

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,  
CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA**

**Caracterização genética de *Banisteriopsis* cf. *caapi* (Spruce ex Griseb.)  
C. V. Morton (Mapighiaceae), um cipó utilizado no preparo do chá  
*ayahuasca***

**THALITA ZANQUETTA LUZ**

**Manaus  
2019**

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,  
CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA**

**Thalita Zanquetta Luz**

**Caracterização genética de *Banisteriopsis cf. caapi* (Spruce ex Griseb.)  
C. V. Morton (Mapighiaceae), um cipó utilizado no preparo do chá  
*ayahuasca***

**Orientadora: Dra. Jacqueline da Silva Batista**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

**Manaus  
2019**

©SEDAB/INPA - Ficha Catalográfica Automática gerada com dados fornecidos pelo(a) autor(a)  
Bibliotecário responsável: Jorge Luiz Cativo Alauzo - CRB11/908

L979c Luz, Thalita Zanquetta  
Caracterização genética de *Banisteriopsis* cf.  
*caapi* (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton  
(Mapighiaceae), um cipó utilizado no preparo do chá  
ayahuasca / Thalita Zanquetta Luz; orientadora  
Jacqueline da Silva Batista. -- Manaus:[s.l], 2019.  
99 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação  
em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) --  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2019.

1. Marcador molecular. 2. Delimitação de  
espécies. 3. Mariri. 4. Jagube. I. Batista,  
Jacqueline da Silva, orient. II. Título.

CDD: 597.80415

*“Daquilo de que os outros  
Não sabem sobre mim,  
Disso eu vivo.”*

Peter Handke

## AGRADECIMENTO INSTITUCIONAL

Agradeço aos financiadores dessa pesquisa científica, no projeto: “*Identificação molecular e estimativa da variabilidade genética de *Banisteriopsis caapi* (mariri), com base em genes cloroplastidial e nuclear (2017-2019)*”, financiando pelo Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (CEBUDV) sob a Coordenação do Dr. Antonio Saulo Cunha Machado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, ao Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv/INPA), ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), ao Grupo de Pesquisas de Biologia Evolutiva de Peixes e de Genética Animal pelo apoio institucional e por toda a infraestrutura do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM/INPA) onde este trabalho foi desenvolvido.

## AGRADECIMENTOS

À pesquisadora e orientadora Dra. Jacqueline da Silva Batista, pela orientação, por todas as experiências acadêmicas proporcionadas, pela confiança depositada em mim, pelo apoio e por todo o incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pesquisador e amigo Antonio Saulo, pela confiança de que eu seria capaz de desenvolver um projeto tão importante, por ter me apresentado o CEBUDV e pelo apoio nas coletas realizadas nos Núcleos e na região de Manaus, pelo apoio e incentivo durante todas as etapas da realização desta dissertação. E também por todas as experiências acadêmicas proporcionadas.

Aos colegas do curso de mestrado da turma de março de 2017 pela parceria nas disciplinas, em especial para a Thamiles das Chagas Gonçalves, Jorge Tavares Ferreira e Alex Matheus Viana Ferreira que tornaram essa caminhada mais prazerosa.

Aos Mestres no CEBUDV: Mestre Armínio Pontes diretor do DPMA do CEBUDV no momento que o projeto foi submetido para financiamento (outubro de 2017), e que nos deu apoio e incentivo. Aos Mestres Clovis Cavalieri e Wladimir Fogagnoli, Mestres Geral e Presidente da Diretoria, respectivamente, no ano em que o projeto foi submetido. Ao atual Mestre Geral Representante e Presidente do CEBUDV, Paulo Afonso e Tadeo Feijão (2018-2019), pela confiança em financiar parte desse projeto, tornando esse um dos primeiros projetos a ser financiado pelo CEBUDV. Ao professor Dr. José Beethoven que intermediou e encaminhou o projeto para financiamento, como também entrou em contato com algumas pessoas que realizaram as coletas no Acre, Pará e Rondônia.

Aos membros da banca de qualificação Dr. Charles R. Clement, Dr. Alberto Vicentini e Dra. Carolina Sousa de Sá Leitão pelas valiosas contribuições.

Aos Mestres Evandro Jesus e Albertino que nos deram total apoio nas coletas realizadas em Presidente Figueiredo – AM e Novo Airão – AM.

Às pessoas que gentilmente realizaram as coletas no estado do Acre: Sebastião S. Cruz, Luana Maria Pinto De Souza, Thauna Cavalcante de Sousa, Carlos Henrique Profirio Marques, Romário Sena Oliveira, Dhemerson Santos do Vale, Manoel Delson Campos Filho, Luis Marcelo Silva dos Passos, Raimundo Nonato, Claudio, Antônio Dário Pinheiro de França, Antônio Francisco de Oliveira Filho, Antônio da Costa Dantas, Francisco Alan Pinto de Sousa, Ferlândia de Souza Lima, Francisco Cleomar Barbosa

Cosmiro, Reinaldo Moreira de Souza, Fredis Carvalho Vasques, Francisco Geovane da Silva Moura, Clemilson Dourado da Silva, Jair de Lima Nicarsio, e Mestre Acelino.

Às pessoas que gentilmente realizaram as coletas no estado de Rondônia: Wanderlei, Edilson, Mestre Salvador, Rafael, Sidney, Mestre Ivison, Fábio Junior, Mestre Humberto, Erlan Kleider Marques da Silva, Davi Bento de Oliveira, Abraão de Almeida Santos, Laucidio Sena Jatobá, Itamar Felix Vieira, Glauco Antonio Alves e Augusto Leite de Souza.

À equipe de coletas do estado do Pará pela gentileza em realizarem as coletas: Raimundo André, Paulo Carvalho, Bruno Diacomeli, Manoel Ocelio.

Ao Mestre Moacir Biondo e à equipe que coletou na cidade de Tefé – AM, Almir Souza, Aildo Souza, Jonas Pinheiro, Ronivon Caxeixa, Rossinei Bruno, Márcio Barbosa e Adelson de Carvalho pela gentileza da coleta das amostras.

Aos que ainda não agradei da equipe de coleta de Presidente Figueiredo – AM e Novo Airão – AM: Mirza Lago, Felipe Mota, Guilherme Sioufi, Conselheira Sueli, Conselheiro Carlos Memória, Paulo Chagas e Diego Santiago Pimentel. Grata pela companhia, pelo acolhimento, pelos significativos aprendizados na identificação do mariri e apoio na realização das coletas.

Ao Dr. Ricardo Monteles pela gentileza em ceder as amostras de jagube.

Aos integrantes do grupo PIRADA pela troca de conhecimentos e experiências acadêmicas, em especial para Giselle Moura Guimarães Marques, Kyara Martins Formiga, Diego Mavignieur Cajueiro de Albuquerque, Wagner Oliveira de Azevedo e Juliana Nascimento da Silva pelo carinho, força, apoio, amizade, compartilhamento de agonias e alegrias.

As técnicas do laboratório (LTBM) MSc. Paula Barbosa e MSc. Alyne Farias pela gentileza e pelo auxílio com a utilização dos equipamentos laboratoriais.

À Zeina pela amizade e pelos momentos especiais compartilhados.

À todos os frequentadores do LTBM/INPA nos anos 2017 a 2019 pelas discussões científicas, pelo suporte e troca de conhecimento durante o período de bancada e análise de dados.

Ao MSc. Érico Polo pela valiosa contribuição durante a fase das análises computacionais.

Ao Dr. Fabio Muniz por compartilhar seu conhecimento para a confecção dos mapas.

À Katell Uguen pela amizade, pelo apoio e considerações durante a fase final da escrita dissertação, pelas valiosas e prazerosas conversas.

À Karen Hanna Schoaba pelos momentos de desabafos e conversas políticas e feministas, por ter me hospedado durante o período da conclusão deste trabalho e pela companhia imensamente prazerosa.

À Raysa Paz pela irmandade no período que estive em Manaus. Por ter sido compreensiva nos momentos agoniados, pelos passeios e pela agradável companhia durante esse período.

À Andressa Cardoso dos Santos pela amizade e pelos momentos prazerosos repletos de muita risada.

À todos os irmãos do Núcleo Mestre Angílio pelo acolhimento. Em especial aos Mestres responsáveis pelo Núcleo durante o período que estive em Manaus (Mestres Daniel Teixeira, José de Jesus e Orlando Pires Monteiro), por tantos ensinamentos de vida compartilhados durante as sessões e pelos momentos de descontração.

Aos membros da banca da defesa da dissertação Dr. Santiago Linorio Ferreyra Ramos, Dr. Ricardo Lopes e Dra. Carolina Sousa de Sá Leitão pelas valiosas contribuições.

Por fim, sou grata a TUDO, a TODAS e TODOS que compartilharam estes momentos comigo. São muitas as pessoas que auxiliaram na minha formação acadêmica e pessoal durante minha estadia em Manaus. Esta dissertação foi fruto do trabalho coletivo de todos que direta ou indiretamente participaram desta pesquisa. Gratidão!



## RESUMO

*Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton (mariri/jagube) é um cipó da família Malpighiaceae encontrada na floresta amazônica e também é o principal ingrediente do chá enteógeno, *ayahuasca*, utilizada por povos nativos da região em cerimônias de cura a pelo menos 300 anos. Importantes pesquisas científicas têm demonstrado, que as substâncias químicas encontradas *B. caapi* podem ser usadas para a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas. Apesar de *B. caapi* ser a espécie tradicionalmente atribuída a *ayahuasca* há indícios que outras espécies de cipó também são utilizadas no preparo do chá. Além disso, são reconhecidas diferentes variedades do cipó que possuem diferenças na morfologia do caule e na sensação no corpo e na mente; entretanto essas variedades ainda não foram todas identificadas. Nesse contexto, o uso de marcadores moleculares pode auxiliar na avaliação da biodiversidade para que futuramente eficientes estratégias de conservação e manejo dessa espécie sejam propostas. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma biblioteca genômica para *B. cf. caapi* e caracterização de marcadores moleculares do cloroplasto e nuclear para a espécie. Foram feitas também análises de delimitação de espécies, e foram calculados índices de diversidade genética, a fim de caracterizar geneticamente 120 amostras de cipós coletados em quatro estados da região Norte do Brasil. As análises das sequências do marcador molecular do cloroplasto, não resultaram em polimorfismos e índices de diversidade suficientes entre as amostras para acessar a variação genética, por outro lado se mostraram adequados para a identificação molecular no nível de gênero para o cipó utilizado no preparo do chá *ayahuasca*. Os marcadores nucleares mostraram-se promissores para o acesso a diversidade genética de *B. cf. caapi* e recuperaram 12 linhagens genéticas de *B. cf. caapi*. As linhagens genéticas delimitadas foram classificadas como espécies candidatas não confirmadas. A diversidade genética das 120 amostras analisadas teve valores de 88 haplótipos, 201 sítios polimórficos, 0,967 de diversidade haplotípica, e as distâncias genéticas *P* calculadas variaram de 0,229 a 0,017. Estudos posteriores devem trazer maiores esclarecimentos sobre a classificação taxonômica referente aos espécimes de cipó que são utilizados para o preparo do chá *ayahuasca*.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
SUMÁRIO.....	10
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	17
1.1. Família Malpighiaceae e o gênero <i>Banisteriopsis</i> .....	17
1.2. A espécie <i>Banisteriopsis caapi</i> (Spruce ex Griseb.) C.V. Morton .....	20
1.3. Uso ritualístico e potencial terapêutico da <i>ayahuasca</i> .....	21
1.4. Diversidade da flora Amazônica e conservação de espécies .....	22
1.5. Marcadores moleculares .....	24
1.6. História taxonômica complexa em <i>Banisteriopsis caapi</i> e incertezas em relação a identificação de espécies de cipó que são usadas no preparo do chá <i>ayahuasca</i> .....	28
1.7. Delimitação de espécies .....	32
2. Justificativa.....	33
3. Objetivos.....	35
3.1. Objetivo geral .....	35
3.2. Objetivos específicos .....	35
REFERÊNCIAS .....	36
CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e caracterização de marcadores moleculares nucleares e cloroplastidiais para o cipó <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton (Malpighiaceae), utilizados para o preparo do chá <i>ayahuasca</i> .....	41
Resumo .....	41
1. Introdução.....	42
2. Material e Métodos.....	45
2.1. Amostragem e Extração de DNA .....	45
2.2. Desenvolvimento da biblioteca genômica .....	46
2.3. Amplificação e sequenciamento de marcadores de DNA nuclear e do cloroplasto .....	46
2.4. Análise dos dados .....	49
3. Resultados.....	50

3.1. Biblioteca genômica .....	50
3.2. Análises dos marcadores nucleares.....	50
3.3. Análises dos marcadores do cloroplasto .....	54
4. Discussão .....	55
5. Conclusão .....	57
REFERÊNCIAS .....	59
Material Suplementar – Capítulo 1 .....	63
CAPÍTULO 2: Revelando linhagens divergentes em <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton (Mapighiaceae), um cipó utilizado no preparo do chá <i>ayahuasca</i> .....	
	70
Resumo .....	70
1. Introdução .....	71
2. Material e métodos .....	73
2.1. Amostragem e Extração de DNA .....	73
2.2. Amplificação e sequenciamento de DNA.....	75
2.1. Análise dos dados .....	76
<i>Delimitação de linhagens e diversidade genética</i> .....	76
3. Resultados.....	77
3.1. Delimitação de linhagens e diversidade genética de <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> referente ao marcador nuclear ITS .....	77
<i>Diversidade genética</i> .....	81
3.2. Delimitação de linhagens e diversidade genética de <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> com o marcador molecular do cloroplasto ( <i>matK</i> ).....	82
4. Discussão .....	85
5. Conclusão .....	89
REFERÊNCIAS .....	91
Material Suplementar – Capítulo 2.....	94
CONCLUSÕES GERAIS.....	99

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1:

<b>Tabela 1.</b> Marcadores moleculares e respectivos <i>primers</i> , selecionados para a caracterização genética de cipós de <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> . .....	48
<b>Tabela 2.</b> Informações da análise BLASTn de três clones utilizados para a síntese dos <i>primers</i> testados que foram obtidos na biblioteca genômica desenvolvida para <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> . que apresentaram homologia com regiões codificadoras de proteína. ....	50
<b>Tabela 3.</b> Índices de diversidade genética para <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> obtidos a partir da sequência nucleotídica de seis marcadores moleculares.....	51

<b>Tabela Suplementar 1.</b> Análise do BLASTn do marcador do cloroplasto <i>rbcL</i> conduzidas no NCBI de amostras de variedades de <i>Banisteriopsis</i> cf <i>caapi</i> coletadas no Estado do Amazonas. ....	65
---	----

<b>Tabela Suplementar 2.</b> Análise do BLASTn do marcador do cloroplasto <i>matK</i> conduzidas no NCBI de amostras de variedades de <i>Banisteriopsis</i> cf <i>caapi</i> , coletadas no Estado do Amazonas. ....	66
---	----

<b>Tabela Suplementar 3.</b> Análise do BLASTn do marcador do cloroplasto <i>ndhF</i> conduzidas no NCBI de amostras de variedades de <i>Banisteriopsis</i> cf <i>caapi</i> , coletadas no Estado do Amazonas. ....	68
---	----

### Capítulo 2:

<b>Tabela 1.</b> Marcadores moleculares e respectivos <i>primers</i> utilizados para caracterização molecular de <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> . .....	75
---	----

<b>Tabela 2.</b> Distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) entre as 12 linhagens de <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> recuperadas pelos métodos GMYC e bGMYC amostradas nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia. Os valores na diagonal da tabela (em vermelho) são os valores médios de distância genética encontrados dentro das linhagens. ....	81
--	----

<b>Tabela 3.</b> Parâmetros de diversidade genética referente a 12 linhagens genéticas de <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> recuperadas pelos métodos GMYC e bGMYC, amostradas em 30 municípios de quatro estados da região Norte do Brasil, a partir da análise do marcador molecular nuclear ITS. ....	82
---	----

<b>Tabela 4.</b> Análise do BLASTn de amostras que não foram identificadas como <i>Banisteriopsis</i> conduzidas no NCBI referente ao marcador do cloroplasto <i>matK</i> .....	83
---	----

<b>Tabela 5.</b> Parâmetros de diversidade genética referente a 120 amostras de <i>Banisteriopsis</i> cf. <i>caapi</i> , amostradas em 30 municípios de quatro estados da região Norte do Brasil, a partir da análise do marcador molecular nuclear <i>matK</i> . ....	85
--	----

**Tabela Suplementar 1.** Dados referentes as amostras de *Banisteriopsis* cf. *caapi* que foram utilizadas para as análises de delimitação de linhagens, diversidade genética dos cipós utilizados para o prepare do chá *ayahuasca*..... 94

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução Geral:

- Figura 1.** Distribuição geográfica de Malpighiaceae. (Fonte: Davis et al, 2002; adaptado) ..... 17
- Figura 2.** Filogenia em destaque dos gêneros: *Browenia*, *Diplopterys* e *Banisteriopsis* (imagem modificada de Davis e Anderson, 2010). ..... 19
- Figura 3.** Distribuição de *Banisteriopsis caapi*. (Fonte: GBIF). ..... 20
- Figura 4.** Organização estrutural do genoma do cloroplasto de *Astelia pumila* (G.Forst.) Gaudich. Os genes mostrados na parte externa do círculo externo são transcritos no sentido horário, enquanto os genes mostrados na parte interna são transcritos no sentido anti-horário. As posições das regiões grande (LSC) e pequena cópia única (SSC), bem como das repetições invertidas (IRs), são indicadas no círculo interno (Fonte: Pfanzelt et al. 2019). ..... 26
- Figura 5.** Esquema da organização do DNA ribossômico - marcador molecular ITS (*internal transcribed spacer*). Os blocos em cinza representam as regiões codificadoras, as linhas representam a região não-codificadora (ITS). Fonte: White et al. 1990 - adaptado ..... 28
- Figura 6.** Diversidade morfológica do caule de mariri (*Banisteriopsis* cf. *caapi*) que são usados no preparo do chá *ayahuasca*. (A) caule de um mariri tucunacá; (B) caule de um mariri caupuri com nó; (C) caule de em mariri caupuri sem nó ..... 29
- Figura 7.** Variação nos mariris (*Banisteriopsis* cf. *caapi*). (A) diferença no tamanho das sementes; (B) diferença no formato da folha; (C) Variação na cor, quantidade e formato das glândulas foliares. .... 30
- Figura 8.** Diferentes cores do chá *ayahuasca* proporcionadas pelas diferentes variedades de mariri (*Banisteriopsis* cf. *caapi*). Da esquerda para direita: os dois primeiros são de mariri tucunacá e o terceiro é de mariri caupuri. .... 31

### Capítulo 1:

- Figura 1.** Mapa destacando os municípios no Estado do Amazonas de coleta de amostras de *Banisteriopsis* cf. *caapi* que foram utilizadas no presente estudo. .... 45
- Figura 2.** Rede de haplótipos do marcador nuclear ITS e a respectiva árvore filogenética de 16 amostras de cipós *Banisteriopsis* cf. *caapi* com suporte de *bootstrap* para *Neighbor-Joining* (NJ)/*Maximum Likelihood* (ML). Os clados usados para as estimativas de distância genética entre os grupos são indicadas pelos colchetes e pelos algarismos romanos. As amostras seguidas por \*\* indicam alelos de indivíduos que apresentam fenótipo com nó. Na rede de haplótipos cada círculo representa um haplótipo e possui a informação da frequência de cada um dos haplótipos, que estão representados da mesma cor na árvore filogenética. .... 52
- Figura 3.** Rede de haplótipos do marcador nuclear MP3-kinase e a árvore filogenética de 18 amostras de cipós *Banisteriopsis* cf. *caapi* com suporte de *bootstrap* para *Neighbor-Joining* (NJ)/*Maximum Likelihood* (ML). Os clados usados para as estimativas de distância genética entre os grupos são indicadas pelos colchetes e pelos algarismos

romanos. As amostras seguidas por \*\* indicam alelos de indivíduos que apresentam fenótipo com nó. Na rede de haplótipos cada círculo representa um haplótipo e possui a informação da frequência de cada um dos haplótipos, que estão representados da mesma cor na árvore filogenética. .... 53

**Figura 4.** Rede de haplótipos do marcador nuclear *yage5* e a árvore filogenética de 14 amostras de cipós *Banisteriopsis* cf. *caapi* com suporte de *bootstrap* para *Neighbor-Joining* (NJ)/*Maximum Likelihood* (ML). Os clados usados para as estimativas de distância genética entre os grupos são indicadas pelos colchetes e pelos algarismos romanos. As amostras seguidas por \*\* indicam alelos de indivíduos que apresentam fenótipo com nó. Na rede de haplótipos cada círculo representa um haplótipo e possui a informação da frequência de cada um dos haplótipos, que estão representados da mesma cor na árvore filogenética. .... 54

**Figura 5.** Rede de haplótipos dos marcadores do cloroplasto e as respectivas árvores filogenéticas de 19 amostras de cipós *Banisteriopsis* cf. *caapi* com suporte de *bootstrap* para *Neighbor-Joining* (NJ)/*Maximum Likelihood* (ML). Os clados usados para as estimativas de distância genética entre os grupos são indicados pelos colchetes e pelos algarismos romanos. As amostras seguidas por \*\* indicam indivíduos que apresentam fenótipo com nó. Na rede de haplótipos cada círculo representa um haplótipo e possui a informação da frequência de cada um dos haplótipos, que estão representados da mesma cor na árvore filogenética. .... 55

**Figura Suplementar 1.** Diferentes variações morfológicas do caule de 14 amostras de *Banisteriopsis* cf. *caapi*, coletados em cultivos no município de Manaus, Amazonas. . 63

**Figura Suplementar 2.** Morfologia dos cipós *Banisteriopsis* cf. *caapi* coletados em ambiente natural nos municípios de Presidente Figueiredo e Novo Airão, Amazonas.

64

## Capítulo 2:

**Figura 1.** Mapa destacando os pontos na região amazônica de coleta de amostras de *Banisteriopsis* cf. *caapi*. .... 74

**Figura 2.** Árvore filogenética bayesiana (*Maximum clade credibility tree*) com base em 3000 árvores posteriores geradas usando o BEAST. Foram usadas 240 sequências do ITS de 120 amostras de indivíduos heterozigotos e homozigotos de *Banisteriopsis* cf. *caapi* (mariri/jagube), amostrado nos estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Pará (as informações dos municípios e estado de coleta, referente a cada código estão na Tabela Suplementar 1). Os códigos das amostras seguidas por \*\* indicam cipós que apresentam fenótipo de caule com nó. Probabilidades posteriores com suporte acima de 0,95 são mostradas com pontos vermelhos. As linhagens genéticas delimitadas pelo modelo GMYC e bGMYC são demonstradas por caixas coloridas. .... 79

**Figura 3.** Mapa contendo a distribuição das linhagens genéticas de *Banisteriopsis* cf. *caapi* (mariri/jagube) identificadas pelo método GMYC e bGMYC. Os pontos marcados em círculo são amostras coletadas em ambiente natural. Os pontos marcados com triangulo são amostras coletadas em ambiente de cultivo. Para melhor visualização da

distribuição geográfica das linhagens, os pontos foram plotados com a função deslocador de pontos no QGIS. .... 80

**Figura 4.** Árvore filogenética bayesiana (*Maximum clade credibility tree*) com base em 3000 árvores posteriores geradas usando o BEAST. Foram usadas 120 sequencias do *matK* de *Banisteriopsis* cf. *caapi* (mariri/jagube), amostrado nos estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Pará (as informações dos municípios e estado de coleta, referente a cada código estão na Tabela Suplementar 1). Probabilidades posteriores com suporte acima de 0,95 são mostradas com pontos vermelhos. As linhagens genéticas delimitadas pelo modelo GMYC, bGMYC são demonstradas por caixas. Os códigos das amostras seguidas por \*\* indicam cipós que apresentam fenótipo de caule com nó. .... 84

**Figura Suplementar 1.** Diferentes morfologias de nó de *Banisteriopsis* cf. *caapi* em amostras coletadas no Amazonas. .... 97

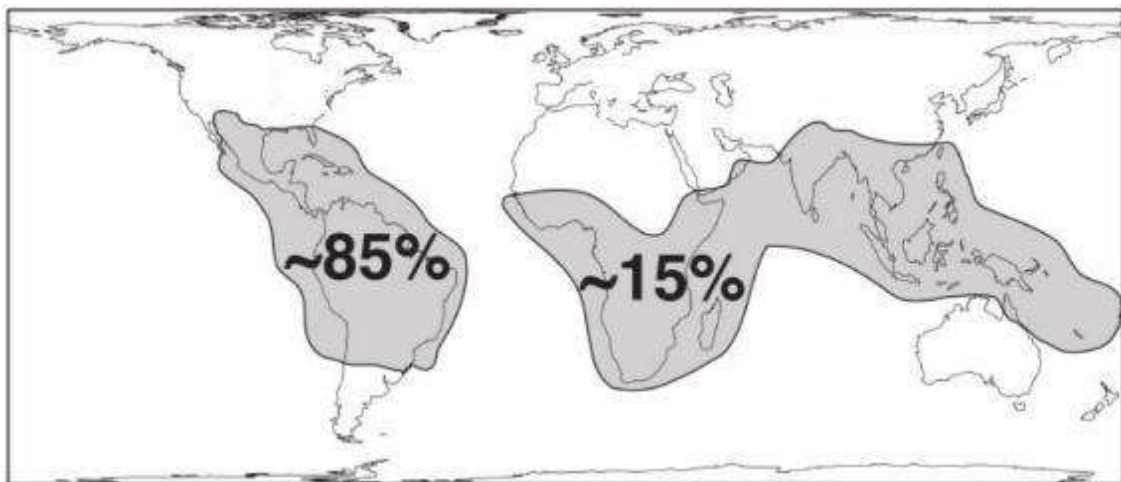
**Figura Suplementar 2.** Morfologias do nó de caule de cipós utilizados no preparo da *ayahuasca*. (A) *Banisteriopsis caapi*, amostra coletada por Spruce (retirada de Schultes et al 1969); (B) *Banisteriopsis* cf. *caapi*, amostra FN4 coletada para análises no presente estudo..... 98



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Família Malpighiaceae e o gênero *Banisteriopsis*

A família Malpighiaceae é composta por lianas/cipós, arbustos, subarbustos ou raramente árvores (Davis e Anderson 2010). Atualmente, possui 1301 espécies distribuídas em 81 gêneros (The Plant List, 2019). Têm distribuição geográfica tropical e subtropical sendo predominantemente tropical (Figura 1). Aproximadamente 85% dos gêneros e espécies reconhecidas ocorrem no continente americano, com maior diversidade na América do Sul (Anderson 1990, Davis et al. 2002, Davis e Anderson 2010). No Brasil estão registrados 44 gêneros e 561 espécies, sendo 336 espécies endêmicas (Malpighiaceae, Flora do Brasil 2020). As espécies ocorrem em diversas formações vegetais como: florestas tropicais, cerrados, campos rupestres e caatingas (Mamede et al. 2015).



**Figura 1.** Distribuição geográfica de Malpighiaceae. (Fonte: Davis et al, 2002; adaptado)

As espécies de Malpighiaceae da região neotropical possuem interações ecológicas com as abelhas da família Apidae (tribos: Centridini, Tetrapedini e Tapinotaspidini) (Vogel 1974, Anderson 1979, Sigrist e Sazima 2004, Araújo et al. 2006). Há evidências, em registros fósseis, de que a associação entre as espécies de Malpighiaceae produtoras de óleo e as abelhas Centridini deu-se logo após o surgimento de ambas, na região norte da América do Sul (Taylor e Crepet, 1987). Acredita-se que essa antiga interação, além de ser responsável pela uniformidade da morfologia das flores das espécies neotropicais (Anderson, 1990; Vogel, 1990; Sigrist e Sazima, 2004; Davis e

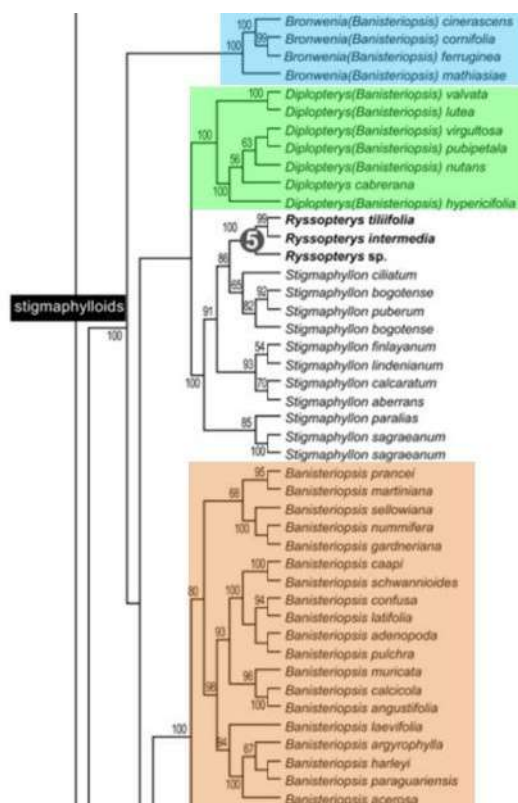
Anderson, 2010), seja também responsável pela riqueza de espécies nessa região quando comparadas a riqueza de espécies no continente africano (Davis e Anderson, 2010).

De maneira geral, as espécies dessa família exibem considerável variabilidade em características como: hábito, morfologia polínica, androceu e gineceu, número cromossômico e especialmente a estrutura dos frutos. Em contraste, as flores das Malpighiaceae da região neotropical são relativamente semelhantes em termos de morfologia geral, o que torna difícil distinguir algumas espécies (a exemplo das espécies do gênero *Banisteriopsis*) (Anderson 1979, Sigrist e Sazima 2004, Davis e Anderson 2010). Essa diversidade nos frutos, juntamente com a uniformidade das flores das espécies neotropicais, levou os pesquisadores a definir gêneros e tribos principalmente em função da morfologia dos frutos (Anderson 1979). Entretanto estudos filogenéticos revelaram gêneros não monofiléticos (a exemplo de *Banisteriopsis*), evidenciando a natureza problemática dessa taxonomia com base em caracteres morfológicos (Cameron et al. 2001, Davis et al. 2001, Davis e Anderson 2010).

*Banisteriopsis* C. B. Rob. ex Small é um dos gêneros de Malpighiaceae com maior riqueza na região neotropical, e compreende espécies com hábitos de árvores, arbustos ou cipós (Gates 1982). Taxonomicamente, *Banisteriopsis* é considerado um gênero complexo em Malpighiaceae, principalmente pelo fato das espécies exibirem alta semelhança morfológica floral (Gates 1982).

O gênero *Banisteriopsis* teve em sua segunda revisão taxonômica um total de 92 espécies contabilizadas, distribuídas principalmente no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Peru (Gates, 1982). Com base somente em dados morfológicos, Gates (1982) reconheceu três subgêneros em *Banisteriopsis*: *Banisteriopsis*, *Hemiramma* e *Pleiopterys*.

Posteriormente, estudos de filogenia com abordagem integrativa de dados genéticos, com o uso de três marcadores moleculares do cloroplasto (ribulose-1,5-bisfosfato – *rbcL*, maturase K – *matK* e desidrogenase F – *ndhF*), um marcador nuclear (fitocromo C – PHYC), e dados morfológicos (caracteres de flor, fruto e grão de pólen), identificaram a polifilia do gênero em três clados distintos, bem suportados, e relacionados aos subgêneros reconhecidos por Gates (1982) o que resultou numa reorganização na taxonomia do gênero (Cameron et al. 2001, Anderson e Davis 2006, 2007, Davis e Anderson 2010) (Figura 2).



**Figura 2.** Filogenia em destaque dos gêneros: *Browenia*, *Diplopterys* e *Banisteriopsis* (imagem modificada de Davis e Anderson, 2010).

Dessa maneira, as espécies de *Banisteriopsis* subg *Pleiopterys* (Nied.) B. Gates foram realocadas para o gênero *Diplopterys* (Anderson e Davis 2006, Davis e Anderson 2010). Os membros do subgênero *Banisteriopsis* formaram um clado distinto, e em homenagem a Browen Gates, as espécies desse grupo foram reagrupadas em um novo gênero, *Browenia* (Anderson e Davis 2007, Davis e Anderson 2010). Já o subgênero *Hemiramma*, que possuía o maior número de espécies, ficou nomeado como o gênero *Banisteriopsis* (Anderson e Davis, 2007; Davis e Anderson, 2010).

Atualmente o gênero *Banisteriopsis* possui 60 espécies (The Plant List, 2019), com 47 registradas no Brasil, sendo 34 endêmicas (*Banisteriopsis*, Flora do Brasil 2020). Poucas espécies de *Banisteriopsis* amazônicas foram amostradas nos estudos desse gênero, o que pode ainda ter subestimado a diversidade existente nesse grupo de plantas.

Espécies desse gênero possuem metabólitos biologicamente ativos que apresentam importantes atividades farmacológicas (dos Santos e Hallak 2019). Algumas espécies de *Banisteriopsis* encontram-se no livro vermelho da flora do Brasil: *B. andersonii*, *B. basifixa* e *B. sellowiana* encontram-se vulneráveis a extinção; *B. cipoensis*, *B. hatschbachii*, *B. hirsuta* e *B. magdalenensis* encontram-se em perigo de extinção; e *B.*

*pseudojanusia* encontra-se criticamente em perigo, podendo estar extinta na natureza (Martinelli e Moraes, 2013).

## 1.2. A espécie *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C.V. Morton

*B. caapi* é um cipó e está distribuído ao longo da floresta Amazônica, sendo seu limite de ocorrência: ao sul até a Bolívia e ao norte até a Venezuela. Cresce ainda na Amazônia colombiana, equatoriana, peruana e brasileira, tendo se propagado através dos Andes até a costa equatoriana (Gates 1982, Ott 1994). Embora Gates (1982) tenha proposto essa distribuição para *B. caapi*, não foi possível identificar com precisão de onde essa espécie é nativa, pois a maior parte dos acessos analisados no estudo foram de plantas cultivadas. Historicamente *B. caapi* foi muito cultivada no Peru, Colômbia e Amazônia brasileira por populações nativas, que fazem o uso da planta para preparar uma bebida enteógena (substância natural que conduz a expansão da consciência e induz ao estado xamânico), o chá *ayahuasca* (Gates, 1982).

De acordo com *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF) a atual área de ocorrência de *B. caapi* (Figura 3) vai muito além do que foi proposto por Gates (1982) e continua sendo cultivada por sociedades religiosas que fazem o uso do chá em seus rituais, o que explica a atual área de ocorrência para a espécie.



**Figura 3.** Distribuição de *Banisteriopsis caapi*. (Fonte: GBIF).

Os diversos grupos sociais que fazem o uso da *ayahuasca* em seus rituais, reconhecem a bebida por diferentes nomes: *ayahuasca* no dialeto quéchua, na região central dos Andes, *yajé* nas partes média e alta dos afluentes do Amazonas, *cabí*, *capí*, *caapi* no Amazonas brasileiro, *natema* em jíbaro, *nepi* na costa equatoriana, *dapa* na costa colombiana, *pildé* na Colômbia e no Equador (Schultes 1957, Albuquerque 2012). Além de dar o nome a bebida, essas denominações podem se referir também ao nome do cipó (*B. caapi*) que é utilizado para o preparo. Sendo assim, são reconhecidos muitos tipos diferentes de cipó, com diferentes propriedades enteógenas e isso têm sido justificado como consequência de variantes químicas ou pode refletir os diferentes estágios de crescimento do cipó (Schultes 1974, Gates 1982, Langdon 1986).

### 1.3. Uso ritualístico e potencial terapêutico da *ayahuasca*

*Banisteriopsis caapi* é um dos principais ingredientes do chá *ayahuasca*. As investigações sobre o cipó da *ayahuasca* se iniciaram com os registros de Spruce que, em 1851, observou índios da tribo Tukano utilizando um cipó com o nome de *caapi* para o preparo de uma bebida enteógena e fez coletas de ramos reprodutivos dos mesmos cipós que eram utilizados para o preparo da bebida. Spruce identificou o cipó como *Banisteria caapi*. Em 1931, Morton reclassificou o gênero *Banisteria* para *Banisteriopsis*, então a espécie passou a ser classificada como *Banisteriopsis caapi*.

O uso do cipó para o preparo do chá *ayahuasca* com propósitos ritualísticos e terapêuticos pelas populações nativas datam pelo menos 300 anos (Samorini 2014) e esse uso vem permanecendo devido a expansão das religiões *ayahuasqueiras* que vem surgindo nos tempos modernos. As interações entre as civilizações colonizadoras e as populações nativas amazônicas geram uma fusão de costumes e estilos de vida que teve como uma de suas consequências movimentos religiosos sincréticos que combinam elementos do uso da *ayahuasca* indígena, o espiritualismo africano e a liturgia cristã (Tupper 2008). Entre esses grupos religiosos os principais são o CEBUDV (Centro Espírita Beneficente União do Vegetal) e o Santo Daime (Mckenna et al. 1998, MacRae 2004, Tupper 2008).

A fórmula mais difundida da bebida *ayahuasca* pelas populações nativas amazônicas é a decocção do cipó macerado de *B. caapi* (mariri/jagube) com folhas de *Psychotria viridis* Ruiz & Pav (chacrona/rainha). O cipó *B. caapi* contém em sua composição alcalóides pertencentes ao grupo das  $\beta$ -carbolinas (harmina, harmalina e tetrahidraharmina) e a espécie *P. viridis* possui em sua composição N,N-dimetiltriptamina

(DMT), que é considerado o principal agente enteógeno da bebida (Callaway et al. 2005). Quando essas duas plantas são combinadas para o preparo da bebida, elas têm efeitos dinâmicos de interação: os alcalóides presentes no cipó (as  $\beta$ -carbolinas) previnem a quebra do DMT no trato digestivo e atuam como inibidores da monoamina oxidase, permitindo que o DMT chegue até o sistema nervoso central (Callaway et al. 1999).

Na última década, aumentou o interesse nos potenciais efeitos terapêuticos da *ayahuasca* nos distúrbios neuropsiquiátricos, como depressão profunda e reabilitação de dependentes químicos (Samoylenko et al. 2010, Wang et al. 2010, dos Santos e Hallak 2019). A *ayahuasca* possui alcaloides que têm demonstrado efeitos positivos em tratamento de pacientes com depressão e ansiedade (Serrano-Dueñas et al. 2001, dos Santos e Hallak 2019).

#### **1.4. Diversidade da flora Amazônica e conservação de espécies**

A Amazônia abriga a maior extensão de floresta tropical do mundo e possui uma grande diversidade de espécies que há muito tempo atraem a atenção de cientistas e exploradores com o objetivo de entender a ecologia dessa rica biota, assim como sua origem e os processos evolutivos que criaram e agora mantêm suas comunidades hiperdiversas (Ter Steege et al. 2013, Cardoso et al. 2017, Dexter et al. 2017).

Entretanto, debates de longa data sobre o número e a identidade das espécies de plantas encontradas na região ainda permanecem sem solução (Hopkins 2007). A flora da Amazônia ainda é em grande parte subamostrada (Ter Steege et al. 2013), por isso há pouca informação disponível sobre a distribuição da diversidade de plantas. Estima-se que a bacia amazônica abrigue até 16000 espécies de plantas (Cardoso et al. 2017) e a inspeção de qualquer uma das recentes monografias botânicas de qualquer grupo amazônico revelará muitas espécies com distribuições aparentemente muito limitadas (Hopkins 2007).

Grandes lacunas geográficas e o pequeno número de coleções de herbários disponíveis para o estudo de muitas espécies impedem o mapeamento preciso das distribuições de plantas e conseqüentemente a identificação de regiões de endemismo (Hopkins 2007, Ter Steege et al. 2013), informações relevantes para estudos sobre a conservação da biodiversidade.

Os cipós são um grupo abundante e diversificado em florestas em todo o mundo, particularmente na região tropical (Schnitzer e Bongers 2002, Dewalt et al. 2014). Estudos das três últimas décadas revelaram a importância das lianas para dinâmica

florestal, como na diversidade de espécies, crescimento das árvores, sucessão florestal, funcionamento do ecossistema, entre outros (Burnham 2002, Schnitzer e Bongers 2002, Gerwing et al. 2006). No entanto, a compreensão atual da ecologia dos cipós e seu papel nos processos ecossistêmicos da floresta tem ficado bem atrás da maioria dos outros grupos de plantas vasculares (Schnitzer e Bongers 2002).

Percebe-se que as informações sobre diversidade, distribuição e ecologia para muitos grupos de espécies que compõe a flora amazônica ainda são escassas. Conhecer estes fatores é importante para propor estratégias de manejo eficientes para conservação das espécies. Até o momento não existe um trabalho que caracterize a diversidade de espécies de *Banisteriopsis* que são usadas para o preparo da *ayahuasca* no contexto religioso.

A grande diversidade encontrada na floresta amazônica faz dessa um verdadeiro banco natural de recursos genéticos. A manutenção da diversidade genética é um dos principais focos da biologia da conservação, já que é ela que fornece o potencial adaptativo/evolutivo de uma espécie. Por este motivo, o conhecimento da composição genética de uma espécie, e de como ela está organizada (estruturada) em suas populações, é fundamental para que as ações de manejo e conservação sejam adequadamente planejadas e eficientes (Kageyama 1987).

Os recursos genéticos vegetais compreendem plantas cultivadas e espécies silvestres com valor potencial ou comprovado, como é o caso do mariri. A manutenção desses recursos pode ocorrer por meio do estabelecimento de áreas de proteção ambiental e pela coleta e manutenção desse material, os quais passam a ser denominados de germoplasma (Kageyama 1987).

As estratégias de conservação de determinada espécie podem ser *in situ*, na qual são conservadas as populações de espécies nativas em seu ambiente natural onde há continuidade da evolução; *ex situ*, na qual é conservada a variação genética das espécies fora do seu habitat natural; *on farm*, complementar à conservação *in situ*, sendo uma das formas para a conservação da agrobiodiversidade, envolvendo recursos nativos e exóticos adaptados às condições locais, que estão em contínuo processo de seleção e de melhoramento pelas comunidades locais e populações nativas (Esquinas-Alcázar 2005).

O Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (CEBUDV) é considerado o maior grupo religioso responsável pelo cultivo de *Banisteriopsis caapi* no Brasil (Mckenna et al. 1998, Bernardino-Costa 2011). Segundo dados do censo do plantio de

2002, o CEBUDV possuía no Brasil cerca de 97 mil pés de *B. caapi* plantados em área total de aproximadamente 1500 hectares (ha) (Alto Falante, 2011).

Nesse contexto o referido centro vem realizando a conservação *in situ* do mariri. Alguns Núcleos do CEBUDV possuem terrenos onde ainda são encontrados mariri em ambiente natural e há um cuidado para que estes permaneçam nesse ambiente. Naturalmente, esses mariris também são utilizados para retirada de estacas ou sementes para serem posteriormente cultivados *ex situ*. Dessa forma também o CEBUDV vem realizando empiricamente medidas de conservação *in situ* e *ex situ*.

Entretanto, não existe até o momento estudos que caracterizem o germoplasma referente a esses cipós utilizados para o preparo do chá *ayahuasca*. Estudos de caracterização de germoplasma visam a conservação da diversidade genética. Caracterizar um germoplasma significa basicamente, identificar e descrever diferenças entre os espécimes (Kageyama 1987, Chiorato et al. 2006). Para isso, diferentes características são utilizadas, destacando-se as agronômicas, morfológicas, moleculares e genéticas. Independentemente das características utilizadas na caracterização, os resultados devem possibilitar, principalmente, a distinção das amostras.

Pela própria expansão do CEBUDV e de outros grupos sociais que usam *ayahuasca* em seus rituais e também pelo crescente desmatamento da Amazônia, existe um grande interesse em se conhecer a variabilidade genética das espécies que são usadas para o preparo da *ayahuasca*, para que a conservação dos recursos genéticos, através do cultivo de matrizes, seja mais eficiente e direcionada.

A caracterização molecular é possível devido ao desenvolvimento de métodos que usam marcadores moleculares baseados em polimorfismo ao nível de sequências de DNA. Esses métodos são ferramentas eficientes para caracterizar e avaliar recursos genéticos, especialmente para entender a diferenciação e organização da diversidade genética das populações e seu monitoramento ao longo do tempo (Kresovich et al. 1995).

### **1.5. Marcadores moleculares**

Uma marca genética, essencialmente pode ser classificada: com base visualmente em características avaliáveis (morfológicas e agronômicas, por exemplo); aquelas baseadas em produtos gênicos (marcadores químicos) e as que se baseiam em polimorfismo em nível de DNA (marcadores moleculares). Os marcadores moleculares têm exercido um papel fundamental em diversas áreas das ciências naturais, tais como:



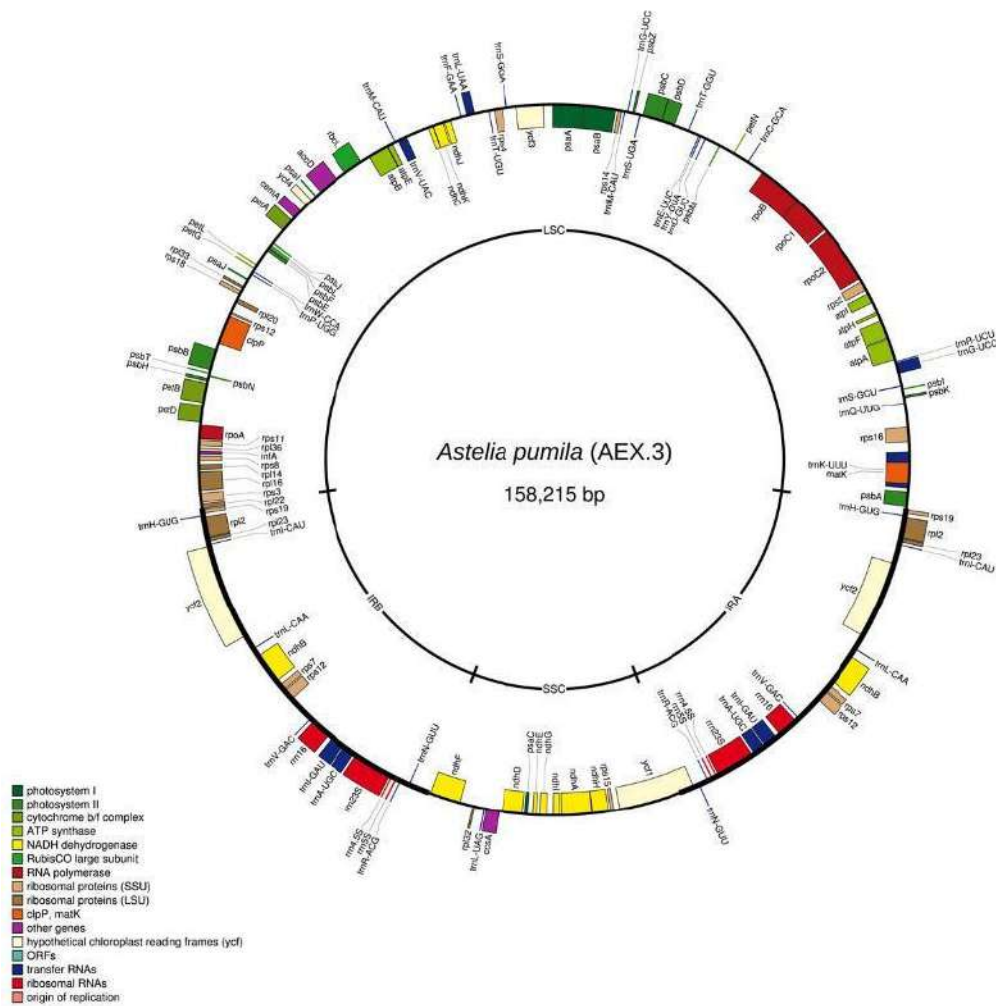
taxonomia, fisiologia, biologia das populações, ecologia comportamental, evolução de organismos, filogenia, conservação e manejo (Avice 1994, Souza 2015).

Atualmente existem diferentes técnicas da biologia molecular que permitem acessar e estimar a variabilidade existente no nível do DNA. O sequenciamento nucleotídico de regiões cloroplastidiais e nucleares são exemplos de marcadores bastante utilizados para análises filogenéticas, filogeográficas e diversidade genética populacional (Álvarez e Wendel 2003, CBOL Group et al. 2009, Li et al. 2011, Vivas et al. 2014).

A escolha das sequências de DNA mais apropriadas para responder uma questão em particular é um passo crítico em qualquer análise molecular. Se a região escolhida for muito conservada, isto é, se as sequências forem muito semelhantes entre si, as diferenças não serão suficientes para uma análise adequada. Por outro lado, regiões muito variáveis são difíceis para alinhar, além de gerarem alinhamentos questionáveis (Zhang e Hewitt 2003, CBOL Group et al. 2009).

Em espécies de plantas, a informação genética está contida em três genomas distintos: o mitocondrial, o cloroplastidial e o nuclear. O genoma mitocondrial possui herança uniparental é o que apresenta taxa de evolução mais lenta entre os três genomas, por isso é de pouca utilidade em estudos sobre a variabilidade genética de populações vegetais (Clegg et al. 1994, Zhang e Hewitt 2003, Braukmann et al. 2017).

O genoma do cloroplasto é uma molécula de DNA circular (Figura 4) e é um componente abundante do DNA celular total, sendo a principal fonte de marcadores moleculares para estudos comparativos em plantas (Shaw et al. 2007). Entretanto evolui 10 vezes mais lentamente que o DNA mitocondrial animal (que é a principal fonte de marcadores moleculares para estudos comparativos em animais) (Wolfe et al. 1987).



**Figura 4.** Organização estrutural do genoma do cloroplasto de *Astelia pumila* (G.Forst.) Gaudich. Os genes mostrados na parte externa do círculo externo são transcritos no sentido horário, enquanto os genes mostrados na parte interna são transcritos no sentido anti-horário. As posições das regiões grande (LSC) e pequena cópia única (SSC), bem como das repetições invertidas (IRs), são indicadas no círculo interno (Fonte: Pfanzelt et al. 2019).

Os marcadores do cloroplasto, assim como os mitocondriais, caracterizam-se pela frequente herança uniparental, que é uma vantagem destes marcadores para a avaliação diferencial do fluxo de pólen e sementes. Além disso pode permitir a detecção de híbridos, que podem não ser identificados somente através de análises morfológicas (Clegg et al. 1994, Provan et al. 2001, CBOL Group et al. 2009)

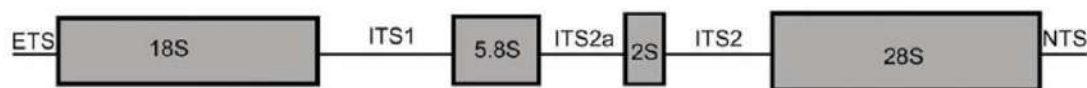
O genoma do cloroplasto de *Banisteriopsis caapi* foi recentemente sequenciado e caracterizado. As amostras foram obtidas no *U.S. Botanic Garden* (número de acesso 1989-0298). O genoma em questão possui o tamanho de 158473 pb, com um conteúdo de G+C de 36,8%. As repetições invertidas (IRs) de *B. caapi* são separadas por regiões

grandes de cópia única (LSC) e pequena cópia única (SSC) com tamanhos de 83602 pb e 18171 pb, respectivamente (Ramachandran et al. 2018).

Já os marcadores nucleares em plantas tendem a evoluir mais rapidamente (Braukmann et al. 2017). Uma alternativa de fonte de marcadores moleculares para acessar a variação intraespecífica em organismos não modelos, para os quais praticamente não existe informação de sequência (como é o caso do mariri), é o isolamento de marcadores moleculares nucleares, no qual uma biblioteca com DNA genômico é construída e os locos são aleatoriamente selecionados e obtidos por sequenciamento nucleotídico dos clones. Geralmente, esses marcadores encontram-se em regiões não codificadoras e são denominados marcadores nucleares anônimos, por serem regiões do genoma que são, *a priori*, desconhecidas (Thomson et al. 2010, Mine e Susumu 2012, Perez et al. 2016).

O marcador molecular *internal transcribed spacer* (ITS) é uma região do cistron ribossômico nuclear, que pode ser facilmente sequenciada a partir de diversas linhagens vegetais com o uso de *primers* universais (Lahaye et al. 2008, Li et al. 2015, Mishra et al. 2016).

Nos eucariontes, os genes que codificam o RNA ribossômico estão organizados em unidades repetidas em tandem agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas (White et al. 1990) (Figura 5). Cada unidade possui sequências codificadoras altamente conservadas e sequências intercalares que, em geral, variam dentro e entre populações. De forma geral, cada unidade de repetição do DNA ribossômico eucarionte consiste de: um espaçador externo (ETS - *external transcribed spacer*), transcrito em uma sequência que contém a extremidade 5' da molécula precursora do RNA ribossômico; uma região que codifica para o RNA ribossômico 18S; um espaçador interno que é transcrito (ITS1 - *internal transcribed spacer*); a região que codifica o RNA ribossômico 5.8S; outro espaçador interno (ITS2); uma região que codifica para o RNA ribossômico 25-28S e um espaçador externo (NTS - *non transcribed spacer*), que não é transcrito; as cópias das unidades de repetição do DNA ribossômico são separadas pelo espaçador não-transcrito (NTS). Os espaçadores reconhecem sinais para processar a transcrição do RNA ribossômico. A região dos espaçadores (ITS) apresenta uma alta taxa de divergência quando comparada com as sequências codificadoras dos RNA ribossômico 18S, 5.8S e 28S (Álvarez e Wendel 2003, Lahaye et al. 2008).



**Figura 5.** Esquema da organização do DNA ribossômico - marcador molecular ITS (*internal transcribed spacer*). Os blocos em cinza representam as regiões codificadoras, as linhas representam a região não-codificadora (ITS). Fonte: White et al. 1990 - adaptado

O problema inicial da região espaçadora ITS é o fato de ocorrer em múltiplas cópias no genoma nuclear, havendo uma potencial variação intragenômica (Álvarez e Wendel 2003). Entretanto, diversos estudos que procuraram estabelecer a filogenia fazendo o uso desse marcador molecular foram bem sucedidos. Esses espaçadores podem ser usados para inferir filogenia entre espécies próximas, para a identificação de espécies ou linhagens, para estudos de hibridização e como marcadores em genética populacional (Li et al. 2001, Lahaye et al. 2008, Nicolè et al. 2011, Mishra et al. 2016, Ren et al. 2019). No entanto pode não mostrar variação suficiente entre as espécies em alguns clados importantes de origem relativamente recente, como em algumas linhagens de plantas lenhosas (Pennington e Dick 2009, Mishra et al. 2016, Dexter et al. 2017).

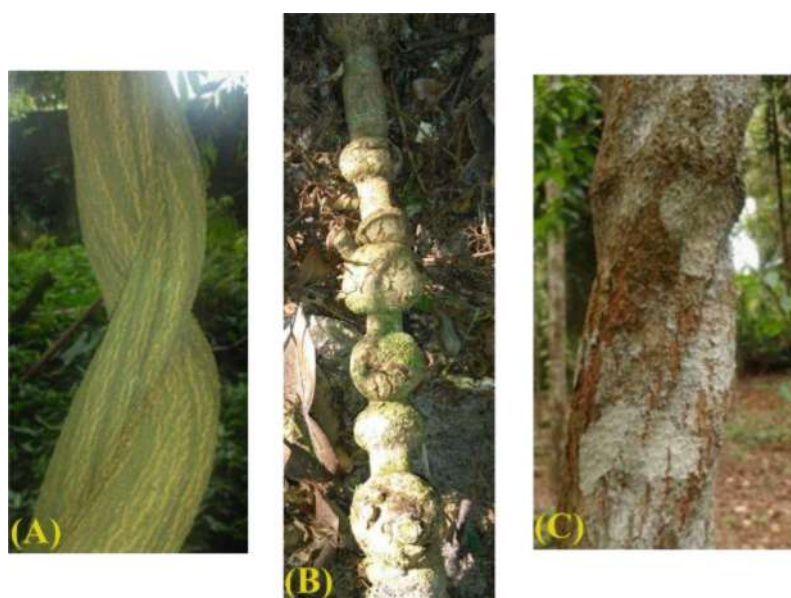
### **1.6. História taxonômica complexa em *Banisteriopsis caapi* e incertezas em relação a identificação de espécies de cipó que são usadas no preparo do chá *ayahuasca***

O histórico taxonômico de *Banisteriopsis caapi* desde sua descrição (Spruce, 1851) pode evidenciar a dificuldade de classificação da espécie, quando a mesma foi dividida em *B. quitensis* (Niedenzu 1900) e *B. inebrians* (Morton 1931), e novamente reagrupada em apenas uma espécie (*B. caapi*) na última revisão taxonômica (Gates 1982). Vale destacar a importante contribuição de Gates (1982) na revisão do gênero, no entanto, não amostrou *B. caapi* em toda sua área de distribuição, o que pode ter levado a subestimar a riqueza de espécies de *Banisteriopsis*.

Apesar de *B. caapi* ser a espécie tradicionalmente atribuída a bebida *ayahuasca*, há relatos de que *B. muricata* e outras espécies do gênero *Banisteriopsis* também sejam utilizados para o preparo do chá (Gates 1982, Schultes 1984, Schultes et al. 1992). Entretanto, devido à escassez de coleções férteis e carência de estudos taxonômicos detalhados, essas espécies não foram devidamente discriminadas e descritas (Langdon 1986, Wang et al. 2010). Langdon (1986) estudou 18 variedades de *Banisteriopsis* que são utilizados para o preparo da *ayahuasca* e classificou-as levando em consideração

caracteres morfológicos e os efeitos enteógenos referentes a cada planta; entretanto não foi possível identificar taxonomicamente todas as variedades descritas, pois somente seis dessas foram possíveis a coleta e cinco estavam em condições de serem identificadas e foram, como *B caapi*.

Os dirigentes mais conservadores do CEBUDV identificam duas variedades de *B. caapi* (mariri), que são distintas na morfologia do caule e apresentam diferenças nas concentrações de alcaloides, que causam diferentes sensações no corpo e na mente após a ingestão do chá; essas variedades são denominadas *tucunacá* e *caupuri* e são usadas para o preparo da *ayahuasca* (Callaway et al. 2005, Bernardino-Costa 2011). O mariri *tucunacá* têm um caule relativamente liso ou com fissuras nítidas, enquanto o mariri *caupuri* geralmente possui nós (Callaway et al. 1999). Porém, são conhecidas variedade de mariri *caupuri* que não possuem nós (Figura 6).



**Figura 6.** Diversidade morfológica do caule de mariri (*Banisteriopsis* cf. *caapi*) que são usados no preparo do chá *ayahuasca*. (A) caule de um mariri *tucunacá*; (B) caule de um mariri *caupuri* com nó; (C) caule de em mariri *caupuri* sem nó

Além das variedades *caupuri* e *tucunacá*, outros dirigentes reconhecem outras variedades, como *caupurizão*, *pajézinho*, *ourinho*, *amarelinho*, *fio de ouro*, entre outros. Além das diferenças já destacadas de fenótipos de caule entre *tucunacá* e *caupuri*, é possível também observar algumas diferenças entre os mariris, como o formato das glândulas e das folhas, tamanho das sementes e pubescência das folhas (Figura 7).



(A)



(B)



(C)

**Figura 7.** Variação nos mariris (*Banisteriopsis* cf. *caapi*). (A) diferença no tamanho das sementes; (B) diferença no formato da folha; (C) Variação na cor, quantidade e formato das glândulas foliares.

Outra característica relatada é a diferença de cor que as diferentes variedades podem proporcionar ao chá: geralmente quando a *ayahuasca* é preparada usando o mariri tucunacá ela apresenta uma cor marrom clara, e quando é preparada usando o mariri caupuri o chá apresenta uma cor marrom escura (Figura 8). A bebida preparada com *B. muricata* apresenta também um aspecto escuro, e por esse fato é conhecida como “*ayahuasca negro*” (Gates 1982, Schultes 1984, Schultes et al. 1992).





**Figura 8.** Diferentes cores do chá *ayahuasca* proporcionadas pelas diferentes variedades de mariri (*Banisteriopsis* cf. *caapi*). Da esquerda para direita: os dois primeiros são de mariri tucunacá e o terceiro é de mariri caupuri.

As imprecisões taxonômicas surgem, na maioria das vezes, da ausência de dados apropriados. Infelizmente, para muitos grupos de plantas tropicais, faltam revisões modernas e há poucos especialistas disponíveis. A descrição de muitas espécies é baseada em informações limitadas sobre a distribuição geográfica ou sobre um pequeno número de características (geralmente morfológicas), sendo os dados genéticos desconhecidos na maioria das vezes (Frankham et al. 2004).

Ainda, muitos grupos de plantas tropicais apresentam espécies crípticas e podem formar complexos de espécies, que são grupos cujos limites entre as espécies não são claros e, portanto, o número de espécies é incerto (Rosell et al. 2010, Duminil et al. 2012, Scotti-Saintagne et al. 2013). As consequências taxonômicas da variação morfológica críptica em complexos de espécies são: a sinonimização ou o agrupamento de espécies com sobreposição morfológica como uma única espécie (um potencial falso negativo para espécies), e a descrição de novas espécies baseada em variação morfológica intraespecífica de uma espécie já descrita (um potencial falso positivo), o último caso resultando em um número superestimado de espécies (Fujita et al. 2012).

Novas coleções e exames de espécimes já realizados em herbários globais levam ao reconhecimento de novas espécies e gêneros através de trabalhos monográficos taxonômicos detalhados (Sobral e Stehmann 2009, Cardoso et al. 2017). Devido ao fato da região amazônica ser subamostrada, é necessário o trabalho sinérgico por taxonomistas de plantas, ecólogos tropicais e parataxonomistas para completar a tarefa de explorar, descrever, revisar e mapear espécies de plantas ao longo da vasta extensão da floresta amazônica (Baker et al. 2017).

Como consequência de existirem os complexos de espécies, da subamostragem da flora amazônica e de muitos grupos de plantas tropicais ainda não serem muito estudados, muitos grupos são generalizados e podem conter, portanto, espécies ainda não descritas (Rosell et al. 2010). Esses diversos cenários somados com a melhoria das técnicas moleculares justificam o atual e contínuo estado de mudança da atual taxonomia das famílias e gêneros de espécies de plantas da Amazônia (Ter Steege et al. 2016).

### **1.7. Delimitação de espécies**

A precisão taxonômica sempre foi uma questão crucial para os conservacionistas que usaram ao longo do tempo análises genéticas que estavam ao alcance para o auxílio na delimitação de espécies, que é o ato de identificar a diversidade biológica no nível de espécie (Carstens et al. 2013). A categoria de espécies é uma unidade fundamental em biologia, e o desenvolvimento de medidas robustas e altamente replicáveis para identificar distintas linhagens evolutivas é um objetivo central da delimitação de espécies (De Queiroz 2007, Carstens et al. 2013).

Tradicionalmente, essa delimitação baseou-se apenas em caracteres morfológicos. No entanto, nos últimos anos, com o uso de ferramentas moleculares houve um aumento no número de métodos disponíveis para a delimitação de espécies (O'Meara 2010, Yang e Rannala 2010).

Durante o processo de formação das espécies (especiação), a diferenciação morfológica, especialização por habitat e evolução da distribuição geográfica são fatores intrínsecos que podem ser tanto consequência da divergência entre linhagens como também fatores promotores da divergência entre linhagens (Mayr 1992, De Queiroz 2007). Portanto, durante o processo de delimitação de espécies, uma dada espécie pode ser ou não reconhecida e classificada, dependendo do critério e do conceito de espécie adotado (De Queiroz 2007, Fujita et al. 2012).

Historicamente, muitas espécies têm sido descritas baseada em critérios como isolamento reprodutivo, monofilia, caracteres diagnósticos, e ecologia. Apesar das particularidades de cada um, implicitamente ou explicitamente todos eles relacionam espécies com linhagens evolutivas (Myers et al. 2000, De Queiroz 2007). Portanto, em razão de cada critério acessar um tipo diferente de informação sobre linhagens em divergência, múltiplas linhas de evidência são necessárias na delimitação de espécies (De Queiroz 2007).



Os estudos genéticos de populações, também devem levar em consideração a possibilidade de que algumas descontinuidades genéticas podem ser causadas por mecanismos de isolamento reprodutivo, e não por barreiras geográficas ou outras causas. Uma abordagem para lidar com a incerteza taxonômica é executar uma abordagem de 'genética populacional cega', na qual os métodos bayesianos de agrupamento e atribuição são usados para estimar o número de grupos genéticos distintos sem classificação taxonômica prévia (Duminil et al. 2012).

As árvores gênicas fornecem uma fonte valiosa de informação por inferir o padrão e os processos de diversificação. Foram propostos métodos bayesianos para delimitar espécies usando dados de sequência multiloco. Essas abordagens podem lidar com a incerteza de delimitação (Yang e Rannala 2010). A teoria coalescente fornece modelos poderosos para a inferência genética da população e agora é cada vez mais importante na pesquisa filogenética e na especiação. Ao aplicar modelos probabilísticos, a delimitação de espécies baseada em coalescência podem fornecer testes de hipóteses alternativas de independência evolutiva, podendo desempenhar um papel importante em uma taxonomia integrativa que enfatiza a identificação de limites de espécies e os processos que promoveram a diversificação de linhagens (De Queiroz 2007, Fujita et al. 2012).

O método *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC), é um método desenvolvido para delimitar espécies em evolução independente usando dados de locos único. "Evolução independente" significa que novas mutações que surgem em uma espécie não podem se espalhar prontamente para outra (De Queiroz 2007, Fujisawa e Barraclough 2013). O método GMYC baseia-se na previsão de que a evolução independente leva ao aparecimento de grupos genéticos distintos, separados por ramos internos mais longos. Os grupos genéticos são delimitados otimizando o conjunto de nós que definem as transições entre processos inter e intra-específicos. Como não se baseia em evidências adicionais para formular hipóteses de espécies, o método pode ser aplicado em casos em que não há dados adicionais com os quais inferir limites de espécies (Fujisawa e Barraclough 2013).

## **2. Justificativa**

A espécie *B. caapi* (mariri) é um cipó da família Malpighiaceae encontrada na floresta amazônica e também é o principal ingrediente do chá enteógeno, *ayahuasca*, que vem sendo usado durante séculos por populações nativas da Amazônia no Brasil, Peru,

Colômbia e Equador, com propósitos rituais, religiosos e terapêuticos (Schultes et al. 1992).

Desde 1930, a *ayahuasca* passou a ser utilizada por organizações religiosas sincréticas que tiveram origem na região Norte do Brasil, como o Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (CEBUDV), o Santo Daime e a Barquinha. Os grupos também usam o chá como sacramento e terapêuticamente. O CEBUDV e o Santo Daime estão presentes em todos os Estados brasileiros e também em alguns países europeus, nos Estados Unidos, Ásia e África (MacRae 2004, Labate e MacRae 2006).

*Banisteriopsis caapi* é uma espécie que apresenta grande potencial para aplicação médico-farmacêutica, por apresentar grande diversidade de metabólitos bioativos. Importantes pesquisas científicas têm demonstrado, que as substâncias químicas encontradas *B. caapi* podem ser usadas para a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo, o mal de Parkinson e o Alzheimer (Samoylenko et al. 2010, Wang et al. 2010, dos Santos e Hallak 2019).

Apesar de *B. caapi* ser a espécie tradicionalmente atribuída a *ayahuasca* há indícios que outras espécies (cipós da família Malpighiaceae) também sejam utilizadas no preparo do chá (Schultes et al. 1992). Além disso, são reconhecidas diferentes variedades do cipó que possuem diferenças na morfologia do caule e na sensação no corpo e na mente. Entretanto essas variedades não foram todas identificadas até o momento (Langdon 1986, Schultes et al. 1992, Callaway et al. 2005).

As incertezas no nível taxonômico para *B. caapi*, é devido a subamostragem de *Banisteriopsis* na Amazônia quando o gênero foi revisado (a espécie não foi amostrada em toda sua área de distribuição) (Gates 1982, Cameron et al. 2001, Davis e Anderson 2010). Além disso, a variação morfológica do caule, as diferenças observadas nas glândulas foliares e as diferentes sensações físicas relatadas, que são proporcionadas pelas diferentes variedades de cipó, são fatores que reforçam essas incertezas na classificação das espécies que são utilizadas para o preparo do chá *ayahuasca* e conseqüentemente quanto ao número real de espécies de *Banisteriopsis* que são usadas.

Pela própria expansão das religiões e pelo crescente desmatamento da Amazônia, existe um grande interesse em se conhecer o real número e a variabilidade genética das espécies que são usadas para o preparo da *ayahuasca*, para a conservação dos recursos genéticos, através do cultivo de matrizes.

Nesse contexto, o uso de marcadores moleculares pode auxiliar na identificação de linhagens genéticas que pode servir como base para futuras resoluções de incertezas

taxonômicas de *B. cf. caapi* utilizadas no contexto social/religioso. O uso de marcadores moleculares também pode auxiliar nos estudos sobre a diversidade genética, para que melhores estratégias de conservação e manejo dessa espécie possam ser desenvolvidas futuramente.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Delimitar linhagens genéticas de *Banisteriopsis cf caapi* que são utilizadas no preparo do chá *ayahuasca* coletadas em ambiente natural e de cultivo e estimar a diversidade genética das linhagens delimitadas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Isolar e caracterizar marcadores moleculares nucleares para *Banisteriopsis caapi*;
- Caracterizar marcadores moleculares do cloroplasto para *Banisteriopsis caapi*;
- Delimitar linhagens genéticas de *Banisteriopsis cf caapi* que são utilizadas no preparo do chá *ayahuasca*;
- Analisar a diversidade genética das linhagens genéticas de *B. cf caapi*.

## REFERÊNCIAS

- Albuquerque, M.B.B. 2012. Modalidades de usos e saberes do cipó Cabi. *Saculum - Revista de História* 27: 195–213.
- Alto Falante, 2011. "Alto Falante", *Veículo Informativo Oficial da Diretoria Geral da C.E.B.U.D.V.*, Janeiro, 10 p.
- Álvarez, I.; Wendel, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417–434.
- Anderson, W.R. 1979. Floral Conservatism in Neotropical Malpighiaceae. *Biotropica* 11: 219–223.
- Anderson, W.R. 1990. The Origin of the Malpighiaceae - The Evidence from Morphology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 64: 210–224.
- Anderson, W.R.; Davis, C.C. 2006. Expansion of *Diplopterys* at the Expense of *Banisteriopsis* (Malpighiaceae). *Harvard Papers in Botany* 11: 1–16.
- Anderson, W.R.; Davis, C.C. 2007. Generic Adjustments in Neotropical Malpighiaceae. *Contr. Univ. Michigan Herb.* 25: 137–166.
- Araújo, V.A.; Antonini, Y.; Araújo, A.P.A. 2006. Diversity of Bees and their Floral Resources at Altitudinal Areas in the Southern Espinhaço Range, Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Entomology* 35: 30–40.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Springer US, Boston, MA, .
- Baker, T.R.; Pennington, R.T.; Dexter, K.G.; Fine, P.V.A.; Fortune-Hopkins, H.; Honorio, E.N.; et al. 2017. Maximising Synergy among Tropical Plant Systematists, Ecologists, and Evolutionary Biologists. *Trends in Ecology and Evolution* 32: 258–267.
- Banisteriopsis* em Flora do Brasil 2020. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8803>>. Acesso em: 01 Set. 2019.
- Bernardino-Costa, J. 2011. *Hoasca: Ciência, Sociedade e Meio Ambiente*. Mercado de ed. Campinas, 360p.
- Braukmann, T.W.A.; Kuzmina, M.L.; Sills, J.; Zakharov, E. V.; Hebert, P.D.N. 2017. Testing the efficacy of DNA barcodes for identifying the vascular plants of Canada. *PLoS ONE* 12: 1–19.
- Burnham, R.J. 2002. Dominance, diversity and distribution of lianas in Yasuní, Ecuador: Who is on top? *Journal of Tropical Ecology* 18: 845–864.
- Callaway, J.C.; Brito, G.S.; Neves, E.S. 2005. Phytochemical Analyses of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*. *Journal of Psychoactive Drugs* 37: 145–150.
- Callaway, J.C.; Mckenna, D.J.; Grob, C.S.; Brito, G.S.; Raymon, L.P.; Poland, R.E.; et al. 1999. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology* 65: 243–256.
- Cameron, K.M.; Chase, M.W.; Anderson, W.R.; Hills, H.G. 2001. Molecular systematics of Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences. *American Journal of Botany* 88: 1847–1862.
- Cardoso, D.; Särkinen, T.; Alexander, S.; Amorim, A.M.; Bittrich, V.; Celis, M.; et al. 2017. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 10695–10700.
- Carstens, B.C.; Pelletier, T.A.; Reid, N.M.; Satler, J.D. 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22: 4369–4383.
- Chiorato, A.F.; Carbonell, S.A.M.; Dias, L.A. dos S.; Moura, R.R.; Chiavegato, M.B.;

- Colombo, C.A. 2006. Identification of common bean (*Phaseolus vulgaris*) duplicates using agromorphological and molecular data. *Genetics and Molecular Biology* 29: 105–111.
- Clegg, M.T.; Gaut, B.S.; Learn, G.H.; Morton, B.R. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 6795–6801.
- Davis, C.C.; Anderson, W.R. 2010. A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. *American Journal of Botany* 97: 2031–2048.
- Davis, C.C.; Anderson, W.R.; Donoghue, M.J. 2001. Phylogeny Malpighiaceae: evidence from chloroplast *ndhF* and *trnL-F* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 88: 1830–1846.
- Davis, C.C.; Bell, C.D.; Mathews, S.; Donoghue, M.J. 2002. Laurasian migration explains Gondwanan disjunctions: Evidence from Malpighiaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 6833–6837.
- Dewalt, S.J.; Schnitzer, S.A.; Alves, L.F.; Bongers, F.; Burnham, R.J.; Cai, Z.; et al. 2014. Biogeographical patterns of liana abundance and diversity. *Ecology of Lianas*: 131–146.
- Dexter, K.G.; Lavin, M.; Torke, B.M.; Twyford, A.D.; Kursar, T.A.; Coley, P.D.; et al. 2017. Dispersal assembly of rain forest tree communities across the Amazon basin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 2645–2650.
- Duminil, J.; Kenfack, D.; Viscosi, V.; Grumiau, L.; Hardy, O.J. 2012. Testing species delimitation in sympatric species complexes: The case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 275–285.
- Esquinas-Alcázar, J. 2005. Protecting crop genetic diversity for food security: Political, ethical and technical challenges. *Nature Reviews Genetics* 6: 946–953.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2004. *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press, .
- Fujisawa, T.; Barraclough, T.G. 2013. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology* 62: 707–724.
- Fujita, M.K.; Leaché, A.D.; Burbrink, F.T.; McGuire, J.A.; Moritz, C. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 27: 480–488.
- Gates, B. 1982. *Banisteriopsis, Diplopterys (Malpighiaceae)*. Flora Neot. New York Botanical Garden Press, 1–237p.
- Gerwing, J.J.; Schnitzer, S.A.; Burnham, R.J.; Bongers, F.; Chave, J.; DeWalt, S.J.; et al. 2006. A Standard Protocol for Liana Censuses. *Biotropica* 38: 256–261.
- Hollingsworth, P.M.; Forrest, L.L.; Spouge, J.L.; Hajibabaei, M.; Ratnasingham, S.; van der Bank, M.; et al. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12794–12797.
- Hopkins, M.J.G. 2007. Modelling the known and unknown plant biodiversity of the Amazon Basin. *Journal of Biogeography* 34: 1400–1411.
- Kageyama, P.Y. 1987. Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas. *IPEF* 35: 7–37.
- Kresovich, S.; Szewc-McFadden, A.K.; Bliet, S.M.; McFerson, J.R. 1995. Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theoretical and Applied Genetics* 91: 206–211.

- Labate, B.C.; MacRae, E. 2006. The Light from the Forest: The Ritual Use of Ayahuasca in Brazil. *Fieldwork in Religion* 2.
- Lahaye, R.; van der Bank, M.; Bogarin, D.; Warner, J.; Pupulin, F.; Gigot, G.; et al. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 2923–2928.
- Langdon, E.J. 1986. Las clasificaciones del yagé dentro del grupo Siona: etnobotánica, etnoquímica e historia. In: *América Indígena XLVI*, p.101–116.
- Li, D.-Z.; Gao, L.-M.; Li, H.-T.; Wang, H.; Ge, X.-J.; Liu, J.-Q.; et al. 2011. 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* 108: 19641–19646.
- Li, J.; Davis, C.C.; Tredici, P. Del; Donoghue, M.J. 2001. Phylogeny and biogeography of *Taxus* (Taxaceae) inferred from sequences of the *Internal Transcribed Spacer* region of nuclear ribosomal DNA. *Harvard Papers in Botany* 6: 267–274.
- Li, X.; Yang, Y.; Henry, R.J.; Rossetto, M.; Wang, Y.; Chen, S. 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews* 90: 157–166.
- Mabberley, D.J. 1997. *The Plant Book. A Portable Dictionary of the Higher Plants*. In: Press, C.U. (Ed.) 2nd ed. Wiley-VCH Verlag, 858p.
- MacRae, E. 2004. The ritual use of ayahuasca by three Brazilian religions. In: *Drug Use and Cultural Contexts 'beyond the West': Tradition, Change and Post-Colonialism*, p.27–45.
- Malpighiaceae em Flora do Brasil 2020. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB155>>. Acesso em: 01 Set. 2019
- Mamede, M.C.H.; Sebastiani, R.; Almeida, R.F.; Francener, A.; Amorim, A.M.A. 2015. *Malpighiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. .
- Martinelli, G.; Moraes, M.A. 2013. *Livro Vermelho da Flora Brasileira*. In: Andrea Jakobson, E. (Ed.) 1st ed. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 1100p.
- Mayr, E. 1992. A local flora and the biological species concept. *American Journal of Botany* 79: 222–238.
- Mckenna, D.J.; Callaway, J.C.; Grob, C.S. 1998. 10 . The Scientific Investigation of Ayahuasca: A Review of Past and Current Research. *The Heffter Review of Psychedelic Research* 1: 65–76.
- Mishra, P.; Kumar, A.; Nagireddy, A.; Mani, D.N.; Shukla, A.K.; Tiwari, R.; et al. 2016. DNA barcoding: An efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnology Journal* 14: 8–21.
- Morton, C. V. 1931. Botany - Notes on Yagé, a drug plant os southeastern Colombia. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 21: 485–488.
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nicolè, S.; Erickson, D.L.; Ambrosi, D.; Bellucci, E.; Lucchin, M.; Papa, R.; et al. 2011. Biodiversity studies in *Phaseolus* species by DNA barcoding. *Genome* 54: 529–545.
- Nieden zu, F. 1900. De genre Banisteria, parts 1 & 2. *Ind. Lect. Lyc. Brunsb.*
- O'Meara, B.C. 2010. New Heuristic Methods for Joint Species Delimitation and Species Tree Inference. *Systematic Biology* 59: 59–73.
- Ott, J. 1994. *Ayahuasca analogues: Pangaean entheogens*. 1st ed. Natural Books Co., Kennewick, WA, 127p.
- Pennington, R.T.; Dick, C.W. 2009. Diversification of the Amazonian flora and its

- relation to key geological and environmental events: a molecular perspective. : 1–13.
- Perez, M.F.; Carstens, B.C.; Rodrigues, G.L.; Moraes, E.M. 2016. Anonymous nuclear markers reveal taxonomic incongruence and long-term disjunction in a cactus species complex with continental-island distribution in South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 95: 11–19.
- Pfanzelt, S.; Albach, D.C.; von Hagen, K.B. 2019. Extremely low levels of chloroplast genome sequence variability in *Astelia pumila* (Asteliaceae, Asparagales). *PeerJ* 7: e6244.
- Provan, J.; Powell, W.; Hollingsworth, P.M.; Provan, J. 2001. Chloroplast microsatellites : new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 142–147.
- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic biology* 56: 879–886.
- Ramachandran, P.; Zhang, N.; McLaughlin, W.B.; Luo, Y.; Handy, S.; Duke, J.A.; et al. 2018. Sequencing the Vine of the Soul: Full Chloroplast Genome Sequence of *Banisteriopsis caapi*. *Genome Announcements* 6: 1–2.
- Ren, F.-M.; Wang, Y.-W.; Xu, Z.-C.; Li, Y.; Xin, T.-Y.; Zhou, J.-G.; et al. 2019. DNA barcoding of *Corydalis* , the most taxonomically complicated genus of Papaveraceae. *Ecology and Evolution* 9: 1934–1945.
- Rosell, J.A.; Olson, M.E.; Weeks, A.; De-Nova, J.A.; Lemos, R.M.; Camacho, J.P.; et al. 2010. Diversification in species complexes: Tests of species origin and delimitation in the *Bursera simaruba* clade of tropical trees (Burseraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 798–811.
- Samorini, G. 2014. Aspectos y problemas de la arqueología de las drogas sudamericanas. *Cultura y Droga* 19: 13–34.
- Samoylenko, V.; Rahman, M.M.; Tekwani, B.L.; Tripathi, L.M.; Wang, Y.; Khan, S.I.; et al. 2010. *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson’s disease. *Journal of Ethnopharmacology* 127: 357–367.
- dos Santos, R.G.; Hallak, J.E.C. 2019. Ayahuasca, an ancient substance with traditional and contemporary use in neuropsychiatry and neuroscience. *Epilepsy & Behavior*: 2–7.
- Schnitzer, S.A.; Bongers, F. 2002. The ecology of lianas and their role in forests. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 223–230.
- Schultes, R.E. 1957. The identity of the Malpighiaceae narcotics of the South America. *Botanical Museum Leaflets* 18: 1–56.
- Schultes, R.E. 1974. De plants toxicariis e o mundo novo tropicale commentationes X. *Botanical Museum Leaflets Harvard University* 23: 137–147.
- Schultes, R.E. 1984. Psychoactive plants in need of chemical and pharmacological study. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* 93: 281–304.
- Schultes, R.E.; Hofmann, A.; Ratsch, C. 1992. *Plants Of The Gods: their sacred, healing, and hallucinogenic powers*. Rochester, Healing Arts Press, .
- Scotti-Saintagne, C.; Dick, C.W.; Caron, H.; Vendramin, G.G.; Guichoux, E.; Buonamici, A.; et al. 2013. Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (*Carapa*, Meliaceae). *Journal of Biogeography* 40: 676–692.
- Serrano-Deñas, M.; Cardozo-Pelaez, F.; Sanchez-Ramos, J.R. 2001. Effects of *Banisteriopsis caapi* extract Parkinson’s disease. *The Scientific Review of Alternative Medicine* 5: 127–132.
- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Schilling, E.E.; Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies

- in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275–288.
- Sigris, M.R.; Sazima, M. 2004. Pollination and Reproductive Biology of Twelve Species of Neotropical Malpighiaceae: Stigma Morphology and its Implications for the Breeding System. *Annals of Botany* 94: 33–41.
- Sobral, M.; Stehmann, J.R. 2009. An analysis of new angiosperm species discoveries in Brazil. *TAXON* 58: 227–232.
- Souza, D.C.L. 2015. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 17: 495–503.
- ter Steege, H.; Pitman, N.C.A.; Sabatier, D.; Baraloto, C.; Salomao, R.P.; Guevara, J.E.; et al. 2013. Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora. *Science* 342: 1243092–1243092.
- Ter Steege, H.; Vaessen, R.W.; Cárdenas-López, D.; Sabatier, D.; Antonelli, A.; De Oliveira, S.M.; et al. 2016. The discovery of the Amazonian tree flora with an updated checklist of all known tree taxa. *Scientific Reports* 6: 1–15.
- Suharyanto; Nose, M.; Shiraishi, S. 2012. Characterization of 14 anonymous nuclear loci in *Pinus thunbergii* and their cross-species transferability. *Journal of Forestry Research* 23: 161–163.
- Taylor, D.W.; Crepet, W.L. 1987. Fossil floral evidence of Malpighiaceae and an early plant-pollinator relationship. *American Journal of Botany* 74.
- Thomson, R.C.; Wang, I.J.; Johnson, J.R. 2010. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology* 19: 2184–2195.
- Tupper, K.W. 2008. The globalization of ayahuasca: Harm reduction or benefit maximization? *International Journal of Drug Policy* 19: 297–303.
- Vivas, C.V.; César, R.; Moraes, S.; Alves-araújo, A.; Alves, M.; Mariano-neto, E.; et al. 2014. DNA barcoding in Atlantic Forest plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification? *Genetics and Molecular Biology* 670: 662–670.
- Vogel, S. 1974. Oil flowers and oil collecting bees (original: German). *Pflanzenwelt* 7: 1–267.
- Vogel, S. 1990. History of the Malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 130–142.
- Wang, Y.; Samoylenko, V.; Tekwani, B.L.; Khan, I.A.; Miller, L.S.; Chaurasiya, N.D.; et al. 2010. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology* 128: 662–671.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press Inc, p.315–322.
- Wolfe, K.H.; Li, W.H.; Sharp, P.M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 9054–9058.
- Yang, Z.; Rannala, B. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9264–9269.
- Zhang, D.-X.; Hewitt, G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular ecology* 12: 563–584.



**CAPÍTULO 1: Desenvolvimento e caracterização de marcadores moleculares nucleares e cloroplastidiais para o cipó *Banisteriopsis* cf. *caapi* (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton (Malpighiaceae), utilizados para o preparo do chá *ayahuasca***

**Resumo**

O chá *ayahuasca* é uma bebida enteógena utilizada por povos nativos da Amazônia em cerimônias de cura a pelo menos 300 anos. Seu uso vem se tornando globalizado com a expansão de grupos religiosos que usam o chá como sacramento e terapêuticamente. A bebida é preparada tradicionalmente fervendo, o cipó *Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton (mariri/jagube) macerado, com as folhas de *Psychotria viridis* Ruiz & Pav (chacrona/rainha). Existem variedades do cipó que apresentam diferenças: na morfologia do caule, nas cores das flores e nas concentrações de alcaloides. Estudos envolvendo marcadores moleculares podem contribuir para caracterização da diversidade genética das espécies. O presente estudo teve como objetivo isolar marcadores nucleares para *B. caapi*, e também a caracterização molecular referente a três genes do cloroplasto (*matK*, *ndhF* e *rcbL*) e três marcadores nucleares (dois destes isolados no presente estudo e o ITS). Foram usadas 19 amostras de cipós utilizados no preparo do chá *ayahuasca* na referida caracterização. Foram sintetizados 10 pares de *primers*, sendo que 08 foram amplificados para as 19 amostras. Foram recuperados um total de 4586 pares bases (pb) para os seis marcadores selecionados para as análises de diversidade genética. As análises das sequências dos marcadores moleculares do cloroplasto identificaram as 19 espécies como sendo do gênero *Banisteriopsis*, mas não resultaram em polimorfismos e índices de diversidade suficientes entre as amostras para acessar a variação genética do cipó utilizado no preparo do chá *ayahuasca*. Por outro lado, os marcadores nucleares apresentaram os maiores índices de diversidade genética e mostraram-se promissores para futuros estudos moleculares da espécie.

## 1. Introdução

A documentação etnográfica e etnohistórica indica que o consumo de plantas enteógenas desempenha um papel importante na cultura das populações nativas americanas (Schultes et al. 1992, Ogalde et al. 2009). Dos diversos enteógenos vegetais utilizados pelas populações indígenas da Amazônia, talvez nenhum seja tão interessante ou complexo botanicamente, quimicamente ou etnograficamente, como a bebida enteógena conhecida como *ayahuasca* (Mckenna et al. 1998, Fotiou 2019). Tradicionalmente, a bebida é resultado da decocção do cipó da família Malpighiaceae, conhecido popularmente como mariri ou jagube [*Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton] macerado com as folhas do arbusto de *Psychotria viridis* Ruiz & Pav da família Rubiaceae (Samorini 2014), popularmente conhecida como chacrona ou rainha. Desde a chegada dos primeiros europeus à Amazônia ocidental, o uso da *ayahuasca* por populações nativas americanas foi documentado por missionários e viajantes (Schultes 1986).

A palavra *ayahuasca* é um nome de origem *quéchua*, uma língua nativa da região andina. A palavra é usada para descrever o chá, mas também pode designar o próprio cipó (*B. caapi*). *Banisteriopsis caapi* é, portanto, o principal ingrediente do chá enteógeno que vem sendo usado durante séculos por grupos nativos dos países do noroeste da Amazônia, como Brasil, Peru, Colômbia e Equador, com propósitos ritualísticos, religiosos e terapêuticos (Schultes 1992).

Desde 1930, a *ayahuasca* passou a ser utilizada por organizações religiosas sincréticas que tiveram origem na região Norte do Brasil, como o Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (CEBUDV), o Santo Daime e a Barquinha. Os grupos usam o chá como sacramento e terapeuticamente. O CEBUDV e o Santo Daime estão presentes em todos os Estados brasileiros e também em alguns países europeus, nos Estados Unidos, Ásia e África (Labate e Feeney 2011, dos Santos e Hallak 2019). Pela própria expansão das religiões e pelo crescente desmatamento da Amazônia, existe um grande interesse em se conhecer a variabilidade genética das espécies que são usadas para o preparo da *ayahuasca*, para a conservação dos recursos genéticos, através do cultivo de matrizes.

Para que haja a manutenção adequada da diversidade genética das espécies é necessário estimar, caracterizar e avaliar a variabilidade genética em populações nativas

e em plantios disponíveis, com a finalidade de identificar possíveis populações que contenham maior variabilidade (Azevedo 2010).

O uso de métodos, envolvendo marcadores moleculares, aplicados a estudos genéticos de populações de plantas de diferentes áreas geográficas, já se mostraram capazes de identificar as áreas geográficas de sua difusão antrópica (Motamayor et al. 2002, Arroyo-García et al. 2006). A técnica de identificação molecular usando o DNA *barcode* emprega as variações das sequências em regiões genéticas padronizadas como uma ferramenta para discriminar espécies (Hebert et al. 2003, Casiraghi et al. 2010).

O pressuposto para a efetividade do DNA *barcode* é de que as divergências intraespecíficas sempre sejam menores que as interespecíficas, o que se chama de *barcode gap*. Para isso as regiões de DNA escolhidas para ser *barcode* em estudos genéticos devem conter variabilidade e divergência genéticas significativas em nível de espécies (Hebert et al. 2003). É fundamental determinar esses intervalos de variação intra e interespecífica entre os diferentes grupos taxonômicos (Čandek e Kuntner 2015). Esse método mostra-se promissor, porque, além de contribuir para identificação de espécies através do uso de uma, ou até mesmo várias regiões de DNA, podem também contribuir para a descoberta de novas espécies ou elucidação de espécies crípticas para a caracterização da diversidade genética (Hebert et al. 2003, Kress et al. 2005, Lahaye et al. 2008, Hollingsworth et al. 2009, Liu et al. 2011, 2012, Ji et al. 2013, Huemer et al. 2014, Zhang et al. 2015).

Algumas regiões nos genomas cloroplastidiais e nucleares foram propostas inicialmente para o método de DNA *barcode*, estudos populacionais e filogenéticos para plantas (Hollingsworth et al. 2009, Yan et al. 2015, Ren et al. 2019). O genoma do cloroplasto pode ser dividido em três categorias: genes codificadores de proteínas, introns e espaçadores intergênicos. Os dois últimos não codificam proteínas (Shaw et al. 2007).

Porções dos genes de codificação plastidial incluindo o *rbcL* (ribulose-1,5-bisfosfato) e *matK* (maturase K) foram sugeridas como as regiões centrais para estabelecer um banco de dados para espécies de plantas (Hollingsworth et al. 2009). O gene plastidial *matK*, com em torno de 1500 pb, é um gene codificador de *maturase* localizado no intron de *trnK*; o *rbcL* é um gene que é responsável pela produção da ribulose-1,5-bisfosfato (Clegg et al. 1994), possuindo vantagens como facilidade de amplificação, sequenciamento e alinhamento de sequências de DNA na maioria dos grupos de plantas (Mishra et al. 2016) com tamanho em torno de 1400 pb; o *ndhF* (desidrogenase F; 1800 pb) codifica uma subunidade do complexo de nicotinamida

desidrogenase. Os três marcadores cloroplastidiais citados (*matK*, *rbcL* e *ndhF*) são eficientemente utilizados em sistemática molecular para elucidação da taxonomia nos níveis de gênero e família (Davis e Anderson 2010, Vivas et al. 2014, Palhares et al. 2015, Braukmann et al. 2017, Mezzasalma et al. 2017, Ren et al. 2019). No entanto, para alguns grupos com possíveis divergências recentes, esses marcadores não se mostram eficientes para separar espécies do mesmo gênero (Nicolè et al. 2011, Ren et al. 2019).

Nesses casos os marcadores moleculares do genoma nuclear são mais prováveis de terem polimorfismos suficientes para serem analisados em níveis intraespecíficos. O ITS (espaçador interno transcrito nuclear), também foi uma região proposta para *barcode* para alguns grupos (Li et al. 2011, Mishra et al. 2016) devido a sua alta taxa de substituição de nucleotídeos que permite comparações em nível de espécie, um nível no qual poucos genes forneceram caracteres suficientes para a análise filogenética (Stanford et al. 2000, Palhares et al. 2015, Braukmann et al. 2017, Mezzasalma et al. 2017).

Outra alternativa de fonte de marcadores moleculares para acessar a variação intraespecífica possível em organismos não modelos, para os quais praticamente não existe informação de sequência, é o isolamento de marcadores moleculares nucleares, no qual uma biblioteca genômica é construída com DNA e os locos são aleatoriamente selecionados e obtidos por sequenciamento de clones. Geralmente, esses marcadores encontram-se em regiões não codificantes e são denominados marcadores nucleares anônimos, por serem regiões do genoma que são, *a priori*, desconhecidas (Thomson et al. 2010, Mine e Susumu 2012, Perez et al. 2016).

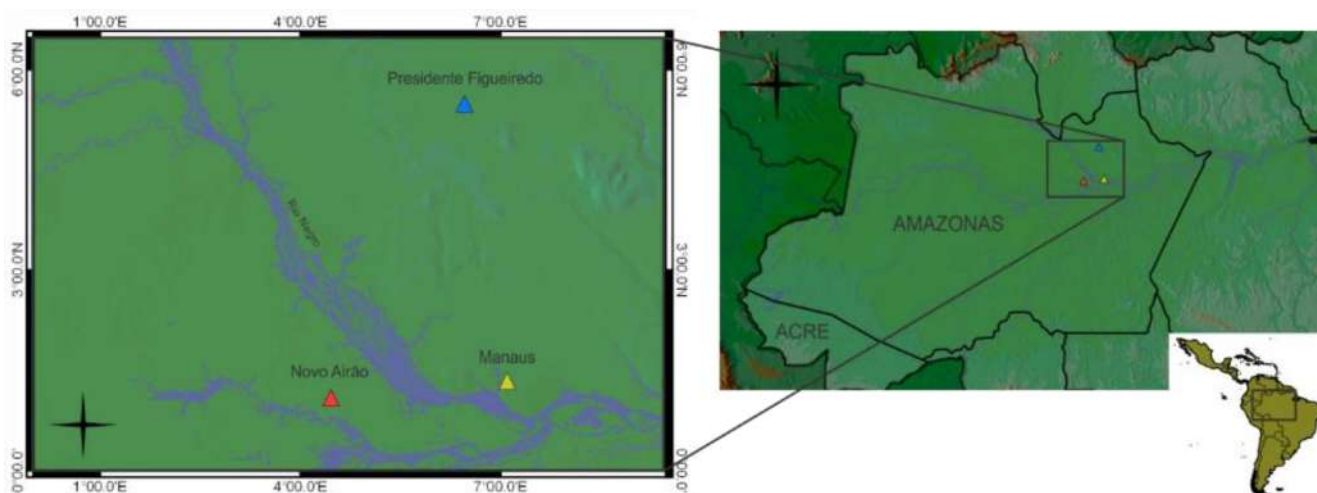
Estudos anteriores relacionados a filogenia da família Malpighiaceae, a qual inclui o gênero de *Banisteriopsis caapi*, usaram dados moleculares como uma das ferramentas para auxiliar na resolução das relações entre gêneros e espécies que pertencem a essa família botânica. Além de dados de morfologia, foi usado um marcador nuclear (PHYC) e regiões do cloroplasto que incluem as regiões *matK*, *rbcL*, *ndhF* (Cameron et al. 2001, Davis et al. 2001, Davis e Anderson 2010). No entanto, apenas uma amostra de *B. caapi* foi utilizada nas análises em somente um destes estudos (Davis e Anderson 2010), sem considerar as diferentes variedades usadas para o preparo do chá *ayahuasca*.

Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo o isolamento de marcadores moleculares anônimos por meio do desenvolvimento de uma biblioteca genômica para *B. cf. caapi*, assim como a caracterização molecular referente a três genes do cloroplasto e três marcadores nucleares em amostras de 19 espécimes de cipó de ambiente natural e cultivado que são utilizados no preparo do chá *ayahuasca*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostragem e Extração de DNA

As coletas de amostras de 19 cipós (*Banisteriopsis cf. caapi*) utilizados para o preparo do chá *ayahuasca* foram realizadas entre os anos de 2017 e 2018, em três municípios do Estado do Amazonas: Manaus, Novo Airão e Presidente Figueiredo (Figura 1). Em Manaus as coletas aconteceram em três plantios de três núcleos (Núcleo Mestre Vicente Marques, Núcleo Mestre Angílio e Núcleo Flor do Norte) do Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (CEBUDV) totalizando 14 amostras. Para as coletas desses plantios foram priorizadas diferentes variações morfológicas do caule do cipó (Figura Suplementar 1). Em Presidente Figueiredo (4 amostras) e em Novo Airão (1 amostra) as coletas foram realizadas em ambiente natural juntamente com dirigentes do CEBUDV, detentores do conhecimento tradicional dos cipós que são usados para o preparo do chá *ayahuasca* no contexto religioso. Para as análises moleculares as amostras de câmbio, folha ou casca do cipó (*B. cf. caapi*) foram armazenadas em recipientes contendo sílica gel e posteriormente armazenadas no freezer. Para amostras de ambiente natural foram coletadas também 10 pedaços de cipós de cada indivíduo para o cultivo nos plantios dos núcleos do CEBUDV.



**Figura 1.** Mapa destacando os municípios no Estado do Amazonas de coleta de amostras de *Banisteriopsis cf. caapi* que foram utilizadas no presente estudo.

O DNA genômico foi extraído de 120 mg de material vegetal submetido a maceração em um disruptor celular *Bead Beater* (Biospec Products) com o auxílio de 2 esferas (*beads*) de 5 mm, seguindo o protocolo de extração de tecidos vegetais CTAB

(brometo de cetiltrimetilamônio; Doyle e Doyle 1987) com adição de acetato de sódio, modificado por Oliveira et al. (2017).

A integridade e concentração do DNA extraído das amostras foram verificadas em gel de agarose (1% p/v) por comparação com padrões de massa molecular conhecida do DNA do bacteriófago *lambda* corados com Diamond™ *Nucleic Acid Dye* (Promega) e posteriormente analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultra pura e padronizadas a uma concentração de 20 ng/μL.

## **2.2. Desenvolvimento da biblioteca genômica**

A biblioteca genômica de DNA foi construída para *Banisteriopsis caapi*, a partir de uma amostra da etnovarietade *tucunacá* (fenótipo sem nó), cultivada no Núcleo Mestre Angílio (Manaus – AM), de acordo com o protocolo descrito por Billotte et al. (1999). O DNA plasmidial de 96 clones foi extraído de acordo com Green e Sambrook (2012). Para o sequenciamento foram utilizados os *primers* T7 e SP6, juntamente com o Kit *Big Dye terminator v3.1* seguindo as recomendações do fabricante. Para a edição das sequências de DNA e formação dos *contigs* foi utilizado o programa SeqScape® *Software v2.7* (Applied Biosystems). As sequências foram submetidas ao BLASTn na base de dados de sequências do NCBI para checagem e confirmação das regiões anônimas do DNA, como também para checagem da presença de regiões codificadoras de proteínas. O desenho dos *primers* foi realizado com o auxílio do programa Primer3 *web version 4.0.0* (Koressaar e Remm 2007, Untergasser et al. 2012).

## **2.3. Amplificação e sequenciamento de marcadores de DNA nuclear e do cloroplasto**

Para o DNA nuclear foram usados três marcadores: espaçador interno transcrito (ITS) e dois marcadores nucleares resultantes da biblioteca genômica construída no presente estudo. Foram selecionados também três marcadores do cloroplasto: maturase K (*matK*), ribulose-1,5-bisfosfato (*rbcL*) e desidrogenase F (*ndhF*), esses marcadores foram selecionados por existirem disponíveis no NCBI sequências de espécies de *Banisteriopsis* que foram usadas para comparação com o banco de dados de sequências do cloroplasto obtido nesse estudo.

As reações de PCRs (*polymerase chain reactions*) aconteceram em um volume final de 17 μL com 2 μL de DNA genômico, 4,7 μL de água ultra pura, 1,5 μL de tampão

para PCR 10x (Thermo Scientific) , 2  $\mu$ L de  $MgCl_2$  25 mM, 3  $\mu$ L de dNTP's 1 mM, 0,3  $\mu$ L de Taq 5 U/ $\mu$ L, 1,5  $\mu$ L BSA (*Bovine Serum Albumin*) 10x, 1  $\mu$ L de cada *primer* (*forward* e *reverse*). Para o *rbcL* foram usados os *primers* *rbcL-1F* e *rbcL-1367R* e para o *matK* foram usados os *primers* *trnK-2R* e *matK-400F* (Tabela 1). A PCR foi realizada em um termociclador Veriti® *Thermal Cycler* (ThermoFisher) seguindo as ciclagens referenciadas na Tabela 1.

Os produtos de PCRs foram purificados usando um kit de purificação GFX™ (GE Healthcare) e visualizados em gel de agarose a 1% (p/v) corado com Diamond™ *Nucleic Acid Dye* (Promega). As reações de sequenciamento nucleotídico foram realizadas de acordo com Platt et al. (2007) usando o Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Para os marcadores *rbcL* e *matK* foram utilizados também *primers* internos para as reações de sequenciamento, o *rbcL-636F*, *rbcL-724R* e *matK-400F* (Tabela 1). O sequenciamento nucleotídico foi realizado no analisador de DNA 3130xl *Genetic Analyzer* (ThermoFisher).

**Tabela 1.** Marcadores moleculares e respectivos *primers*, selecionados para a caracterização genética de cipós de *Banisteropsis cf. caapi*.

<b>Marcador Molecular</b>	<b>Nome do primer</b>	<b>Sequência dos primers 5'-3'</b>	<b>Termociclagem</b>	<b>Referência</b>
ITS	ITS-5 <sup>a</sup>	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG	94°C 2 min, [35 ciclos: 94°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 2 min] 72°C 5 min	Stanford et al (2000).
	ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		White et al (1990).
MP3	MP3-kinaseF	CCACGCATATAACCGTGAGA	98°C 45 seg, [35 ciclos: 98°C 10 seg, 56°C 1 min, 72°C 40 seg] 72°C 10 min	Biblioteca genômica
	MP3-kinaseR	CCGCACACAACCTCCATGA		
<i>yage5</i>	<i>yage5</i> -F	CAGAGCCTCTATATGATGTCACC	68°C 1 min, [35 ciclos: 93°C 30 seg, 56°C 40 seg, 72°C 1 min] 72°C 8 min	Biblioteca genômica
	<i>yage5</i> -R	CACGACCGATACGGGCTA		
<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> -1F	ATGTCACCACAAACAGAAAC	80°C 30 seg, [35 ciclos: 95°C 1 min, 58°C 1 min, 65°C 2 min] 65°C 10 min	Cameron et al (2001)
	<i>rbcL</i> -636F	GCGTTGGAGAGATCGTTTCT		
	<i>rbcL</i> -724R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC		
	<i>rbcL</i> -1367R	CTTTCCAAATTTTACAAGCAGCA		
<i>matK</i>	<i>trnK</i> -2R( <i>matk</i> )	AACTAGTCGGATGGAGTAG	95°C 1 min, [35 ciclos: 95°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 2 min] 72°C 10 min	Cameron et al (2001)
	<i>matK</i> -400F	CCCTAATTTACGATCAATTCATTCAAT		
	<i>matK</i> -842F	GATCCTTTCATACATTATGT		
<i>ndhF</i>	<i>ndhF</i> -5.5F	TTAGTRAYAGTYGGTTGTATTCACC	80°C 30 seg, [35 ciclos: 95°C 1 min, 58°C 1 min, 65°C 2 min] 65°C 10 min	Davis et al (2001)
	<i>ndhF</i> -10.2R	CCATCRATNACTCGYCYATCAAAAA		



## 2.4. Análise dos dados

Para edição das sequências dos marcadores nucleares e do cloroplasto foi usado o programa SeqScape® *Software* v2.7 (Applied Biosystems). Para o alinhamento das sequências foi utilizado o programa MAFFT v7.307 (Katoh e Standley 2013). Para os marcadores nucleares, os sítios heterozigotos das sequências foram codificados de acordo com os códigos de ambiguidade IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Para a definição da fase dos alelos dos indivíduos heterozigotos, foi usado o programa PHASE v2.1.1 (Stephens et al. 2001) com o auxílio da ferramenta *on-line* SeqPHASE (Flot 2010). Devido a dificuldade em conseguir ramos reprodutivos para identificação morfológica floral das amostras que foram coletadas para as análises, as sequências dos marcadores do cloroplasto (*matK*, *rbcL* e *ndhF*) foram submetidas a análise no BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al. 1990) na base de dados de sequências do NCBI para a identificação no nível de gênero.

Após a edição e alinhamento das sequências, foram calculados índices de diversidade genética com o auxílio do programa DnaSP 6.0 (Rozas et al. 2017). Foram construídas árvores filogenéticas pelo método *Neighbor-Joining* (NJ) usando o modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P) no MEGA X (Kumar et al. 2018) e também pelo método de *Maximum Likelihood* (ML) no RaxML v8.2.10 (Stamatakis 2014). A confiabilidade de cada nó das análises de NJ e ML foram estimadas pelo método de *bootstrap* com 1000 réplicas (Felsenstein 1985). As redes de haplótipos foram geradas no programa HAPLOVIEWER (Salzburger et al. 2011) com base nas sequências de DNA e nas árvores de ML.

Foram identificados grupos de acordo com os clados que foram recuperados na topologia das árvores filogenéticas. As distâncias genéticas foram calculadas para cada marcador: entre todos os indivíduos (distância genética intraespecífica), entre os clados e entre os indivíduos de um clado (distância genética intraespecífica do clado). Essas distâncias foram calculadas usando o modelo de distância Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura 1980) com suporte de *bootstrap* com 1000 replicações no programa MEGA X (Kumar et al. 2018).

### 3. Resultados

#### 3.1. Biblioteca genômica

A partir dos 96 clones da biblioteca genômica de DNA, foram obtidas sequências com boa qualidade de 53 clones que variaram entre 570 a 1004 pb e destes, 52 foram sequências nucleotídicas de clones não redundantes. Foram usadas 10 sequências para desenhar 10 pares de *primers*. O BLASTn das sequências desses 10 clones identificou sete regiões anônimas do DNA (os marcadores dessas regiões foram nomeados como *yage1*, *yage2*, *yage3*, *yage4*, *yage5*, *yage6*, *yage7*) e três regiões que apresentaram homologia com regiões codificadoras de proteína (Tabela 2).

**Tabela 2.** Informações da análise BLASTn de três clones utilizados para a síntese dos *primers* testados que foram obtidos na biblioteca genômica desenvolvida para *Banisteriopsis cf. caapi*, que apresentaram homologia com regiões codificadoras de proteína.

Sequência do clone	Número do acesso	Porcentagem de identidade	Região identificada
MP1-SSR	XM_012988973.1	76,02%	proteína <i>K02A2.6-like</i>
MP2-31-like	XM_016024177.2	91,53%	proteína <i>31 like</i>
MP3-kinase	XM_006339966.2	87,00%	proteína <i>kinase</i>

Dos 10 pares de *primers*, oito geraram amplificações para todas as amostras. Destes marcadores, dois (*yage5* e MP3-kinase) foram selecionados para as análises de diversidade genética em razão da alta qualidade das sequências de DNA. Os outros seis marcadores foram altamente polimórficos, identificados pela alta frequência de bases sobrepostas observadas nas sequências nucleotídicas, revelando assim necessidade de clonagem para obtenção de sequências de DNA de boa qualidade.

#### 3.2. Análises dos marcadores nucleares

Os três marcadores nucleares ITS, MP3-kinase e *yage5* resultaram em 1514 pb (523 pb, 425 pb e 566 pb, respectivamente). O ITS e o *yage5* resultaram em 15 e 21 haplótipos, respectivamente e foram os marcadores que obtiveram os maiores índices de diversidade entre os marcadores analisados nesse estudo (Tabela 3). Para esses marcadores o número de sítios polimórficos variou entre 10 (MP3-kinase) a 170 (ITS), a diversidade haplotípica foi de 0,784 (MP3-kinase) a 0,966 (*yage5*), a diversidade

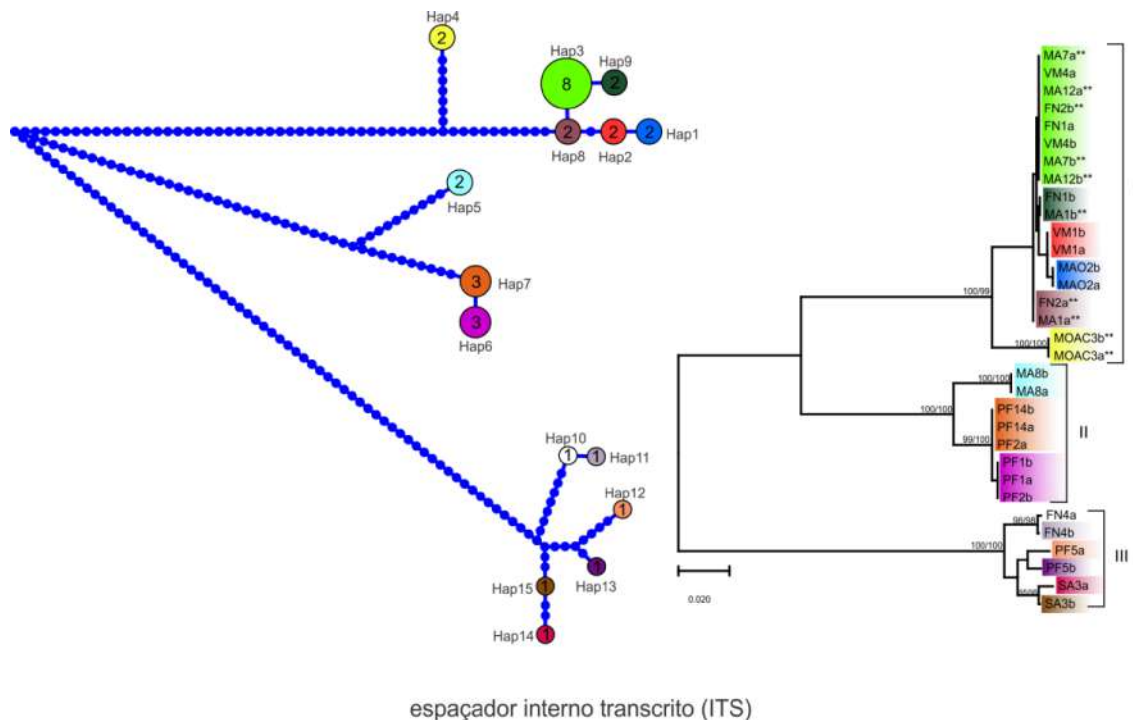
nucleotídica obteve valores variando de 0,0035 (MP3-kinase) a 0,1172 (ITS), com número de *indels* (inserções ou deleções) variando de 1 (MP3-kinase) a 6 (ITS).

**Tabela 3.** Índices de diversidade genética para *Banisteriopsis cf. caapi* obtidos a partir da sequência nucleotídica de seis marcadores moleculares.

Marcadores	Tamanho em pb	N	S	ETA	h	Hd	Pi	I
ITS	523	16	170	187	15	0,919	0,1172	6
MP3	425	18	10	10	12	0,784	0,0035	1
<i>yage5</i>	566	14	58	58	21	0,966	0,0357	5
<i>rbcL</i>	1295	19	1	1	2	0,526	0,0004	0
<i>matK</i>	1090	19	3	3	3	0,649	0,0008	0
<i>ndhF</i>	687	19	3	3	4	0,696	0,0015	0

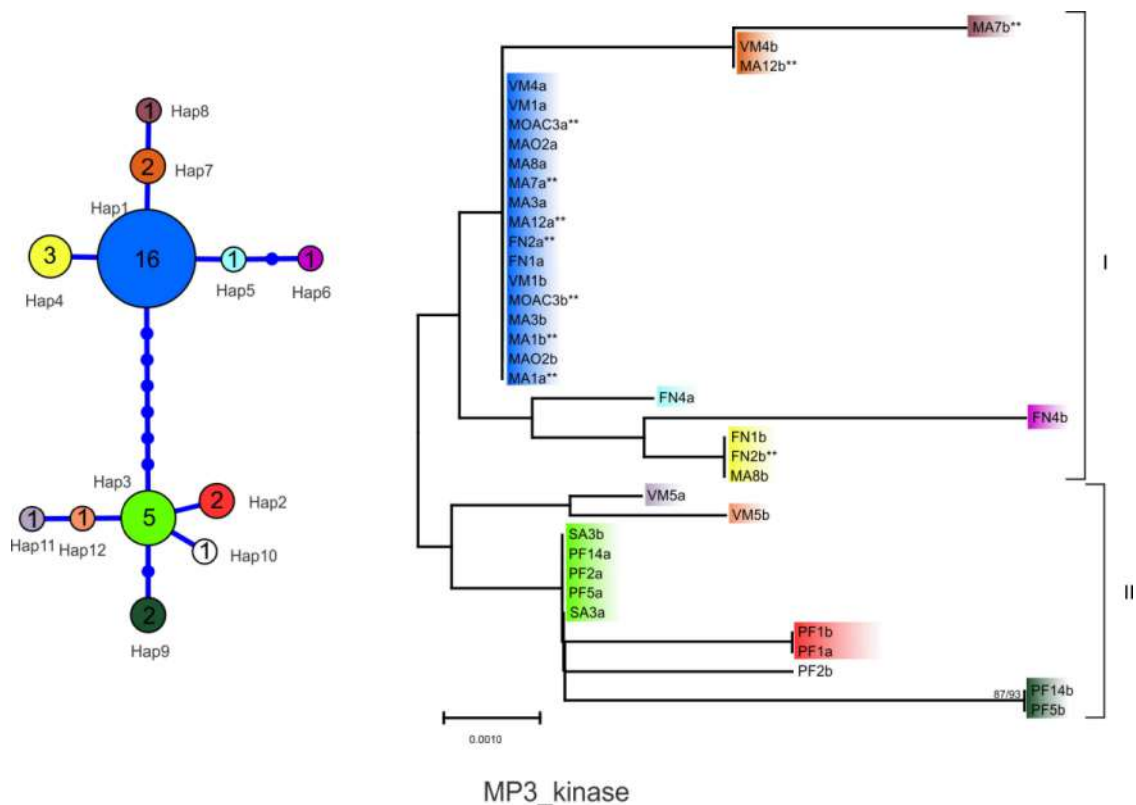
**N** = número de amostras sequenciadas, **S** = sítios polimórficos, **ETA** = número total de mutações, **h** = número de haplótipos, **Hd** = diversidade haplotípica, **Pi** = diversidade nucleotídica, **I** = indels.

A rede gerada com as sequências de DNA do marcador ITS foi a que obteve o maior número de passos mutacionais entre os haplótipos (Figura 2). A árvore resultante desse marcador recuperou mais de 3 clados com suporte de *bootstrap* 100. O clado I possui o maior número de alelos e na rede de haplótipos está representado pelos haplótipos 1, 2, 3, 4, 8 e 9. O clado II é representado pelos haplótipos 5, 6 e 7. A média da distância genética entre os clado I e II é de 0,1712. A representação do clado III é dada pelos haplótipos 10, 11, 12, 13, 14 e 15. A distância genética estimada entre os clados II e III e entre os clados I e III foi de 0,2654 e 0,2852 respectivamente. A média da distância genética intraespecífica foi de 0,1574. Os valores das distâncias genéticas intraespecíficas do clado I foi de 0,0110, do clado II 0,0172 e do clado III 0,0232.



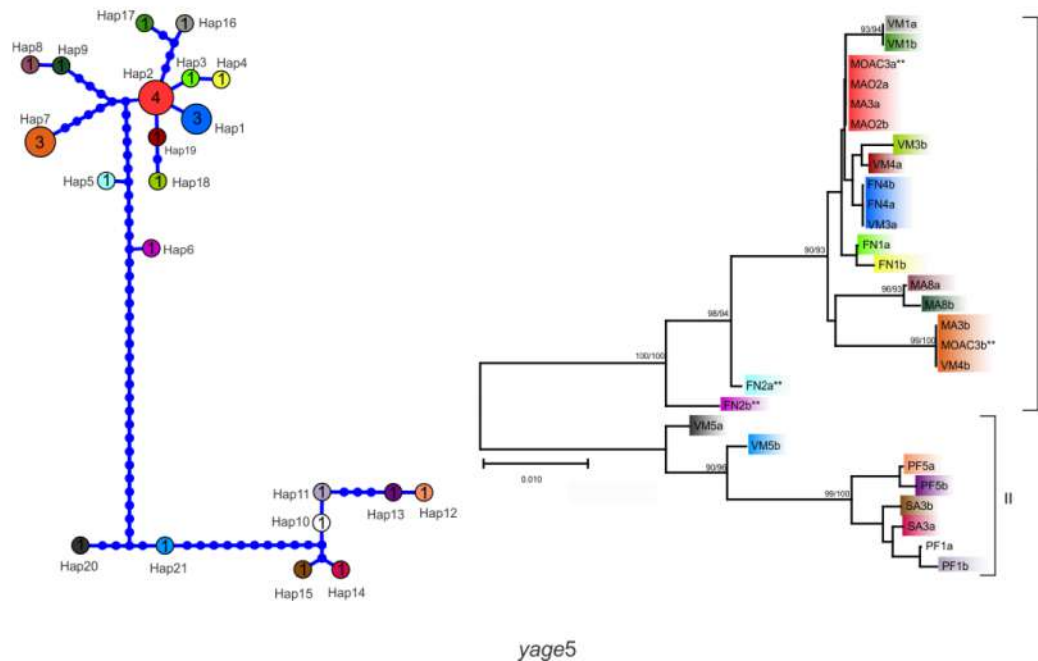
**Figura 2.** Rede de haplótipos do marcador nuclear ITS e a respectiva árvore filogenética de 16 amostras de cipós *Banisteriopsis* cf. *caapi* com suporte de *bootstrap* para *Neighbor-Joining* (NJ)/*Maximum Likelihood* (ML). Os clados usados para as estimativas de distância genética entre os grupos são indicadas pelos colchetes e pelos algarismos romanos. As amostras seguidas por \*\* indicam alelos de indivíduos que apresentam fenótipo com nó. Na rede de haplótipos cada círculo representa um haplótipo e possui a informação da frequência de cada um dos haplótipos, que estão representados da mesma cor na árvore filogenética.

As relações evolutivas resultantes da análise NJ e ML obtidas para o marcador MP3-kinase resultou em uma árvore apresentando os clados I e II (Figura 3). O clado número I representa os haplótipos 1, 4, 5, 6, 7 e 8 e todos os alelos inclusos são representados por amostras que foram coletadas nos Núcleos da UDV. Os alelos inclusos no clado II são de amostras que foram coletadas em ambiente natural, além de incluir uma amostra de cultivo coletada no Núcleo Mestre Vicente Marques. O clado II é representado pelos haplótipos 2, 3, 9, 10, 11 e 12. As relações evolutivas obtidas pela árvore e a rede de haplótipos geradas são informações concordantes, visto que os alelos que compõe o clado I está a 7 passos mutacionais do conjunto de alelos que compões o clado II. A distância genética entre o clado I e II para o marcador MP3-kinase foi de 0,0049 e média da distância genética intraespecífica foi de 0,0035. A média da distância genética calculada entre os alelos do clado I foi de 0,0020 e para o clado II foi de 0,0037.



**Figura 3.** Rede de haplótipos do marcador nuclear MP3-kinase e a árvore filogenética de 18 amostras de cipós *Banisteriopsis* cf. *caapi* com suporte de *bootstrap* para *Neighbor-Joining* (NJ)/*Maximum Likelihood* (ML). Os clados usados para as estimativas de distância genética entre os grupos são indicadas pelos colchetes e pelos algarismos romanos. As amostras seguidas por \*\* indicam alelos de indivíduos que apresentam fenótipo com nó. Na rede de haplótipos cada círculo representa um haplótipo e possui a informação da frequência de cada um dos haplótipos, que estão representados da mesma cor na árvore filogenética.

A topologia da árvore obtida para o marcador *yage5* apresentou dois clados (Figura 4). O clado I é representado na rede pelos haplótipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 19 e possuem os alelos das amostras que foram coletadas nos núcleos. Assim como foi para o MP3-kinase, os alelos inclusos no clado II são de amostras que foram encontradas em ambiente natural, além de incluir uma amostra de cultivo coletada no Núcleo Mestre Vicente Marques. A distância genética entre os clados I e II com base no K2P foi de 0,0740 e média da distância genética intraespecífica foi de 0,0376. A média da distância genética calculada entre os alelos do clado I foi de 0,0103 e para o clado II foi de 0,0140.

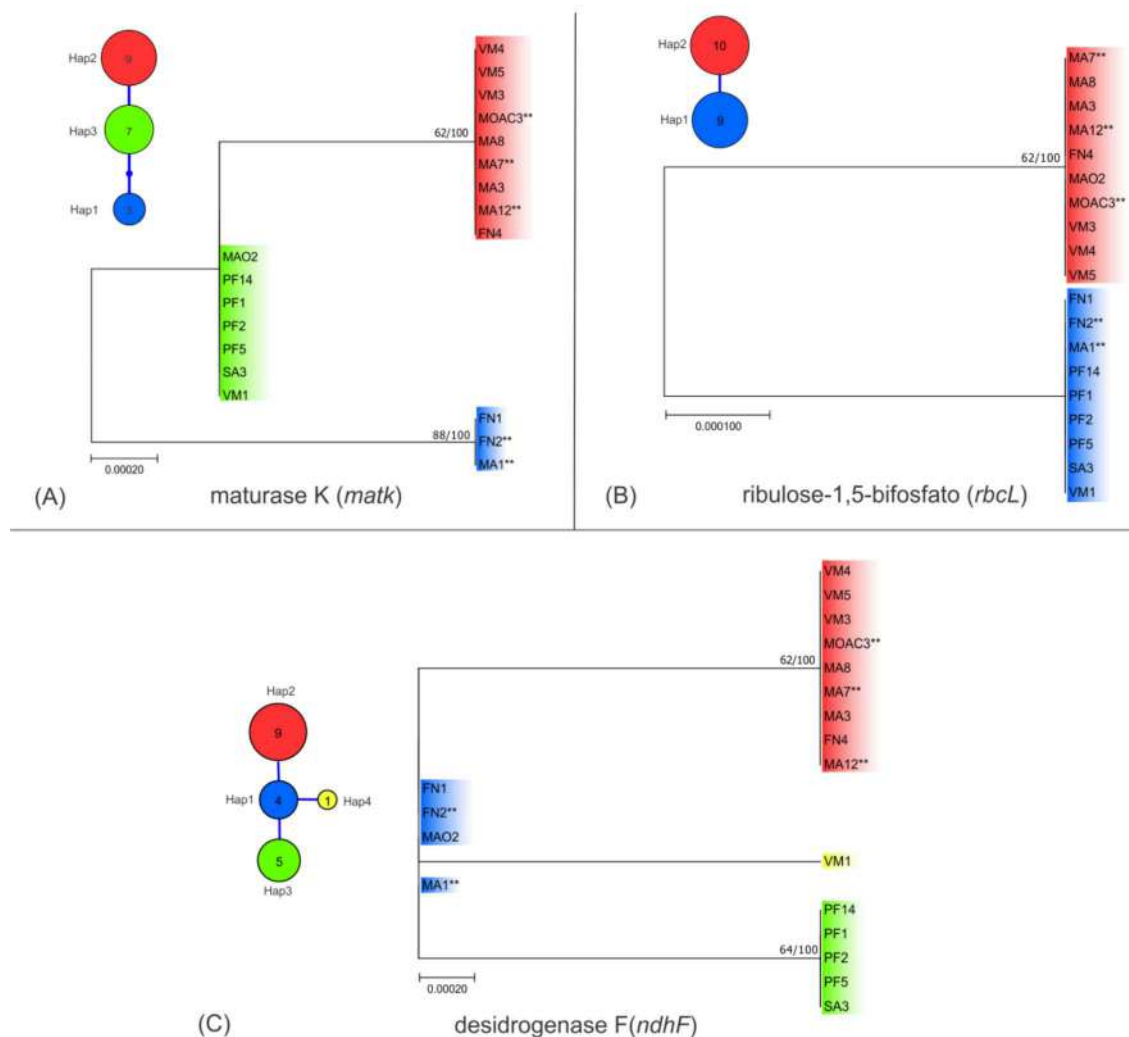


**Figura 4.** Rede de haplótipos do marcador nuclear *yage5* e a árvore filogenética de 14 amostras de cipós *Banisteriopsis* cf. *caapi* com suporte de *bootstrap* para *Neighbor-Joining* (NJ)/*Maximum Likelihood* (ML). Os clados usados para as estimativas de distância genética entre os grupos são indicadas pelos colchetes e pelos algarismos romanos. As amostras seguidas por \*\* indicam alelos de indivíduos que apresentam fenótipo com nó. Na rede de haplótipos cada círculo representa um haplótipo e possui a informação da frequência de cada um dos haplótipos, que estão representados da mesma cor na árvore filogenética.

### 3.3. Análises dos marcadores do cloroplasto

Os três marcadores do cloroplasto *rbcL*, *matK* e *ndhF* resultaram em 3072 pb (1295 pb, 1090 pb e 687 pb, respectivamente). No entanto, resultaram nos menores índices de diversidade genética quando comparados com os marcadores nucleares (Tabela 3). Sequências de DNA dos referidos marcadores foram geradas a partir do DNA genômico de 19 indivíduos, sendo que o número de sítios polimórficos foi de 1 (*rbcL*) a 3 (*matK* e *ndhF*), com número de haplótipos variando de 2 (*rbcL*) a 4 (*ndhF*) (Tabela 3 e Figura 5), com diversidade haplotípica variando de 0,526 (*rbcL*) a 0,696 (*ndhF*). A maior diversidade nucleotídica foi de 0,0015 (*ndhF*). Com base nas árvores de NJ e ML para esses três marcadores não foi possível observar clados que fossem bem suportados com as duas análises, apenas para o *matK* foi possível observar um *bootstrap* de 88 para o método NJ e de 100 para o ML para três amostras (duas do Núcleo Flor do Norte e uma do Núcleo Mestre Angílio). Nenhum dos três marcadores cloroplastidiais apresentaram *indels*. A média das distâncias genéticas estimada para cada um dos três marcadores apresentaram os menores valores (0,0004 para *rbcL*, 0,0008 para o *matk* e 0,0015 para o

*ndhF*) e por isso não foram calculadas as distâncias entre os clados identificados pela filogenia. A análise do BLASTn para esses marcadores considerando todas as 19 amostras, teve correspondência com o gênero *Banisteriopsis* (Tabela Suplementar 1, 2 e 3).



**Figura 5.** Rede de haplótipos dos marcadores do cloroplasto e as respectivas árvores filogenéticas de 19 amostras de cipós *Banisteriopsis cf. caapi* com suporte de *bootstrap* para *Neighbor-Joining* (NJ)/*Maximum Likelihood* (ML). Os clados usados para as estimativas de distância genética entre os grupos são indicados pelos colchetes e pelos algarismos romanos. As amostras seguidas por \*\* indicam indivíduos que apresentam fenótipo com nó. Na rede de haplótipos cada círculo representa um haplótipo e possui a informação da frequência de cada um dos haplótipos, que estão representados da mesma cor na árvore filogenética.

#### 4. Discussão

Os marcadores nucleares em plantas tendem a evoluir mais rapidamente (Braukmann et al. 2017) e apresentaram os maiores índices de diferenciação e diversidade

genética nas amostras de *B. cf. caapi* analisadas no presente estudo, principalmente o marcador ITS, que resultou numa distância média intraespecífica de 0,1574 com 170 sítios polimórficos e apresentou 15 haplótipos em 16 amostras analisadas. Os índices de diversidade genética encontrados referentes as análises dos marcadores nucleares desenvolvidos na biblioteca genômica tiveram valores altos quando comparados com os marcadores do cloroplasto (Tabela 3).

As diferentes pressões seletivas que atuam nas diferentes regiões gênicas, pode estar relacionadas com a função biológica que a região gênica exerce na regulação das funções celulares. Os marcadores anônimos são geralmente regiões não codificadoras, e por isso possuem uma alta taxa de substituição, tornando-os informativas para análises de níveis taxonômicos mais baixos (Thomson et al. 2010). O marcador MP3-kinase, que apresentou homologia com a região codificadora do complexo de proteína *kinase*, resultou em menores índices de diversidade genética quando comparada com o marcador nuclear anônimo *yage5*. Apesar do MP3-kinase ter resultado em menores índices de diversidade genética, foi geneticamente mais variável de que os marcadores do cloroplasto.

As regiões do genoma do cloroplasto possuem taxas relativamente lentas de substituição de nucleotídeos, pois possuem herança uniparental, o que não permite o agrupamento das sequências por recombinação (Clegg et al. 1994, Provan et al. 2001, Kaila et al. 2016). O gene *rbcL*, que codifica a grande subunidade da RuBisCo, tem um papel essencial na fotossíntese e está sob forte seleção purificadora em plantas autotróficas o que implica em uma baixa taxa de evolução molecular e limita sua utilidade para distinguir espécies relacionadas. O *matK* é um intron maturase envolvido no *splicing* dos introns do grupo IIa, e está sob seleção purificadora relaxada (Braukmann et al. 2017).

A análise BLASTn de todas as 19 amostras para os três marcadores do cloroplasto tiveram correspondência com o gênero *Banisteriopsis*. Apesar dos baixos índices de diversidade genética dos marcadores do cloroplasto, os mesmos se mostraram adequados para a identificação molecular no nível de gênero para as amostras de mariri utilizadas no preparo do chá *ayahuasca*. No entanto, foi observado que não foram eficientes para as análises de diversidade genética no nível intraespecífico para *B. cf. caapi*.

O marcador molecular nuclear ITS é uma região proposta para *barcode* em alguns grupos de plantas (Mishra et al. 2016). Os limiares de divergência genética entre espécies precisam ser estabelecidos para os diferentes grupos taxonômicos levando em consideração fatores como a distribuição geográfica e também o tempo de geração ou



regime de dispersão da espécie, que podem causar alterações nas taxas de evolução molecular ou na extensão da subdivisão populacional (Hebert et al. 2003, Čandek e Kuntner 2015). Sendo assim, um valor limiar de distância genética padrão, não é uma regra para a identificação de todas as espécies. Os resultados de distância genética considerando o marcador molecular ITS apresentaram valores de 0,027 até 0,047 entre espécies de *Cyperus* (Mezzasalma et al. 2017). O valor de distância genética deste marcador nuclear encontrados entre as amostras de cipó no presente trabalho resultou em uma média de 0,157 e também foi superior quando comparado com os valores de distância genética entre espécies de *Phaseolus* e entre espécies de *Cercis*. Com base no ITS foi observado 0,06 de distância genética entre *P. lunatus* e *P. coccineus*, e de 0,02 entre *C. canadensis* var. *mexicana* e *C. glabra* (Coşkun e Parks 2009, Nicolè et al. 2011). Neste sentido, os limiares de distância genética entre os clados recuperados no presente estudo para a espécie *B. cf. caapi* foi maior do que poderia se esperar e apresentaram valores de até 0,28 de distância genética, considerando o marcador molecular ITS.

Há uma grande diversidade fenotípica entre os caules do mariri nas amostras coletadas em ambiente de cultivo (Figura Suplementar 1). Por outro lado, as cinco amostras coletadas em ambiente natural possuem o fenótipo do cipó bem semelhantes entre si (Figura Suplementar 2). Em resumo, nas filogenias recuperadas referentes aos três marcadores nucleares os clados contém a maioria de amostras coletadas em ambiente de cultivo (amostras com fenótipos do caule diferentes) ou a maioria das amostras coletadas em ambiente natural (fenótipos de caule semelhantes entre si) (Figuras 2, 3 e 4).

Neste sentido, as distâncias genéticas intraespecíficas calculadas referente aos clados que possuem a maioria das amostras coletadas em cultivos (amostras com maior diversidade fenotípica de caule) apresentaram menores valores (0,011 para o ITS, 0,002 para o MP3-kinase e 0,010 para o *yage5*) quando comparados com as distâncias genéticas intraespecíficas calculadas dos outros clados (0,017 e 0,023 para o ITS, 0,003 para o MP3-kinase e 0,014 para *yage5*) que na sua maioria estão representadas por amostras coletadas em ambiente natural (com fenótipos semelhantes).

## 5. Conclusão

Este é o primeiro trabalho que avalia o uso de marcadores moleculares para o estudo de diversidade genética de *Banisteriopsis cf. caapi* (mariri/jagube). As análises das sequências dos marcadores moleculares do cloroplasto (*matK*, *rbcL* e *ndhF*), não

resultaram em polimorfismos e índices de diversidade suficientes entre as amostras para acessar a variação genética do cipó utilizado no preparo do chá *ayahuasca*. Entretanto, os mesmos se mostraram adequados para a identificação molecular no nível de gênero para as amostras de mariri. Os marcadores nucleares (ITS, MP3-kinase e *yage5*) mostraram-se promissores para o acesso a diversidade genética de *B. cf. caapi* e podem ser usados para futuros estudos que envolvam não somente a diversidade genética, mas também a identificação de diferentes linhagens genéticas com a finalidade de propor estratégias para sua conservação e manejo.

## REFERÊNCIAS

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Arroyo-García, R.; Ruiz-García, L.; Bolling, L.; Ocete, R.; López, M.A.; Arnold, C.; et al. 2006. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology* 15: 3707–3714.
- Azevedo, V.C.R. 2010. *Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Caracterização Molecular*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF, 1–17p.
- Billotte, N.; Lagoda, P.J.L.; Risterucci, A.M.; Baurens, F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits (Paris)* 54: 277–288.
- Braukmann, T.W.A.; Kuzmina, M.L.; Sills, J.; Zakharov, E. V.; Hebert, P.D.N. 2017. Testing the efficacy of DNA barcodes for identifying the vascular plants of Canada. *PLoS ONE* 12: 1–19.
- Callaway, J.C.; Brito, G.S.; Neves, E.S. 2005. Phytochemical Analyses of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*. *Journal of Psychoactive Drugs* 37: 145–150.
- Cameron, K.M.; Chase, M.W.; Anderson, W.R.; Hills, H.G. 2001. Molecular systematics of Malpighiaceae: evidence from plastid *rbcL* and *matK* sequences. *American Journal of Botany* 88: 1847–1862.
- Čandek, K.; Kuntner, M. 2015. DNA barcoding gap: Reliable species identification over morphological and geographical scales. *Molecular Ecology Resources* 15: 268–277.
- Casiraghi, M.; Labra, M.; Ferri, E.; Galimberti, A.; de Mattia, F. 2010. DNA barcoding: A six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics* 11: 440–453.
- Clegg, M.T.; Zurawski, G. 1992. Chloroplast DNA and the Study of Plant Phylogeny: Present Status and Future Prospects BT - Molecular Systematics of Plants. In: Soltis, P.S.; Soltis, D.E.; Doyle, J.J. (Eds.), Springer US, Boston, MA, p.1–13.
- Clegg, M.T.; Gaut, B.S.; Learn, G.H.; Morton, B.R. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 6795–6801.
- Coşkun, F.; Parks, C.R. 2009. A molecular phylogenetic study of red buds (*Cercis* L., Fabaceae) based on ITS nrDNA sequences. *Pakistan Journal of Botany* 41: 1577–1586.
- Davis, C.C.; Anderson, W.R. 2010. A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. *American Journal of Botany* 97: 2031–2048.
- Davis, C.C.; Anderson, W.R.; Donoghue, M.J. 2001. Phylogeny Malpighiaceae: evidence from chloroplast *ndhF* and *trnL-F* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 88: 1830–1846.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*: 11–15.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *39*: 783–791.
- Flot, J.F. 2010. Seqphase: A web tool for interconverting phase input/output files and fasta sequence alignments. *Molecular Ecology Resources* 10: 162–166.
- Fotiou, E. 2019. Technologies of the Body in Contemporary Ayahuasca Shamanism in the Peruvian Amazon: Implications for Future Research. *Human Ecology* 47: 145–151.

- Green, M.R.; Sambrook, J. 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, .
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; DeWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hollingsworth, P.M.; Forrest, L.L.; Spouge, J.L.; Hajibabaei, M.; Ratnasingham, S.; van der Bank, M.; et al. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12794–12797.
- Huemer, P.; Karsholt, O.; Mutanen, M. 2014. DNA barcoding as a screening tool for cryptic diversity: An example from *Caryocolum*, with description of a new species (Lepidoptera, Gelechiidae). *ZooKeys* 404: 91–111.
- Ji, Y.; Ashton, L.; Pedley, S.M.; Edwards, D.P.; Tang, Y.; Nakamura, A.; et al. 2013. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology letters* 16: 1245–1257.
- Kaila, T.; Chaduvla, P.K.; Saxena, S.; Bahadur, K.; Gahukar, S.J.; Chaudhury, A.; et al. 2016. Chloroplast Genome Sequence of Pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) and *Cajanus scarabaeoides* (L.) Thouars: Genome Organization and Comparison with Other Legumes. *Frontiers in Plant Science* 7: 1–16.
- Katoh, K.; Standley, D.M. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16: 111–120.
- Koressaar, T.; Remm, M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23: 1289–1291.
- Kress, W.J.; Wurdack, K.J.; Zimmer, E.A.; Weigt, L.A.; Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 8369–8374.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549.
- Labate, B.C.; Feeney, K. 2011. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: Implications and challenges. *International Journal of Drug Policy* 23: 154–161.
- Lahaye, R.; van der Bank, M.; Bogarin, D.; Warner, J.; Pupulin, F.; Gigot, G.; et al. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 2923–2928.
- Li, D.-Z.; Gao, L.-M.; Li, H.-T.; Wang, H.; Ge, X.-J.; Liu, J.-Q.; et al. 2011. 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* 108: 19641–19646.
- Liu, J.; Provan, J.; Gao, L.; Li, D. 2012. Sampling Strategy and Potential Utility of Indels for DNA Barcoding of Closely Related Plant Species: A Case Study in *Taxus*. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 8740–8751.
- Liu, J.; Möller, M.; Gao, L.M.; Zhang, D.Q.; Li, D.Z. 2011. DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus* L., Taxaceae) and the discovery of cryptic species. *Molecular Ecology Resources* 11: 89–100.
- Mckenna, D.J.; Callaway, J.C.; Grob, C.S. 1998. 10 . The Scientific Investigation of Ayahuasca: A Review of Past and Current Research. *The Heffter Review of*

- Psychedellic Research* 1: 65–76.
- Mezzasalma, V.; Bruni, I.; Fontana, D.; Galimberti, A.; Magoni, C.; Labra, M. 2017. A DNA barcoding approach for identifying species in Amazonian traditional medicine: The case of Piri-Piri. *Plant Gene* 9: 1–5.
- Mishra, P.; Kumar, A.; Nagireddy, A.; Mani, D.N.; Shukla, A.K.; Tiwari, R.; et al. 2016. DNA barcoding: An efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnology Journal* 14: 8–21.
- Motamayor, J.C.; Risterucci, A.M.; Lopez, P.A.; Ortiz, C.F.; Moreno, A.; Lanaud, C. 2002. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89: 380–386.
- Nicolè, S.; Erickson, D.L.; Ambrosi, D.; Bellucci, E.; Lucchin, M.; Papa, R.; et al. 2011. Biodiversity studies in *Phaseolus* species by DNA barcoding. *Genome* 54: 529–545.
- Ogalde, J.P.; Arriaza, B.T.; Soto, E.C. 2009. Identification of psychoactive alkaloids in ancient Andean human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Archaeological Science* 36: 467–472.
- Oliveira, L.C.; Rodrigues, D.P.; Hopkins, M.J.G. 2017. Comparação de seis protocolos de extração de DNA para análises moleculares em espécies de Fabaceae. *Scientia Amazonia* 6: 38–45.
- Palhares, R.M.; Drummond, M.G.; Dos Santos Alves Figueiredo Brasil, B.; Cosenza, G.P.; Das Graças Lins Brandão, M.; Oliveira, G. 2015. Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. *PLoS ONE* 10: 1–29.
- Perez, M.F.; Carstens, B.C.; Rodrigues, G.L.; Moraes, E.M. 2016. Anonymous nuclear markers reveal taxonomic incongruence and long-term disjunction in a cactus species complex with continental-island distribution in South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*: 11–19.
- Platt, A.R.; Woodhall, R.W.; George, A.L. 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques* 43: 58–62.
- Provan, J.; Powell, W.; Hollingsworth, P.M.; Provan, J. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 142–147.
- Ren, F.-M.; Wang, Y.-W.; Xu, Z.-C.; Li, Y.; Xin, T.-Y.; Zhou, J.-G.; et al. 2019. DNA barcoding of *Corydalis*, the most taxonomically complicated genus of Papaveraceae. *Ecology and Evolution* 9: 1934–1945.
- Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sanchez-DelBarrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S.E.; et al. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299–3302.
- Salzburger, W.; Ewing, G.B.; Von Haeseler, A. 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20: 1952–1963.
- Samorini, G. 2014. Aspectos y problemas de la arqueología de las drogas sudamericanas. *Cultura y Droga* 19: 13–34.
- dos Santos, R.G.; Hallak, J.E.C. 2019. Ayahuasca, an ancient substance with traditional and contemporary use in neuropsychiatry and neuroscience. *Epilepsy & Behavior*: 2–7.
- Schultes, R.E. 1986. Recognition of variability in wild plants by Indians of the Northwest Amazon: An enigma. *Journal of Ethnobiology* 6: 229–238.
- Schultes, R.E.; Hofmann, A.; Ratsch, C. 1992. *Plants Of The Gods: their sacred, healing, and hallucinogenic powers*. Rochester, Healing Arts Press, .

- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Schilling, E.E.; Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275–288.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- Stanford, A.M.; Harden, R.; Parks, C.R. 2000. Phylogeny and biogeography of Juglans (Juglandaceae) based on matK and ITS sequence data. *American Journal of Botany* 87: 872–882.
- Stephens, M.; Smith, N.J.; Donnelly, P. 2001. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. *The American Journal of Human Genetics* 68: 978–989.
- Suharyanto; Nose, M.; Shiraishi, S. 2012. Characterization of 14 anonymous nuclear loci in *Pinus thunbergii* and their cross-species transferability. *Journal of Forestry Research* 23: 161–163.
- Thomson, R.C.; Wang, I.J.; Johnson, J.R. 2010. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology* 19: 2184–2195.
- Tupper, K.W. 2008. The globalization of ayahuasca: Harm reduction or benefit maximization? *International Journal of Drug Policy* 19: 297–303.
- Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; et al. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: 1–12.
- Vivas, C.V.; César, R.; Moraes, S.; Alves-araújo, A.; Alves, M.; Mariano-neto, E.; et al. 2014. DNA barcoding in Atlantic Forest plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification? *670*: 662–670.
- Yan, L.-J.; Liu, J.; Möller, M.; Zhang, L.; Zhang, X.-M.; Li, D.-Z.; et al. 2015. DNA barcoding of *Rhododendron* (Ericaceae), the largest Chinese plant genus in biodiversity hotspots of the Himalaya-Hengduan Mountains. *Molecular Ecology Resources* 15: 932–944.
- Zhang, Z.-X.; Niu, H.-Y.; Guo, X.; Wang, D.; Eaton, W.D. 2015. Genetic diversity and genetic structure of *Corydalis tomentella* Franch. (Papaveraceae), an endangered herb species from Central China. *Biochemical Systematics and Ecology* 63: 27–33.



## Material Suplementar – Capítulo 1



**Figura Suplementar 1.** Diferentes variações morfológicas do caule de 14 amostras de *Banisteriopsis cf. caapi*, coletados em cultivos no município de Manaus, Amazonas.



**Figura Suplementar 2.** Morfologia dos cipós *Banisteriopsis* cf. *caapi* coletados em ambiente natural nos municípios de Presidente Figueiredo e Novo Airão, Amazonas.



**Tabela Suplementar 1.** Análise do BLASTn do marcador do cloroplasto *rbcL* conduzidas no NCBI de amostras de variedades de *Banisteriopsis cf caapi* coletadas no Estado do Amazonas.

Marcador molecular			<i>rbcL</i>			
Código da amostra	Etnovariedade	Município de coleta	Espécie do BLASTn	N. de acesso que foi comparado	Query Cover (%)	Per. Ident. (%)
<b>VM1</b>	Tucunacá	Manaus	<i>B. malifolia</i>	KM197467.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
<b>VM3</b>	Pajezinho	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>VM4</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>VM5</b>	Tucunacá	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>MA1</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. malifolia</i>	KM197467.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
<b>MA3</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>MA7</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>MA8</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>MA12</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>FN1</b>	Tucunacá	Manaus	<i>B. malifolia</i>	KM197467.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
<b>FN2</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. malifolia</i>	KM197467.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
<b>FN4</b>	Pajezinho	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>SA3</b>	Nativo	Novo Airão	<i>B. malifolia</i>	KM197467.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
<b>MOAC3</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100

			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>MAO2</b>	Tucunacá	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>PF1</b>	Nativo	Presidente Figueiredo	<i>B. malifolia</i>	KM197467.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
<b>PF2</b>	Nativo	Presidente Figueiredo	<i>B. malifolia</i>	KM197467.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
<b>PF5</b>	Nativo	Presidente Figueiredo	<i>B. malifolia</i>	KM197467.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
<b>PF14</b>	Nativo	Presidente Figueiredo	<i>B. malifolia</i>	KM197467.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92

**Tabela Suplementar 2.** Análise do BLASTn do marcador do cloroplasto *matK* conduzidas no NCBI de amostras de variedades de *Banisteriopsis cf caapi*, coletadas no Estado do Amazonas.

Código da amostra	Marcador Molecular		Espécie do BLASTn	<i>matK</i>			
	Etnovariedade	Município de coleta		N. de acesso que foi comparado	Query (%)	Cover	Per. (%)
<b>VM1</b>	Tucunacá	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		99,92
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		99,92
<b>VM3</b>	Pajezinho	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
<b>VM4</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
<b>VM5</b>	Tucunacá	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
<b>MA1</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		99,77
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		99,77
<b>MA3</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100

<b>MA7</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>MA8</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>MA12</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>FN1</b>	Tucunacá	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,77
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,77
<b>FN2</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,77
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,77
<b>FN4</b>	Pajezinho	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>SA3</b>	Nativo	Novo Airão	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,92
<b>MOAC3</b>	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>MAO2</b>	Tucunacá	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,92
<b>PF1</b>	Nativo	Presidente	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
		Figueiredo	<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,92
<b>PF2</b>	Nativo	Presidente	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
		Figueiredo	<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,92
<b>PF5</b>	Nativo	Presidente	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
		Figueiredo	<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,92
<b>PF14</b>	Nativo	Presidente	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,92
		Figueiredo	<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,92

**Tabela Suplementar 3.** Análise do BLASTn do marcador do cloroplasto *ndhF* conduzidas no NCBI de amostras de variedades de *Banisteriopsis cf caapi*, coletadas no Estado do Amazonas.

Código da amostra	Marcador molecular		<i>ndhF</i>				
	Etnovariedade	Município de coleta	Espécie do BLASTn	N. de acesso que foi comparado	Query (%)	Cover (%)	Per. Ident. (%)
VM1	Tucunacá	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		99,71
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		99,71
VM3	Pajezinho	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
VM4	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
VM5	Tucunacá	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
MA1	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		99,85
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		99,85
MA3	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
MA7	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
MA8	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
MA12	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
FN1	Tucunacá	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		99,85
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		99,85
FN2	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		99,85
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		99,85
FN4	Pajezinho	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		100
SA3	Nativo	Novo Airão	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		99,71
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100		99,71
MOAC3	Caupuri	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100		100

			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	100
<b>MAO2</b>	Tucunacá	Manaus	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,85
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,85
<b>PF1</b>	Nativo	Presidente Figueiredo	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,71
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,71
<b>PF2</b>	Nativo	Presidente Figueiredo	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,71
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,71
<b>PF5</b>	Nativo	Presidente Figueiredo	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,71
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,71
<b>PF14</b>	Nativo	Presidente Figueiredo	<i>B. caapi</i>	NC_037945.1	100	99,71
			<i>B. caapi</i>	MH041648.1	100	99,71

## **CAPÍTULO 2: Revelando linhagens divergentes em *Banisteriopsis cf. caapi* (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton (Mapighiaceae), um cipó utilizado no preparo do chá *ayahuasca***

### **Resumo**

A identificação e delimitação de espécies são fundamentalmente importante nos campos da biologia, biogeografia, ecologia e conservação. No entanto, nos trópicos a identificação de espécies pode ser problemática, devido à falta de caracteres morfológicos de diagnóstico que são claramente visíveis. As informações geradas com base nos marcadores moleculares podem complementar os estudos taxonômicos, contribuindo para a avaliação da biodiversidade. O modelo GMYC (*generalized mixed Yule coalescent*) usa a informação genética para gerar uma estimativa do número de unidades semelhantes a espécies. O presente estudo teve como objetivo a identificação de linhagens genéticas de *Banisteriopsis cf. caapi* (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton usando métodos moleculares de delimitação de espécies e estimar a diversidade genética das linhagens de *B. cf. caapi* que foram identificadas. Foram obtidas sequências nucleotídicas para 120 amostras de cipó, utilizados no preparo do chá *ayahuasca*, para o marcador ITS (nuclear) e *matK* (do cloroplasto). A identificação das linhagens genéticas foi realizada com base em dois métodos de análises com dados de loco único: o GMYC e o bGMYC. As análises das sequências do marcador molecular do cloroplasto, não resultaram em polimorfismos e índices de diversidade suficientes entre as amostras para acessar a variação genética, por outro lado se mostraram adequados para a identificação molecular no nível de gênero para o cipó utilizado no preparo do chá *ayahuasca*. De acordo com as análises de delimitação de espécies/linhagens utilizando o marcador nuclear ITS, foram recuperadas 12 linhagens genéticas de *B. cf. caapi*. As linhagens genéticas delimitadas foram classificadas como espécies candidatas não confirmadas. A diversidade genética das 120 amostras analisadas teve valores de 88 haplótipos, 201 sítios polimórficos, 0,967 de diversidade haplotípica, e as distâncias genéticas calculadas pelo método K2P variaram de 0,017 a 0,229. Estudos integrativos posteriores devem trazer maiores esclarecimentos sobre a classificação taxonômica referente aos espécimes de cipó que são utilizados para o preparo do chá *ayahuasca*.

## 1. Introdução

As espécies são as unidades de trabalho na maior parte da biologia, mas a delimitação de espécies é repleta de complexidade (De Queiroz 2007, Rosell et al. 2010). Historicamente, muitas espécies têm sido propostas baseada em critérios como isolamento reprodutivo, monofilia, caracteres diagnósticos e ecologia. Apesar das particularidades de cada um, implicitamente ou explicitamente todos eles relacionam espécies com linhagens evolutivas (Myers et al. 2000, De Queiroz 2007).

A flora da Amazônia ainda é em grande parte subamostrada, exceto talvez para as Guianas (Ter Steege et al. 2013). No Brasil, a maioria das pesquisas concentra-se no sudeste e sul e a pesquisa sistemática atual se concentra em áreas não amazônicas. Devido a esses fatores, debates de longa data sobre o número e a identidade das espécies de plantas encontradas na região amazônica permanecem sem solução. Entretanto, estima-se que a bacia amazônica abrigue até 16000 espécies de plantas (Cardoso et al. 2017).

*Banisteriopsis caapi* (Spruce ex Griseb.) C. V. Morton é uma liana da família Malpighiaceae encontrada na floresta amazônica e também é o principal ingrediente do chá *ayahuasca*, enteógeno que vem sendo usado durante séculos por populações nativas dos países do noroeste da Amazônia, como Brasil, Peru, Colômbia e Equador, com propósitos rituais, religiosos e terapêuticos (Schultes et al. 1992). As populações nativas que usam esta planta reconhecem muitos tipos diferentes de cipó com diferentes propriedades enteógenas, isso pode ser resultado de variantes químicas ou pode refletir os diferentes estágios de crescimento do cipó (Schultes 1974, Gates 1982, Langdon 1986).

Apesar de *B. caapi* ser a espécie tradicionalmente atribuída a bebida *ayahuasca*, há relatos de que *B. muricata* e outras espécies do gênero *Banisteriopsis* também são utilizados para o preparo do chá (Gates 1982, Schultes 1984, Schultes et al. 1992), entretanto devido a escassez de coleções férteis e carência de estudos taxonômicos detalhados, essas espécies não foram devidamente discriminadas e descritas (Langdon 1986, Wang et al. 2010). Langdon (1986) estudou 18 variedades de *Banisteriopsis* que são utilizados para o preparo da *ayahuasca* e classificou-as levando em consideração caracteres morfológicos e os efeitos enteógenos referentes a cada planta; entretanto não foi possível identificar taxonomicamente todas as variedades descritas, pois somente 6 dessas foram possíveis a coleta e 5 dessas estavam em condições de ser identificadas e foram, como *B. caapi*.

A identificação e delimitação de espécies são fundamentalmente importante nos campos da biologia, biogeografia, ecologia e conservação (Duminil et al. 2012, Fujita et al. 2012). Nos trópicos, a identificação de espécies pode, no entanto, ser problemática devido à falta de caracteres morfológicos de diagnóstico que são claramente visíveis. A morfologia floral no gênero *Banisteriopsis* possui caracteres conservados e isso dificulta a clara identificação e classificação das espécies do gênero (Gates 1982).

Abordar a delimitação de espécies nos ecossistemas tropicais é de grande importância prática para a conservação da biodiversidade (Duminil et al. 2012, Fujita et al. 2012, Gomes et al. 2013). Sobretudo para *Banisteriopsis* que apresenta grande potencial para aplicação médico-farmacêutica, devido a presença de grande diversidade de metabólitos bioativos (Samoylenko et al. 2010, dos Santos e Hallak 2019). Importantes pesquisas científicas têm demonstrado, que as substâncias químicas encontradas *B. caapi* podem ser usadas para a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo, o mal de Parkinson, o Alzheimer (Serrano-Deñás et al. 2001, Wang et al. 2010, dos Santos e Hallak 2019).

Desde 1930, a *ayahuasca* passou a ser utilizada por organizações religiosas sincréticas que tiveram origem na região Norte do Brasil, como o Centro Espírita Beneficente União do Vegetal (CEBUDV), o Santo Daime e a Barquinha. Os grupos também usam o chá como sacramento e terapeuticamente. O CEBUDV e o Santo Daime estão presentes em todos os Estados brasileiros e também em alguns países europeus, nos Estados Unidos, Ásia e África (MacRae 2004, Labate e MacRae 2006). Pela própria expansão das religiões e pelo crescente desmatamento da Amazônia, existe um grande interesse em se conhecer a diversidade genética das espécies que são usadas para o preparo da *ayahuasca*, para a conservação dos recursos genéticos, através do cultivo de matrizes.

O acesso à diversidade genética via marcadores moleculares de DNA, associados a sofisticadas ferramentas analíticas, têm colaborado com análises que visam a avaliação da biodiversidade. Técnicas que utilizam a abordagem do modelo coalescente de Yule, são capazes de utilizar a informação genética para gerar uma estimativa do número de unidades semelhantes a espécies (Fujisawa e Barraclough 2013). As informações geradas com base nos marcadores moleculares podem complementar os estudos taxonômicos, contribuindo para a descrição de novas espécies (Valentini et al. 2009). O conhecimento referente a taxonomia das espécies é importante para o estabelecimento de estratégias para a conservação da biodiversidade.



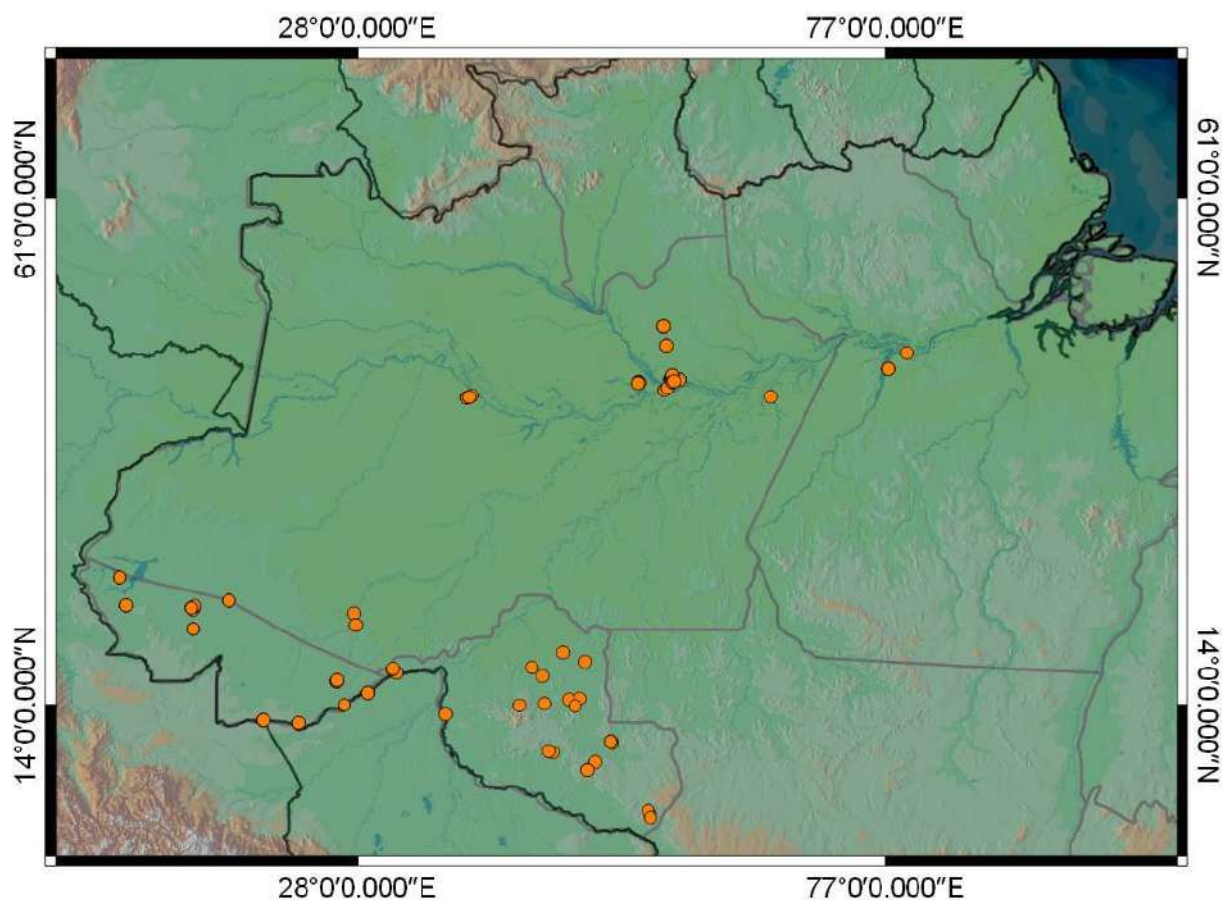
A diversidade genética é importante, porque além de permitir a adoção de estratégias de manejo para a conservação genética, é uma informação relevante para a exploração desta variabilidade em melhoramento vegetal (Kageyama 1987, Myers et al. 2000, Gomes et al. 2013, Ter Steege et al. 2016).

Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo delimitar linhagens genéticas de *Banisteriopsis* cf. *caapi* que são utilizadas no preparo do chá *ayahuasca* coletadas em ambiente natural e de cultivo e estimar a diversidade genética das linhagens delimitadas.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Amostragem e Extração de DNA

Foram coletadas um total de 172 amostras de mariri (*Banisteriopsis* cf. *caapi*) que são utilizadas para o preparo do chá *ayahuasca*. As coletas foram realizadas entre os anos de 2017 e 2018 em 36 municípios de quatro estados da região Norte do Brasil (Figura 1). Novo Airão (N=08), Tefé (N=09), Presidente Figueiredo (N=14), Manaus (N=37), Iranduba (N=04), Maués (N=01), Boca do Acre (N=01), Lábrea (N=04) e Guajará (N=05) municípios do estado do Amazonas. Rio Branco (N=11), Plácido de Castro (N=07), Capixaba (N=02), Brasiléia (N=04), Assis Brasil (N=08), Feijó (N=05), Porto Walter (N=04), Mâncio Lima (N=05) e Santa Luzia (N=10) municípios do estado do Acre. Extrema (N=04), Guajará Mirim (N=02), Colorado do Oeste (N=02), Cabixi (N=01), Cacoal (N=05), Alta Floresta D'Oeste (N=03), Ariquemes (N=01), Campo Novo de Rondônia (N=01), Machadinho do Oeste (N=01), Cujubim (N=01), Alto Paraíso (N=01), Jaru (N=01), Vale do Paraíso (N=01), Colina Verde (N=01), Ouro Preto do Oeste (N=01) e Seringueiras (N=02) municípios do estado de Rondônia. Santarém (N=05), município do estado do Pará. Sendo que 35 amostras foram coletadas em plantios de Núcleos do CEBUDV em Manaus – AM (Núcleo Mestre Vicente Marques/N=06, Núcleo Mestre Angílio/N=22, Núcleo Flor do Norte/N=04 e Núcleo Tiuaço/N=03), 2 em plantio do CEBUDV no Núcleo de Marfim (Santarém – PA) e 135 amostras em ambiente natural. As coletas realizadas em ambiente natural, contaram com o auxílio de dirigentes e alguns adeptos do CEBUDV, conhecedores dos mariris que são usados para o preparo do chá *ayahuasca* no contexto religioso. Amostras de câmbio, folha ou casca do cipó (*B.* cf. *caapi*) foram armazenadas em recipientes contendo sílica gel e posteriormente armazenadas no freezer. Para amostras de ambiente natural foram coletados também 10 pedaços de cipós de cada indivíduo para o cultivo nos plantios dos núcleos do CEBUDV.



**Figura 1.** Mapa destacando os pontos na região amazônica de coleta de amostras de *Banisteriopsis cf. caapi*.

O DNA genômico foi extraído de 120 mg de material vegetal submetido a maceração em um disruptor celular *Bead Beater* (Biospec Products) com o auxílio de 2 esferas (*beads*) de 5 mm, seguindo o protocolo de extração de tecidos vegetais CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio; Doyle e Doyle 1987) com adição de acetato de sódio, modificado por Oliveira et al. (2017).

A integridade e concentração do DNA extraído das amostras foi verificada em gel de agarose (1% p/v) por comparação com padrões de concentração conhecida do DNA do bacteriófago lambda corados com Diamond™ *Nucleic Acid Dye* (Promega) e posteriormente analisados em transiluminador sob luz ultravioleta Alpha Mini e fotodocumentados. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água ultra pura e padronizadas a uma concentração de 20 ng/μL.

## 2.2. Amplificação e sequenciamento de DNA

Foram selecionados dois marcadores moleculares: um do genoma do cloroplasto, o maturase K (*matK*) e outro do genoma nuclear o espaçador interno transcrito (ITS). O *matK* foi selecionado para a identificação molecular no nível de gênero para as amostras coletadas. Entre os marcadores cloroplastidiais que foram estudados previamente, o *matK* é o que apresenta maior número de sequências de espécies de plantas no banco de dados do NCBI, além de ser um marcador que é de fácil amplificação e sequenciamento. Já o ITS foi selecionado por ser um marcador nuclear amplamente utilizado em outras espécies de plantas e também por ter apresentado bons resultados no estudo anterior (ver Capítulo 1).

As reações de PCRs (*polymerase chain reactions*) aconteceram em um volume final de 17 µL com 2 µL de DNA genômico, 4,7 µL de água ultra pura, 1,5 µL de tampão para PCR 10x (Thermo Scientific), 2 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 3 µL dNTP's 1 mM, 0,3 µL de Taq 5 U/µL, 1,5 µL BSA (*Bovine Serum Albumin*) 10x, 1 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*). Para o *matK* foram usados os *primers* trnK-2R e matK-400F. As amplificações foram realizadas em um termociclador Veriti® *Thermal Cycler* (Applied Biosystems) seguindo as ciclagens referenciadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Marcadores moleculares e respectivos *primers* utilizados para caracterização molecular de *Banisteriopsis cf. caapi*.

Marcadores	Nome dos <i>primers</i>	Sequência dos <i>primers</i> 5'-3'	Ciclagem	Referência
ITS	ITS_5a	CCTTATCATTAGAGGAAGGAG	94°C 2 min, [35 ciclos: 94°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 2 min] 72°C 5 min	Stanford et al (2000)
	ITS_4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		White et al (1990)
<i>matK</i>	trnK-2R( <i>matk</i> )	AACTAGTCGGATGGAGTAG	95°C 1 min, [35 ciclos: 95°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 2 min] 72°C 10 min	Cameron et al (2001)
	matK-400F	CCCTAATTTACGATCAATTCATTCAAT		
	matK-842F	GATCCTTTCATACATTATGT		

Os produtos de PCRs foram purificados usando um kit de purificação GFX™ (GE Healthcare) e visualizados em gel de agarose a 1% (p/v) corado com Diamond™ *Nucleic Acid Dye* (Promega). As reações de sequenciamento nucleotídico foram realizadas de acordo com Platt et al. (2007) usando o Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Life Technologies). Para o marcador *matK* foi utilizado também um *primer* interno para

as reações de sequenciamento, o matK-400F (Tabela 1). O sequenciamento foi realizado no analisador de DNA 3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

## 2.1. Análise dos dados

Para edição das sequências dos dois marcadores foi usado o programa SeqScape® *Software* v2.7 (Applied Biosystems). Para o alinhamento das sequências nucleotídicas foi utilizado o programa MAFFT v7.307 (Kato e Standley 2013). Para os marcadores nucleares, os sítios heterozigotos das sequências foram codificados de acordo com os códigos de ambiguidade IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Para a definição da fase dos alelos dos indivíduos heterozigotos, foi usado o programa PHASE v2.1.1 (Stephens et al. 2001) com o auxílio da ferramenta *on-line* SeqPHASE (Flot 2010). Devido a dificuldade em conseguir ramos reprodutivos para identificação morfológica floral das amostras que foram coletadas para as análises, as sequências de DNA do marcador do cloroplasto *matK* foram submetidas a análise no BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al. 1990) na base de dados de sequências do NCBI para a identificação no nível de gênero.

### *Delimitação de linhagens e diversidade genética*

Os bancos de dados de sequências de DNA dos marcadores ITS e *matK* foram analisados separadamente com base na inferência filogenética bayesiana utilizando os programas do pacote BEAST v 2.5.2 (Bouckaert et al. 2019). As análises foram conduzidas utilizando o modelo de substituição nucleotídica estimado (para cada gene) no programa PartitionFinder v2.1.1 (Lanfear et al. 2017) com base no *Bayesian Information Criterion* (BIC). Os modelos de substituição nucleotídica selecionados para o ITS e *matK*, foram SYM+G e HKY+X, respectivamente. Para ambos os dados foi considerado um relógio molecular estrito, taxa de substituição arbitrária de 1.0, com o *prior* da árvore Yule. Foram conduzidas três corridas independentes de 20 milhões de gerações de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) com amostragem das árvores a cada 18000 gerações, resultando em 3333 árvores (das quais 333 foram descartados como *burn-in*). Para verificar se as cadeias (MCMC) convergiram à estacionariedade foi usado o programa Tracer 1.7 (Rambaut et al. 2018). Os valores de ESS (*effective sample sizes*) > 200 indicaram a convergência e estacionariedade das cadeias. As 3000 árvores geradas, foram combinadas no programa LogCombiner e sumarizadas pelo método *maximum clade credibility* (MCC) *tree* no programa TreeAnnotator (ambos programas do pacote

BEAST v 2.5.2). Sequências da espécie *Mascagnia sepium* (A.Juss.) Griseb. disponíveis no banco de dados do NCBI foram utilizadas como grupo externo, assumindo que as amostras analisadas de mariri são monofiléticas, para os dois bancos de dados. O número de acesso AF436789 foi utilizado para a sequência do marcador ITS e AF344567 para o *matK*.

A identificação das linhagens genéticas foi realizada com base em dois métodos de análises com dados de loco único: o GMYC (*generalized mixed Yule coalescent*) (Fujisawa e Barraclough 2013) e o bGMYC (implementação bayesiana do GMYC) (Carstens e Reid 2012). Como dados de entrada foram utilizadas as topologias ultramétricas estimada pelo BEAST 2. As análises foram conduzidas no *software* RStudio 3.6.0 e os pacotes utilizados foram: bGMYC\_1.0.2, splits\_1.0-19 (Fujisawa e Barraclough 2013), phangorn\_2.3.1 (Schliep 2011) e ape\_5.0 (Paradis et al. 2004). Os resultados foram visualizados usando ggtree (Yu et al. 2017), também implementado no R.

Para as linhagens genéticas delimitadas pelos métodos GMYC e bGMYC foram estimadas as distâncias genéticas com base no modelo de Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura 1980) com suporte de *bootstrap* com 1000 replicações no programa MEGA X (Kumar et al. 2018). Os índices de diversidade genética foram calculados com o auxílio do programa DnaSP 6.0 (Rozas et al. 2017).

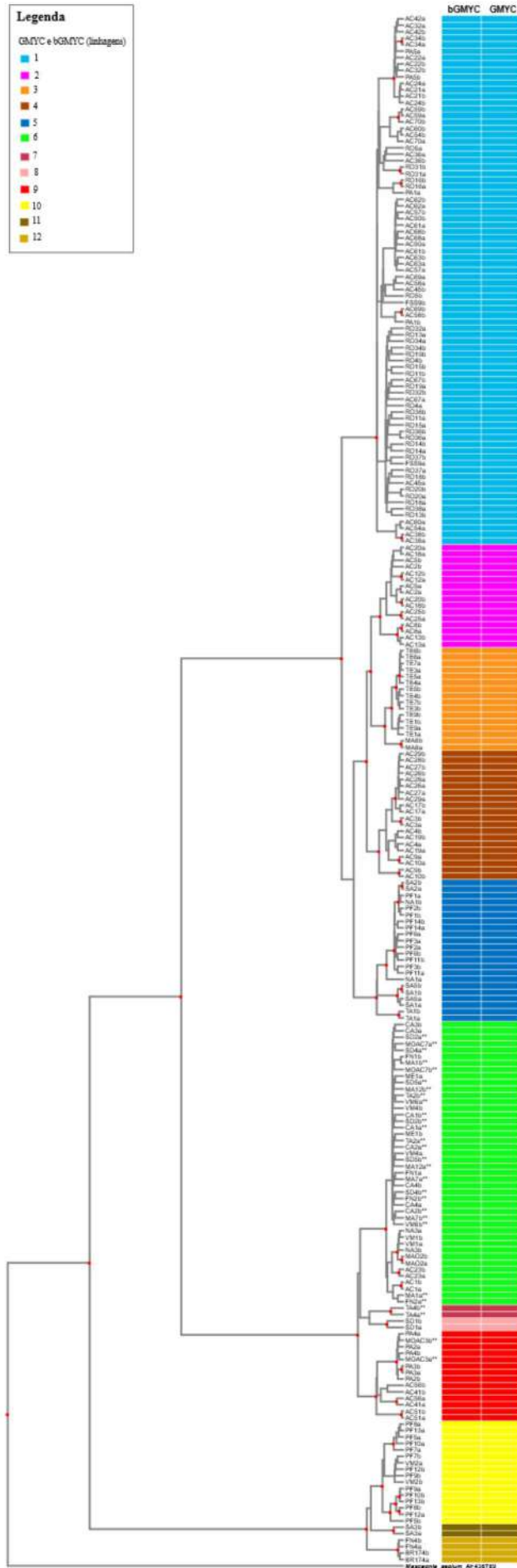
### 3. Resultados

#### 3.1. Delimitação de linhagens e diversidade genética de *Banisteriopsis cf. caapi* referente ao marcador nuclear ITS

Foram obtidas sequências de boa qualidade para 120 amostras de mariri que são utilizados no preparo do chá *ayahuasca* para o marcador ITS. Os indivíduos heterozigotos tiveram suas fases alélicas resolvidas computacionalmente e os homozigotos tiveram suas sequencias duplicadas para compor o banco de dados para as análises posteriores. Dessa forma, após o alinhamento das sequências e a determinação das fases alélicas, o banco de dados resultou em 240 sequências (referente aos heterozigotos e homozigotos com as sequencias duplicadas) com 528 pb.

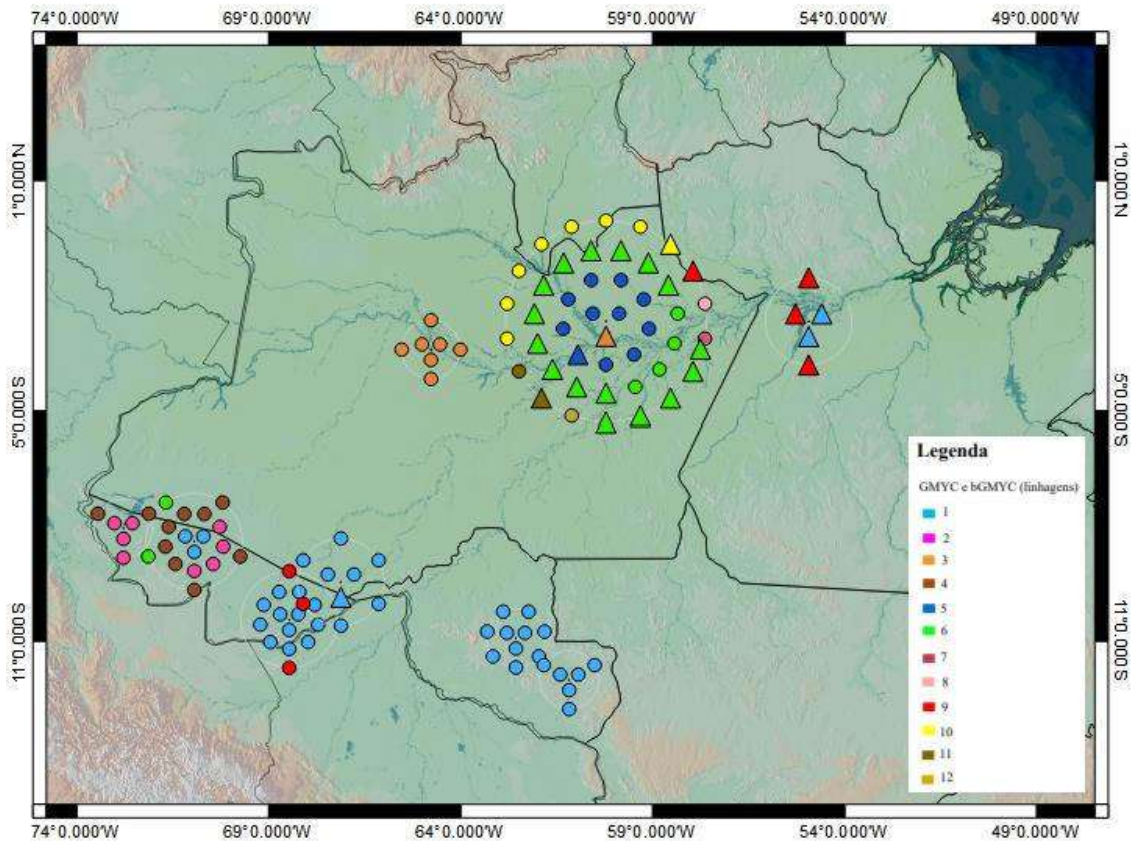
As duas análises usadas para delimitação de espécies/linhagens (GMYC e bGMYC) foram concordantes e recuperaram 12 linhagens genéticas com o número de amostras que representam cada linhagem genética variando de 1 a 41 amostras (Figura

2). A primeira linhagem genética recuperada pelo GMYC e bGMYC representada pela cor azul claro (1) agrupou a maioria das amostras analisadas (41) e estas foram coletadas em ambientes nativos nos estados do Acre, Rondônia, sul do Amazonas e em ambiente cultivado no Pará (Figura 3). As amostras dessa linhagem azul claro (1) estão no mesmo ambiente que as amostras da linhagem representada pela cor vermelha (9), correspondente às amostras coletadas em ambiente natural do Acre, e coletadas em ambiente cultivado no Pará e em Manaus (MOAC3). Essas duas linhagens estão filogeneticamente distantes (Figura 2), sendo 0,169 o valor de distância genética entre elas. A linhagem rosa (2) e marrom (4) são dos municípios Porto Walter, Santa Luzia, Mâncio Lima, Guajará e Feijó (Acre) e foram coletadas em ambientes que estão geograficamente próximos. A linhagem laranja (3) e azul escuro (5) são exclusivas do Amazonas. A linhagem laranja (3) é exclusiva de amostras coletadas em ambiente natural de Tefé, além de incluir uma amostra (MA8) coletada em cultivo (Núcleo Mestre Angílio), já a linhagem azul escuro (5) possui amostras coletadas em ambiente natural em Presidente Figueiredo e Novo Airão e também inclui uma amostra (TA1) coletada em ambiente de cultivo (Núcleo Tiuaco).



**Figura 2.** Árvore filogenética bayesiana (*Maximum clade credibility tree*) com base em 3000 árvores posteriores geradas usando o BEAST. Foram usadas 240 sequências do ITS de 120 amostras de indivíduos heterozigotos e homozigotos de *Banisteriopsis cf. caapi* (mariri/jagube), amostrado nos estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Pará (as informações dos municípios e estado de coleta, referente a cada código estão na Tabela Suplementar 1). Os códigos das amostras seguidas por \*\* indicam cipós que apresentam fenótipo de caule com nó. Probabilidades posteriores com suporte acima de 0,95 são mostradas com pontos vermelhos. As linhagens genéticas delimitadas pelo modelo GMYC e bGMYC são demonstradas por caixas coloridas.





**Figura 3.** Mapa contendo a distribuição das linhagens genéticas de *Banisteriopsis cf. caapi* (mariri/jagube) identificadas pelo método GMYC e bGMYC. Os pontos marcados em círculo são amostras coletadas em ambiente natural. Os pontos marcados com triângulo são amostras coletadas em ambiente de cultivo. Para melhor visualização da distribuição geográfica das linhagens, os pontos foram plotados com a função deslocador de pontos no QGIS.

A linhagem verde (6) possui a maioria dos cultivados com nós, com exceção de duas amostras do Acre, uma de Novo Airão e quatro de Iranduba (sendo que três dessas apresentaram o fenótipo com nó). A linhagem vinho (7) e rosa claro (8), só possuem uma amostra representando cada linhagem: TA4 (com nó) e SD1 (ourinho) respectivamente, sendo ambas coletadas em ambiente de cultivo. A linhagem amarela (10) possui amostras coletadas em Presidente Figueiredo e uma amostra (VM2) de cultivo (Núcleo Mestre Vicente Marques) e a linhagem (11) possui uma única amostra coletada em Novo Airão. A linhagem (12) possui duas amostras sendo uma coletada em ambiente natural (BR 174) e a outra amostra (FN4) coletada em ambiente cultivado (Núcleo Flor do Norte), ambas são conhecidas como “pajezinho”.

As distâncias genéticas com base no modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) entre as 12 linhagens genéticas delimitadas pelos métodos GMYC e bGMYC estão apresentadas na Tabela 2. A menor distância genética foi de 0,018, observada entre as linhagens 7 e 8.



A maior distância genética foi 0,291, observada entre as linhagens 6 e 10. Todos os valores calculados de distâncias genéticas dentro das linhagens foram mais baixos de que os valores encontrados entre as linhagens.

**Tabela 2.** Distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) entre as 12 linhagens de *Banisteriopsis cf. caapi* recuperadas pelos métodos GMYC e bGMYC amostradas nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia. Os valores na diagonal da tabela (em vermelho) são os valores médios de distância genética encontrados dentro das linhagens.

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0,006											
2	0,038	0,009										
3	0,042	0,024	0,005									
4	0,037	0,021	0,026	0,006								
5	0,030	0,033	0,038	0,030	0,008							
6	0,159	0,177	0,172	0,174	0,168	0,003						
7	0,160	0,178	0,174	0,175	0,169	0,022	0,010					
8	0,156	0,174	0,170	0,169	0,166	0,026	0,018	0,012				
9	0,169	0,188	0,184	0,184	0,179	0,037	0,028	0,023	0,015			
10	0,247	0,265	0,264	0,258	0,257	0,291	0,281	0,273	0,283	0,008		
11	0,248	0,266	0,265	0,260	0,260	0,289	0,278	0,271	0,275	0,021	0,006	
12	0,257	0,275	0,274	0,269	0,269	0,280	0,277	0,269	0,279	0,031	0,027	0,001

### *Diversidade genética*

O número de haplótipos encontrados nas 120 amostras analisadas foi de 88 (Tabela 3). A linhagem 1 apresentou o maior número de haplótipos (27) e as linhagens 7, 8, 11 e 12, que são as linhagens com o menor número de amostras, tiveram 2 haplótipos cada. Na linhagem 9 foi encontrado o maior número de sítios polimórficos (23), 7 haplótipos e uma diversidade nucleotídica de 0,0143. A linhagem 6 com oito haplótipos (que possui a maioria dos cultivados com nós) apresentou os menores índices de diversidade haplotípica (0,530) e diversidade nucleotídica (0,0025).

**Tabela 3.** Parâmetros de diversidade genética referente a 12 linhagens genéticas de *Banisteriopsis cf. caapi* recuperadas pelos métodos GMYC e bGMYC, amostradas em 30 municípios de quatro estados da região Norte do Brasil, a partir da análise do marcador molecular nuclear ITS.

<b>Linhagem</b>	<b>N° amostras</b>	<b>N° de alelos</b>	<b>S</b>	<b>ETA</b>	<b>h</b>	<b>Hd</b>	<b>Pi</b>	<b>I</b>
<b>Todas</b>	120	240	201	228	88	0,965	0,0960	12
<b>1</b>	41	82	18	19	27	0,879	0,0061	2
<b>2</b>	8	16	12	13	8	0,908	0,0085	4
<b>3</b>	8	16	7	7	4	0,767	0,0047	4
<b>4</b>	10	20	10	11	9	0,847	0,0063	2
<b>5</b>	11	22	13	13	7	0,801	0,0076	3
<b>6</b>	22	44	7	7	8	0,530	0,0025	0
<b>7</b>	1	2	5	5	2	1,000	0,0096	0
<b>8</b>	1	2	6	6	2	1,000	0,0116	0
<b>9</b>	7	14	23	23	7	0,813	0,0143	0
<b>10</b>	8	16	10	10	10	0,900	0,0076	4
<b>11</b>	1	2	3	3	2	1,000	0,0058	0
<b>12</b>	2	4	1	1	2	0,500	0,0010	0

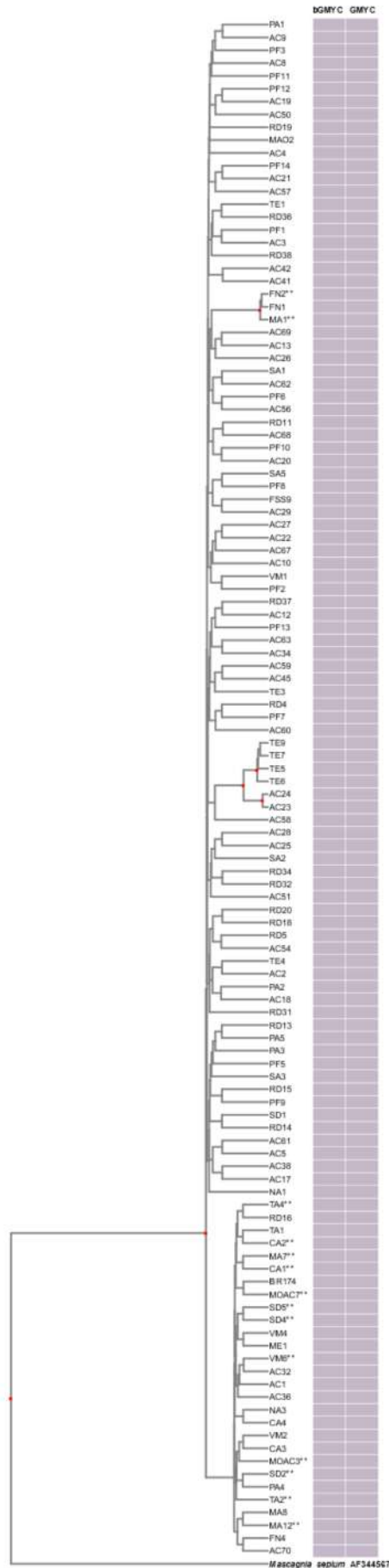
S = sítios polimórficos, ETA = número total de mutações, h = número de haplótipos, Hd = diversidade haplotípica, Pi = diversidade nucleotídica, I = indels.

### **3.2. Delimitação de linhagens e diversidade genética de *Banisteriopsis cf. caapi* com o marcador molecular do cloroplasto (*matK*)**

Foram sequenciadas 163 amostras de cipó para o marcador cloroplastidial *matK*. As sequências resultaram em 1301 pb cada e estas foram submetidas a análise BLASTn. Foi detectado que 3 amostras de cipó não pertenciam ao gênero *Banisteriopsis* (Tabela 4). As análises de delimitação de linhagens e diversidade genética foram conduzidas para as 120 amostras de *B. cf. caapi* que também tiveram a região ITS sequenciada. Para o marcador do cloroplasto não foram identificadas linhagens genéticas com base nas análises GMYC e bGMYC (Figura 4).

**Tabela 4.** Análise do BLASTn de amostras que não foram identificadas como *Banisteriopsis* conduzidas no NCBI referente ao marcador do cloroplasto *matK*

<b>Código da amostra</b>	<b>Etnovariedade</b>	<b>Município e Estado de coleta</b>	<b>Espécie identificada pelo BLASTn</b>	<b>Acesso</b>	<b>Query Cover (%)</b>	<b>Per. Ident. (%)</b>
RD1	Pajezinho	Guajará Mirim – RO	<i>Bignonia capreolata</i>	HQ384518.1	100	96,55
RD2	Pajezinho	Guajará Mirim – RO	<i>Bignonia capreolata</i>	HQ384518.1	100	96,70
MOAC8	Cipó usado do Daime	Manaus – AM	<i>Callaeum antifebrile</i> (Ruiz ex Griseb.) D. M. Johnson	HQ247244.1	84	99,82



**Figura 4.** Árvore filogenética bayesiana (*Maximum clade credibility tree*) com base em 3000 árvores posteriores geradas usando o BEAST. Foram usadas 120 sequências do *matK* de *Banisteriopsis* cf. *caapi* (mariri/jagube), amostrado nos estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Pará (as informações dos municípios e estado de coleta, referente a cada código estão na Tabela Suplementar 1). Probabilidades posteriores com suporte acima de 0,95 são mostradas com pontos vermelhos. As linhagens genéticas delimitadas pelo modelo GMYC, bGMYC são demonstradas por caixas. Os códigos das amostras seguidas por \*\* indicam cipós que apresentam fenótipo de caule com nó.

Os índices de diversidade genética referente a esse marcador molecular para as 120 amostras, apresentou valores baixos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Parâmetros de diversidade genética referente a 120 amostras de *Banisteriopsis cf. caapi*, amostradas em 30 municípios de quatro estados da região Norte do Brasil, a partir da análise do marcador molecular nuclear *matK*.

<b>Diversidade genética - <i>matK</i></b>	
Nº de amostras	120
Nº de sítios polimórficos (S)	6
Nº de haplótipos (h)	5
Diversidade Haplotípica (Hd)	0,469
<i>Indels</i>	0

#### 4. Discussão

Estudos de delimitação de espécies/linhagens da flora tropical amazônica (usando as análises GMYC e bGMYC), com base em marcadores moleculares, são praticamente inexistentes. A taxonomia das famílias e gêneros de plantas da Amazônia está em contínuo estado de mudança e o uso e refinamento de técnicas moleculares tendem a causar grandes alterações na atual classificação e número de espécies, gêneros e famílias (Ter Steege et al. 2016). Essa questão tem sido frequentemente observada em estudos que abordam biodiversidade molecular, onde o número de espécies/linhagens delimitadas é geralmente maior que o número de taxa nominal ou mesmo de espécies morfológicas analisadas nos estudos. Os resultados do presente estudo indicam a mesma tendência; enquanto analisamos uma morfo-espécie, um taxa nominal (*Banisteriopsis cf. caapi*), as análises de delimitação de espécies/linhagens, somadas com a relação geográfica dos pontos de coletas das amostras de mariri/jagube recuperaram 12 linhagens. Portanto, não existe uma concordância entre morfo-espécies (taxa nominal, até então *B. caapi*) e espécies/linhagens delimitadas.

Para a caracterização molecular e delimitação de espécies/linhagens, os resultados de diversidade relacionados aos dois marcadores moleculares analisados neste estudo não foram congruentes. Devido ao baixo nível de polimorfismos do *matK* (marcador do cloroplasto), não foi possível distinguir as linhagens genéticas que foram recuperadas considerando o marcador ITS. Essa limitação (dos marcadores do cloroplasto, ver cap.1) destaca a necessidade de dados de DNA nuclear na delimitação de espécies/linhagens que

são estreitamente relacionadas. O uso do ITS como marcador molecular identificou o referido marcador como uma região adequada para inferir hipóteses de filogenia, para delimitação de espécies/linhagens e se mostram eficientes com análises de DNA *barcode* para determinados grupos de plantas (Duminil et al. 2012, Mezzasalma et al. 2017, Mishra et al. 2017, Villaverde et al. 2017, Cap. 1). No presente estudo, o ITS não apresentou a necessidade de clonagem, pois apresentou boa qualidade no sequenciamento e não apresentou problemas quanto ao alinhamento, revelando ser um bom marcador para identificação de linhagens genéticas de mariri/jagube (*Banisteriopsis cf. caapi*) e para as análises de diversidade genética.

As linhagens genéticas encontradas pelo marcador nuclear, foram geograficamente relacionadas (Figura 3). Ainda, percebe-se que algumas das amostras cultivadas nos plantios dos Núcleos das CEBUDV de Manaus, pertencem a linhagens de ambiente natural de municípios próximos como Novo Airão, Presidente Figueiredo e Tefé. A exemplo da amostra TA1 cultivada no Núcleo Tiuaco pertencente à linhagem 5 (agrupada com 10 amostras coletadas em ambiente natural nos municípios de Novo Airão e Presidente Figueiredo), a amostra MA8 cultivada no Núcleo Mestre Angílio pertencente a linhagem 3 (agrupada com 7 amostras coletadas em ambiente natural no município de Tefé) e a amostra VM2 cultivada no Núcleo Mestre Vicente Marques pertencente a linhagem 10 (agrupada com 7 amostras coletadas em ambiente natural em Presidente Figueiredo). O que destaca que medidas de conservação estão sendo realizadas (mesmo que de forma empírica).

A grande maioria das coletas registradas em herbários sobre *B. caapi*, não possuem informação sobre fenótipos do caule, que podem ser informações importantes para a identificação de variedades de cipós, como no caso do mariri/jagube. As amostras de fenótipo com nó analisadas no presente estudo, na sua grande maioria só estavam presentes nos plantios do CEBUDV da cidade de Manaus, com exceção de três amostras de Iranduba, no entanto, coletadas em uma localidade de terra preta de índio. Apesar das diferenças que são observadas nos caules dos mariris, essas características devem ser utilizadas com cautela em análises morfológicas, visto que a característica do caule com nó foi observada em três linhagens (6, 7 e 9), e em duas das linhagens estavam presentes indivíduos que apresentavam caule com nó e sem nó. Além disto, podemos observar que ocorrem diferentes morfologias de nós para os cipós que apresentaram este fenótipo (Figura Suplementar 1). Também acontece que estas diferentes morfologias de nós não

foram constatadas exclusivas em determinadas linhagens, o que reforça a cautela e instiga o conhecimento em relação a análise deste caractere em análises morfológicas.

O fenótipo de caule mais abundante das amostras coletadas no presente estudo é o mariri sem nó. Com base em informações do Departamento de Memória e Documentação (DMD) do CEBUDV, foi encontrado no ano de 1966, mariri caupuri (com nó) em uma região de floresta, na cidade de Manaus. A busca de mariri na floresta foi muito mais comum quando o CEBUDV foi fundado e os plantios ainda não tinham sido estabelecidos. Nessa época os primeiros dirigentes (*in memoriam*, Mestres Florêncio Carvalho, Geraldo Carvalho e Roberto Evangelista) fizeram buscas nos arredores de Manaus e subindo o Rio Negro, encontram o mariri caupuri com nó (Alto Falante, 2019). Esse fato pode justificar a grande presença do mariri com esse fenótipo nos plantios dos Núcleos do CEBUDV em Manaus.

O conhecimento de mariri com nó no âmbito do CEBUDV é relativamente recente. Entretanto, o primeiro registro de coleta de *B. caapi* (utilizado no preparo do chá *ayahuasca* pelas populações nativas) foi relatada por Spruce entre os Tukanos do Uaupés e este cipó possui um nó alongado (Schultes e Holmstedt 1968). Nas amostras coletadas no presente estudo, uma amostra coletada em ambiente de cultivo possuiu um fenótipo semelhante (Figura Suplementar 2).

Em Presidente Figueiredo – AM foram observadas linhagens genéticas (5 e 10) ocorrendo em simpatria e com alto valor de distância genética entre elas. A simpatria acontece também com as linhagens 1, 2, 4 e 9 que estão no Acre. Foi observado que dentro dos cultivos, diferentes etnovarietades reconhecidas pelos plantadores não floram no mesmo tempo (apresentam floração assíncrona). Se esse fato acontecer entre as linhagens de ambiente natural (de apresentar floração assíncrona), pode justificar o fato de as mesmas coexistirem e apresentarem altos valores de distância genética (Tabela 2).

Há uma baixa amostragem de espécies amazônicas nos estudos relacionados a família (Malpighiaceae) e ao gênero *Banisteriopsis*. A taxonomia se baseou tradicionalmente em caracteres morfológicos e em plantas tropicais. As dificuldades de classificação são frequentemente encontradas ao tentar definir caracteres diagnósticos morfológicos confiáveis. Portanto, marcadores morfológicos podem falhar na discriminação entre espécies morfológicamente semelhantes (como em espécies crípticas), onde a divergência evolutiva no genoma não é refletida no fenótipo que são usados para as separações das espécies (Rosell et al. 2010). No caso de *Banisteriopsis*, as

flores são relativamente semelhantes em termos de morfologia geral, o que torna difícil distinguir algumas espécies (Gates 1982).

A disponibilidade de marcadores morfológicos confiáveis para o diagnóstico de espécies geralmente requer investigações taxonômicas profundas, uma condição raramente encontrada para espécies tropicais (Duminil et al. 2012, Cardoso et al. 2017) e conseqüentemente para espécies amazônicas do gênero *Banisteriopsis*. Por esses motivos nos últimos anos a taxonomia integrativa vem ganhado destaque, onde são usadas informações morfológicas, genéticas e ecológicas para delimitação de espécies (Rosell et al. 2010, Cavers et al. 2013, Scotti-Saintagne et al. 2013, Vicentini 2016).

O presente estudo considerou 120 amostras de mariris que são utilizados para o preparo do chá *ayahuasca*, e essas amostras foram coletadas em quatro estados diferentes. Até o momento não existiam estudos (taxonômicos, genéticos, fitoquímicos) que avaliaram um grande número de amostras desse cipó, com a finalidade de caracterizar a diversidade desse grupo de plantas. As informações geradas com base nos marcadores moleculares podem complementar os estudos taxonômicos, contribuindo para a descrição de novas espécies (Valentini et al. 2009). O modelo GMYC (*generalized mixed Yule coalescent*) usa a informação genética para gerar um estimativa do número de unidades semelhantes a espécies (Collins e Cruickshank 2012). Nesse sentido, podemos classificar as 12 linhagens genéticas delimitadas no presente trabalho, como espécies candidatas não confirmadas: linhagens que são geneticamente divergentes, mas nenhum caractere morfológico adicional foi analisado para suportar essa divergência (caracteres morfológicos não foram analisados) (Vieites et al. 2009).

Crítérios como isolamento reprodutivo, monofilia, caracteres diagnósticos, e ecologia têm sido utilizadas para descrever muitas espécies. Apesar das particularidades de cada critério, implicitamente ou explicitamente todos eles relacionam espécies com linhagens evolutivas (Myers et al. 2000, De Queiroz 2007), o que pode justificar a classificação de espécies candidatas não confirmadas para as linhagens genéticas de *B. cf. caapi* delimitadas no presente estudo. Entretanto, múltiplas linhas de evidência são necessárias na delimitação de espécies, em razão de cada critério acessar um tipo diferente de informação sobre linhagens em divergência (De Queiroz 2007). Além dos resultados das análises de delimitação de espécies/linhagens que considera informações evolutivas, os resultados das distâncias genéticas entre as linhagens (Tabela 2), também podem reforçar a hipótese de que as linhagens de *B. cf. caapi* identificadas no presente trabalho, são espécies candidatas não confirmadas. Na perspectiva do DNA *barcode* são



considerados as distâncias genéticas para identificar espécies. Este método também pode auxiliar em estudos para averiguar se existe diversidade críptica ou possíveis novas espécies (Hebert et al. 2003; Liu et al. 2011). Os valores de distância genética do marcador nuclear ITS entre as linhagens de *B. cf. caapi* no presente trabalho resultou em valores de até 0,291 e foi superior quando comparado com os valores de distância genética entre espécies de *Phaseolus* e entre espécies de *Cercis*. Com base no ITS foi observado 0,06 de distância genética entre *P. lunatus* e *P. coccineus*, e de 0,02 entre *C. canadensis* var. *mexicana* e *C. glabra* (Coşkun e Parks 2009, Nicolè et al. 2011). As distâncias calculadas entre as linhagens de *B. cf. caapi* também foram superiores quando comparadas a distâncias encontradas entre espécies de *Cyperus* (espécie Amazônica usada por povos indígenas), onde os resultados de distância genética, considerando este marcador, apresentaram valores de 0,027 até 0,047 (Mezzasalma et al. 2017).

A incerteza em torno da riqueza e identidade das espécies vegetais da floresta amazônica compromete a ciência focada na conservação (Cardoso et al. 2017). Os esforços de conservação, devem tentar agregar tanto os índices de variabilidade quanto a manutenção desta. As amostras analisadas de mariri/jagube apresentaram 88 haplótipos, 201 sítios polimórficos, 0,967 de diversidade haplotípica, e as distâncias genéticas entre as linhagens variaram de 0,017 a 0,229, considerando o marcador molecular ITS. As linhagens genéticas 1, 2, 9 e 10 apresentaram altos índices de diversidade genética se comparadas com as outras linhagens delimitadas no presente estudo. A linhagem 6 apresentou os menores índices de diversidade genética e nessa linhagem estão inclusas a maioria das amostras que foram coletadas em ambiente cultivado. Como a conservação de espécies tem por base a manutenção dos níveis naturais de variabilidade genética nas populações, o conhecimento dos níveis e distribuição da variação genética dentro e entre populações é de fundamental importância para o estabelecimento de práticas conservacionistas eficientes. Entretanto, estudos posteriores de taxonomia integrativa podem trazer maiores esclarecimentos sobre a classificação taxonômica referente aos espécimes de cipó mariri/jagube que são utilizadas para o preparo do chá *ayahuasca*.

## 5. Conclusão

De acordo com as análises de delimitação de espécies/linhagens utilizando o marcador nuclear ITS, foram recuperadas 12 linhagens genéticas de *Banisteriopsis* cf. *caapi*. Essas linhagens genéticas delimitadas foram classificadas como espécies candidatas não confirmadas: linhagens que são geneticamente divergentes, mas nenhum

caractere morfológico adicional foi analisado para suportar essa divergência. As linhagens estão geograficamente relacionadas, o que é mais uma evidência que suporta os resultados encontrados com as análises do marcador molecular em questão.

*A priori* o manejo e conservação dessas linhagens de *B. cf caapi* podem ser realizados de maneira independente. Uma das propostas desse estudo foi que para cada amostra coletada (que foi submetida a análises genéticas) fosse também retirada estacas para serem cultivadas em Núcleos do CEBUDV localizados mais próximos da área de coleta, dessa forma, estabelecendo a conservação *ex situ* de todas essas amostras e linhagens genéticas que foram identificadas. No entanto, estudos futuros de taxonomia integrativa devem ser realizados para definição do estado taxonômico das linhagens genéticas que foram identificadas.

## REFERÊNCIAS

- Alto Falante, 2019. “Alto Falante”, *Veículo Informativo Oficial da Diretoria Geral da C.E.B.U.D.V.*, Julho, 2019.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Bouckaert, R.; Vaughan, T.G.; Barido-Sottani, J.; Duchêne, S.; Fourment, M.; Gavryushkina, A.; et al. 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology* 15: e1006650.
- Cardoso, D.; Särkinen, T.; Alexander, S.; Amorim, A.M.; Bittrich, V.; Celis, M.; et al. 2017. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 10695–10700.
- Carstens, B.C.; Reid, N.M. 2012. Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC Evolutionary Biology* 12: 196.
- Cavers, S.; Telford, A.; Arenal Cruz, F.; Pérez Castañeda, A.J.; Valencia, R.; Navarro, C.; et al. 2013. Cryptic species and phylogeographical structure in the tree *Cedrela odorata* L. throughout the Neotropics. *Journal of Biogeography* 40: 732–746.
- Collins, R.A.; Cruickshank, R.H. 2012. The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 13: n/a-n/a.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*: 11–15.
- Duminil, J.; Kenfack, D.; Viscosi, V.; Grumiau, L.; Hardy, O.J. 2012. Testing species delimitation in sympatric species complexes: The case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 275–285.
- Flot, J.F. 2010. Seqphase: A web tool for interconverting phase input/output files and fasta sequence alignments. *Molecular Ecology Resources* 10: 162–166.
- Fujisawa, T.; Barraclough, T.G. 2013. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology* 62: 707–724.
- Fujita, M.K.; Leaché, A.D.; Burbrink, F.T.; McGuire, J.A.; Moritz, C. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 27: 480–488.
- Gates, B. 1982. *Banisteriopsis, Diplopterys (Malpighiaceae)*. Flora Neot. New York Botanical Garden Press, 1–237p.
- Gomes, A.C.S.; Andrade, A.; Barreto-Silva, J.S.; Brenes-Arguedas, T.; López, D.C.; de Freitas, C.C.; et al. 2013. Local plant species delimitation in a highly diverse Amazonian forest: Do we all see the same species? *Journal of Vegetation Science* 24: 70–79.
- Kageyama, P.Y. 1987. Conservação in situ de recursos genéticos de plantas. *IPEF* 35: 7–37.
- Katoh, K.; Standley, D.M. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16: 111–120.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and*

- Evolution* 35: 1547–1549.
- Labate, B.C.; MacRae, E. 2006. The Light from the Forest: The Ritual Use of Ayahuasca in Brazil. *Fieldwork in Religion* 2.
- Lanfear, R.; Frandsen, P.B.; Wright, A.M.; Senfeld, T.; Calcott, B. 2017. Partitionfinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 34: 772–773.
- Langdon, E.J. 1986. Las clasificaciones del yagé dentro del grupo Siona: etnobotánica, etnoquímica e historia. In: *América Indígena XLVI*, p.101–116.
- MacRae, E. 2004. The ritual use of ayahuasca by three Brazilian religions. In: *Drug Use and Cultural Contexts 'beyond the West': Tradition, Change and Post-Colonialism*, p.27–45.
- Mezzasalma, V.; Bruni, I.; Fontana, D.; Galimberti, A.; Magoni, C.; Labra, M. 2017. A DNA barcoding approach for identifying species in Amazonian traditional medicine: The case of Piri-Piri. *Plant Gene* 9: 1–5.
- Mishra, P.; Kumar, A.; Nagireddy, A.; Shukla, A.K.; Sundaresan, V. 2017. Evaluation of single and multilocus DNA barcodes towards species delineation in complex tree genus Terminalia. *PLOS ONE* 12: e0182836.
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Oliveira, L.C.; Rodrigues, D.P.; Hopkins, M.J.G. 2017. Comparação de seis protocolos de extração de DNA para análises moleculares em espécies de Fabaceae. *Scientia Amazonia* 6: 38–45.
- Paradis, E.; Claude, J.; Strimmer, K. 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289–290.
- Platt, A.R.; Woodhall, R.W.; George, A.L. 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques* 43: 58–62.
- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic biology* 56: 879–886.
- Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Xie, D.; Baele, G.; Suchard, M.A. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67: 901–904.
- Rosell, J.A.; Olson, M.E.; Weeks, A.; De-Nova, J.A.; Lemos, R.M.; Camacho, J.P.; et al. 2010. Diversification in species complexes: Tests of species origin and delimitation in the *Bursera simaruba* clade of tropical trees (Burseraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 798–811.
- Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sanchez-DelBarrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S.E.; et al. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299–3302.
- Samoylenko, V.; Rahman, M.M.; Tekwani, B.L.; Tripathi, L.M.; Wang, Y.; Khan, S.I.; et al. 2010. *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology* 127: 357–367.
- dos Santos, R.G.; Hallak, J.E.C. 2019. Ayahuasca, an ancient substance with traditional and contemporary use in neuropsychiatry and neuroscience. *Epilepsy & Behavior*: 2–7.
- Schliep, K.P. 2011. phangorn: Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27: 592–593.
- Schultes, R.E.; Holmstedt, B. 1968. De Plantas toxicariis e mundo novo tropicale commentationes II. The vegetal ingredients of the Myristicaceous snuffs of the

- Northwest Amazon. *Rhodora* 70: 113-160.
- Schultes, R.E.; Holmstedt, B.; Lindgren, J. 1969. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale: Comentationes III. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 121-132.
- Schultes, R.E. 1974. De plants toxicariis e o mundo novo tropicale commentationes X. *Botanical Museum Leaflets Harvard University* 23: 137–147.
- Schultes, R.E. 1984. Psychoactive plants in need of chemical and pharmacological study. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* 93: 281–304.
- Schultes, R.E.; Hofmann, A.; Ratsch, C. 1992. *Plants Of The Gods: their sacred, healing, and hallucinogenic powers*. Rochester, Healing Arts Press.
- Scotti-Saintagne, C.; Dick, C.W.; Caron, H.; Vendramin, G.G.; Guichoux, E.; Buonamici, A.; et al. 2013. Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (*Carapa*, Meliaceae). *Journal of Biogeography* 40: 676–692.
- Serrano-Deñas, M.; Cardozo-Pelaez, F.; Sanchez-Ramos, J.R. 2001. Effects of *Banisteriopsis caapi* extract Parkinson's disease. *The Scientific Review of Alternative Medicine* 5: 127–132.
- ter Steege, H.; Pitman, N.C.A.; Sabatier, D.; Baraloto, C.; Salomao, R.P.; Guevara, J.E.; et al. 2013. Hyperdominance in the Amazonian Tree Flora. *Science* 342: 1243092–1243092.
- Ter Steege, H.; Vaessen, R.W.; Cárdenas-López, D.; Sabatier, D.; Antonelli, A.; De Oliveira, S.M.; et al. 2016. The discovery of the Amazonian tree flora with an updated checklist of all known tree taxa. *Scientific Reports* 6: 1–15.
- Stephens, M.; Smith, N.J.; Donnelly, P. 2001. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. *The American Journal of Human Genetics* 68: 978–989.
- Valentini, A.; Pompanon, F.; Taberlet, P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 110–117.
- Vicentini, A. 2016. The Evolutionary History of *Pagamea* (Rubiaceae), a White-sand Specialist Lineage in Tropical South America. *Biotropica* 48: 58–69.
- Vieites, D.R.; Wollenberg, K.C.; Andreone, F.; Kohler, J.; Glaw, F.; Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 8267–8272.
- Villaverde, T.; Escudero, M.; Martín-Bravo, S.; Luceño, M. 2017. Two independent dispersals to the Southern Hemisphere to become the most widespread bipolar *Carex* species: Biogeography of *C. canescens* (Cyperaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 183: 360–372.
- Wang, Y.; Samoylenko, V.; Tekwani, B.L.; Khan, I.A.; Miller, L.S.; Chaurasiya, N.D.; et al. 2010. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology* 128: 662–671.
- Yu, G.; Smith, D.K.; Zhu, H.; Guan, Y.; Lam, T.T.Y. 2017. Ggtree: an R Package for Visualization and Annotation of Phylogenetic Trees With Their Covariates and Other Associated Data. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 28–36.

## Material Suplementar – Capítulo 2

**Tabela Suplementar 1.** Dados referentes as amostras de *Banisteriopsis cf. caapi* que foram utilizadas para as análises de delimitação de linhagens, diversidade genética dos cipós utilizados para o prepare do chá *ayahuasca*.

<b>Linhagem (GMYC e bGMYC)</b>	<b>Número de campo</b>	<b>Município e Estado de coleta</b>	<b>Ambiente de coleta</b>	<b>Etnovariedade</b>
1	AC42	Brasiléia - AC	Natural	Tucunacá
1	AC32	Assis Brasil - AC	Natural	Tucunacá
1	AC34	Assis Brasil - AC	Natural	Tucunacá
1	PA5	Santarém - PA	Cultivado	Tucunacá
1	AC22	Feijó - AC	Natural	Tucunacá
1	AC24	Feijó - AC	Natural	Tucunacá
1	AC21	Feijó - AC	Natural	Tucunacá
1	AC59	Rio Branco - AC	Natural	Tucunacá
1	AC70	Rio Branco - AC	Natural	Tucunacá
1	AC60	Rio Branco - AC	Natural	Tucunacá
1	AC54	Rio Branco - AC	Natural	Tucunacá
1	RD5	Cabixi - RO	Natural	Tucunacá
1	AC36	Assis Brasil - AC	Natural	Tucunacá
1	RD31	Ariquemes - RO	Natural	Amarelinho
1	RD16	Seringueiras - RO	Natural	Tucunacá
1	PA1	Santarém - PA	Cultivado	Tucunacá
1	AC62	Lábrea - AM	Natural	Tucunacá
1	AC57	Rio Branco - AC	Natural	Tucunacá
1	AC50	Plácido de Castro - AC	Natural	Tucunacá
1	AC61	Lábrea - AM	Natural	Tucunacá
1	AC68	Extrema - RO	Natural	Tucunacá
1	AC63	Lábrea - AM	Natural	Tucunacá
1	AC69	Rio Branco - AC	Natural	Tucunacá
1	AC58	Rio Branco - AC	Natural	Tucunacá
1	AC45	Plácido de Castro - AC	Natural	Tucunacá
1	FSS9	Boca do Acre - AM	Cultivado	Tucunacá
1	RD32	Campo Novo de Rondônia - RO	Natural	Amarelinho
1	RD13	Cacoal - RO	Natural	Tucunacá
1	RD34	Cujubim - RO	Natural	Amarelinho
1	RD19	Alta Floresta D'Oeste -RO	Natural	Tucunacá
1	RD4	Colorado do Oeste - RO	Natural	Tucunacá
1	RD15	Cacoal - RO	Natural	Tucunacá
1	RD11	Cacoal - RO	Natural	Tucunacá
1	AC67	Extrema - RO	Natural	Tucunacá
1	RD38	Colina Verde - RO	Natural	Amarelinho
1	RD36	Jaru - RO	Natural	Amarelinho
1	RD14	Cacoal - RO	Natural	Tucunacá
1	RD37	Vale do Paraíso - RO	Natural	Amarelinho
1	RD18	Alta Floresta D'Oeste -RO	Natural	Tucunacá
1	RD20	Alta Floresta D'Oeste -RO	Natural	Tucunacá

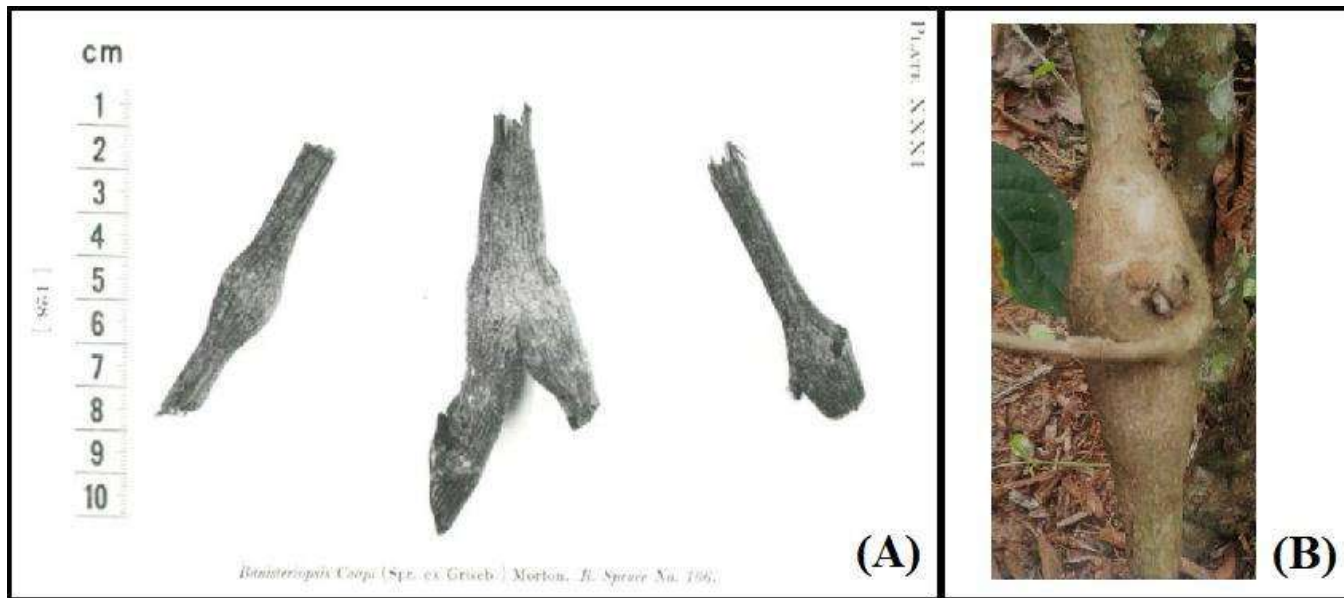
1	AC38	Assis Brasil - AC	Natural	Tucunacá
2	AC20	Porto Walter - AC	Natural	Tucunacá
2	AC18	Porto Walter - AC	Natural	Tucunacá
2	AC5	Santa Luzia - AC	Natural	Tucunacá
2	AC2	Santa Luzia - AC	Natural	Tucunacá
2	AC12	Mâncio Lima - AC	Natural	Tucunacá
2	AC25	Feijó - AC	Natural	Tucunacá
2	AC8	Santa Luzia - AC	Natural	Tucunacá
2	AC13	Mâncio Lima - AC	Natural	Tucunacá
3	TE6	Tefé - AM	Natural	Tucunacá
3	TE7	Tefé - AM	Natural	Tucunacá
3	TE3	Tefé - AM	Natural	Tucunacá
3	TE5	Tefé - AM	Natural	Tucunacá
3	TE4	Tefé - AM	Natural	Tucunacá
3	TE9	Tefé - AM	Natural	Tucunacá
3	TE1	Tefé - AM	Natural	Tucunacá
3	MA8	Manaus - AM	Cultivado	Mariri
4	AC29	Guajará - AM	Natural	Tucunacá
4	AC28	Guajará - AM	Natural	Tucunacá
4	AC27	Guajará - AM	Natural	Tucunacá
4	AC26	Guajará - AM	Natural	Tucunacá
4	AC17	Porto Walter - AC	Natural	Tucunacá
4	AC3	Santa Luzia - AC	Natural	Tucunacá
4	AC4	Santa Luzia - AC	Natural	Tucunacá
4	AC19	Porto Walter - AC	Natural	Tucunacá
4	AC9	Santa Luzia - AC	Natural	Tucunacá
4	AC10	Santa Luzia - AC	Natural	Tucunacá
5	SA2	Novo Airão - AM	Natural	Nativo
5	PF1	Presidente Figueiredo -AM	Natural	Tucunacá
5	NA1	Novo Airão - AM	Natural	Nativo
5	PF2	Presidente Figueiredo -AM	Natural	Tucunacá
5	PF14	Presidente Figueiredo -AM	Natural	Tucunacá
5	PF6	Presidente Figueiredo -AM	Natural	Tucunacá
5	PF3	Presidente Figueiredo -AM	Natural	Tucunacá
5	PF11	Presidente Figueiredo -AM	Natural	Tucunacá
5	SA5	Novo Airão - AM	Natural	Nativo
5	SA1	Novo Airão - AM	Natural	Nativo
5	TA1	Manaus - AM	Cultivado	Tucunacá
6	CA3	Irاندuba - AM	Natural	Nativo
6	SD2**	Manaus - AM	Cultivado	Caupuri
6	MOAC7**	Manaus - AM	Cultivado	Pajezinho
6	SD4**	Manaus - AM	Cultivado	Caupuri
6	FN1	Manaus - AM	Cultivado	Tucunacá
6	MA1**	Manaus - AM	Cultivado	Mariri
6	ME1	Maués - AM	Cultivado	Mariri
6	SD5**	Manaus - AM	Cultivado	Caupuri

6	MA12**	Manaus - AM	Cultivado	Mariri
6	TA2**	Manaus - AM	Cultivado	Tucunacá
6	VM6**	Manaus - AM	Cultivado	Caupuri
6	VM4	Manaus - AM	Cultivado	Caupuri
6	CA1**	Irاندوبا - AM	Natural	Nativo
6	CA2**	Irاندوبا - AM	Natural	Nativo
6	MA7**	Manaus - AM	Cultivado	Mariri
6	CA4	Irاندوبا - AM	Natural	Nativo
6	FN2**	Manaus - AM	Cultivado	Caupuri
6	NA3	Novo Airão - AM	Cultivado	Nativo
6	VM1	Manaus - AM	Cultivado	Tucunacá
6	MAO2	Manaus - AM	Cultivado	Tucunacá
6	AC23	Feijó - AC	Natural	Tucunacá
6	AC1	Santa Luzia - AC	Natural	Tucunacá
7	TA4**	Manaus - AM	Cultivado	Tucunacá
8	SD1	Manaus - AM	Cultivado	Ourinho
9	PA4	Santarém - PA	Cultivado	Tucunacá
9	MOAC3**	Manaus - AM	Cultivado	Caupuri
9	PA2	Santarém - PA	Cultivado	Tucunacá
9	PA3	Santarém - PA	Cultivado	Tucunacá
9	AC56	Rio Branco - AC	Natural	Tucunacá
9	AC41	Brasiléia - AC	Natural	Tucunacá
9	AC51	Plácido de Castro - AC	Natural	Tucunacá
10	PF8	Presidente Figueiredo - AM	Natural	Tucunacá
10	PF13	Presidente Figueiredo - AM	Natural	Tucunacá
10	PF5	Presidente Figueiredo - AM	Natural	Tucunacá
10	PF10	Presidente Figueiredo - AM	Natural	Tucunacá
10	PF7	Presidente Figueiredo - AM	Natural	Tucunacá
10	VM2	Manaus - AM	Cultivado	Tucunacá
10	PF12	Presidente Figueiredo - AM	Natural	Tucunacá
10	PF9	Presidente Figueiredo - AM	Natural	Tucunacá
11	SA3	Novo Airão - AM	Natural	Nativo
12	FN4	Manaus - AM	Cultivado	Pajezinho
12	BR174	Manaus - AM	Natural	Pajezinho





**Figura Suplementar 1.** Diferentes morfologias de nó de *Banisteriopsis cf. caapi* em amostras coletadas no Amazonas.



**Figura Suplementar 2.** Morfologias do nó de caule de cipós utilizados no preparo da *ayahuasca*. (A) *Banisteriopsis caapi*, amostra coletada por Spruce (retirada de Schultes et al 1969); (B) *Banisteriopsis* cf. *caapi*, amostra FN4 coletada para análises no presente estudo

## CONCLUSÕES GERAIS

- As análises das sequências dos marcadores moleculares do cloroplasto, não resultaram em polimorfismos e índices de diversidade suficientes entre as amostras para acessar a variação genética do cipó utilizado no preparo do chá *ayahuasca*; Apesar dos baixos índices de diversidade genética desses marcadores, os mesmos se mostraram adequados para a identificação molecular no nível de gênero para as amostras de mariri utilizadas no preparo do chá *ayahuasca*.
- Os marcadores nucleares mostraram-se promissores para o acesso a diversidade genética de *Banisteriopsis* cf. *caapi* e na identificação de diferentes linhagens genéticas;
- O ITS apresentou boa qualidade no sequenciamento e não apresentou problemas quanto ao alinhamento, revelando ser um bom marcador molecular para esse grupo de plantas;
- As análises com o marcador molecular ITS conseguiram agrupar amostras que estavam em ambiente de cultivo com amostras que foram coletadas em ambiente natural;
- Foram recuperadas 12 linhagens genéticas de *Banisteriopsis* cf. *caapi*. Essas linhagens genéticas delimitadas foram classificadas como espécies candidatas não confirmadas. As linhagens estão geograficamente relacionadas, o que é mais uma evidência que suporta os resultados encontrados com as análises do marcador molecular em questão;
- Estudos integrativos posteriores devem trazer maiores esclarecimentos sobre a classificação taxonômica referente aos espécimes de cipó que são utilizados para o preparo do chá *ayahuasca*.