



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
DOUTORADO EM AGRONOMIA

SHIRLENE CRISTINA BRITO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS DE FLORESTA
REMANESCENTE EM ÁREA DE MINERAÇÃO NA AMAZÔNIA ORIENTAL.**

BELÉM/PA

2023

SHIRLENE CRISTINA BRITO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS DE FLORESTA
REMANESCENTE EM ÁREA DE MINERAÇÃO NA AMAZÔNIA ORIENTAL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia da Universidade Federal Rural da
Amazônia como requisito para obtenção do título de
Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof.º Dr. Anderson Gonçalves da Silva

BELÉM/PA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo autor(a)

SILVA, SHIRLENE CRISTINA BRITO DA
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS DE FLORESTA REMANESCENTE
EM ÁREA DE MINERAÇÃO NA AMAZÔNIA ORIENTAL.- 2023.
67 f.: il. color.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), Campus
Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2023.
Orientador: Prof. Dr. ANDERSON GONÇALVES DA SIVA

1. Morfologia foliar. 2. DNA. 3. ITS. 4. Nome vulgar. 5. Amazônia. I. SILVA,
ANDERSON GONÇALVES DA, *orient.* II. Título

CDD 581.35

SHIRLENE CRISTINA BRITO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS DE FLORESTA
REMANESCENTE EM ÁREA DE MINERAÇÃO NA AMAZÔNIA ORIENTAL.**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da
Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de
Doutor.

Aprovado em 30 de junho de 2023.

Banca Examinadora

Belém (PA), 30 de junho de 2023.

Documento assinado digitalmente

gov.br

ANDERSON GONCALVES DA SILVA

Data: 05/07/2023 11:03:11-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Presidente/Orientador (a): Prot. Dr. Anderson Gonçalves da Silva

Documento assinado digitalmente

gov.br

JOAO RAFAEL DE CONTE CARVALHO DE AL

Data: 05/07/2023 20:01:14-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

1º Examinador (a): Prof. Dr. João Rafael de Conte Carvalho de Alencar

Documento assinado digitalmente

gov.br

ALESSANDRA JACKELINE GUEDES DE MOR

Data: 05/07/2023 19:38:06-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

2º Examinador (a): Prof.^a Dr.^a Alessandra Jackeline Guedes de Moraes

Documento assinado digitalmente

gov.br

GRACIALDA COSTA FERREIRA

Data: 05/07/2023 11:10:10-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

3º Examinador (a): Prof.^a Dr.^a Gracialda Costa Ferreira

Documento assinado digitalmente

gov.br

TELMA FATIMA VIEIRA BATISTA

Data: 05/07/2023 19:27:14-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

4º Examinador (a): Prof.^a Dr.^a Telma Fatima Vieira Batista

Este trabalho dedico à minha Mãe
Zoneide de Brito, ao meu Pai Iracenir
Nery, e ao meu filho Guilherme David.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

Ao Prof^o. Dr. Anderson Gonçalves da Silva pela orientação e confiança neste trabalho.

A Prof^a. Dra. Telma de Fátima Vieira Batista pela Co-orientação e confiança no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia e a UFRA pela oportunidade de realizar este curso.

A Mineradora Paragominas S.A., Grupo Hydro, pela parceria na realização deste trabalho.

A Zoneide de Brito (mãe) e ao Iracenir Nery da Silva (pai) pelo dom da vida, incentivo, apoio, confiança e coragem nessa caminhada árdua.

Aos meus irmãos: Julianderson, Juliane e Julielson pelo apoio e confiança nessa caminhada árdua.

Ao David Costa Correia da Silva (esposo) pelo incentivo, apoio e confiança para a conclusão deste trabalho.

Ao meu amigo MSc. José de Jesus Corrêa Neto pelas contribuições e realizações dos mapas geográficos presente neste trabalho, e pelo incentivo e apoio na conclusão deste trabalho.

A Dra. Gleiciane Rodrigues dos Santos pela ajuda no Laboratório de proteção de plantas.

A Prof^a. Dra. Gracialda Costa Ferreira pela ajuda e orientação na área morfológica dos vegetais.

A Dra. Alessandra Jackeline Guedes de Moraes pelas correções e contribuições nos artigos oriundos deste trabalho.

A Jéssy Anni Vilhena Senado e ao Victor Fernando Galvão Bezerra pela realização das análises moleculares contidas neste trabalho.

A prof^a. Dra. Dênhora Gomes de Araújo pela contribuição e colaboração no projeto oriundo deste trabalho.

A prof^a. Dra. Selma Toyoko Ohashi (*in memoriam*) pela iniciativa deste projeto e contribuição dos seus conhecimentos científicos para realização e melhoria do mesmo.

A todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!

RESUMO

A associação de nomes científicos às plantas, a partir de nomes vulgares, tem recorrido com muitos erros na validação e registro de muitas espécies em ambientes florestais. Poucos dados morfológicos associados e, sem conhecimento consistente de morfologia vegetal tem sido a principal causa do elevado número de erros. Com isso, o uso de técnicas moleculares tem sido utilizado como ferramentas complementares no processo de identificação específica para diversos táxons vegetais. O presente estudo teve como objetivo registrar as espécies de plantas, a partir de análises morfológicas e moleculares, para garantir o sucesso de monitoramento das espécies vegetais nas áreas de recuperação pós mineração no Sudeste do estado do Pará, Amazônia Oriental. As amostras foliares das árvores foram obtidas na área de propriedade da empresa Mineração Paragominas S.A., localizada há aproximadamente 70 km do município de Paragominas, sudeste do estado do Pará. Em campo, foram realizadas a coleta e processamento das amostras que levadas ao laboratório foram submetidas à desidratação para secagem. Posteriormente a partir de análises morfológicas, procedeu-se a identificação, por comparação, junto ao acervo do herbário da Embrapa Amazônia Oriental e validação dos nomes científicos. Amostras de folhas, coletadas em campo e conservadas em sílica passaram por análises moleculares, a partir da extração do DNA das amostras vegetais (CTAB - *Cetyl trimethylammonium bromide*), quantificação, amplificação (PCR), purificação e sequenciamento. Todas as árvores foram identificadas, em campo, por identificar que associou ao seu respectivo nome vulgar. A identificação dos espécimes vegetais foi feita até o nível de espécie, pelos dois métodos de identificação proposta nesta pesquisa. De acordo com a identificação botânica foram identificados cinco gêneros distribuídas em quatro famílias: *Croton sp.* pertencente à Euphorbiaceae; *Ecclinusa sp.* e *Pouteria sp.*, ambas pertencentes a Sapotaceae; *Vismia sp.* pertencente à Hypericaceae, e *Zanthoxylum sp.* de Rutaceae. Em relação as análises de DNA, todas as amostras foram significativas no processo de amplificação (PCR) e sequenciamento, dos quais, todos os espécimes foram identificados a nível de espécie, são elas: *Croton matourensis* Aubl. (Maravuvuia), *Ecclinusa guianensis* Eyma (Abiu-seringarana), *Pouteria venosa subsp. amazonica* T.D. Penn. (Abiu), *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Tamanqueira), *Vismia glaziovii* Hieron e *Vismia gracilis* Hieron (Lacre), no qual, todas as espécies corresponderam com a análise botânica a nível de

gênero. Diante de tais resultados, conclui-se que as metodologias utilizadas são eficientes para a identificação taxonômica das plantas conhecida por seus nomes vulgares nas florestas remanescentes de mineração na Amazônia Oriental. Com isso, sugere-se que a análise tradicional de identificação de espécies vegetais seja complementada com as ferramentas moleculares, vindo a diminuir os erros de identificação dos espécimes vegetais da floresta Amazônica.

Palavras-Chave: morfologia foliar, DNA, ITS, nome vulgar, Amazônia.

ABSTRACT

The association of scientific names to plants, from common names, has resorted to many errors in the validation of many species in forest environments. Little associated morphological data and no consistent knowledge of plant morphology has been the main cause of the high number of errors. With this, the use of molecular techniques has been used as complementary tools in the process of specific identification of several plant taxa. The present study aimed to register plant species, based on morphological and molecular analyses, to ensure successful monitoring of plant species in post-mining recovery areas in the Southeast of the state of Pará, Eastern Amazon. The foliar samples of the trees were obtained in the area owned by the company Mineração Paragominas S.A., located approximately 70 km from the municipality of Paragominas, southeast of the state of Pará. In the field, samples were collected and processed, which were taken to the laboratory and subjected to dehydration for drying. Subsequently, based on morphological analyses, identification was carried out by comparison with the herbarium collection of Embrapa Amazônia Oriental and validation of scientific names. Leaf samples, collected in the field and preserved in silica, underwent molecular analysis, from the extraction of DNA from plant samples (CTAB - Cetyl trimethylammonium bromide), quantification, amplification (PCR), purification and sequencing. All trees were identified, in the field, by identifying what was associated with their respective common name. The identification of plant specimens was carried out down to the species level, using the two identification methods proposed in this research. According to the botanical identification, five genera distributed in four families were identified: *Croton* sp. (Maravuvuia) belonging to the Euphorbiaceae family; *Ecclinusa* sp. (Abiu-seringarana) and *Pouteria* sp. (Abiu), both belonging to the Sapotaceae; *Vismia* sp. (Pau-de-lacre) belonging to the Hypericaceae family, and *Zanthoxylum* sp. (Tamanqueira) of the Rutaceae family. Regarding the DNA analysis, all samples were significant in the amplification process (PCR) and sequencing, of which, all specimens were identified at the species level, they are: *Croton matourensis* Aubl., *Ecclinusa guianensis* Eyma, *Pouteria venosa* subsp. *amazonica* T.D. Penn., *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, *Vismia glaziovii* Hieron and *Vismia gracilis* Hieron, in which all species corresponded with the botanical analysis at the genus level. Given

these results, it is concluded that the methodologies used are efficient for the taxonomic identification of plants known by their common names in the remaining forests of mining in the Eastern Amazon. With this, it is suggested that the traditional analysis of identification of plant species be complemented with molecular tools, thus reducing errors in the identification of plant specimens from the Amazon rainforest.

Keywords: leaf morphology, DNA, ITS, common name, Amazon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 2

- Figura 1 - Localização geográfica do local da coleta das três árvores de “Abiu” 25
- Figura 2 - Folhas desidratadas de *Pouteria* sp. 27
- Figura 3 - Reconstrução da árvore filogenética por máxima verosimilhança comparando a região dos genes ITS1 e ITS4 de isolados de *Pouteria*..... 29

Capítulo 3

- Figura 1 - Location of the three trees of *Ecclinusa* 37
- Figura 2 - Phylogenetic tree of the genus *Ecclinusa* 40

Capítulo 4

- Figura 1 - Localização das nove árvores (“Maravuvuia”, “Lacre” e “Tamanqueira”) .. 47
- Figura 2 - Ramos com folhas de: a) *Croton matourensis*, b) *Vismia guianensis* e c) *Zanthoxylum rhoifolium* 52
- Figura 3a - Árvore filogenética reconstruída por meio de Máxima verosimilhança comparando a região dos genes ITS1 e ITS4 para o gênero *Croton* 57
- Figura 3b - Árvore filogenética reconstruída por meio de Máxima verosimilhança comparando a região dos genes ITS1 e ITS4 para o gênero *Vismia* 58
- Figura 3c - Árvore filogenética do gênero *Zanthoxylum* 59

SUMÁRIO

1.CONTEXTUALIZAÇÃO	13
REFERÊNCIAS	17
2.DETERMINAÇÃO BOTÂNICA DE “ABIU” (POUTERIA SP.) A PARTIR DE ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES	21
RESUMO	21
ABSTRACT	22
2.1 Introdução	23
2.2 Material e Métodos	24
2.4 Discussão	29
2.5 Conclusão	31
REFERÊNCIAS	31
3.VALIDATION BOTANY OF ECCLINUSA (CHRYSOPHYLLOIDEAE: SAPOTACEAE) FROM REMNANTS FORESTS IN A MINING AREA USING MOLECULAR ANALYSIS AS A COMPLEMENTARY METHOD TO MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION	34
RESUMO	34
ABSTRACT	35
3.1 Introduction	36
3.2 Material and Methods	36
3.3 Results	39
3.4 Discussion	40
REFERÊNCIAS	41
4. IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES FLORESTAIS A PARTIR DA ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR	44
RESUMO	44
ABSTRACT	45
4.1 Introdução	46
4.2 Material e Métodos	47

4.3 Resultado e Discussão	51
4.4 Conclusão	60
REFERÊNCIAS	60
5.CONSIDERAÇÕES FINAIS	64

1.CONTEXTUALIZAÇÃO

A mineração gera diversos bens e serviços a sociedade contemporânea, mas também, gera inúmeros impactos ao meio ambiente, que envolvem a supressão total da cobertura vegetal nativa, a retirada da camada superficial do solo, a perda de matéria orgânica, a baixa disponibilidade de nutrientes do solo, a perda do banco de sementes, a poluição do solo, a poluição atmosférica e a compactação do solo, acarretando prejuízos aos mananciais, a e a fauna local (CUGULA *et al.*, 2021; KOCH, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015; MARTINS, 2020).

Em área de mineração, a importância de inventários florestais antes da exploração mineral é necessária para conhecimento da flora nativa da região. Após a exploração do minério, faz-se necessário a restauração do ambiente degradado, objetivando o retorno dos serviços ecossistêmicos nativos a sociedade (MARTINS, 2020). A implantação do plano de restauração florestal de áreas degradadas é obrigatória pelas empresas e constam na legislação brasileira, no quais, elas são obrigadas a recuperar o ambiente degradado, de acordo com as soluções técnicas exigidas pelo órgão público competente, na forma da lei (BRASIL, 1988). Em suma, o decreto 97.632 de 1989 torna obrigatório que as empresas apresentem o Estudo de Impacto Ambiental (EIA) e o Relatório do Impacto Ambiental (RIMA) (BRASIL, 1989).

Assim, para a restauração de ambientes degradados, é fundamental a escolha de métodos capazes de minimizar as consequências causados pela mineração (MARTINS, 2020). Dos métodos mais utilizados para a restauração de áreas degradadas pela mineração estão o plantio de mudas, a indução da regeneração natural, a semeadura direta, a hidrossemeadura, o depósito de serapilheira e do solo superficial (*topsoil*) (CUGULA *et al.*, 2021; MARTINS *et al.*, 2020). Desse modo, estudos sobre a composição florística e estrutura da comunidade recolonizadora de áreas de mineração devem ser consideradas ferramentas importantes a serem empregadas nas estratégias para recuperação de áreas mineradas (PERREIRA *et al.*, 2015), possibilitando a seleção de espécies ideótipos mais adaptados ao ambiente pós mineração (MARTINS, 2020) e, conseqüentemente, com maior chance de sucesso no plantio (PERREIRA *et al.*, 2015).

Diante do exposto, a determinação botânica de plantas, em atividades florestais, tem sido um desafio, pela falta de consistência que tem sido observada nos nomes científicos associados às plantas. É comum em atividades florestais as plantas serem nomeadas em campo, a partir de nomes vulgares dados por mateiros que somam conhecimento empírico sobre as mesmas, conhecimento este geralmente com base em características sensoriais (cor, cheiro, sabor e outros). Em campo, os botânicos realizam a identificação das plantas através da avaliação dos caracteres morfológicos e por meio de coletas de folhas para comparações em herbário (HADLICH, 2017).

A incerteza na identificação de espécie vegetais são comuns na floresta Amazônica por diversos fatores, como falta de estudos taxonômicos e guias de identificação local, além de muito material com estruturas apenas vegetativas (GOMES *et al.*, 2013) com poucos caracteres úteis na identificação de espécies (CAMARGO *et al.*, 2008). Erros na identificação de espécies se deve as coletas de vegetais sem flores e/ou frutos, o que impossibilita o uso de guias especializados (CARVALHO, 2017).

A identificação de uma planta é a determinação de um táxon como idêntico ou semelhante a uma descrição morfológica de outra planta já identificada (BARROSO *et al.*, 2007). Esse conceito, mostra as relações existentes entre as plantas, que podem ser enquadradas em categorias que indiquem suas presumíveis afinidades sistemáticas (BARROSO *et al.*, 2007).

No ramo da taxonomia, a descrição dos caracteres morfológicos de indivíduos vegetais reprodutivos é a base para uma identificação correta das espécies e a elaboração das chaves de identificação são fundamentais para esse processo sendo o acervo dos herbários um aliado, pois todas as espécies recebem registros de coleta, informações de localidade e dados morfológicos de cada indivíduo (AMARAL, 2012).

A morfologia, é um dos principais ramos da botânica, com objetivo de estudar e documentar as formas e as estruturas das plantas (GONÇALVES; LORENZI, 2007), sendo utilizada para comparar os caracteres morfológicos já descritos na literatura e classificar as espécies, pertencem ou não, a grupos de organismos similares que são morfológicamente distintos entre si (JOLY, 1993), no entanto, é possível que espécies diferentes apresentem algumas semelhanças (PINTO; MELO; MENDES, 2012). Segundo Silva *et al.* (2009), a caracterização morfológica consiste na anotação de

caracteres botânicos facilmente visíveis ou mensuráveis, tornando-os marcadores fenotípicos e que a princípio podem ser expressos em todos os ambientes, e são acessíveis e variam em função do ambiente.

Porém, o método clássico de identificação de espécies vegetais, ainda, apresenta algumas limitações significativas devido, principalmente, a plasticidade fenotípica e a variabilidade dos caracteres morfológicos usados para o reconhecimento de espécies, que levam, muitas vezes, a erros na identificação (HEBERT *et al.*, 2003). Diante do exposto, as técnicas moleculares têm sido utilizadas como ferramentas complementares no método de identificação dos diversos táxons (HEBERT *et al.*, 2003), incluindo os vegetais.

A identidade dos organismos vivos é determinada pela composição e sequência do material genético, e o uso de técnicas moleculares, através da análise de DNA, possui vantagem de ser um método rápido, preciso e sensível (MENEZES *et al.*, 2010). De acordo com Martin (2007), as análises moleculares não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do indivíduo e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo. Entretanto, as análises moleculares têm auxiliado significativamente na identificação de espécies, bem como em estudos filogenéticos e taxonômicos (MOURÃO *et al.*, 2017).

A partir do ano de 1990, as sequências das regiões espaçadoras internas transcritas (ITS - *Internal Transcribed Spacer*) são usadas em estudos filogenéticos de plantas (BALDWIN, 1993, 1992; HAMBY; ZIMMER, 1992) e se tornou um dos iniciadores, *primers*, mais utilizados para inferências filogenéticas, apesar de alguns estudos questionarem sobre a neutralidade desse *primer* para esta região, sendo que esta região, ITS, sofre pressão seletiva (EDGER *et al.*, 2014).

Em análises filogenéticas de plantas tem sido comum o uso do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossômico nuclear, sendo um dos iniciadores de DNA mais comumente usados, e também, recomendado como código de barras de DNA (*Barcoding*) de plantas (CHENG *et al.*, 2016). Ainda de acordo com os autores, a universalidade e especificidade dos *primers* para a região ITS não são satisfatórias, resultando em dificuldades de amplificação e sequenciamento.

A região dos espaçadores ITS, evoluem rapidamente, podem ou não variar intraespecificamente nas sequências de bases e no comprimento (GERBI, 1986), sendo

que o seu uso se explica, principalmente, pela disponibilidade dos *primers* universais, pela herança biparental do marcador e pelos níveis de variação genética para estudos infragenéricos (ALVAREZ; WENDEL, 2003). Além desses fatores, a região ITS se destaca pelo grande número de cópias e o tamanho moderado de suas sequências, que facilita o isolamento e amplificação das regiões mesmo a partir de materiais mortos, como o acervo de herbário (FELINER; ROSSELLÓ, 2007).

Diante do exposto, a região espaçadora ITS apresenta características interessantes para a identificação a nível molecular. A utilização dos *primers* universais ITS são os mais comuns e utilizados na amplificação da PCR e estudos de identificação de espécies (WHITE *et al.*, 1990), assim, são considerando de ampla aplicação e com melhorar significativamente qualitativa das informações de sequências ITS em sistemática molecular de plantas.

Por mais, as ferramentas moleculares precisam ser desenvolvidas para auxiliar no processo de identificação tradicional (VIVAS *et al.*, 2014). Ainda segundo os autores, as análises de DNA têm ajudado na identificação molecular em vários grupos de plantas, sendo um método benéfico, rápido e preciso, permitindo a identificação de espécimes quando o uso de métodos tradicionais seria impossível (HEBERT; GREGORY, 2005).

Portanto, devido a exploração mineral ser uma atividade que ocorre em lavra e, inicia-se com a supressão da vegetação nativa, logo o conhecimento taxonômico e da estrutura genética das espécies vegetais são essenciais para subsidiar o monitoramento das amostras vegetais (matrizes) de onde são obtidas as sementes para o programa de restauração das áreas degradadas pela mineração. Se as árvores forem semelhantes, o material genético utilizado, a partir da produção de mudas das sementes colhidas destas árvores será de baixa qualidade, logo, ter amostras vegetais bem identificadas taxonomicamente com precisão por meio da análise de DNA, garante maior variabilidade de espécie, favorecendo a atividade de restauração florestal.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plants phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, p. 417- 434. 2003.
DOI: [10.1016/s1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(03)00208-2)
- AMARAL, E. V. E. J. **Caracterização morfológica e identificação taxonômica de espécies de *Campomanesia ruiz & pavon* (myrtaceae)**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Goiás – UFG. Jataí, Go. 75p. 2012.
https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/217/o/Erica_Amaral_2012.pdf?1352469077
- BALDWIN, B. G. Molecular Phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. **American Journal of Botany**, v. 80. p.222-238. 1993.
<https://doi.org/10.2307/2445043>
- BALDWIN, B.G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.1. p. 3 -16. 1992. [https://doi.org/10.1016/1055-7903\(92\)90030-K](https://doi.org/10.1016/1055-7903(92)90030-K)
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. v. 1, 2ª ed. Editora UFV, Viçosa, MG. 2007. 309p.
- BRASIL. **Constituição (1988)**. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília: DF: Senado Federal: Centro Gráfico, 1988. 292 p. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm. Acesso em 31 de maio de 2023.
- BRASIL. **Decreto 97.632, de 10 de abril de 1989**. Dispõe sobre a regulamentação do artigo 2º, inciso VIII, da lei 6.938, de 31 de agosto de 1981, e dá outras providências. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1980-1989/d97632.htm. Acesso em 31 de maio de 2023.
- CAMARGO, J. L.C.; FERRAZ, I. D. K.; MESQUITA, M. R.; SANTOS, B. A.; BRUM, H. D. **Guia de propágulos e plântulas da Amazônia**. Editora INPA, Manaus, Amazonas. 2008. 168 p. <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/36019>
- CARVALHO, T. C. R. **Complexo *Ecclinusa guianensis* (Sapotaceae, Chrysophylloideae): uma abordagem morfológica, ecológica e spectral**. Dissertação (Mestrado). INPA, Manaus, Am. 2017. 85p.
<https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/37630>
- CHENG T, XU C, LEI L, LI C, ZHANG Y, ZHOU S. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, p.138-149, 2016. DOI: [10.1111/1755-0998.12438](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12438)

CUGULA, J. S.; ARAUJO, R. A.; FREIRE, L. S.; PASCHOAL, J. P.; PONTES, A. K. S.; MORGADO, C. R. V.; ESTEVES, E. M. M. Temporal analysis of mining area recovery in Paragominas by natural regeneration technique through vegetation indices. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 06, p. 379-395, 2021.

<https://doi.org/10.24221/jeap.6.4.2021.3676.379-395>

EDGER, P.P.; TANG, M.; BIRD, K.A.; MAYFIELD, D.R.; CONANT, G.; MUMMENHOFF, K.; KOCH, M.A.; PIRES, J.C. Secondary structure analyses of the nuclear rRNA internal transcribed spacers and assessment of its phylogenetic utility across the Brassicaceae (mustards). **PLoS One**, 9(7):e101341. 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101341>

FELINER, G. N.; ROSSELLÓ, J. A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 44, p. 11-919, 2007.

DOI: [10.1016/j.ympev.2007.01.013](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.01.013)

GERBI, S. A. The evolution of eukaryotic ribosomal DNA. **BioSystems**, v. 19, p. 247-258, 1986. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(86\)90001-8](https://doi.org/10.1016/0303-2647(86)90001-8)

GOMES, A. C. S.; ANDRADE, A.; BARRETO-SILVA, J. S.; BRENES-ARGUEDAS, T.; LÓPEZ, D. C.; FREITAS, C. C.; LANG, C.; OLIVEIRA, A. A.; PÉREZ, A. J.; PEREZ, R.; SILVA, J. B.; SILVEIRA, A. M. F.; VAZ, M. C.; VENDRAMI, J.; VICENTINI, A. Local plant species delimitation in a highly diverse Amazonian forest: do we all see the same species? **Journal of Vegetation Science**, p. 70-79. 2013.

<https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2012.01441.x>

GONÇALVES, E.G.; LORENZI, H. **Morfologia Vegetal: Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. Editora: Instituto Plantarum, São Paulo, 2007. 416p.

HADLICH, H. L. **O reconhecimento de espécies arbóreas em campo por meio da casca com o uso da espectroscopia no visível e infravermelho próximo na Amazônia Central**. Dissertação (mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, AM. 2017. 65p.

<https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/5168>

HAMBY, R.K.; ZIMMER, E.A. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. *In*: SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E.; DOYLE, J.J. (Eds.). **Molecular Systematics of Plants**. New York, p.50-91, 1992.

HEBERT, P. D.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B**, Biological Sciences 270, p.96-99, 2003.

<https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução a taxonomia vegetal**. 11ª ed. São Paulo: Editora Nacional, 1993.

KOCH, J. M. Mining and ecological restoration in the jarrah forest of Western Australia. In: TIBBETT, M. (Ed.). **Mining in ecologically sensitive landscapes**. 1 ed. Australia: CRC Press, CSIRO Publishing, Australia, p. 111-140. 2015.

MARTIN, K. J. Introduction to molecular analyses of ectomycorrhizal communities. **Soil Science Society of America Journal**, 71, p. 601-610, 2007. <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0115>.

MARTINS, W. B. R. **Restauração de ecossistemas degradados pela mineração na Amazônia Oriental**. (Tese de Doutorado). Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil. 2020.140p. <http://repositorio.ufra.edu.br/jspui/handle/123456789/947>

MARTINS, W. B. R.; LIMA, M. D. R.; BARROS JÚNIOR, U. O.; AMORIM, L. S. VB. Ecological methods and indicators for recovering and monitoring ecosystems after mining: A global literature review. **Ecological Engineering**, v. 145, p. 105707, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.105707>

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciências agrotecnológica**, v. 34, p. 132-139, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000100017>.

MOURÃO, D. D. S. C.; SÁGIO, S. A.; SOUZA, M. R. D.; SANTOS, G. R. D. Identificação morfológica e molecular de *Curvularia* sp. Agente causal da mancha foliar do milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.16, p. 1-12. 2017. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v16n1p1-12>

PEREIRA, M. I.; GONZAGA, A. P.D.; MACHADO, E. L. M.; OLIVEIRA, M. L. R.; MARQUES, I. C. Estrutura da vegetação colonizadora em ambiente degradado por extração de cascalho em Diamantina, MG. **Pesquisa Florestal brasileira**, v. 35, p. 77-88, 2015. DOI: 10.4336/2015.pfb.35.82.769.

PINTO, S. F.; MELO, M. G. G.; MENDES, A. M. S. Comparative morphology of propagules of *Chrysophyllum amazonicum* T. D. Penn. and *Chrysophyllum prieurii* A. D. Candolle. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, p. 310-318, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000200017>

SILVA, S. A.; DANTAS, A.C.V.L.; COSTA, M. A. P. C.; FERREIRA, C. F.; FONSECA, A. A. O. Caracterização de genótipos de fruteiras potenciais para o nordeste brasileiro. **Tópicos em Ciências Agrárias**, v.1. UFRB. p. 17-24. 2009. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/899502/caracterizacao-de-genotipos-de-fruteiras-potenciais-para-o-nordeste-brasileiro>.

VIVAS, C. V.; MORAES, R. C. S.; ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M.; MARIANO-NETO, E.; VAN DEN BERG, C.; GAIOTTO, F. A. DNA Barcoding in Atlantic Forest

plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification? **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, p. 662-670. 2014. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572014005000019>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, J.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (eds.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, p. 315-322. 1990. https://www.researchgate.net/publication/262687766_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_RNA_Genes_for_Phylogenetics

2.DETERMINAÇÃO BOTÂNICA DE “ABIU” (*POUTERIA SP.*) A PARTIR DE ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES

Botanical determination of “Abiu” (*Pouteria* sp.) from morphological and molecular analysis

RESUMO

Perante a importância econômica do gênero *Pouteria* para a sociedade, a difícil delimitação das espécies do gênero necessita de estudos complementares que possam auxiliar na sua taxonomia. Com isso, o objetivo deste trabalho foi determinar o nome científico da espécie vegetal atribuída ao nome vulgar de “Abiu” a partir da análise morfológica e molecular oriundas de florestas remanescentes do Sudeste do Estado do Pará, Amazônia Oriental. A metodologia aplicada para as análises morfológicas foram: coleta das amostras em campo; secagem; identificação por comparação com a coleção do herbário da Embrapa Amazônia Oriental e validação do nome científico no site do Flora do Brasil. Para as análises moleculares as metodologias aplicadas foram: extração do DNA (Protocolo CTAB), quantificação do DNA, amplificação do DNA (PCR), sequenciamento. Os resultados das análises indicaram eficiência na determinação científica da espécie, sendo possível determinar o gênero a partir da análise morfológica como *Pouteria* sp., enquanto que, na análise molecular, com uso dos *primers* para região espaçadora interna transcrita (ITS) a identificação da espécie foi *Pouteria venosa* subsp. *amazonica* T. D. Penn., com 98% de semelhança ao DNA de Acesso KJ399445 do NCBI.

Palavras-Chaves: DNA - Abiu - ITS - mineração – morfologia vegetal.

ABSTRACT

Given the economic importance of the genus *Pouteria* for society, the difficult delimitation of the species of the genus requires complementary studies that can help in ITS taxonomy. Thus, the objective of this work was to determine the scientific name of the plant species attributed to the common name of “Abiu” from the morphological and molecular analysis from forests remaining of the Southeast of the State of Pará, Eastern Amazon. The methodology applied for the morphological analyzes were: collection of samples in the field; drying; identification by comparison with the herbarium collection of Embrapa Amazônia Oriental and validation of the scientific name site Flora do Brazil. For the molecular analyzes the methodologies was applied: DNA extraction (CTAB protocol), DNA quantification, DNA amplification (PCR), sequencing. The results of the analyzes indicated efficiency in the scientific determination of the species, being possible to determine the genus from the morphological analysis as *Pouteria* sp., while, in the molecular analysis, with the use of primers for the transcribed internal spacer region (ITS), the identification of the species was *Pouteria venosa* subsp. *amazonica* T. D. Penn., with 98% similarity to DNA from NCBI Accession KJ399445.

Keywords: ADN - Abiu - ITS - mining - plant morphology.

2.1 Introdução

O gênero *Pouteria* Aubl. é conhecida vulgarmente pelo nome de “Abiu” (ALVES-ARAÚJO, 2012) este gênero pertence a subfamília Chrysophylloideae (SWENSON; ANDERBERG, 2005) de Sapotaceae Juss., e compreende cerca de 200 espécies restritas a região dos Neotrópicos (SWENSON *et al.*, 2013), com distribuição, principalmente, na Amazônia e Floresta Atlântica (MÔNICO; ALVES-ARAÚJO, 2019). No Brasil são registradas cerca de 123 espécies do gênero *Pouteria*, das quais, 46 espécies ocorrem no estado do Pará (BFG, 2015; TERRA-ARAÚJO; ZAPPI, 2018).

O gênero *Pouteria* apresenta grande variabilidade morfológica (MÔNICO; ALVES-ARAÚJO, 2019), que inclui árvores, arbustos e subarbustos (ALVES-ARAÚJO, 2022) com folhas alternas e espiraladas, ausência de estipulas (PENNINGTON, 1991), nervuras terciárias (TRIONO *et al.*, 2007), fruto geralmente carnosos e adocicados (ALVES-ARAÚJO, 2012) e sementes com cicatriz adaxial com ou sem endosperma (MÔNICO; ALVES-ARAÚJO, 2019) esses caracteres são considerados importantes para a diagnose e classificação das espécies do gênero.

Algumas espécies do gênero são reconhecidas por sua importância econômica, como frutos comestíveis - “Canista” [*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni]; pela madeira dura e de qualidade utilizadas na construção civil e de móveis - *Pouteria* spp.; e também medicinal atuando como anti-inflamatório contra infecções do trato respiratório e digestivo (PENNINGTON, 1990; SOUZA; LORENZI, 2005; ALVES-ARAÚJO, 2012). Perante a importância econômica do gênero *Pouteria* a sociedade, a sua difícil delimitação das espécies do gênero necessita de estudos complementares que possam auxiliar na sua taxonomia (LIMA; CARNEIRO, 2020).

Diante disso, as análises de DNA veem ajudado na identificação molecular em vários grupos de plantas, sendo um método benéfico, rápido e preciso, permitindo a identificação de espécimes quando o uso de métodos tradicionais seria impossível (HEBERT; GREGORY, 2005; VIVAS *et al.*, 2014).

Portanto, as técnicas moleculares têm sido cada vez mais útil no processo de identificação e classificação no ramo da taxonomia (MENEZES *et al.*, 2010), principalmente, a vegetal. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi identificar as árvores conhecida popularmente como “Abiu” (*Pouteria* sp.) a partir de análises

morfológicas e moleculares oriundas de áreas de recuperação pós mineração do sudeste do Pará, Brasil.

2.2 Material e Métodos

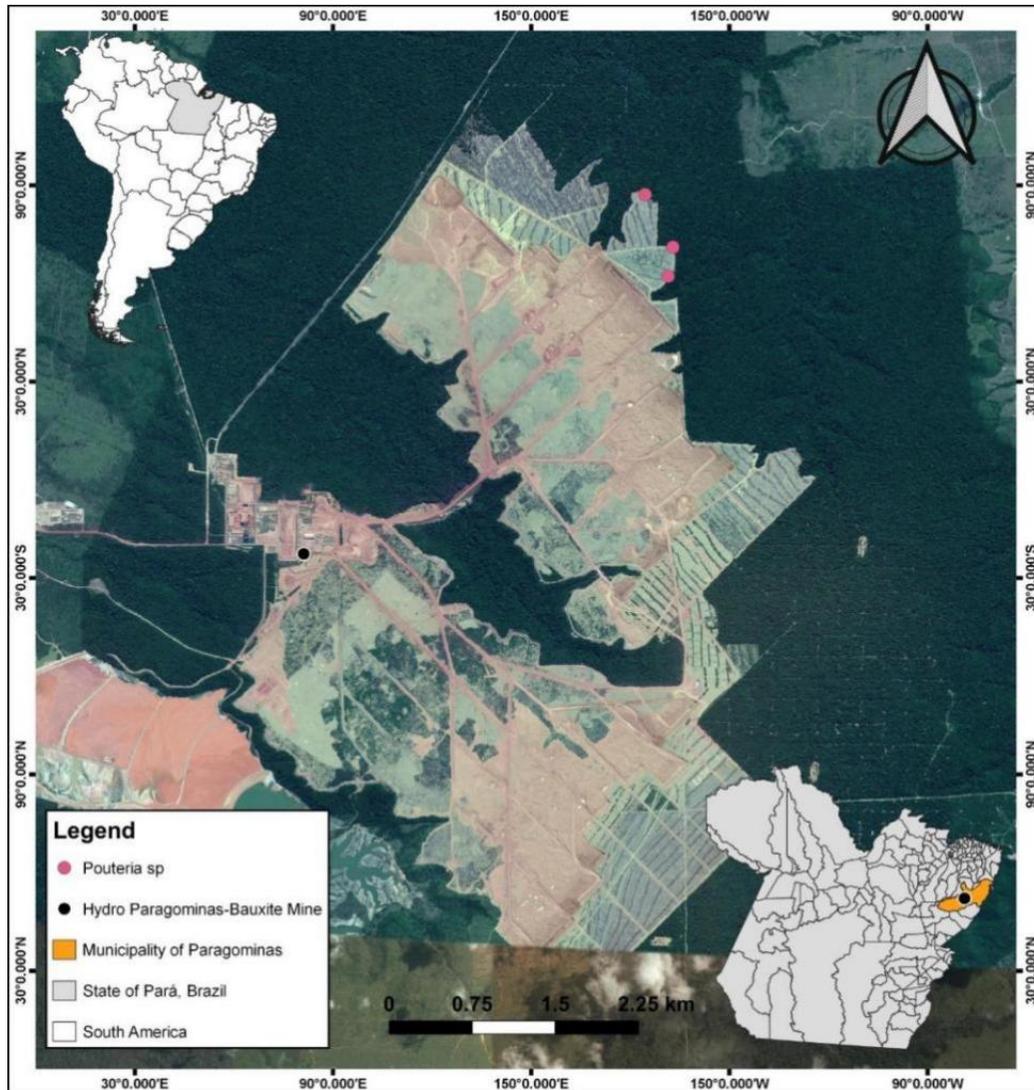
2.2.1 Área de estudo, coleta e identificação das amostras vegetais

Amostras foliares de três árvores de “Abiu” foram coletadas de acordo com a metodologia de Ferreira (2006) na propriedade Mineração Paragominas S.A., localizada há aproximadamente 70 km do município de Paragominas (Figura 1), sudeste do estado do Pará (MARTINS *et al.*, 2018). As amostras foram etiquetadas como HYD98, HYD99 e HYD138. Em seguida, encaminhadas para o Laboratório de Taxonomia de Árvores da Universidade Federal Rural da Amazônia, em Belém, para secagem em estufa a temperatura de 65°C. Após a secagem, as amostras foram submetidas a identificação botânica pelo método de comparação das estruturas morfológicas foliares com amostras da coleção do herbário da Embrapa Amazônia Oriental. As amostras identificadas foram depositadas no herbário Felisberto Camargo da Universidade Federal Rural da Amazônia com os seguintes números de registros Fc-Ufra: 5139 (HYD98), 5140 (HYD99) e 5142 (HYD138). Os nomes científicos obtidos com a determinação botânica, foram validados utilizando-se o banco de dados do Flora do Brasil (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br>).

2.2.2 Extração de DNA, quantificação, PCR e sequenciamento

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Proteção de Plantas (LPP) da Universidade Federal Rural da Amazônia. O protocolo CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*) de Gibbs e Mackenzie (1997) foi adaptado para a extração do DNA das amostras vegetais. Foram usadas 0,2 g de folhas jovens das amostras (HYD98, HYD99 e HYD138), as quais foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio do pistilo e almofariz e transferido para micro-tubos de 2 ml. Foi adicionado 1600 µl de tampão de lavagem e 2 µl de β-mercaptoetanol, centrifugado (13.200 rpm) por 10 minutos e descartado o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 800 µl de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), homogeneizado em vortéx e incubado a 55 °C por 30 minutos.

Figura 1 - Localização geográfica do local da coleta das três árvores de “Abiu” (HYD98, HYD99 e HYD138) de florestas remanescentes de área em recuperação pós mineração da propriedade Mineradora Paragominas S.A. no município de Paragominas, Amazônia Oriental, Brasil.



Fonte: Corrêa (2022).

Após incubação, procedeu-se a primeira lavagem com 800 µl de clorofórmio e álcool-isoamílico (24:1), homogeneizado por 2 minutos no vortéx, centrifugado por 10 minutos e a fase aquosa (superior) transferida para novo tubo. A segunda lavagem foi realizada com 600 µl de clorofórmio e álcool-isoamílico (24:1), homogeneizado, centrifugado e transferência da fase aquosa. Após, foram usados 700 µL de isopropanol (álcool isopropílico absoluto) gelado e 60 µL de acetato de amônio e inverteu-se,

manualmente, o tubo por 10-15 vezes, para precipitação do DNA extraído e incubados a -20 °C por 20 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos para a formação do *pellet* e o sobrenadante descartado. Para a limpeza do *pellet* adicionou-se 1000 µl de etanol 70%, centrifugada por 2 minutos e descartando o sobrenadante. O *pellet* foi exposto a temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos para secagem. Para a ressuspensão do *pellet*, adicionou-se 50 µL de água ultrapura e 0,5 µL de RNase, e foram conservados a -20 °C. A quantificação e a pureza do DNA extraído foi realizada por meio do Espectrofotômetro BioDrop µl UV/VIS (BioDrop).

Para a amplificação do DNA, foi realizada a reação da cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) com o uso dos primers para as regiões Forward ITS-u1 (GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG) e Reverse ITS-u4 (RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA) de acordo com os estudos de Cheng *et al.* (2016) combinado com a solução GoTaq® qPCR Master Mix.

O programa do termociclador foi de 4 minutos a 94°C, 34 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 40 segundos a 55°C (anelamento), 60 segundos a 72°C (extensão) e 10 minutos a 72°C após o ciclo. As amostras foram purificadas utilizando as enzimas Exonuclease I (Exo) e Shrimp Alkaline Phosphatase (Sap). Após a reação de purificação, o sequenciamento foi conduzido no sequenciador automático ABI3730 no Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de Pernambuco (LABBE-UFPE).

2.2.3 Análise Molecular

A análise das sequências de DNA e a montagem dos *contigs* foram realizadas com o Staden Package (STADEN *et al.*, 1998). As sequências de nucleotídeos das árvores HYD98 e HYD99 foram comparadas com as sequências de isolados do gênero *Pouteria* disponíveis no banco de dados GenBank (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o software BLAST Link.

As sequências dos isolados de *Pouteria* foram incluídas no alinhamento em todas as análises. Os alinhamentos de sequência foram realizados por meio do programa de alinhamento múltiplo para sequências de aminoácidos ou nucleotídeos online, MAFFT,

versão 7 (KATOHI; TOH, 2013). Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram submetidos ao servidor web RaxML (<https://www.phylo.org/portal2>) para inferência de máxima verossimilhança (ML) (STAMATAKIS *et al.*, 2008). O modelo GTR + G foi utilizado, incluindo uma estimativa de sítios invariáveis para todas as análises.

A filogenia das sequências de nucleotídeos foi inferida usando o modelo GAMMA AUTO, que permite ao RaxML determinar automaticamente o modelo de substituição de nucleotídeos mais adequado (STAMATAKIS, 2014). As análises de MV foram realizadas com 1000 replicações *bootstrap*. A árvore obtida no método MV foi visualizada com o programa Fig Tree 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). As sequências dos isolados (HYD98 e HYD99) foram depositadas no Genbank com os respectivos números de acesso SUB11370995: ON328319 e ON328320.

2.3 Resultados

As amostras foliares das árvores de “Abiu” (HYD98, HYD99 e HYD138) apresentaram as seguintes características: limbo simples com filotaxia alterna, espiraladas, dispostas no final dos ramos; venação tipo eucampódroma; pecíolo canaliculado (Figura 2), indicando que as amostras pertencem ao gênero *Pouteria* sp. de Sapotaceae.

Figura 2 - Folhas desidratadas de *Pouteria* sp. da área de recuperação da empresa Mineradora Paragominas S.A. no município de Paragominas, Amazônia Oriental, Brasil.



Fonte: A autora (2021).

Na análise molecular, o processo de amplificação da PCR e sequenciamento foram positivos somente para duas amostras, HYD98 e HYD99. O alinhamento dos isolados das amostras HYD98 e HYD99 com as sequências de nucleotídeos de isolados obtidos do banco de dados do Genbank (NCBI) apresentou similaridade de 97% com a espécie *Pouteria venosa* subsp. *amazonica* de código de acesso KJ399445 registrada por Faria & Ribeiro 2007/55 (Tabela 1). Os parâmetros max score (1194 bits - 646), total score (1194), query cover (100%), E value (0.0), Per. Ident. (97, 69%), *Identities* (678/694 - 98%) e *Gaps* (2/694 - 0%) foram significativos para o alinhamento.

Tabela 1 - Sequências de nucleotídeos de espécies de *Pouteria* cadastradas no banco de dados Genbank do Centro Nacional de Informação e Biotecnologia (NCBI) comparadas com os isolados das amostras coletadas de árvores de HYD98 e HYD99 da empresa Mineradora Paragominas S.A. no município de Paragominas, Amazônia Oriental, Brasil.

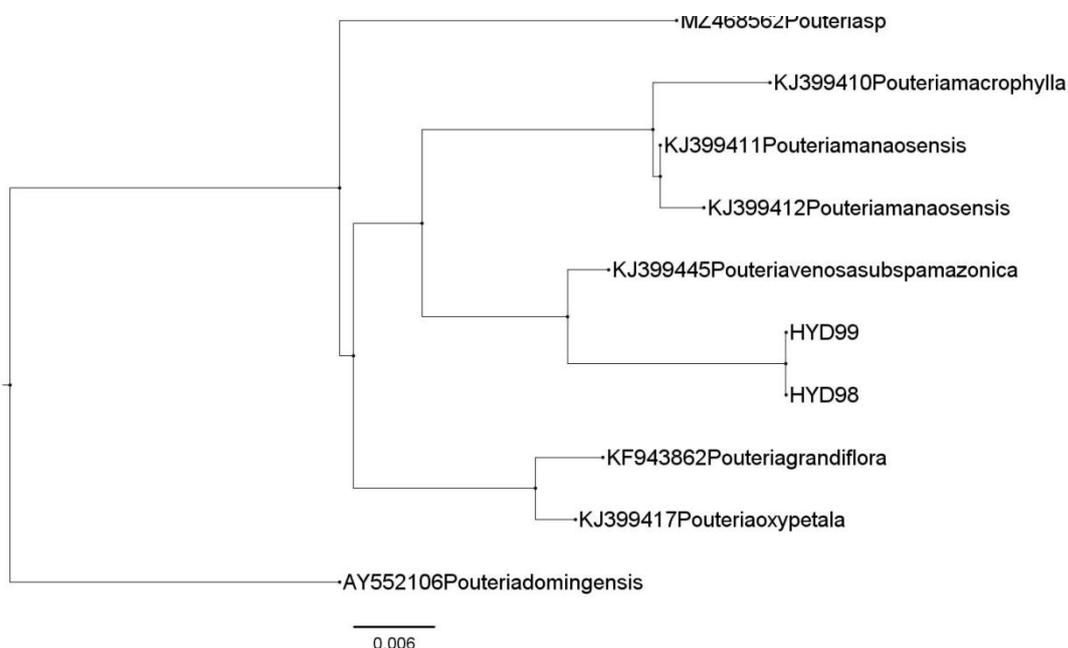
Espécie	Registro (NCBI)	Similaridade	Código de acesso (NCBI)
<i>Pouteria venosa</i> subsp. <i>amazonica</i>	Faria & Ribeiro 2007/55	97,69 %	KJ399445
<i>P. glansis</i>	Sabatier & Molino 995	95,61%	MZ469960
<i>P. grandiflora</i>	Vivas, C. V. 225	95,11 %	KF943862
<i>P. oxypetala</i>	Fiaschi 2506	94,84%	MW843551
<i>P. manaosensis</i>	Nascimento 607	94,81 %	KJ399411
<i>P. manaosensis</i>	Nascimento and Pereira 571	94,67%	KJ399412
<i>P. oxypetala</i>	Bertoni & Geremias 293	94,55%	KJ399417
<i>P. macrophylla</i>	Swenson, Richardson and Bartish (2008)	94,31%	DQ246692
<i>P. macrophylla</i>	Vicentini & Pereira 771	94,39%	KJ399410
<i>P. campechiana</i>	Swenson, Richardson and Bartish (2008)	94,14%	DQ246688
<i>Pouteria</i> sp.	Sabatier & Molino Q423	94%	MZ468562
<i>Pouteria</i> sp.	Anderberg et al. 51	92,03%	MZ469959
<i>P.domingensis</i>	Gutierrez & Nilsson 13	91,99%	AY552106

Fonte: A autora (2022)

A árvore filogenética foi gerada a partir das sequências de nucleotídeos das amostras (HYD98 e HYD99), que trata de um haplótipo, agruparam-se a espécie *Pouteria venosa* subsp. *amazonica*, com 99% de *bootstrap* (Figura 3).

Figura 3 – Reconstrução da árvore filogenética por máxima verosimilhança comparando a região dos genes ITS1 e ITS4 de isolados de *Pouteria*, conhecida como “Abiu”, da empresa Mineradora Paragominas S.A. no município de Paragominas, Amazônia Oriental, Brasil.

*Os valores dos ramos indicam percentagem de *bootstrap* de 1000 repetições.



Fonte: A autora (2022)

2.4 Discussão

Na Amazônia, as árvores conhecidas vulgarmente por “Abiu” pertencem ao gênero *Pouteria* da família Sapotaceae. As amostras não apresentaram estípulas nas folhas, sendo essa uma característica marcante para o processo de identificação morfológica do gênero corroborando com Pennington (1990, 2006) e Alves-Araújo (2022) que consideram a ausência de estípulas um dos caracteres morfológicos importantes para a identificação das espécies de *Pouteria*. Além de outros caracteres, como as nervuras terciárias foliares (TRIONO *et al.*, 2007) e a morfologia do fruto (ALVES-ARAÚJO, 2012) relevantes para a diagnose e classificação das espécies do gênero.

A identificação morfológica das amostras das árvores de “Abiu” (HYD98, HYD99 e HYD138) foram realizadas a partir da estrutura vegetativa (folha), no qual, foi eficiente para a identificação em nível de gênero. Porém para uma identificação adequada de plantas, as informações das estruturas reprodutivas são importantes (HADLICH, 2017), principalmente para as espécies de Sapotaceae (VIVAS *et al.*, 2014). Então, para a identificação em nível de espécie se faz necessário a coleta tanto da estrutura vegetativa quanto da reprodutiva da planta, o que não ocorreu neste estudo.

Como há dificuldades, cada vez mais elevados, no processo de identificação das espécies de *Pouteria* (COSTA, 2007), os limites do gênero ainda não foram totalmente solucionados, e devido a isto, é que estudos filogenéticos e, também, taxonômicos são, cada vez mais, necessários para esclarecimento das relações dentro e entre as espécies do gênero *Pouteria* e seus parentes mais próximos (ALVES-ARAÚJO; ALVES, 2011). De acordo com Alves-Araújo *et al.* (2014) existe a necessidade de novos avanços nas análises dos caracteres morfológicos para uma identificação apropriada.

De acordo com os resultados da análise molecular, o uso dos primers ITS foram eficientes na identificação de duas amostras de “Abiu” (HYD98 e HYD99) em nível de espécie. A amostra HYD138 não obteve resultado satisfatório no processo de amplificação e sequenciamento do DNA, sendo possivelmente ocorrido contaminação no processo de extração do DNA da amostra. O alinhamento das sequências de nucleotídeos das amostras HYD98 e HYD99 foram altamente significativas com a espécie *Pouteria venosa* subsp. *amazonica*, mostrando que o uso dos primers ITS foram confiáveis e aplicáveis na identificação molecular de plantas corroborando com os estudos de Li *et al.* (2011) ao afirmarem o uso do ITS na aplicabilidade de identificação molecular de plantas com sementes, destacando assim a relevância do uso da região ITS.

Desse modo, os resultados deste estudo podem colaborar com pesquisa futuras para o processo de revalidação de espécies do gênero *Pouteria* sp. associados ao nome vulgar “Abiu” usando a combinação de dados morfológicos com os moleculares (SWENSON *et al.*, 2007). Além disso, a região ITS pode ser útil na identificação de espécies da família Sapotaceae na floresta Amazônica possibilitando a identificação fácil, rápida e precisa a partir de material estéril (VIVAS *et al.*, 2014).

2.5 Conclusão

Conclui-se que as metodologias utilizadas são suficientes para a identificação taxonômica de árvores conhecida vulgarmente como “Abiu” pertencente ao gênero *Pouteria* sp. e identificada com o nome científico *Pouteria venosa* subsp. *amazonica*, sendo a metodologia morfológica foliar ideal para a identificação do gênero, e a análise molecular, para a espécie. E os *primers* para a identificação genômica da região do ITS Forward ITS-u1 (GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG) e Reverse ITS-u4 (RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA), são eficientes para a amplificação do DNA das árvores de “Abiu”.

AGRADECIMENTO

À Mineradora Paragominas S.A, Grupo Hydro, pela parceria e apoio financeiro na realização do estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão de bolsas para J.A.V.S e V.F.G.B.

REFERÊNCIAS

- ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M. Two New Species of *Pouteria* (Sapotaceae) from the Atlantic Forest in Brazil. **Systematic Botany**, v. 36, p. 1004-1007, 2011. DOI [10.1600/036364411X605001](https://doi.org/10.1600/036364411X605001)
- ALVES-ARAÚJO, A. **Taxonomia e Filogenia de *Pouteria* Aubl. (Sapotaceae) na Mata Atlântica Setentrional**. Tese (doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Pe, 2012. 282f. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/772>
- ALVES-ARAÚJO, A.; SWENSON, U.; ALVES, M. A. Taxonomic Survey of *Pouteria* (Sapotaceae) from the Northern Portion of the Atlantic Rainforest of Brazil. **Systematic Botany**, v. 39, p. 915-938, 2014. <https://doi.org/10.1600/036364414X681428>
- ALVES-ARAÚJO, A. 2022. ***Pouteria* in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14492>. Acesso em 19/05/2022.
- BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66: p. 1085-1113. 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566411>
- COSTA, M. O. **Dendrologia como ferramenta ao manejo de 10 espécies de *Pouteria* Aubl. (Sapotaceae) em florestas do estado do Pará**. Dissertação (mestrado).

Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará. 2007. 108f.
<http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/7040>

FERREIRA, G. C. **Diretrizes para coleta, herborização e identificação de material botânico nas Parcelas Permanentes em florestas naturais da Amazônia brasileira.** Editora IBAMA, Manaus, AM. 2006. 44p.
(https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/417/o/manual_diretrizes_coletas_botanicas.pdf?1494003886). Acesso em: 10 Jun 2022.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 63, p.9-16. 1997.

GOMES, A. C. S.; ANDRADE, A.; BARRETO-SILVA, J. S.; BRENES-ARGUEDAS, T.; LÓPEZ, D. C.; FREITAS, C. C.; LANG, C.; OLIVEIRA, A. A; PÉREZ, A. J.; PEREZ, R.; SILVA, J. B.; SILVEIRA, A. M. F.; VAZ, M. C.; VENDRAMI, J.; VICENTINI, A. Local plant species delimitation in a highly diverse Amazonian forest: do we all see the same species? **Journal of Vegetation Science**, p. 70-79, 2013.

HADLICH, H. L. **O reconhecimento de espécies arbóreas em campo por meio da casca com o uso da espectroscopia no visível e infravermelho próximo na Amazônia Central.** Dissertação (mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Am. 2017. 65f.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA Barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, p. 852-859. 2005.

LI, D. Z.; GAO, L. M.; LI, H. T.; WANG, H.; GE, X. J.; LIU, J. Q.; CHEN, Z. D.; ZHOU, S. L.; CHEN, S.; YANG, J. B. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 19641-19646. 2011.

MARTINS, W. B. R.; FERREIRA, C. G.; SOUZA, F. P.; DIONÍSIO, L. F. S.; OLIVEIRA, F. A. Deposição de serapilheira e nutrientes em áreas de mineração submetidas a métodos de restauração florestal em Paragominas, Pará. **Floresta**, v. 48, p. 37-48. 2018.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Genetic variability in rDNA ITS region of *Trichoderma* spp. (biocontrole agent) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* isolates. **Ciências e agrotecnologia**. v. 34, p. 132-139. 2010.

MÔNICO, A. Z.; ALVES-ARAÚJO, A. *Pouteria* (Sapotaceae) na Estação Biológica de Santa Lúcia, ES, Brasil. **Rodriguésia**, v. 70: e02152017. 2019. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201970024>

PENNINGTON, T. D. **Sapotaceae.** In: Flora Neotropica. The New York Botanical Garden, v.52, 770p. 1990.

PENNINGTON, T. D. **The genera of Sapotaceae**. The Royal Botanical Garden, Kew. 1991.

PENNINGTON, T. D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Sapotaceae. **Rodriguésia**, 5v. 7 (2), p. 251-366. 2006.

SWENSON, U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v. 21, p. 101-130. 2005.

SWENSON, U.; BARTISH, I. V.; MUNZINGER, J. Phylogeny, diagnostic characters, and generic limitation of Australasian Chrysophylloideae (Sapotaceae, Ericales): evidence from ITS sequence data and morphology. **Cladistic**, v. 23, p. 201-228. 2007.

SWENSON, U.; NYLINDER, S.; MUNZINGER, J. Towards a natural classification of Sapotaceae subfamily Chrysophylloideae in Oceania and Southeast Asia based on nuclear sequence data. **Taxon**, v. 62, p. 746-770. 2013.

TERRA-ARAÚJO, M. H.; ZAPPI, D. C. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Sapotaceae. **Rodriguésia**, v. 69(1), p. 241-243. 2018.

TRIONO, T.; BROWN, A. H. D.; WEST, J. G.; CRISP, M. D. A phylogeny of Pouteria (Sapotaceae) of Malesia and Australasia. **Australian Systematic Botany**, v. 20, p. 107-118. 2007.

VIVAS, C. V.; MORAES, R. C. S.; ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M.; MARIANO-NETO, E.; VAN DEN BERG, C.; GAIOTTO, F. A. DNA Barcoding in Atlantic Forest plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification? **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, p. 662-670, 2014.

3. VALIDATION BOTANY OF *ECCLINUSA* (CHRYSOPHYLLOIDEAE: SAPOTACEAE) FROM REMNANTS FORESTS IN A MINING AREA USING MOLECULAR ANALYSIS AS A COMPLEMENTARY METHOD TO MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION.

Validação botânica de *Ecclinusa* (CHRYSOPHYLLOIDEAE: SAPOTACEAE) em remanescentes florestais utilizando à análise molecular como método complementar à identificação morfológica

RESUMO

No contexto de um programa de restauração florestal em área de mineração na Amazônia oriental brasileira, o objetivo deste estudo foi validar as espécies arbóreas de abiu-seringarana (*Ecclinusa* sp.) em remanescentes florestais adjacentes à mina. Como a identificação de *Ecclinusa* com base apenas na morfologia externa é difícil, ela foi corroborada pela análise molecular. Amostras de folhas de três árvores foram comparadas com *Ecclinusa* no acervo do herbário da Embrapa. O DNA extraído seguiu um protocolo CTAB, modificado, e o sequenciamento foi com marcadores ITS. Tanto a identificação morfológica quanto o alinhamento das sequências obtidas com material do GenBank indicaram que os indivíduos pertencem a *Ecclinusa guianensis*, o que se confirma como espécie ocorrente na área de mineração.

Palavra-chave: Amazônia, abiu-seringarana, ITS, restauração florestal, Pará.

ABSTRACT

In the context of a forest restoration program in a mining area in the eastern Brazilian Amazon, the objective of this study was to validate the species of trees of *abiu-seringarana* (*Ecclinusa* sp.) in forest remnants adjacent to the mine. As the identification of *Ecclinusa* based on external morphology alone is difficult, it was corroborated by molecular analysis. Leaf samples of three trees were compared with *Ecclinusa* in the Embrapa herbarium collection. DNA was extracted with a CTAB modified protocol for sequencing with ITS markers. Both the morphological identification and the alignment of the obtained sequences with material in GenBank indicated that the individuals belong to *Ecclinusa guianensis*, which is confirmed as the species occurring in the mining area.

Keywords: Amazon, abiu-seringarana, forests restoration, ITS, Pará.

3.1 Introduction

The genus *Ecclinusa* Martius (subfamily Chryshophylloideae, family Sapotaceae) has about 12 species in the Neotropics (TERRA-ARAÚJO *et al.*, 2015), most of them distributed in the states of Amazonas, Amapá, Pará and Roraima, in the Amazon region of Brazil (ALVES-ARAÚJO, 2022). ITS representatives are medium to tall trees (8–30 m height), rarely shrubs, found in savanna, dry forest and rainforest (ALVES-ARAÚJO, 2023).

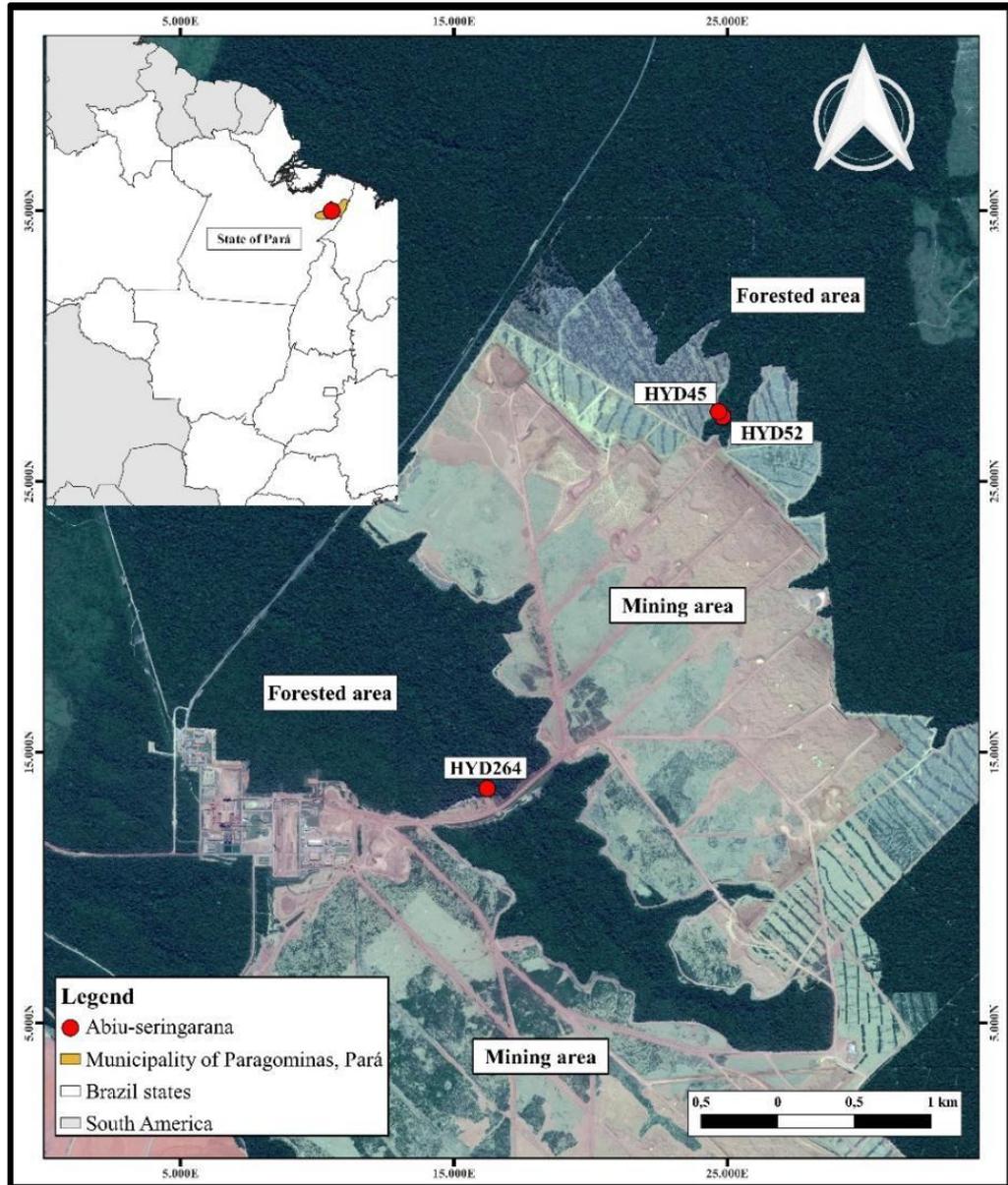
In the eastern Brazilian Amazon, *Ecclinusa* is commonly known as *abiu-seringarana* (REIS *et al.*, 2015) and is easily distinguished morphologically from other Sapotaceae genera by the combination of characters including the presence of stipules, sessile flowers and the absence of staminode (PENNINGTON, 1990; 2006). Within the genus, however, *Ecclinusa* species are difficult to distinguish due to the homogeneity of their external morphological characteristics (PENNINGTON, 1991; SWENSON; ANDERBERG, 2005), especially considering that frequently only vegetative structures are available (GOMES *et al.*, 2013), which has limited use for species identification (CAMARGO *et al.*, 2008).

In the context of timber species survey for the forest restoration program of a mining enterprise in the eastern Brazilian Amazon, the aim of this study was to validate which species *Ecclinusa* occur in forest remnants in the area using molecular analysis as a complementary method to morphological identification of non-reproductive structures.

3.2 Material and Methods

Leaf samples were obtained from three trees of *abiu-seringarana* in two forest remnants belonging to the Hydro S.A. mining enterprise, in the municipality of Paragominas (2°59'42" S, 47°21'10" W), Pará state, Brazil (Figure 1).

Figure 1 - Location of the three trees of *Ecclinusa* sp. (locally known as *abiu-seringarana*) sampled for this study in forest remnants in a mining area in the municipality of Paragominas, state of Pará, eastern Amazon region of Brazil.



Fonte: Corrêa (2022)

3.2.1 Botanical evaluation

Collection procedures followed Ferreira (2006). The samples were labeled as HYD45, HYD52 and HYD264 and sent for analysis to the Laboratory of Arboreal Taxonomy of University Federal Rural da Amazônia – UFRA (Belém, Brazil). The material was oven-dried at 65 °C. After drying, the leaves were identified morphologically by comparison, with the herbarium collection of the Instituto Agrônômico do Norte (IAN), of Embrapa Amazônia Oriental (Belém, Brazil). The specimens were deposited at the Felisberto Camargo Herbarium at UFRA with the respective codes Fc-Ufra: 5137 (HYD45), 5138 (HYD52) and 5143 (HYD264).

3.2.2 Molecular analyses

Molecular analyses were carried out at the Plant Protection Laboratory (LPP) at UFRA. For DNA extraction, the modified CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) protocol proposed by Gibbs and Mackenzie (1997) was used. ITS primers were used, as they show high specific resolution in the sequencing reactions for the discrimination of Sapotaceae species (YOCCOZ *et al.*, 2012; VIVAS *et al.*, 2014).

Changes were made to the volume of the following reagents: recommended CTAB (800 μ l), Chloroform and isoamyl alcohol (24:1) (800 μ l; 600 μ l), ice-cold isopropanol (700 μ l) and ammonium acetate (60 μ l), 70% ethanol (1000 μ l). In addition, changes were also made to the rotation speed and time (13,200 rpm for 10 minutes). Before addition of CTAB, there was a first wash with 1600 μ l of wash advance and 2 μ l of β -mercaptoethanol.

For DNA amplification, the polymerase chain reaction was performed using primers for the Forward ITS-u1 (GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG) and reverse ITS-u4 (RGTTTCTTTTCCCTCCGCGCTTA) regions based on Cheng *et al.* (2016), using a GoTaq® qPCR Master Mix kit.

The thermocycler program was 4 minutes at 94°C, 34 cycles of 30 seconds at 94°C (denaturation), 40 seconds at 55°C (annealing), 60 seconds at 72°C (extension), and 10 minutes at 72°C after cycles. After the purification reaction, sequencing was conducted in an ABI3730 automated sequencer at the Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology of University Federal de Pernambuco (LABBE-UFPE).

Analysis of DNA sequences and assembly of the *contigs* were performed with the Staden Package (STADEN *et al.*, 1998). The obtained nucleotide sequences were compared with the sequences of isolates of *Ecclinusa* available in the GenBank database (National Center for Biotechnology Information - NCBI), using the BLAST Link software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequences from *Ecclinusa* isolates were included in the alignment in all analyses.

Alignments were performed using MAFFT, version 7 (KATO; TOH, 2013). The phylogeny of the nucleotide sequences was inferred using the GAMMA AUTO model. Maximum likelihood (ML) inference analyses were performed with 1000 bootstrap replications. The obtained tree was visualized with the Fig Tree 1.4.2 program (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). The generated sequences were deposited in Genbank with the accession codes SUB11711347: ON862915, ON862916 and ON862917.

3.3 Results

The leaves of the sampled trees were generally elliptical with flat surface, acute base and acuminate apex, eucamptodromous to brochidodromous venation, midrib sunken on the upper side or prominent and with secondary veins, oblique parallel tertiary veins, channeled petiole, covered with appressed minute hairs. These characteristics corresponded to those described by Pennington (1990) and Ribeiro and Pennington (1999) for *Ecclinusa guianensis* Eyma. The comparison with the IAN collection also indicated that the samples belonged to *E. guianensis*.

According to BLAST, the samples HYD45 (583 bp), HYD52 (745 bp) and HYD264 (698 bp) showed 97% similarity with the aligned sequences obtained from GenBank, corresponding to *Ecclinusa guianensis* recorded by Brasil Assunção et al. 162 (INPA) with access code KJ399358 (Table 1).

Tabela 1 - Sequences that produced significant alignments of the *Ecclinusa* species registered in GenBank (NCBI), compared with samples of *Ecclinusa* trees from remnant forests in a mining area in Paragominas, Pará state, eastern Brazilian Amazon. NCBI description = description of the GenBank sequence; Identification = Percentage of identification of the GenBank sequence with the test sequences; Length = length of the GenBank accession; Accession code = code of the sequence in GenBank.

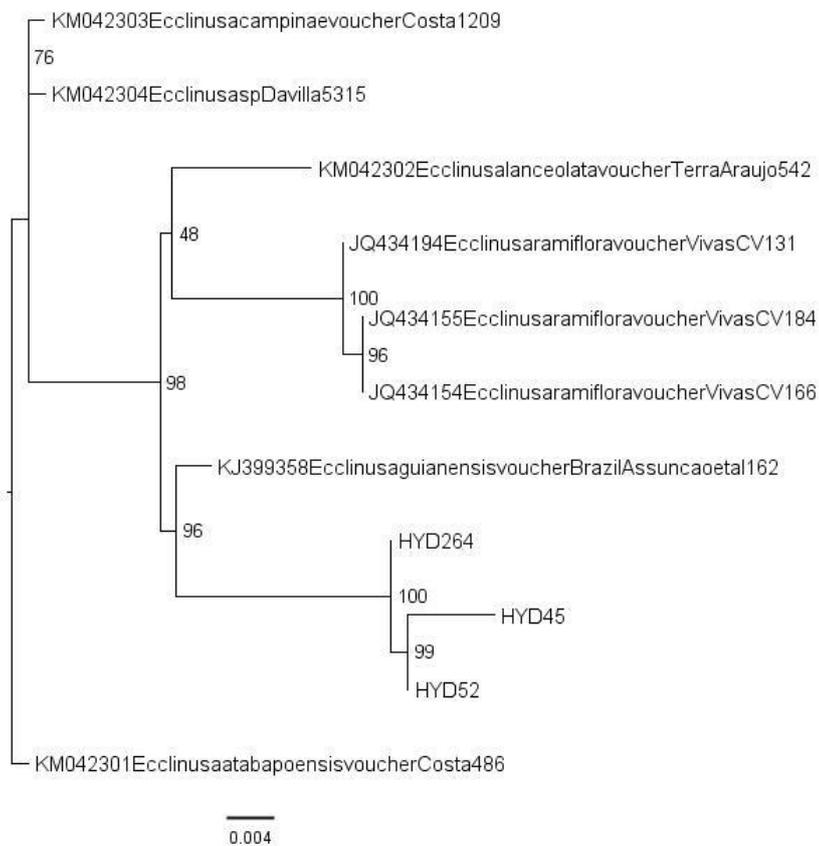
Species	NCBI description	Identification (%)	Length (pb)	Accession code
<i>Ecclinusa guianensis</i>	Brazil Assunção <i>et. al.</i> 162	97.43	795	KJ399358
<i>Ecclinusa lanceolata</i>	Terra-Araújo 542 (INPA)	96.57	786	KM042302
<i>Ecclinusa campinae</i>	Costa 1209 (INPA)	96.06	765	KM042303
<i>Ecclinusa</i> sp.	Davilla 5315 (INPA)	95.90	742	KM042304
<i>Ecclinusa atabapoensis</i>	Costa 486 (INPA)	95.89	782	KM042301
<i>Ecclinusa ramiflora</i>	Vivas, C.V. 131 (CEPEC)	95.73	697	JQ434194
<i>Ecclinusa ramiflora</i>	Vivas, C.V. 166 (CEPEC)	95.56	713	JQ434154
<i>Ecclinusa ramiflora</i>	Vivas, C.V. 184 (CEPEC)	95.56	713	JQ434155

Fonte: A autora (2022).

The test sequences presented satisfactory values for the parameters of maximum score of 994 bits, total score 994, query coverage 100%, E-value was zero, accession length 795, *identities* 568/583 (97%) and *Gaps* 1/583 (0%) to back up the reliable identification of the species as *E. guianensis*. The phylogenetic tree showed three well defined clades, grouping

our DNA sequences with *E. guianensis*, with a bootstrap of 96%, confirming the botanical diagnosis (Figure 2).

Figure 2 - Phylogenetic tree of the genus *Ecclinusa* constructed by means of maximum likelihood comparing the ITS region of samples of three trees (HYD45, HYD52 and HYD264) from forest remnants in a mining area in the eastern Brazilian Amazon with the sequences producing significant alignments for *Ecclinusa* registered in GenBank (NCBI). Values of the branches indicate percentage of bootstrap of 1000 replications.



Fonte: A autora (2022)

3.4 Discussion

Even though the botanical identification was based only on the morphological characteristics of leaves, without using reproductive structures (flower, fruit and seed), it was accurate as confirmed by the ITS analysis.

The phylogenetic tree was consistent with the current delimitation of species in *Ecclinusa*, *E. guianensis* being closer to *E. lanceolata* (SWENSON; ANDEBERG, 2005) forming a

monophyletic group supported by molecular and morphological data (SWENSON; ANDERBERG, 2005; TERRA-ARAUJO *et al.*, 2015; FARIA *et al.*, 2017).

The molecular result of this study corroborates with the plant species monitored in the mining area, and the taxonomic knowledge and genetic structure of the *Ecclinusa guianensis* species present in the remaining forest of the mining area are essential to subsidize forest monitoring, adapting it to the restoration program forestry, reducing the loss in quality of seeds of this species in the fauna during the reconstruction of the forest after the exploitation of the ore.

Therefore, we suggest the use of ITS as a supporting tool for fast and reliable identification of *Ecclinusa* species in the Amazon region.

AGRADECIMENTOS

To Mineradora Paragominas S.A, Hydro Group, for the partnership and financial support in conducting the study. To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) for granting scholarships to J.A.V.S and V.F.G.B.

REFERÊNCIAS

- ALVES-ARAÚJO, A. 2022. *Ecclinusa* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB39441>). Accessed on 20 Jun 2022.
- ALVES-ARAÚJO, A. 2023. *Ecclinusa* in **Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14471>). Accessed on 19 abr 2023.
- CAMARGO, J.L.C.; FERRAZ, I.D.K.; MESQUITA, M.R.; SANTOS, B.A.; BRUM, H.D. **Guia de Propágulos e Plântulas da Amazônia**. Editora INPA, Manaus, 168p, 2008.
- CHENG, T.; XU, C.; LEI, L.; LI, C.; ZHANG, Y.; ZHOU, S. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. **Molecular Ecology Resources**, 16: 138-149, 2016.
- FARIA, A. D.; PIRANI, J.R.; RIBEIRO, J. E. L. S.; NYLINDER, S.; TERRA-ARAUJO, M. H.; VIEIRA, P.P.; SWENSON, U. Towards a natural classification of subfamily Chrysophylloideae (Sapotaceae) in the Neotropics. **Botanical Journal of Linnean Society**, 185, 27-55, 2017.
- FERREIRA, G. C. **Diretrizes para coleta, herborização e identificação de material botânico nas Parcelas Permanentes em florestas naturais da Amazônia brasileira**. IBAMA. Manaus, AM. 44p, 2006.

(https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/417/o/manual_diretrizes_coletas_botanicas.pdf?1494003886). Accessed on 10 Jun 2022.

GIBBS A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, 63: 9-16, 1997.

GOMES, A.C.S.; ANDRADE, A.C.A.; BARRETO-SILVA, J.S.; BRENES-ARGUEDAS, T.; LÓPEZ, D.C.; FREITAS, *et al.* Local plant species delimitation in a highly diverse Amazonian forest: Do we all see the same species? **Journal of Vegetation Science**, 24: 70–79, 2012.

HEBERT, P.D.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 270: S96-S99, 2003.

KATOH, K.; TOH, H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. **Bioinformatics**, 26, 1899-1900, 2010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq224>

MOURÃO, D.S.C.; SÁGIO, S.A.; SOUZA, M.R.; SANTOS, G.R. Identificação morfológica e molecular de *Curvularia sp.* agente causal da mancha foliar do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 16: 1-12, 2017. dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v16n1p1-12

PENNINGTON, T. D. **Sapotaceae, Flora Neotropica**. The New York Botanical Garden, New York, v. 52, 770p, 1990.

PENNINGTON, T. D. **The Genera of Sapotaceae**. The Royal Botanical Garden, Kew, 307p, 1991.

PENNINGTON, T. D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Sapotaceae. **Rodriguésia**, 57: 251-366, 2006.

REIS, L.P.; RUSCHEL, A.R.; REIS, P.C.M.; SOARES, M.H.M.; CRUZ, E.D. **Sapotaceae em uma floresta de terra firme no município de Moju, Pará**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 57p, 2015.

RIBEIRO, J.E.L.S.; PENNINGTON, T.D. Sapotaceae. *In*: RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M. J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; *et al.* (Ed.). **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de Uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**. Editora INPA, Manaus, p.312-331, 1999.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden Package, 1998. **Bioinformatics Methods and Protocols**. 115–130, 1998.

SWENSON, U.; ANDERBERG, A.A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, 21: 101-130, 2005.

VIVAS, C.V.; MORAES, R.C.S.; ARAÚJO, A.A.; ALVES, M.; MARIANO-NETO, E.; BERG, C.V.D.; GAIOT, F.A. DNA barcoding in Atlantic Forest plants: what is the best marker for Sapotaceae species identification? **Genetics and Molecular Biology**, 37, 4, 662-670, 2014.

TERRA-ARAUJO, M.H.; COSTA, F.M.; CARVALHO, R.B.; VICENTINI, A. *Ecclinusa campinae* (Sapotaceae), a new species from the Middle Rio Negro region, Amazonas, Brazil. **Brittonia**, 67: 180-184, 2015.

YOCCOZ, N.G.; BRÅTHEN, K.A.; GIELLY, L.; HAILE, J.; EDWARDS, M.E.; GOSLAR, T.; VON STEDINGK, H.; BRYSTING, A.K.; COISSAC, E.; POMPANON, F.; *et al.* DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. **Molecular Ecology**, 21:3647–3655, 2012.

4. IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES FLORESTAIS A PARTIR DA ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR

IDENTIFICATION OF FOREST SPECIES BASED ON MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS

RESUMO

A identificação botânica de espécies florestais tem sido um desafio pela falta de consistência que tem sido observada nos nomes científicos associados às plantas. É comum as plantas serem nomeadas em campo, a partir de nomes vulgares dados por mateiros que realizam a identificação dos vegetais das características sensoriais associadas ao conhecimento empírico. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar amostras de oito árvores associadas à seus nomes vulgares usando análise morfológica e molecular. Em campo, foram coletadas e prensadas amostras foliares de árvores conhecida por seus nomes vulgares, e também, coletadas folhas jovens para a extração do DNA. No laboratório foram realizadas, a identificação por comparação com o acervo do herbário da Embrapa Amazônia Oriental e, a extração de DNA (Protocolo CTAB, adaptado), PCR (ITS) e sequenciamento para a identificação molecular. Os resultados foram significativos na identificação científica das espécies vegetais em ambos os métodos. As amostras de nomes vulgares: ‘Maravuvuia’, ‘Lacre’ e ‘Tamanqueira’ foram identificadas em nível de espécie em ambas as análises. Os *primers* ITS identificaram 98% das amostras vegetais com as sequências de nucleotídeos (NCBI) de código EU478097 para *C. matourensis*, MG217391 (*V. gracilis*) e KC709410 (*V. glaziovii*) e, KC502933 para *Z. rhoifolium*. Concluiu-se que os métodos foram eficientes na identificação das espécies conhecida vulgarmente como “Maravuvuia”, “Lacre” e “Tamanqueira”.

Palavras-chave: DNA, Morfologia, ITS, vegetal, nome vulgar.

ABSTRACT

The botanical identification of forest species has been a challenge due to the lack of consistency that has been observed in the scientific names associated with plants. It is common for plants to be named in the field, based on common names given by foresters who carry out the identification of the sensorial characteristics associated with the empirical knowledge of the plants. Thus, the aim of this study was to identify samples of eight trees associated with their common names using morphological and molecular analysis. In the field, leaf samples of trees known by their common names were collected and pressed, and young leaves were also collected for DNA extraction. In the laboratory, identification was carried out by comparison with the herbarium collection of Embrapa Amazônia Oriental, and DNA extraction (CTAB Protocol, adapted), PCR (ITS) and sequencing for molecular identification. The results were significant in the scientific identification of plant species in both methods. Samples of common names: “Maravuvuia”, “Lacre” and “Tamanqueira” samples were identified to species level in both analyses. The ITS primers identified 98% of plant samples with the nucleotide sequences (NCBI) code EU478097 for the species *C. matourensis*, MG217391 for *V. gracilis*, KC709410 for *V. glaziovii* and, KC502933 for *Z. rhoifolium*. It is concluded that the methods were efficient in identifying the species commonly known as “Maravuvuia”, “Lacre” and “Tamanqueira”.

Keywords: DNA, Morphology, ITS, plant, common name.

4.1 Introdução

Na Amazônia Oriental brasileira, a identificação botânica tem sido um desafio, pela falta de consistência que tem sido observada nos nomes científicos associados às plantas. Na maioria das vezes, em atividades florestais as plantas são nomeadas em campo, a partir de nomes vulgares dados por trabalhadores de campo que somam conhecimento empírico sobre as mesmas – conhecimento este geralmente com base em características sensoriais.

Em área de mineração, a importância de inventários florestais antes da exploração mineral é necessária para conhecimentos da flora nativas da região. Após a exploração do minério, faz-se necessário a restauração do ambiente degradado, objetivando o retorno dos serviços ecossistêmicos nativos a sociedade (MARTINS, 2020).

A implantação do plano de restauração florestal de áreas degradadas é obrigatória pelas empresas e constam na legislação brasileira, no quais, elas são obrigadas a recuperar o ambiente degradado, de acordo com as soluções técnicas exigidas pelo órgão público competente, na forma da lei (BRASIL, 1988). Em suma, o decreto 97.632 de 1989 torna obrigatório que as empresas apresentem o Estudo de Impacto Ambiental (EIA) e do Relatório do Impacto Ambiental (RIMA) (BRASIL, 1989).

Para isso, os botânicos realizam a identificação das plantas através da avaliação dos caracteres morfológicos, associado aos nomes vulgares, e a coletas das folhas são identificadas por meio de comparação em herbário (HADLICH, 2017), esse processo de identificação tradicional, muitas vezes, leva a erros na identificação da planta.

Segundo Hebert *et al.* (2003) há fatores significativos que podem levar a esse erro na identificação de um organismo, nos quais, pode-se cita a plasticidade fenotípica, chaves ou guias de identificação (GOMES *et al.*, 2013; HEBERT *et al.*, 2003), carências de estudos taxonômicos, material com estruturas apenas vegetativas (GOMES *et al.*, 2013), os fenômenos de floração supra-anual e variação morfológica intraespecífica vegetativa, que tornam a análise de flores e frutos necessária para a correta identificação de muitas espécies (VIVAS *et al.*, 2014).

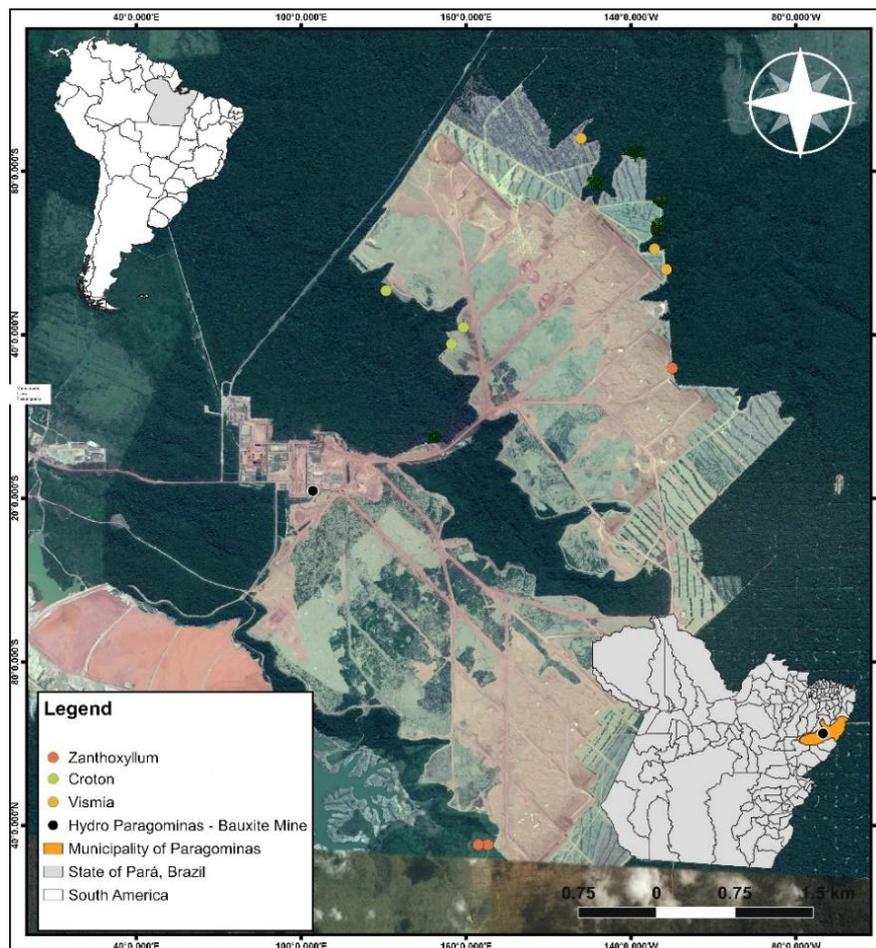
Diante de tais fatores considerados significativos, as técnicas moleculares veem auxiliando na identificação, rápida e apropriada, de organismos vegetais, além de estudos filogenéticos e taxonômicos (MOURÃO *et al.*, 2017). É com base na sequência dos ácidos nucléicos (DNA ou RNA) que a análise molecular tem sido, cada vez mais, útil na identificação de diversos organismos para a taxonomia (MENEZES *et al.*, 2010). Portanto, o objetivo deste estudo foi validar as espécies florestais conhecidos por seus nomes vulgares a partir do uso de ITS como complemento da avaliação botânica.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta e identificação das amostras botânicas

Amostras foliares foram obtidas de nove árvores diferentes, sendo três de “Maravuvuia”, três de “Lacre” e três de “Tamanqueira”, em uma área de floresta remanescente da propriedade Paragominas Mineração S.A. (HYDRO), localizada à 70 km do município de Paragominas, Pará (2° 59' 42” S, 47° 21' 10” W) (Figura 1), no qual, seguiu a metodologia de Ferreira (2006). As amostras botânicas obtidas foram determinadas, ainda em campo, com base nas características morfológicas externas das árvores.

Figura 1 - Localização das nove árvores (“Maravuvuia”, “Lacre” e “Tamanqueira”) na área de floresta remanescente da propriedade de Mineração Paragominas S.A., Paragominas, Pará, Amazônia Oriental, Brasil.



Fonte: Corrêa (2022).

As amostras foram etiquetadas – HYD164, HYD167 e HYD168 (Maravuvuia); HYD104, HYD106 e HYD110 (Lacre) e, HYD92, HYD210 e HYD211 (Tamanqueira) - e enviadas ao Laboratório de Taxonomia de Árvores da Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, onde foram secas em estufa a 65 °C. Após a secagem, as amostras foliares foram identificadas morfológicamente, por comparação foliar, com a coleção do herbário da Embrapa Amazônia Oriental. As amostras foram depositadas no herbário Felisberto Camargo da UFRA, Belém-Pará, com seus respectivos números de registros (Tabela 1). Os nomes científicos obtidos com a determinação botânica, foram validados utilizando-se o banco de dados do Flora do Brasil (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br>).

4.2.2 Extração de DNA vegetal

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Proteção Vegetal (LPP) da UFRA. A extração de DNA foi feita pelo método CTAB, modificado a partir do proposto por Gibbs e Mackenzie (1997). Esse protocolo consiste na quebra das paredes celulares, limpeza e exposição desse DNA para posterior análise.

Foram usadas 0,2 g de folhas jovens das amostras, as quais foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio do pistilo e almofariz e transferido para micro-tubos de 2 ml. Para a primeira limpeza das amostras, foi adicionado 1600 µl de tampão de lavagem e 2 µl de β-mercaptoetanol, centrifugado (13.200 rpm) por 10 minutos e descartado o sobrenadante. Para a quebra de lipídios celulares, adicionou-se 800 µl de detergente CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*), homogeneizado em vortéx e incubado a 55 °C por 30 minutos. Após incubação, procedeu-se as lavagens para a quebra de proteínas e limpeza de impurezas, a primeira lavagem com 800 µl de clorofórmio e álcool-isoamílico (24:1), homogeneizado por 2 minutos no vortéx, centrifugado por 10 minutos e a fase aquosa (superior) transferida para novo tubo. A segunda lavagem foi realizada com 600 µl de clorofórmio e álcool-isoamílico (24:1), homogeneizado, centrifugado e transferência da fase aquosa. Para a precipitação do DNA, foram usados 700 µL de isopropanol (álcool isopropílico absoluto) gelado e 60 µL de acetato de amônio e inverteu-se, manualmente, o tubo por 10-15 vezes, e incubou-o a -20 °C por 20 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos para a formação do *pellet* e o sobrenadante descartado. Para a limpeza do *pellet* adicionou-se 1000 µl de etanol 70%, centrifugou-se por 2 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi exposto a temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos para secagem. Para a ressuspensão do *pellet*, adicionou-se 50 µL de água ultrapura e 0,5 µL de RNase. As

amostras foram conservadas a -20 °C. A quantificação e a pureza do DNA extraído foi realizada por meio do Espectrofotômetro BioDrop µl UV/VIS (BioDrop).

4.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento

Para a amplificação do DNA, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* para as regiões *Forward* ITS-u1 (GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG) e *reverse* ITS-u4 (RGTTTCTTTTCCTCCGCGCTTA), as sequências de *primers* universais foi baseada no estudo de Cheng *et al.* (2016), juntamente com as soluções GoTaq® qPCR Master Mix. O programa do termociclador foi de 4 minutos a 94°C, 34 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 40 segundos a 55°C (anelamento), 60 segundos a 72°C (extensão) e 10 minutos a 72°C C após os ciclos. Os isolados foram purificados utilizando as enzimas Exonuclease I (Exo) e Shrimp Alkaline Phosphatase (Sap). As amostras foram conduzidas para o sequenciamento no sequenciador automatizado ABI3730 pertencente ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de Pernambuco (LABBE-UFPE).

4.2.4 Alinhamento das sequências de DNA

A análise das sequências de DNA e a montagem dos *contigs* foram realizadas com o auxílio do Staden Package (STADEN *et al.*, 1998). As sequências de nucleotídeos das árvores de “Maravuvuia” (HYD167 e HYD168), “Lacre” (HYD104, HYD106 e HYD110) e “Tamanqueira” (HYD92, HYD210 e HYD211) foram comparadas com as sequências de isolados dos gêneros *Croton* (Maravuvuia), *Vismia* (Lacre) e *Zanthoxylum* (Tamanqueira) disponíveis no banco de dados *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*), utilizando o software BLAST Link (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências de isolados dos gêneros foram inclusos no alinhamento em todas as análises. Os alinhamentos das sequências foram realizados através do programa de alinhamento múltiplo para sequências de aminoácidos ou nucleotídeos on-line, MAFFT versão 7 (KATO; TOH, 2013). Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram submetidos ao servidor web RaxML (<https://www.phylo.org/portal2>) para inferência de máxima verossimilhança (ML) (STAMATAKIS *et al.*, 2008). Foi utilizado o modelo GTR + G, incluindo uma estimativa de sítios invariáveis para todas as análises.

Tabela 1 - Número de registro em herbário (Fc-Ufra) e coordenação geográfica das amostras das árvores da área de mineração do município de Paragominas, Pará, Brasil.

Fc-Ufra	Amostras	Nome Vulgar	Lat	Long	y-Proj	x-Proj	Altitude
5158	104	Lacre	-3,231728997	-47,700618	9642392,836	199851,2646	121,106
6645	106	Lacre	-3,229352997	-47,700231	9642655,871	199893,6092	121,6417
5141	110	Lacre	-3,225033997	-47,702498	9643133,128	199640,1955	119,1577
5184	164	Maravuvuia	-3,237109	-47,723924	9641790,567	197260,6705	117,972527
5185	167	Maravuvuia	-3,240304	-47,717261	9641439,002	198002,7067	133,539627
5186	168	Maravuvuia	-3,241738	-47,718271	9641280,016	197890,7966	133,409012
6646	210	Tamanqueira	-3,285266	-47,715126	9636464,221	198253,5987	146,57
6647	211	Tamanqueira	-3,285275	-47,71597	9636462,97	198159,7329	143,4
6644	92	Tamanqueira	-3,243841997	-47,699234	9641052,859	200008,7666	134,8775

Fonte: A autora (2023)

4.2.5. Filogenia

A filogenia de sequências de nucleotídeos foi inferida usando o modelo GAMMA AUTO, que permite que o RaxML determine automaticamente o modelo de substituição de nucleotídeos com melhor score (STAMATAKIS, 2014). As análises de MV foram realizadas com 1000 repetições de bootstrap. As árvores obtidas no método de MV foi visualizada com o programa Fig Tree 1.4.2. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). As sequências das amostras foram depositadas no *Genbank* com os respectivos códigos de acesso: “Maravuvuia” - HYD167 (ON863682) e HYD168 (ON863683); “Lacre” - HYD104 (ON863806), HYD106 (ON863807) e HYD110 (ON863808); “Tamanqueira” - HYD92 (ON863771), HYD210 (ON863772) e HYD211 (ON863773).

4.3 Resultado e Discussão

A identificação, por comparação, com a coleção botânica do Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental indicou que as amostras pertenciam as respectivas espécies: *Croton matourensis* Aubl. (HYD164, HYD167 e HYD168), *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (HYD104, HYD106 e HYD110) e *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (HYD92, HYD210 e HYD211).

As amostras (HYD164, HYD167 e HYD168) conhecida popularmente como “Maravuvuia” e identificada como *C. matourensis*, pertence à Euphorbiaceae, foi reconhecida pelos seguintes caracteres: folha alternada, lâmina elíptica e oblonga com pecíolo longo, margem inteira, ápice acuminado, base obtusa, tricomas estrelados e lepidotos na face abaxial e, ausentes na face adaxial, nervação tipo broquidódromas, glândulas nectaríferas basilaminar estipitadas e ausência de estípulas nas porções apicais dos ramos jovens (Figura 2a).

As amostras (HYD104, HYD106 e HYD110) de nome vulgar “Lacre” foi identificada morfológicamente como *V. guianensis*, pertence a Hypericaceae Juss, nas amostras foram observadas folhas opostas dísticas, pecioladas, elípticas a lanceoladas com base atenuadas a arredondadas, ápice acuminados a agudos, margens inteiras e/ou onduladas, face adaxial marrom-claro e face abaxial ferrugínea (*in sicco*), nervuras secundárias e intersecundárias poucos proeminentes e, glândulas punctadas pretas na face abaxial (Figura 2b).

E por fim, as amostras (HYD92, HYD210 e HYD211) das árvores de “Tamanqueira” identificadas como *Z. rhoifolium*, de Rutaceae, apresentaram folhas compostas com folíolos alternadas, persistentes e com acúleos, folíolos subsésseis a sésseis pecioluladas, oblongo-elíptica, ápice obtuso ou agudo, base atenuada oblíqua, tricomas tipo estrelados ou bífidos,

margem dos folíolos tipo crenadas ou crenuladas, nervação broquidódroma e pinas imparipinadas ou paripinadas (Figura 2c).

A identificação científica baseada nos caracteres morfológicos das folhas, mostrou-se eficiente para a identificação, em nível de espécie, das amostras vegetais das árvores de “Maravuvuia” (HYD167 e HYD168), “Lacre” (HYD104, HYD106 e HYD110) e “Tamanqueira” (HYD92, HYD210 e HYD211). A confirmação das espécies foi validada pelas características descritas na literatura para *Croton matourensis* (GUIMARÃES; SECCO, 2010; MARTINS-DA-SILVA *et al.*, 2014; CARUZO *et al.*, 2023), *Vismia guianensis* (MARINHO *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2017; MOTTA, 2020; LOIOLA *et al.*, 2022; VOGEL ELY *et al.*, 2023) e *Zanthoxylum rhoifolium* (PIRANI, 2005; COSTA *et al.*, 2014; PIRANI; GROPPA, 2023).

Figura 2 - Ramos com folhas de: a) *Croton matourensis*, b) *Vismia guianensis* e c) *Zanthoxylum rhoifolium*, da floresta remanescente pertencente a área de recuperação da mineração Hydro, Paragominas, Amazônia Oriental, Brasil.



Fonte: A autora (2023).

Foram extraídos o DNA de todas as amostras vegetais, e todas obtiveram sucesso no processo de amplificação da PCR e sequenciamento, sendo elas, “Maravuvuia” (HYD167 e HYD168), “Tamanqueira” (HYD92, HYD210 e HYD211) e “Lacre” (HYD104, HYD106 e HYD110). A amostra HYD164 obteve uma boa amplificação na PCR, porém não obteve um bom sequenciamento.

A identificação molecular dos isolados de “Maravuvuia” (HYD167 e HYD168) corresponderam a *C. matourensis* e, os de “Tamanqueira” (HYD92, HYD210 e HYD211) com a *Z. rhoifolium*, sendo significativo o uso de ITS para a identificação do espécime e corroborando com a avaliação botânica. Já os isolados de “Lacre” (HYD104, HYD106 e HYD110) mostraram-se significativas para a análise molecular, porém não correspondendo com a avaliação botânica.

Reporta-se que a identificação baseada nos caracteres morfológicos foliares se mostrou equivocada para as amostras de *Vismia* (HYD104, HYD106 e HYD110), ou a espécie sofreu plasticidade fenotípica de acordo com as condições ambientais da área de estudo (mineração). Segundo Schlichting (1986), a plasticidade pode ser resultado de fatores ambientais como competição, herbivoria e heterofilia. Sendo necessário um estudo mais preciso, com marcadores específicos (exemplo: *matK* ou *rbcl*) para o gênero *Vismia* em área de mineração.

De acordo com o alinhamento do BLAST Link, os isolados *Croton* (HYD167, 626 pb) e (HYD168, 678 pb) apresentaram 99,84% de similaridade com as sequências alinhadas obtidas do GenBank (NCBI), correspondendo à descrição da espécie *C. matourensis* registrada por Berry s.n (615 pb) com código de acesso EU478097 (Tabela 2). O *E-value* foi zero, que é menor e melhor para sequências consultadas, o Score foi 1131, o *identities* foi 614/615 (99%) e as lacunas foram 0/615 (0%).

Os isolados HYD104 (724 pb) e HYD106 (678 pb) mostraram similaridade de 99,20% e 99,74%, respectivamente, com *Vismia gracilis* Hieron registrada por ITV3007 (376 pb) de código MG217391. Enquanto que, a amostra HYD110 (672 pb) mostrou similaridade com *Vismia glaziovii* Ruhland (98,96%) de código KC709410 de registo C190 (672 pb). De acordo com a classificação atual, a espécie *V. glaziovii* é sinônimo de *V. gracilis*, então a amostras HYD110 pertence a espécie *V. gracilis*.

Tabela 2 - Relação das sequências de isolados de nucleotídeos das oitos amostras arbóreas aos seus respectivos nomes científicos de acordo com o banco de dados National Center for Information and Biotechnology (NCBI).

Amostra	Nome vulgar	Espécie	Similaridade (%)	Registro	Código (NCBI)
HYD167 HYD168	<i>Maravuvuia</i>	<i>C. matourensis</i>	99,84	Berry s.n	EU478097
HYD104 HYD106	<i>Lacre</i>	<i>V. gracilis</i>	99,20 99,74	ITV3007	MG217391
HYD110	<i>Lacre</i>	<i>V. glaziovii</i>	98,96	C190	KC709410
HYD92 HYD210 HYD211	<i>Tamanqueira</i>	<i>Z. rhoifolium</i>	99,55 99,85 99,80	Dias <i>et al.</i>	KC502933

Fonte: A autora (2023).

De acordo com os resultados desta pesquisa, podemos afirmar que a espécie identificada e registrada como *V. guianensis* foi confirmada pela análise molecular como sendo a espécie *V. gracilis* na área de mineração pertencente a propriedade Mineração Paragominas S.A. (Hydro). *V. guianensis* e *V. gracilis* apresentam são semelhanças quanto as suas características morfológicas foliares, sendo o que as diferenciam são as estruturas reprodutivas (flor e fruto), que não foram coletadas nesse estudo, sendo que *V. gracilis* apresenta glândulas no ovário, pontuação e linha preta no fruto, e, *V. guianensis* não apresenta tais características (VOGEL ELY *et al.*, 2023).

Para o DNA de HYD92 (746 pb), HYD210 (685 pb) e HYD211 (682pb) estes apresentaram similaridade superior a 99% com *Zanthoxylum rhoifolium* de código de acesso KC502933 registrado por Dias *et al.* (661 pb). O valor do *Score*, *E-value*, *Identities* e *Gaps* mostraram-se significativos para o alinhamento das sequências dos oitos isolados de nucleotídeos. As sequências consideradas significativas oriundas do alinhamento das espécies registradas pelo banco de dados GenBank com as sequências de isolados de “Maravuvuia”, “Lacre” e “Tamanqueira” estão na tabela 3.

Tabela 3 – Similiaridade das sequências de nucleotídeos dos isolados *Croton*, *Vismia* e *Zanthoxylum* registrados no banco de dados do National Center for Information and Biotechnology – NCBI.

Scientific Name	NCBI Description	Per. Ident. (%)	Accession Code
<i>Croton matourensis</i>	Berry s.n	99,84	EU478097
<i>C. matourensis</i>	Wis van Ee 492	99,04	EU478096
<i>C. matourensis</i>	Chavez 248 (MO)	97,76	AY971230
<i>C. palanostigma</i>	Riina 1492(Wis)	95,71	EU586943
<i>C. megalodendron</i>	Riina 1273 (Wis)	94,88	AY971231
<i>C. skutchii</i>	MO Lepiz 526	94,87	EU478098
<i>C. chocoanus</i>	Riina 1415 (Wis)	94,79	EU586941
<i>C. smithianus</i>	MO Aguilar 2263	94,07	EU478101
<i>C. spruceanus</i>	MO Baker 6493	91,92	HM044806
<i>V. bacifera</i>	ITV3836	99,48	MG217390
<i>Vismia sp.</i>	ITV2770	99,22	MG217389
<i>Vismia gracilis</i>	ITV3007	99,20	MG217391
<i>V. glaziovii</i>	C190	98,96	KC709410
<i>V. guianensis</i>	Jansen-Jacobs Lilwah Raghoenandan Scheplitz Vermeer 5501 (B)	98,05	HE653672
<i>V. gracilis</i>	Fuentes Claros A.F 14326	98,03	MN999722
<i>Vismia gracilis</i>	Fuentes Claros A.F 10934	97,97	MN999721
<i>V. cayennensis</i>	Mori Lokova Keeley 25662 (B)	95,48	HE653671
<i>V. macrophylla</i>	Jansen-Jacobs Welle James Andrew 4920 (B)	91,88	HE653673
<i>V. rubescens</i>	Gretchen Walters et al. 501	91,25	MN999725
<i>V. rubescens</i>	Niangadouma, Raoul N. 180	91,25	MN999724
<i>V. rubescens</i>	Niangadouma, Raoul N. 374	91,25	MN999723
<i>V. rubescens</i>	isolate C192	90,71	KC709411
<i>V. laurentii</i>	Boyekoli Ebale 984	89,06	MN999718
<i>V. laurentii</i>	Boyekoli Ebale 410	89,06	MN999717
<i>V. laurentii</i>	Boyekoli Ebale 337	89,06	MN999716
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Dias et al.	99,55	KC502933
<i>Z. caribaeum</i>	Bruniera 549 (SPFR)	99,15	MH016493
<i>Z. rhoifolium</i>	Stevens 33275 (MO)	99,11	MH016537

<i>Z. rhoifolium</i>	Blum10-106	98,67	KF420934
<i>Z. rhoifolium</i>	Groppo 1057 (SPF)	98,58	MH016536
<i>Z. rhoifolium</i>	isolate RHOI01	98,54	HM851478
<i>Z. coco</i>	Ree et Wen 53858 (US)	93,04	MH016500
<i>Z. acuminatum</i>	Groppo 1120 (SPF)	89,96	MH016476
<i>Z. setulosum</i>	Kessler 182 (GOET)	89,96	MH016543

Fonte: A autora (2023).

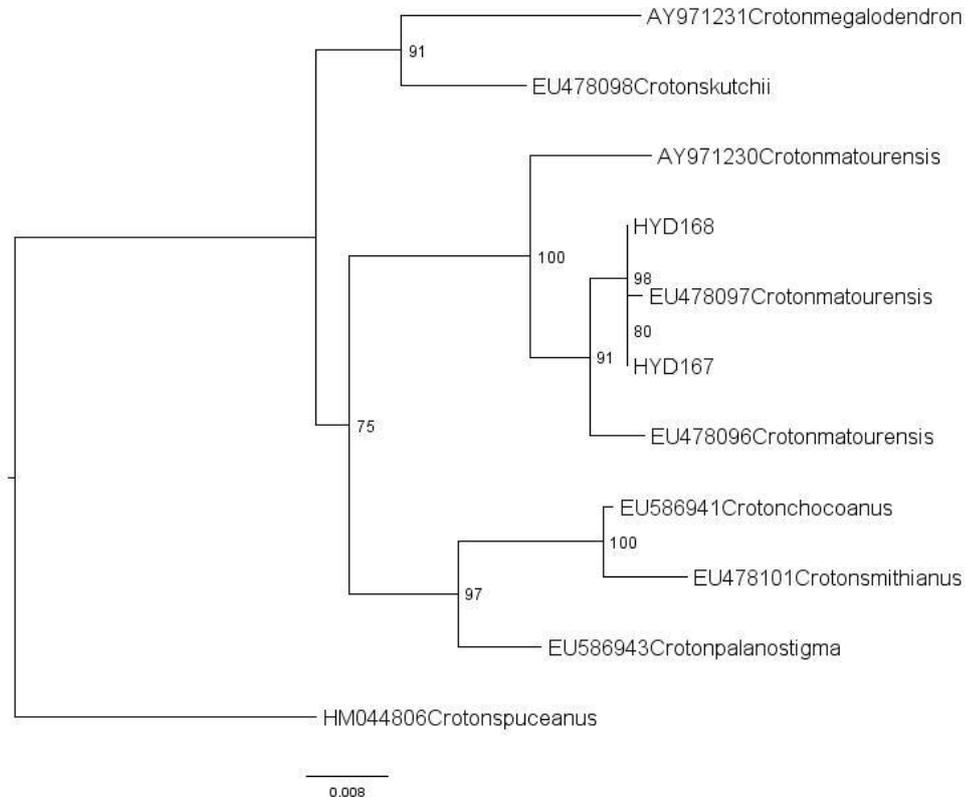
*NCBI description: description of the specie in the NCBI GenBank; Per. Ident: Percentage of identification of the species description in the NCBI GenBank; Accession code: code of the accession of specie in the NCBI GenBank; Acc. Len.: accession length.

Com relação aos resultados obtidos pelo BLAST Link, as sequências dos isolados de *Croton* (HYD167 e HYD168), *Vismia* (HYD104, HYD106 e HYD110) e *Zanthoxylum* (HYD92, HYD210 e HYD211) apresentaram parâmetros satisfatórios para a descrição das espécies identificadas e, os valores corresponderam a um alinhamento significativo, mostrando a confiabilidade da análise. De acordo com Ramalho *et al.* (2018) os bancos de dados genéticos, como o GenBank, são baseados em documentos, constantemente, atualizados e disponibilizados a partir dos trabalhos de taxonomistas e de coleções biológicas mundiais.

O uso de ITS para a resolução taxonômica foi superior a 98% para os isolados nucleotídeos de *Croton* (HYD167 e HYD168), *Vismia* (HYD104, HYD106 e HYD110) e *Zanthoxylum* (HYD92, HYD210 e HYD211), no qual, mostrou-se satisfatório e eficiente para a identificação molecular dos isolados vegetais. Segundo Ramalho *et al.* (2018) as sequências ITS são mais confiáveis, pois apresentam maior especificidade e podem separar grupos em níveis taxonômicos mais baixos.

A árvore filogenética para as sequências de isolados de *Croton* (HYD167 e HYD168) revelaram três clados bem definidos. As sequências dos isolados nucleotídeos agruparam com a espécie *C. matourensis*, com *bootstrap* de 91%, confirmando o diagnóstico botânico (Figura 3a). De acordo com Hillis e Bull (1993) os resultados do *bootstrap* são comumente interpretados como uma medida da probabilidade de que uma estimativa filogenética represente a verdadeira filogenia. Então, podemos dizer que os resultados filogenéticos deste estudo corroboraram com os estudos de Berry *et al.* (2005).

Figura 3a - Árvore filogenética reconstruída por meio de Máxima verosimilhança comparando a região dos genes ITS1 e ITS4 para o gênero *Croton* oriundas de áreas de mineração, Paragominas, Pará.



Fonte: A autora (2023).

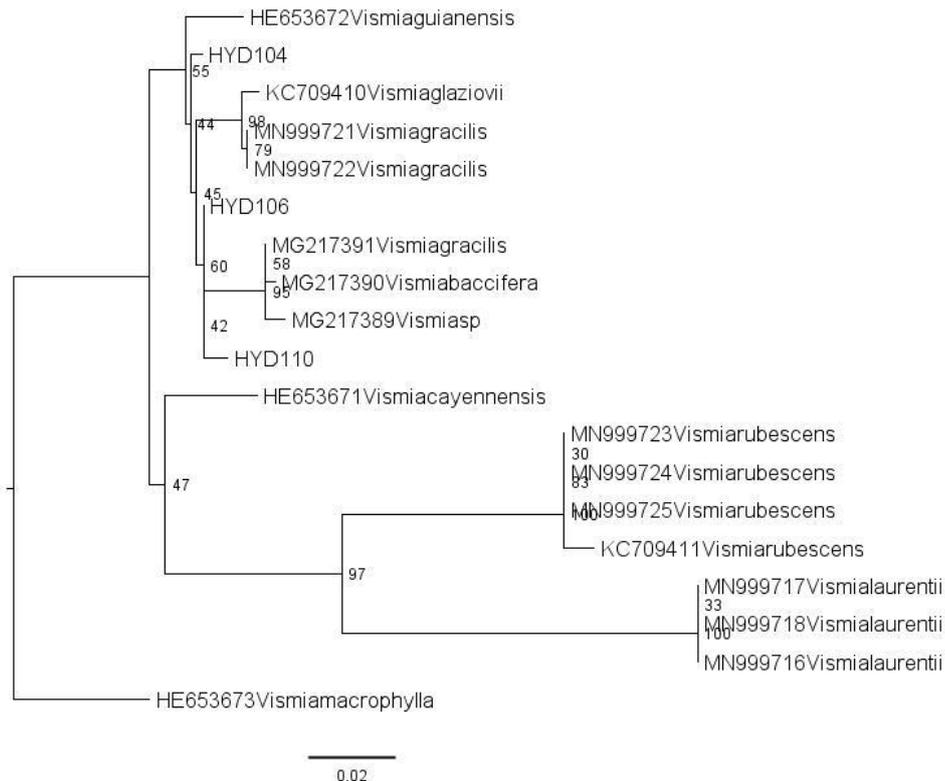
*Os valores dos ramos indicam percentagem de *bootstrap* de 1000 repetições.

As sequências dos isolados de *Vismia* (HYD104, HYD106 e HYD110) definiu quatro cladogramas. Os isolados de nucleotídeos extraídos agruparam com as espécies *V. gracilis*, *V. bacifera* e *Vismia* sp. com valor de *bootstrap* inferior a 70% (Figura 3b). Segundo Caldart *et al.* (2016) o limite aceitável de *bootstrap* é abstrata, sendo que o ponto de corte razoável seria de 70% para avaliar a confiança das análises filogenéticas (HILLIS; BULL, 1993). Como houve taxas de mudanças desiguais entre os isolados, as proporções *bootstrap* inferiores a 50% são superestimativas da precisão (HILLIS; BULL, 1993), não sendo possível fazer a reconstrução filogenética dos nossos isolados com o gênero *Vismia*. Porém, pode-se dizer que os isolados estão mais próximos da espécie *V. guianensis*, nos quais, apresenta características foliares semelhantes a *V. gracilis*.

Como os isolados HYD104, HYD106 e HYD110 alocaram-se com quatro espécies diferentes do gênero *Vismia*, por conta dessa incerteza em relação à filogenia, sugere-se outras

análises com marcadores específicos (plastidiais) para a reconstrução da árvore filogenética dos isolados.

Figura 3b - Árvore filogenética reconstruída por meio de Máxima verosimilhança comparando a região dos genes ITS1 e ITS4 para o gênero *Vismia* oriundas de áreas de mineração no estado do Pará.

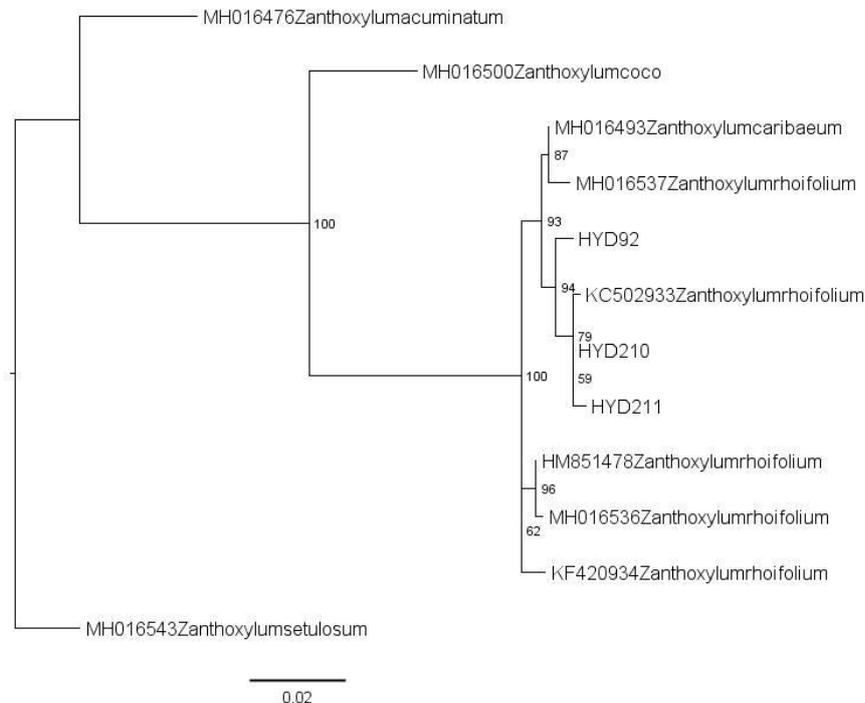


Fonte: A autora (2023).

*Os valores dos ramos indicam percentagem de *bootstrap* de 1000 repetições.

Por fim, os isolados de *Zanthoxylum* mostraram árvore filogenética com clados bem definidos. Sendo que, as sequências de nucleotídeos HYD210 e HYD211 apresentaram politomia com a espécie *Z. rhoifolium* (*bootstrap* = 79%) e, o isolado HYD92 foi a mais próxima de *Z. rhoifolium* com *bootstrap* de 93%. As proporções de *bootstrap* maiores de 70% geralmente correspondem a uma probabilidade maior ou igual a 95% de que o clado correspondente seja real (HILLIS; BULL, 1993). Todas os isolados de *Zanthoxylum* corroboraram com a identificação botânica morfológica.

Figura 3c - Árvore filogenética do gênero *Zanthoxylum* reconstruída por meio de Máxima verosimilhança comparando a região ITS, oriundas de áreas de mineração no estado do Pará, Brasil.



Fonte: A autora (2023).

*Os valores dos ramos indicam percentagem de *bootstrap* de 1000 repetições.

Por fim, a filogenia dos isolados de *Zanthoxylum* (HYD92, HYD210 e DYD211) mostraram árvore com quatro clados bem definidos e alocados com a espécie *Z. rhoifolium*. Segundo Groppo *et al.* (2008), o gênero *Zanthoxylum* (Zanthoxyleae, Rutoideae) é um clado com suporte forte com base nas características morfológicas, químicas (WATERMAN, 2007) e filogenética moleculares (POON *et al.*, 2007).

Diante dos nossos resultados, a correta identificação de espécies florestais em área de mineração por meio do conhecimento taxonômico e da estrutura genética das espécies vegetais, pode subsidiar estudos no processo de recuperação da biodiversidade no ambiente degradado pela exploração do minério, e o conhecimento da diversidade genética pode ser importante para diminuir a perda de material genético durante a reconstrução da floresta, e garantir a sustentabilidade das atividades de mineração.

4.4 Conclusão

A identificação dos indivíduos arbóreos conhecidos popularmente por “Maravuvuia”, “Lacre” e “Tamanqueira” foram significativos tanto na análise morfológica foliar quanto na análise molecular. A análise molecular com o uso do *primer* ITS para as regiões *Forward* ITS-u1 (GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG) e *reverse* ITS-u4 (RGTTTCTTTTCCTCCGCGCTTA) identifica as espécies, em nível específico, das amostras de “Maravuvuia” (*Croton matourensis*), “Lacre” (*Vismia gracilis*) e “Tamanqueira” (*Zanthoxylum rhoifolium*).

AGRADECIMENTOS

À Mineradora Paragominas S.A, Grupo Hydro, pela parceria e apoio financeiro na realização do estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão de bolsas para J.A.V.S e V.F.G.B.

REFERÊNCIAS

- BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN EE, B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. **American Journal of Botany**, 92, 1520-1534, 2005. DOI: [10.3732/ajb.92.9.1520](https://doi.org/10.3732/ajb.92.9.1520)
- BRASIL. **Constituição (1988)**. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília: DF: Senado Federal: Centro Gráfico, 1988. 292 p. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm. Acesso em 31 de maio de 2023.
- BRASIL. **Decreto 97.632, de 10 de abril de 1989**. Dispõe sobre a regulamentação do artigo 2º, inciso VIII, da lei 6.938, de 31 de agosto de 1981, e dá outras providências. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1980-1989/d97632.htm. Acesso em 31 de maio de 2023.
- CALDART, E. T.; MATA, H.; CANAL, C. W.; RAVAZZOLO, A. P. Phylogenetic Analysis: Basic Concepts and Its Use as a Tool for Virology and Molecular Epidemiology. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-20, 2016.
- CARUZO, M.B.R.; SECCO, R.S.; MEDEIROS, D.; RIINA, R.; TORRES, D.S.C.; SANTOS, R.F.D.; PEREIRA, A.P.N.; ROSSINE, Y.; LIMA, L.R.; MUNIZ FILHO, E.; VALDUGA, E. *Croton in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB22689>. Acesso em: 06 mai. 2023.
- CHENG, T.; XU, C.; LEI, L.; LI, C.; ZHANG, Y.; ZHOU, S. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. **Molecular Ecology Resources**, v.16, p. 138-149, 2016. DOI: [10.1111/1755-0998.12438](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12438)

COSTA, C. C.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; GROppo, M.; MACIEIRA, A. P.; CARVALHO, L. T.; GOMES, J. I.; MARGALHO, L. F. Conhecendo Espécies de Planta da Amazônia: Tamanqueira (*Zanthoxylum rhoifolium* Lam. – Rutaceae). **Comunicado técnico 249**, Embrapa. Belém, Pa. 2014. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/996207/1/COM249.pdf>. Acesso: 06 de maio de 2023.

FERREIRA, G. C. **Diretrizes para coleta, herborização e identificação de material botânico nas Parcelas Permanentes em florestas naturais da Amazônia brasileira**. Editora IBAMA. Manaus, AM. 2006, 44p. https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/417/o/manual_diretrizes_coletas_botanicas.pdf?1494003886.

GIBBS A.; MACKENZIE A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.63, p. 9-16, 1997. DOI: [10.1016/S0166-0934\(96\)02103-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(96)02103-9)

GOMES, A. C. S.; ANDRADE, A.; BARRETO-SILVA, J. S.; BRENES-ARGUEDAS, T.; LÓPEZ, D. C.; FREITAS, C. C.; LANG, C.; OLIVEIRA, A. A.; PÉREZ, A. J.; PEREZ, R.; SILVA, J. B.; SILVEIRA, A. M. F.; VAZ, M. C.; VENDRAMI, J.; VICENTINI, A. Local plant species delimitation in a highly diverse Amazonian forest: do we all see the same species? **Journal of Vegetation Science**, p. 70-79, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2012.01441.x>

GROppo, M.; PIRANI, J. R.; SALATINO, M. L. F.; BLANCO, S. R.; KALLUNKI, J. A. Phylogeny of rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. **American Journal of Botany**, v. 95, p. 985–1005, 2008. DOI: [10.3732/ajb.2007313](https://doi.org/10.3732/ajb.2007313)

GUIMARÃES, L.A.C.; SECCO, R. As espécies de *Croton* L. sect. *Cyclostigma* Griseb. e *Croton* L. sect. *Luntia* (Raf.) G. L. Webster subsect. *Matourenses* G. L. Webster (Euphorbiaceae s.s.) ocorrentes na Amazônia brasileira. **Acta Amazônia**, v. 40, p. 471-487. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000300006>

HADLICH, H. L. **O reconhecimento de espécies arbóreas em campo por meio da casca com o uso da espectroscopia no visível e infravermelho próximo na Amazônia Central**. 2020. 154p. Dissertação (mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM. 2017. 65p. <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/5168>

Hillis, D. M.; Bull, J. J. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. **Systematic Biology**, v. 42, p. 182–192, 1993. <https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182>

HEBERT, P.D.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, p. S96-S99, 2003. doi: [10.1098/rsbl.2003.0025](https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025)

KATO, K.; TOH, H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. **Bioinformatics**, v. 26, p. 1899-1900, 2010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq224>

- LOIOLA, M. I. B.; SILVA, M. V. C. C.; RIBEIRO, R. T. M. Flora of Ceará State, Brazil: Caryocaraceae, Hypericaceae, and Rhizophoraceae. **Rodriguésia**, v. 73, 2022. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202273055>.
- MARINHO, L. C.; AMORIM, A. M.; QUEIROZ, L. P. Flora da Bahia: Hypericaceae. **Sitientibus**, v. 16, 2016. <https://doi.org/10.13102/scb1051>.
- MARTINS, M. V.; SHIMIZU, G. H.; BITTRICH, V. Flora da Reserva Ducke, Estado do Amazonas, Brasil: Hypericaceae. **Hoehnea**, v. 45, p. 361-371, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-13/2018>.
- MARTINS, M. V.; SHIMIZU, G. H.; MARINHO, L. C.; VOGEL ELY, C. Flora do Espírito Santo: Hypericaceae. **Rodriguésia**, v. 68, p. 1595-1605, 2017. DOI: 10.1590/2175-7860201768506.
- MARTINS, W. B. R.; LIMA, M. D. R.; BARROS JÚNIOR, U. O.; AMORIM, L. S. VB. Ecological methods and indicators for recovering and monitoring ecosystems after mining: A global literature review. **Ecological Engineering**, v. 145, p. 105707, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.105707>
- MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; SILVA, A. S. L.; FERNANDES, M.M.; MARGALHO, L. F. **Noções morfológicas e taxonômicas para identificação botânica**. Embrapa, 2014. 111p. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/992543/nocoos-morfologicas-e-taxonomicas-para-identificacao-botanica>.
- MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Genetic variability in rDNA ITS region of *Trichoderma* spp. (biocontrol agent) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* isolates. **Ciências e agrotecnologia**. v. 34, p. 132-139, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000100017>
- MOTTA, E. A. P. **Atividade anti-Candida de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy in vitro, in vivo e in silico**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Ma. 2020. https://tedebc.ufma.br/jspui/bitstream/tede/3658/2/Tese_Elizangela.pdf.
- MOURÃO, D. S. C.; SÁGIO, S. A.; SOUZA, M. R.; SANTOS, G. R. Identificação morfológica e molecular de *Curvularia* sp. agente causal da mancha foliar do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.16, p. 1-12, 2017. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v16n1p1-12>.
- PIRANI, J. R. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae. **Rodriguésia**, v. 56, 189-204. 2005. <https://doi.org/10.1590/2175-78602005568634>
- PIRANI, J.R.; GROppo, M. **Rutaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB1162>. Acesso em: 06 mai. 2023
- POON, W. S.; SHAW, P.C.; SIMMONS, M.P.; BUT, P.P.H. Congruence of molecular, morphological and biochemical profiles in Rutaceae: A cladistic analysis of the subfamilies Rutoideae and Toddalioideae. **Systematic Botany**, v. 32, 837-846. 2007. <https://doi.org/10.1043/06-48.1>

RAMALHO, A. J.; ZAPPI, D. C.; NUNES, G. L.; WATANABE, M. T. C.; VASCONCELOS, S.; DIAS, M. C.; JAFFÉ, R.; PROUS, X.; GIANNINI, T. C.; OLIVEIRA, G.; GIULIETTI, A. M. Blind Testing: DNA Barcoding Sheds Light Upon the Identity of Plant Fragments as a Subsidy for Cave Conservation. **Frontiers in plant Science**, v.9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01052>

SCHLICHTING, C. D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual Review of ecology and systematics**, v. 17, p. 667-693, 1986. <https://doi/10.1146/annurev.es.17.110186.003315>.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden Package, 1998. **Bioinformatics Methods and Protocols**, p. 115–130, 1998. DOI: [10.1385/1-59259-192-2:115](https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115)

STAMATAKIS, A. RAxML, version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1312-1313, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

STAMATAKIS, A.; PAUL HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. **Systematic Biology**, v. 57, p. 758-771, 2008. <https://doi.org/10.1080/10635150802429642>

VIVAS, C.V.; MORAES, R.C.S.; ARAÚJO, A.A.; ALVES, M.; MARIANO-NETO, E.; BERG, C.V.D.; GAIOT, F.A. DNA Barcoding in Atlantic Forest plants: what is the best marker for Sapotaceae species identification? **Genetics and Molecular Biology**, v.37, n.4, p. 662-670, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572014005000019>

VOGEL ELY, C.; SHIMIZU, G.H.; MARTINS, M.V.; MARINHO, L.C. *Hypericaceae in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB25586>. Acesso em: 06 mai. 2023

WATERMAN, P. G. The current status of chemical systematics. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2896-2903, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.029>.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados deste estudo, os métodos utilizados para a identificação morfológica das espécies vegetais foram eficientes, porém falhas, sendo comuns os erros na determinação de táxons vegetais em estudos realizados em áreas de florestas na Amazônia. Com isso, se faz necessário a complementação desse tipo de estudo com as análises moleculares, nos quais, mostraram-se significativa para a determinação a nível de espécie das amostras vegetais neste estudo. Neste estudo a análise botânica foi significativa para a determinação dos espécimes vegetais a nível específico, e também, na classificação da família.

Com relação a análise molecular, o uso do protocolo CTAB modificado para a extração de DNA dos vegetais foi satisfatória, assim como, o uso de *primers* ITSu1 e ITSu4 para a amplificação do DNA vegetal. A análise das sequências de nucleotídeos do DNA vegetal foi satisfatória em relação a montagem, alinhamento e reconstrução das árvores filogenéticas.

Ao comparar as sequências de nucleotídeos de DNA das amostras vegetais com as sequências de código ITS do banco de dados, Genbank, do NCBI apresentaram similaridade superior a 90%, confirmando a eficiência de nossas análises moleculares em laboratório e a identidade científica de nossas amostras vegetais obtidas em campo.

A análise molecular mostrou divergência em relação a identificação morfológica, pois de acordo com os resultados moleculares as amostras vegetais foram identificadas como *V. gracilis* não corroborando com a identificação botânica realizada anteriormente (antes do presente estudo), sendo que o este erro compromete o monitoramento proposto no plano de restauração da área de mineração. Este deverá ser revisto e refeito após os resultados deste estudo, desconsiderando a espécie *V. guianensis* registrada e monitorada na presente área.

O problema de identificação das espécies vegetais é comum, e ocorre pela diversidade genética das amostras (matrizes) monitoradas, de onde são obtidas as sementes para o programa de restauração das áreas de mineração, pois se as árvores forem aparentadas, o material genético utilizado a partir da produção de mudas das sementes colhidas destas árvores será de baixa qualidade, então, com a identificação taxonômico correto e complementada pela análise de DNA traz garantias no sucesso das atividades de restauração da floresta.

Assim, se faz necessário o uso da análise molecular no processo de identificação de espécimes vegetais em área de floresta pós-mineração como método complementar a análise morfológica tradicional, no qual, pode auxilia cada vez mais, na resolução de identificação e registro científico de plantas na floresta Amazônica, dando assim, segurança nos estudos de taxonomia.

De acordo com as espécies vegetais identificadas e registradas nas áreas de recuperação pós mineração, têm importâncias ecológicas na dispersão do pólen e servindo de alimento (frutos) para a fauna local, desse modo, os animais contribuem na dispersão de sementes e, também, na composição do reflorestamento destinados ao repovoamento da área. Existem algumas espécies dos gêneros *Vismia* e *Croton* que são candidatas ideais para o processo de restauração florestal por serem pioneiras em ambientes perturbados e a espécie *Z. rhoifolium* produz grande quantidade de sementes viáveis, anualmente, estas espécies garantem a regeneração natural do ambiente.

Em relação a importância econômica das espécies vegetais identificadas neste trabalho, cita-se a extração da madeira de alta qualidade usada na construção civil, o consumo dos frutos comestíveis, as propriedades medicinais atuando no tratamento de diversas doenças e infecções por microrganismos, a atividade inseticida, os fins ornamentais empregada no paisagismo e utilização na arborização urbana.

Com isso, as metodologias utilizadas neste trabalho são importantes para elucidação de estudos futuros sobre a identificação de plantas por meio do conhecimento taxonômico e da estrutura genética das espécies vegetais, podendo subsidiar estudos no processo de recuperação da biodiversidade no ambiente degradado pela exploração do minério, e o conhecimento da diversidade genética pode ser importante para diminuir a perda de material genético durante a reconstrução da floresta. Com estudos desta natureza, é possível garantir a sustentabilidade das atividades de mineração.