



**LILIANA ROCIVALDA GOMES LEITÃO**

**GENÔMICA COMPARATIVA EM *Piper* L.**

**LAVRAS-MG  
2023**

**LILIANA ROCIVALDA GOMES LEITÃO**

**GENÔMICA COMPARATIVA EM *Piper L.***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas,  
área de concentração em Genética e Melhoramento de  
Plantas, para obtenção do título de Doutora.

Profª. Dra. Giovana Augusta Torres  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Leitão, Liliana Rocivalda Gomes.

Genômica comparativa em *Piper L.* / Liliana Rocivalda Gomes Leitão. - 2023.

87 p. : il.

Orientador(a): Giovana Augusta Torres.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Espécies de *Piper*. 2. Elementos repetitivos. 3. Genoma de cloroplastos.  
I. Torres, Giovana Augusta. II. Título.

**LILIANA ROCIVALDA GOMES LEITÃO**

**GENÔMICA COMPARATIVA EM *Piper L.***  
**COMPARATIVE GENOMICS IN *Piper L.***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas,  
área de concentração em Genética e Melhoramento de  
Plantas, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 29 de junho de 2023.

Dra. Magdalena Vaio Scvortzoff	UDELAR
Dr. Jacson Rondinelli da Silva Negreiros	EMBRAPA
Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza	UFPE
Dra. Ludmila Cristina Oliveira	ASCR

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres  
Orientadora

**LAVRAS-MG**  
**2023**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pelas bênçãos recebidas.

À minha família por sempre estar ao meu lado, incentivando-me nos momentos de desânimo e comemorando nos momentos de vitória. Sou grata por todo amor recebido.

À minha filha, meu maior presente de Deus, você me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia, obrigada por ser do jeitinho que é.

Ao grupo de Citogenética Vegetal, em especial ao Alex, Ana Gabriela, Bruna, Clara, Giovanna, Lara, Marcelo e Tiago, agradeço por toda ajuda, risadas, pelas confraternizações e trocas de experiências durante todo esse período de convívio.

À Professora Magdalena agradeço por toda atenção, generosidade e ajuda nas análises. Também agradeço pelas contribuições para melhoria do trabalho e por fazer parte da minha banca examinadora. Muito obrigada.

Ao Pesquisador Jacson Negreiros, Professor Gustavo Souza e Pesquisadora Ludmila Oliveira também agradeço pelas contribuições para melhoria do trabalho e por fazer parte da minha banca examinadora. Muito obrigada.

À Professora Giovana Torres agradeço por toda ajuda, paciência, atenção e carinho que recebi durante esses anos. Foram dias difíceis, cheios de obstáculos, mas com ajuda mútua meu doutorado se tornou uma jornada de muito aprendizado e experiência. Fico muito feliz por ter participado do seu grupo de estudo. Muito obrigada.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas agradeço pela qualidade de ensino e oportunidade de realização do meu doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“Todas as conquistas começam pelo simples ato de acreditar que elas são possíveis” (Isi Golfetto)*

## RESUMO

*Piper* L. é considerado o segundo maior gênero das Angiospermas e apresenta espécies com elevada importância socioeconômica, incluindo as produtoras de óleos essenciais, como *Piper hispidinervum* C.DC, *Piper aduncum* L. e *Piper* aff. *hispidinervum* C.DC. Essas espécies estão envolvidas em uma controvérsia taxonômica por possuírem características morfológicas e citogenéticas muito similares. A fim de identificar caracteres de maior resolução para definição de seus *status* taxonômico, objetivou-se realizar uma análise comparativa e filogenética da fração repetitiva de DNA e do genoma cloroplastidial entre elas. Os DNA genômicos foram sequenciados na plataforma Illumina e as análises das sequências repetitivas foram realizadas no *pipeline RepeatExplorer*. A espécie *Piper nigrum* foi usada como grupo externo a partir de sequências de nucleotídeos disponíveis no banco ENA. A similaridade entre as sequências satélite foi determinada pelo alinhamento MAFFT no *software* UGENE. Sequências de aminoácidos dos domínios proteicos conservados da superfamília *Ty3-Gypsy* foram extraídas e as relações filogenéticas foram estabelecidas pelo método Neighbor-Joining. Os genomas de cloroplastos foram montados no NOVOPlasty, anotados via GeSeq-CHLOROBX e Geneious Prime e os mapas gráficos circulares obtidos no OrganellarGenomeDRAW. As sequências dos genomas cloroplastidiais foram alinhadas com MAFFT e a árvore filogenética foi construída com 32 espécies de *Piper* pelo método de Máxima Verossimilhança. A fração repetitiva representou cerca de 60% do genoma de *P. hispidinervum*, 62% de *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*. Os retrotransposons foram a classe mais abundante, sendo a ordem LTR (52%) e a superfamília *Ty3-Gypsy* (49,8%) responsáveis pela maior parte da fração repetitiva em *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*. A família *EnSpm-CACATA* esteve ausente em *P. nigrum* e foi a mais abundante dos transposons nas demais espécies. Por outro lado, as famílias *hAT* e *Mutator* foram mais abundantes em *P. nigrum* e estiveram em menores quantidades nas demais espécies. Sequências satélite foram identificadas em todos os genomas e foram classificadas em nove famílias. Apenas o satélite PafSat1 foi compartilhado em todas as espécies, enquanto os satélites PadSat1 e PadSat2 foram exclusivos de *P. aduncum* e PniSat1 e PniSat2 foram exclusivos de *P. nigrum*. A superfamília *Ty3-Gypsy* formou seis clados com linhagens comuns da retrotransposase entre as espécies de *Piper*. O genoma do cloroplasto das espécies analisadas possui estrutura quadripartida, formada pela pequena região de cópia única (SSC), regiões de repetições invertidas (IRa e IRb) e grande região de cópia única (LSC). *P. aduncum* apresentou genoma com tamanho de 161.719 pb, *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* apresentaram tamanhos de 161.287 e 161.257 pb, respectivamente, e todas apresentaram 129 genes, sendo 88 genes codificadores de proteínas, 34 RNA transportadores e sete RNA ribossômicos. A fração repetitiva e os genomas cloroplastidiais de *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* foram mais próximos entre si e mais distantes de *P. aduncum*, corroborando com a hipótese de *P. hispidinervum* ser uma espécie distinta de *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* um ecótipo de *P. hispidinervum*.

**Palavras-chave:** Espécies de *Piper*. Elementos repetitivos. Genoma de cloroplastos.

## ABSTRACT

*Piper* L. is considered the second largest genus of Angiosperms and has species of high socioeconomic importance, including those that produce essential oils, such as *Piper hispidinervum* C.DC, *Piper aduncum* L. e *Piper* aff. *hispidinervum* C.DC. These species are involved in a taxonomic controversy because they have very similar morphological and cytogenetic traits. In order to identify higher resolution traits to define their taxonomic status, the aim was to carry out a comparative and phylogenetic analysis of the repetitive collection of DNA and the chloroplast genome between them. Genomic DNAs were sequenced on Illumina and repetitive sequence analyzes were performed on the RepeatExplorer pipeline. The species *Piper nigrum* L. was used as outgroup from nucleotide sequences available in the ENA bank. The similarity between the satellite sequences was determined by MAFFT in the UGENE software. Amino acid sequences of conserved protein domains of the Ty3-Gypsy superfamily were extracted, and phylogenetic relationships protected by the Neighbor-Joining method. Chloroplast genomes were assembled in NOVOPlasty, annotated via GeSeq-CHLOROBOX and Geneious Prime, and circular graphic maps obtained in OrganellarGenomeDRAW. The chloroplast genome sequences were identified with MAFFT, and the phylogenetic tree was built with 32 *Piper* species by the Maximum Likelihood method. The repetitive sample represented about 60% of the genome of *P. hispidinervum*, 62% of *P. aduncum* and *P. aff. hispidinervum*. Retrotransposons were the most abundant class, with the LTR order (52%) and the Ty3-Gypsy superfamily (49.8%) accounting for most of the repetitive revenue in *P. hispidinervum*, *P. aduncum*, and *P. aff. hispidinervum*. The EnSpm-CACATA family was absent in *P. nigrum* and was the most abundant transposon in the other species. On the other hand, the hAT and Mutator families were more abundant in *P. nigrum* and remained in lower capacities in the other species. DNA satellites were identified in all genomes and were classified into new families. Only the PafSat1 satellite was shared in all species, while the PadSat1 and PadSat2 satellites were exclusive to *P. aduncum* and PniSat1 and PniSat2 were exclusive to *P. nigrum*. The Ty3-Gypsy superfamily comprises six clades with common lineages of retrotransposition among *Piper* species. The chloroplast genome of these species has a quadripartite structure, formed by the small single copy region (SSC), inverted repeat regions (IRa and IRb) and the large single copy region (LSC). *P. aduncum* had a genome size of 161,719 bp, *P. hispidinervum* and *P. aff. hispidinervum* showed patterns of 161,287 and 161,257 bp, respectively, and all approved 129 genes, 88 protein-coding genes, 34 transfer RNA genes and seven ribosomal RNA genes. The repetitive collection and chloroplast genomes of *P. hispidinervum* and *P. aff. hispidinervum* were closer to each other and more distant from *P. aduncum*, supporting the hypothesis that *P. hispidinervum* is a distinct species from *P. aduncum* and *P. aff. hispidinervum* an ecotype of *P. hispidinervum*.

**Keywords:** *Piper* species. Repetitive elements. Chloroplast genome.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – <i>Piper aduncum</i> (a), <i>Piper hispidinervum</i> (b) e <i>Piper</i> aff. <i>hispidinervum</i> (c).....	47
Figura 2.2 – Abundância das superfamílias de LTR e transposons na análise comparativa de <i>Piper aduncum</i> , <i>Piper hispidinervum</i> , <i>Piper</i> aff. <i>hispidinervum</i> e <i>Piper nigrum</i> .....	52
Figura 2.3 – Abundância das sequências de DNA satélites identificadas em <i>Piper aduncum</i> (Pa), <i>Piper</i> aff. <i>hispidinervum</i> (Paf), <i>Piper hispidinervum</i> (Ph) e <i>Piper nigrum</i> (Pn).....	54
Figura 2.4 – Dotplot da análise conjunta das sequências de DNA satélites identificadas em <i>Piper aduncum</i> (Pad), <i>Piper hispidinervum</i> (Phs), <i>Piper</i> aff. <i>hispidinervum</i> (Paf) e <i>Piper nigrum</i> (Pni).....	55
Figura 2.5 – Relações filogenéticas entre os domínios proteicos da superfamília <i>Ty3-Gypsy</i> nos genomas de <i>Piper</i> . Valores de bootstrap localizados em cada nó da árvore filogenética.....	56
Figura 3.1 – Mapas circulares do genoma do cloroplasto de <i>Piper aduncum</i> (a), <i>Piper hispidinervum</i> (b), <i>Piper</i> aff. <i>hispidinervum</i> (c) e <i>Piper nigrum</i> (d). Genes internos ao mapa são transcritos em sentido horário e genes externos são transcritos em sentido anti-horário.....	77
Figura 3.2 – Comparação entre os limites das regiões LSC (cópia única longa), SSC (cópia única curta) e IR (regiões invertidas a e b) no genoma de <i>Piper aduncum</i> , <i>Piper hispidinervum</i> , <i>Piper</i> aff. <i>hispidinervum</i> . As linhas pontilhadas verticais representam a junção entre duas regiões. Genes acima das linhas são transcritos em sentido horário e abaixo das linhas em sentido anti-horário.....	79
Figura 3.3 – Árvore filogenética de 32 genomas de cloroplastos de <i>Piper</i> e uma espécie de grupo externo.....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição do genoma cloroplastidial de espécies de <i>Piper</i> publicadas em periódicos.....	33
Tabela 2.1 – Composição da fração repetitiva de DNA nos genomas de <i>Piper aduncum</i> (Pa), <i>Piper hispidinervum</i> (Ph), <i>Piper</i> aff. <i>hispidinervum</i> (Paf) e <i>Piper nigrum</i> (Pn).....	51
Tabela 2.2 – Classificação, comprimento e abundância das sequências satélites em <i>Piper aduncum</i> (Pa), <i>Piper hispidinervum</i> (Ph), <i>Piper</i> aff. <i>hispidinervum</i> (Paf) e <i>Piper nigrum</i> (Pn).....	54
Tabela 3.1 – Composição do genoma cloroplastidial de espécies de <i>Piper</i> . N: Neotrópicos, TA: Trópicos Asiáticos, PS: Pacífico Sul.....	75
Tabela 3.2 – Composição do genoma cloroplastidial de <i>Piper aduncum</i> (Pa), <i>Piper hispidinervum</i> (Ph) e <i>Piper</i> aff. <i>hispidinervum</i> (Paf).....	76
Tabela 3.3 – Conteúdo gênico do genoma cloroplastidial de <i>Piper aduncum</i> , <i>Piper hispidinervum</i> , <i>Piper</i> aff. <i>hispidinervum</i> *Exclusivo de Pad. **Exclusivo de Phi e Paf. +Genes duplicados. Genes sem asterisco indicam que são comum entre as espécies.....	78

## LISTA DE SIGLAS

BAG	Banco Ativo de Germoplasma
ENA	European Nucleotide Archive
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
IR	Inverted Repeat
LSC	Large Single Copy
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RNA <sub>t</sub>	RNA transportador
RNA <sub>r</sub>	rRNA ribossômico
SSC	Small Single Copy

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 ANÁLISES COMPARATIVA E FILOGENÉTICA DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS DE DNA E GENOMA CLOROPLASTIDIAL EM ESPÉCIES DE <i>Piper</i> L.</b>		<b>14</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Origem, diversidade, botânica e citogenética de <i>Piper</i> spp.</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Importância socioeconômica</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Classificação taxonômica</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Elementos repetitivos do genoma eucarioto</b>	<b>23</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Família <i>Tandem Repeats</i></b>	<b>23</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Família <i>Dispersed Repeats</i></b>	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>Filogenia molecular</b>	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b>Genoma cloroplastidial</b>	<b>29</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Características e origem dos cloroplastos</b>	<b>29</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Herança e estruturas genômicas</b>	<b>30</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Genoma cloroplastidial em <i>Piper</i></b>	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO 2 FRAÇÃO DO DNA REPETITIVO E FILOGENIA DOS DOMÍNIOS PROTEICOS EM <i>Piper</i> L.</b>		<b>43</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>46</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<b>2.1</b>	<b>Material genético, extração de DNA e sequenciamento genômico</b>	<b>47</b>
<b>2.2</b>	<b>Pré-processamento e análise da fração repetitiva</b>	<b>48</b>
<b>2.3</b>	<b>Filogenia dos domínios conservados</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Caracterização da fração repetitiva</b>	<b>50</b>
<b>3.2</b>	<b>Caracterização das sequências de DNA satélite</b>	<b>53</b>
<b>3.3</b>	<b>Filogenia dos domínios da retrotransposase (RT)</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>62</b>

	<b>ANEXO A – Análise individual da fração repetitiva de DNA nos genomas de <i>Piper aduncum</i> (Pa), <i>Piper hispidinervum</i> (Ph), <i>Piper aff. hispidinervum</i> (Paf) e <i>Piper nigrum</i> (Pn) .....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO B – Sequências dos monômeros de DNA satélites identificados nos genomas de <i>Piper aduncum</i> (Pad), <i>Piper hispidinervum</i> (Phs), <i>Piper aff. hispidinervum</i> (Paf) e <i>Piper nigrum</i> (Pni) .....</b>	<b>67</b>
	<b>CAPÍTULO 3 ANÁLISE COMPARATIVA DO GENOMA CLOROPLASTIDIAL DE <i>Piper</i> L. ....</b>	<b>68</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
<b>2.1</b>	<b>Montagem do genoma cloroplastidial das espécies de <i>Piper</i> .....</b>	<b>73</b>
<b>2.2</b>	<b>Análise filogenética .....</b>	<b>74</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>76</b>
<b>3.1</b>	<b>Estrutura e composição dos genomas cloroplastidiais .....</b>	<b>76</b>
<b>3.2</b>	<b>Limite entre as regiões gênicas .....</b>	<b>79</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise filogenética .....</b>	<b>80</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Piper hispidinervum</i> como uma espécie distinta de <i>Piper aduncum</i> .....</b>	<b>82</b>
<b>4.2</b>	<b><i>Piper aff. hispidinervum</i> como ecótipo de <i>Piper hispidinervum</i> .....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>

**CAPÍTULO 1**  
**ANÁLISES COMPARATIVA E FILOGENÉTICA DE SEQUÊNCIAS REPETITIVAS**  
**DE DNA E GENOMA CLOROPLASTIDIAL EM ESPÉCIES DE *Piper* L**

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Piper* L. constitui o segundo maior gênero das Angiospermas (2.171 espécies) e um dos maiores gêneros da família Piperaceae (> 2.000 espécies), possuindo uma notável importância socioeconômica, visto que muitas espécies são usadas como especiarias, aromatizantes, plantas medicinais e alimentares não convencionais (GROUP, 2016; SALEHI *et al.*, 2019). Os óleos essenciais contêm os metabólitos secundários extraídos de algumas espécies, como *Piper hispidinervum* C.DC., *Piper aduncum* L. e *Piper affinis hispidinervum* C.DC., e são utilizados nas indústrias cosméticas, de química fina e biopesticidas (SILVA *et al.*, 2017; SIVIERO *et al.*, 2015).

*Piper hispidinervum* C.DC. também chamada de “pimenta longa” é nativa Amazônia ocidental (Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima) e possui o safrol como principal componente de seu óleo essencial (NEGREIROS; MIQUELONI, 2015; SIVIERO *et al.*, 2015). *Piper aduncum* L. ou “pimenta-de-macaco” é uma espécie nativa da América Tropical com ampla dispersão no território brasileiro e apresenta óleo essencial com alto teor de dilapiol (SIVIERO *et al.*, 2015). Já *P. aff. hispidinervum* C.DC. é nativo do Acre e apresenta óleo essencial rico em sarisan (BIZZO *et al.*, 2001).

Essas duas espécies e os exemplares de *P. aff. hispidinervum* se destacam no germoplasma da Embrapa Acre por apresentarem capacidade de produção comercial de tais óleos essenciais (SILVA; OLIVEIRA, 2000a; BIZZO *et al.*, 2001). Espécimes de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* foram identificadas por Elsie Franklin no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e alguns exemplares coletados na região de Tarauacá/Envira-AC não tiveram o status definido devido às similaridades morfológicas com *P. hispidinervum*. Contudo, por apresentarem o sarisan como o principal componente de seu óleo essencial, esses exemplares foram denominados provisoriamente de *Piper affinis hispidinervum* (BIZZO *et al.*, 2001).

A caracterização da diversidade genética da coleção de *Piper* da Embrapa Acre, por meio de marcadores RAPD, revelou uma clara distinção entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum*, mas os genótipos de *P. aff. hispidinervum* formaram um subgrupo dentro de *P. hispidinervum*, não sendo possível a separação clara entre eles (WADT, EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004). Essa dificuldade de classificação levou à proposição das hipóteses de que *P. hispidinervum* seja uma espécie distinta de *P. aduncum* e que *P. aff. hispidinervum* seja um ecótipo de *P. hispidinervum* ou um híbrido entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum* (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

Do ponto de vista citogenético, Nunes *et al.* (2022) relataram que *P. aduncum* e *P. hispidinervum* apresentam cariótipos semelhantes quanto ao número e morfologia dos cromossomos. Soares *et al.* (2022) também relataram alta similaridade cariotípica, com todas as espécies apresentando 26 cromossomos com morfologia muito similar e com o mesmo padrão de distribuição de sítios de DNAr 5S e 35S. A hibridização recíproca de sondas genômicas revelou um padrão semelhante nas três espécies, com sinais GISH+ predominantemente localizados na região centromérica.

A persistência dessa indefinição prejudica os trabalhos desenvolvidos de identificação e caracterização dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de pimenta longa e pimenta-de-macaco da Embrapa Acre e, por conseguinte, a conservação e o uso da variabilidade que servirão de base para o programa de melhoramento dessas espécies (BERGO *et al.*, 2002). Portanto, é importante a geração de informações de maior resolução sobre o genoma dessas espécies.

O uso de plataformas de sequenciamento associado às diversas ferramentas de bioinformática tem permitido uma análise genômica de alta resolução em diferentes grupos de organismos. Com custo inferior e sem necessidade de montagem do genoma, o sequenciamento de baixa cobertura e o uso de plataformas online vêm se tornando uma opção amplamente utilizada por fornecer informações relevantes sobre a caracterização das sequências repetitivas de DNA e sobre o genoma cloroplastidial a fim de elucidar as relações taxonômicas e filogenéticas em grupos com baixa diferenciação (NOVÁK *et al.*, 2020; DIERCKXSENS; MARDULYN; SMITS, 2017).

Regiões repetitivas de DNA demonstraram sinal filogenético em cinco ordens de angiospermas (Lamiales, Fabales, Liliales, Gentianales e Solanales). Essas regiões forneceram resultados semelhantes ao da análise usando marcadores filogenéticos padrão. A fração repetitiva de DNA, além de fornecer dados para inferência filogenética bem suportada, também pode ser utilizada em estudos comparativos, sobretudo em organismos que possuem baixa diferenciação genética (DODSWORTH *et al.*, 2015), como em algumas espécies de *Piper*.

No gênero *Piper*, a caracterização dos elementos repetitivos foi determinada na pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). Os elementos repetitivos constituíram 55% do genoma dessa espécie, com predomínio da ordem LTR e das superfamílias *Ty3-Gypsy* e *Ty1-Copia*. Esses elementos repetitivos também forneceram evidências sobre a posição filogenética das magnoliídeas como um clado irmão ao das monocotiledôneas, demonstrando que as regiões repetitivas podem ser usadas na separação de grupos entre as angiospermas basais (HU *et al.*, 2019).



Com relação à caracterização do genoma cloroplastidial, 29 espécies de *Piper* tiveram seus genomas de cloroplastos sequenciados e montados, não havendo relatos para *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*. A composição gênica dessa organela revelou que genes de cloroplastos fornecem marcas específicas para a reconstrução filogenética do gênero, minimizando os erros taxonômicos causados por similaridades morfológicas (LI *et al.*, 2022; GAIKWAD *et al.*, 2023). Desse modo, as sequências repetitivas de DNA e o genoma de cloroplasto são informações promissoras para estudos comparativos e filogenéticos a fim de auxiliar na classificação taxonômica de espécies de *Piper*.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi testar as hipóteses de relacionamento entre as duas espécies de *Piper* e os exemplares de *P. aff. hispidinervum* por meio de análises comparativa e filogenética do genoma cloroplastidial e das sequências repetitivas de DNA do genoma nuclear de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Origem, diversidade, botânica e citogenética de *Piper* spp.

Piperaceae é uma das famílias basais do grupo das Angiospermas, sendo constituída por plantas trepadeiras, herbáceas, arbustivas e árvores. A família Piperaceae agrupa cinco gêneros - *Manekia* Trel., *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Piper* L., *Verhuellia* Miq. e *Zippelia* Blume, sendo *Piper* o segundo maior gênero de Piperaceae e das Angiospermas, como um todo. Originário da região neotropical durante o Cretáceo (cerca de 71,75 milhões de anos atrás), se diversificou ao longo do Terciário, há cerca de 37,33 milhões de anos, na era Cenozóica (LIM *et al.*, 2019; MARTÍNEZ *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2008).

*Piper* possui espécies distribuídas em três principais linhagens biogeográficas: Neotrópicos (1300 spp.), Pacífico Sul (10 spp.) e Trópicos Asiáticos (600 spp.) (JARAMILLO *et al.*, 2008; JARAMILLO; MANOS, 2001). Apesar da distribuição pantropical, a maior diversidade de *Piper* se concentra nos neotrópicos, sobretudo, na cordilheira andina, planícies da América Central e Amazônia Central (JARAMILLO; MANOS, 2001; QUIJANO-ABRIL *et al.*, 2006).

As espécies de *Piper* são facilmente reconhecidas por apresentarem características marcantes do gênero, com padrões morfo-anatômicos semelhantes (CHANCHAL, THONGAM; HANDIQUE, 2014). O caule é articulado e nodoso; as folhas são simples, lanceoladas, ovaladas ou elípticas, hipoestomáticas e com nervura central na face abaxial; a

inflorescência é diminuta, do tipo espiga filiforme, cilíndrica ou globosa; os botões florais são latentes, ocorrem ao longo do ano e moldam o sistema reprodutivo (CHANCHAL, THONGAM; HANDIQUE, 2014; VALENTIN-SILVA *et al.*, 2018).

As espécies desse gênero são conhecidas como plantas aromáticas por apresentarem estruturas capazes de produzir óleos essenciais com composições distintas. Esses óleos são ricos em diversos compostos, como safrol, dilapiol, asaricina e cânfora, que apresentam diferentes bioatividades com ação antibacteriana, antifúngica, acaricida, larvicida, inseticida, dentre outros (SILVA *et al.*, 2017).

Visando à produção desses óleos essenciais, bioprospecções de espécies de *Piper* foram realizadas na Amazônia, na década de 90. O objetivo inicial era a coleta de espécies produtoras de safrol, como alternativa de substituir o safrol da árvore Canela sassafrás (*Ocotea pretiosa*), pois a exploração foi proibida pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais) visando evitar a extinção da espécie, decorrente do método de extração ser destrutivo (ROCHA; MING, 1999).

Além de *P. hispidinervum*, espécimes de *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* também foram coletados, sendo a identificação feita pelo aroma dos óleos essenciais liberado da maceração das folhas. Essas etapas de bioprospecção e coleta de *Piper* levaram à criação do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa-Acre, cuja coleção contém acessos de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* que se destacam por apresentarem altas concentrações de dilapiol, safrol e sarisan, respectivamente (SILVA; OLIVEIRA, 2000a; BIZZO *et al.*, 2001).

*Piper hispidinervum* também conhecida como “pimenta longa” é nativa da Amazônia ocidental e se desenvolve em ambientes abertos, com incidência direta da luz solar. São arvoretas, com folhas simples, oblongo-lanceoladas ou oblongo-elípticas, verde-escuras e ásperas na face adaxial e verde-claras e com tricomas na face abaxial. As flores são pequenas, unissexuais, com inflorescência em espigas alongadas, densas e curvas. Os frutos são drupas com coloração amarronzada quando maduro. Apresenta o safrol como principal componente de seu óleo essencial (NEGREIROS; MIQUELONI, 2015; SIVIERO *et al.*, 2015).

*Piper aduncum* também chamada de “pimenta-de-macaco”, “aperta-ruão”, “pimenta-de-fruto-ganchoso”, “falso-jaborandi”, é nativa da América Tropical e possui ampla ocorrência no território brasileiro, sobretudo, na Amazônia. As plantas são aromáticas, arbustivas, com hastes articuladas e nodosas. As folhas são elípticas ou lanceoladas, verde-escuras na face adaxial e verde-claras na face abaxial, e ambas as faces são ásperas ao tato. As flores são pequenas, discretas e hermafroditas, com inflorescência em espigas alongadas, densas e curvas.

Os frutos são drupas, com formato obovoide e coloração amarronzada quando maduro. Apresentam alto teor de dilapiol em seu óleo essencial (NEGREIROS; MIQUELONI, 2015; SIVIERO *et al.*, 2015).

Os exemplares de *Piper affinis hispidinervum* foram identificados e coletados na região Tarauacá/Envira, sendo nativos dessa região no Acre. Esses exemplares apresentam morfologia semelhante a *P. hispidinervum* diferindo no componente majoritário de seu óleo essencial rico em sarisan (diferentemente de *P. hispidinervum* com óleo essencial rico em safrol). Esses exemplares foram denominados de *Piper affinis hispidinervum* (BIZZO *et al.*, 2001; SIVIERO *et al.*, 2015).

Com relação à expressão sexual, *P. aduncum* possui flores bissexuais, caracterizando-se como uma espécie hermafrodita portadora de androceu e gineceu funcionais (VALENTIN-SILVA; BATALHA; GUIMARÃES, 2018). Apresenta alto índice de autopolinização espontânea, com sistema reprodutivo do tipo autogamia (FIGUEIREDO, 1997; WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004). Em *P. hispidinervum*, as flores são unissexuais e há algum tipo de auto-incompatibilidade que impede a autofecundação, desse modo, a espécie realiza a fecundação cruzada e apresenta sistema reprodutivo do tipo alogamia (SILVA; OLIVEIRA, 2000b; WADT; KAGEYAMA, 2004). Não há relatos sobre a expressão sexual e tipo de sistema reprodutivo em *P. aff. hispidinervum*.

Essas espécies e os exemplares de *P. aff. hispidinervum* apresentam similaridades anatômicas, morfológicas e citogenéticas, o que dificulta a separação entre elas. Na anatomia foliar, *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* apresentam nervação primária pinada, nervação secundária camptodroma, nervação eucamptodroma terciária, com nervuras de quarta ordem. As folhas possuem tricomas glandulares e tectores, estômatos tetracíticos, estaurocíticos e anisocíticos, e mesófilos com idioblastos oleosos e cristalinos (GOULART, 2011). A epiderme é unisseriada e a hipoderme tem origem do meristema fundamental, sendo composta por uma a três camadas celulares, com função de proteção do aparato fotossintético contra a incidência do excesso de luz solar (NAKAMURA *et al.*, 2015).

*Piper hispidinervum* e *P. aduncum* apresentam características xeromórficas, com folhas hipoestomáticas, alto número de tricomas não glandulares e baixa densidade estomática, sendo adaptadas a ambientes secos e ensolarados da região leste do Acre. Por outro lado, *P. aff. hispidinervum* desenvolveu características mesofíticas, com folhas anfiestomáticas, baixo número de tricomas não glandulares e alta densidade estomática, sendo adaptada a ambientes sombreados e com alta disponibilidade hídrica da região Tarauacá/Envira no Acre (GOULART, 2011).

Em estudos citogenéticos, a análise de cariótipos identificou que os três táxons são diploides, com  $2n = 26$  cromossomos e possuem um tamanho médio de genoma de 1Gb (giga base). Todos os táxons também apresentam cromossomos pequenos (1,32-1,38  $\mu\text{m}$ ) e metacêntricos (NUNES *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2022).

Sítios de DNAr 5S e 35S também foram localizados nas regiões proximais do par de cromossomos sete e quatro, respectivamente. A localização de sondas genômicas usando hibridizações recíprocas também revelou semelhanças entre elas, com sinais GISH+ localizados na região centromérica. *P. hispidinervum* possuiu maior afinidade genômica com *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* obteve maior taxa de hibridação com *P. aduncum*, indicando maior homologia com esta espécie (SOARES, 2022). Esses trabalhos demonstraram similaridades nos caracteres anatômicos e citogenéticos, não sendo possível identificar descritores capazes de diferenciá-los.

## 2.2 Importância socioeconômica

As espécies de *Piper* são utilizadas mundialmente para os mais diversos fins, possuindo importância socioeconômica alimentar, medicinal e fitoquímica (SALEHI *et al.*, 2019). A pimenta-do-reino, *Piper nigrum* L., é a espécie mais importante do gênero, sendo originária da Índia e cultivada em regiões tropicais, a espécie é comercializada nas formas de especiarias, conservantes e em perfumaria devido à produção de piperina (ACHARYA; MOMIN; GAJJAR, 2012). *P. nigrum* também é considerada uma cultura de destaque comercial (produção e exportação) para pequenos agricultores em países em desenvolvimento, como no Brasil (POLTRONIERI *et al.*, 2020).

Outras espécies de *Piper* também são usadas como PANCs (Plantas alimentícias não convencionais) como a Capeba (*Piper peltatum* L.), um arbusto de folhas com formato de coração e sabor picante. As folhas possuem importante valor nutritivo, sendo fontes de vitaminas, fibras e antioxidantes (betacaroteno) (RODRIGUES; MESSIAS, 2020). As folhas são cozidas e utilizadas de modo semelhante ao da couve (*Brassica oleracea*) na alimentação humana (RANIERE, 2017).

Na medicina popular, muitas espécies também são utilizadas em tratamentos de diferentes doenças, distúrbios e fins terapêuticos (SALEHI *et al.*, 2019). Algumas espécies possuem propriedades biológicas e farmacológicas com atividades antidepressivas como *Piper amplum* (ZIMATH *et al.*, 2017), anticonvulsivante como *Piper nigrum* (SONG *et al.*, 2020), antiparasitária como *Piper crassinervium* (CANCINI *et al.*, 2020).

Do ponto de vista fitoquímico, os óleos essenciais constituem os principais metabólitos secundários extraídos de tecidos e órgãos de *Piper* spp. e apresentam diferentes compostos voláteis, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (SILVA *et al.*, 2017). Esses constituintes variam inter ou intraespecificamente no gênero *Piper*, dependendo do local e sazonalidade da coleta (SILVA *et al.*, 2017), bem como do órgão da planta, condições ambientais e quimiotipos coletados (THIN *et al.*, 2018).

O óleo essencial de *P. hispidinervum* é rico em safrol (acima de 90%), um fenilpropanoide usado na produção de perfumes a partir da síntese de piperonal, um composto orgânico fixador de fragrâncias (SIVIERO *et al.*, 2015). O safrol também possui ação inseticida no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) (FAZOLIN *et al.*, 2015), ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), pulgão-preto (*Cerataphis lataniae*) e, inclusive, no controle do *Aedes aegypti* (SILVA *et al.*, 2019). Além de inseticida, o safrol possui efeito de inibir a alimentação quando adicionado na dieta de *Spodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Myzus persicae* e *Rhopalosiphum padi*, ocasionando a morte desses insetos e, conseqüentemente, aumentando o potencial do safrol como bioinseticida (ANDRÉS *et al.*, 2017).

Em *P. aduncum*, o dilapiol, um fenilpropanoide, é o principal componente de seu óleo essencial (acima de 80%) e possui atividade comprovada de biopesticida (FAZOLIN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2013). O dilapiol inibe o crescimento de fitopatógenos causador da antracnose em bananeira (*Musa* sp.) (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004) e possui ação inseticida contra pragas de grãos economicamente importantes, como soja (*Glycine max*) (PITON *et al.*, 2014) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Quando combinado com inseticidas piretróides no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), o dilapiol também atua como agente sinergista, potencializando a ação dos inseticidas e diminuindo a dosagem comercial e os resíduos no ambiente (FAZOLIN, *et al.*, 2016).

Em *P. aff. hispidinervum* o constituinte sarisan, fonte de arilpropanoide, é o mais abundante na composição do óleo essencial, apresentando teores que variam de 52 a 90% (BIZZO *et al.*, 2001). Assim como o dilapiol e safrol, o sarisan também possui ação de bioinseticida, atuando no controle de pragas da cultura do milho (*Zea mays*) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) (FAZOLIN *et al.*, 2011).

### 2.3 Classificação taxonômica

As primeiras classificações taxonômicas da família Piperaceae no Brasil foram propostas, no século XIX, por Velloso (1827) e Miquel (1843), que descreveram as espécies nas obras “Flora Fluminense” e “Flora Brasiliensis”, respectivamente (CRIA, 2005). Posteriormente, Yuncker (1972, 1973, 1974) também realizou uma vasta revisão e propôs a principal classificação taxonômica para essa família, coletando informações de aspectos ecológicos, morfológicos e geográficos.

Apesar da amplitude na taxonomia da família Piperaceae, algumas espécies apresentam classificação considerada complexa e controversa devido, principalmente, a três fatores. O primeiro está relacionado à uniformidade da morfologia vegetativa e ao tamanho diminuto das inflorescências; o segundo consiste na ausência de órgãos florais ou frutíferos em muitas espécies coletadas para descrição taxonômica (SUWANPHAKDEE *et al.*, 2016). O terceiro fator se refere à amostragem inferior à necessária para a correta identificação de novas espécies (JARAMILLO; CALLEJAS, 2004). Esses fatores prejudicam a correta identificação e classificação taxonômica dessas espécies, como ocorre em *Piper hispidinervum* e *Piper* aff. *hispidinervum*.

A classificação de *Piper hispidinervum* não está bem definida, visto que existe hipótese de que *P. hispidinervum* não seja uma espécie distinta de *P. aduncum*, uma vez que a distinção entre elas se dá pelo componente majoritário de seus óleos essenciais (SILVA, 1993). Nunes *et al.* (2007) e Soares *et al.* (2022) corroboraram com essa hipótese, de que *P. hispidinervum* seja uma variedade de *P. aduncum*, uma vez que não foram encontradas diferenças na caracterização cariotípica e nem nos padrões de hibridização genômica entre elas.

Por outro lado, Yuncker (1972) propõe que *P. hispidinervum* seja uma espécie distinta de *P. aduncum*. Essa hipótese foi confirmada por Wadt, Ehringhaus e Kageyama (2004) que avaliaram a diversidade genética do BAG da Embrapa Acre utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Esses autores concluíram que *P. hispidinervum* e *P. aduncum* são espécies diferentes, baseadas nas diferenças do grau de polimorfismo e número de marcadores amplificados em cada espécie (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

Quanto à *Piper* aff. *hispidinervum*, alguns exemplares da região Tarauacá/Envira-AC não foram reconhecidos como uma espécie. Essas amostras foram, então, denominadas de *P. aff. hispidinervum* por apresentarem características morfológicas muito semelhantes a *P. hispidinervum*, mas diferindo dela por conter o sarisan como o principal componente de seu óleo essencial (BIZZO *et al.*, 2001).

Wadt, Ehringhaus e Kageyama (2004) propuseram que *P. aff. hispidinervum* fosse um ecótipo de *P. hispidinervum* (adaptado à região dos rios Tarauacá e Envira – Acre) ou um

híbrido entre *P. hispidinervum* x *P. aduncum*. Na análise de dissimilaridade genética, genótipos de *P. aff. hispidinervum* formaram um subgrupo no grupo de *P. hispidinervum* e, por isso, *P. aff. hispidinervum* não pode ser considerada como uma nova espécie (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

## 2.4 Elementos repetitivos do genoma eucarioto

Elementos repetitivos são sequências de DNA repetidas que estão dispersas ou localizadas em regiões específicas ao longo do genoma dos eucariotos (RICHARD; KERREST; DUJON, 2008). Essas sequências são responsáveis pela diversidade de tamanho nos genomas dos organismos eucariotos por apresentarem múltiplas cópias e constituírem de 20% até 90% do genoma (DODSWORTH *et al.*, 2015), como ocorre no gênero *Oryza* (abundância de 25%) e nos gêneros *Orobanche* e *Posidonia* (abundância acima de 90%) (ZUCCOLO *et al.*, 2007; PIEDNOËL; RENNER, 2015; BARGHINI *et al.*, 2015).

As sequências repetitivas de DNA desempenham diferentes funções nos organismos e atuam em vários processos da divisão celular, como: adesão dos cromossomos ao fuso mitótico; movimentação, pareamento e recombinação dos cromossomos; condensação das regiões centroméricas e coesão das cromátides-irmãs. Essas sequências também estão envolvidas na regulação da expressão gênica, ocasionando mudanças fenotípicas em resposta às variações ambientais (MEHROTRA; GOYAL, 2014).

A variação desses elementos repetitivos em composição e abundância nos organismos resulta em maior diversidade genômica (HESLOP-HARRISON; SCHMIDT, 2012). Devido à alta variabilidade de elementos, as sequências repetitivas foram agrupadas em duas grandes famílias segundo características e localização destas no genoma: *Tandem Repeats* (repetições em tandem) e *Dispersed Repeats* (repetições dispersas) (RICHARD; KERREST; DUJON, 2008).

### 2.4.1 Família *Tandem Repeats*

A família *Tandem Repeats* se caracteriza por apresentar repetições de monômeros em tandem, isto é, adjacentes uns aos outros e se divide em três subfamílias: genes parálogos em tandem, DNA ribossomal (DNAr) e DNA satélite. Os genes parálogos em tandem são repetições originadas após duplicações de um único gene na posição alélica e ocorrem frequentemente em genoma eucariótico (RICHARD, 2020).

DNAr são sequências repetitivas de DNA transcritas em RNA ribossômicos (RNAr) pela ação da RNA polimerase I. Os DNAr dão origem, no nucléolo, aos transcritos RNA ribossomal 35S em plantas e RNAr 45S em animais. Além desses transcritos, também ocorre a transcrição do RNAr 5S pela RNA polimerase III no nucleoplasma (GARCIA; KOVAŘÍK, 2013).

Os DNA satélites correspondem às sequências repetitivas em tandem, não codificadoras de proteínas e presentes em regiões heterocromáticas (GARRIDO-RAMOS, 2015). Dependendo do comprimento da unidade de repetição e tamanho da matriz de nucleotídeos, o DNA satélite pode ser classificado em microssatélites, minissatélites, e satélites baseado no comprimento de repetição monoméricas (RICHARD; KERREST; DUJON, 2008). Minissatélites e microssatélites são unidades de repetição curtas em tandem, em que o tamanho da unidade de repetição é a principal característica que diferencia uma sequência da outra.

Os minissatélites possuem comprimento de 6 a 100 pb (pares de base) repetidos em uma matriz de 0,5 a 30 kb (quilobases) (MEHROTRA; GOYAL, 2014). Os minissatélites são altamente variáveis, classificados como VNTRs (número variável de repetições em tandem) (THAKUR, PACKIARAJ, HENIKOFF, 2021) e se caracterizam por possuírem alto conteúdo de GC (guanina e citosina) e altas taxas de mutações que podem ocorrer aleatoriamente nas regiões dos telômeros (RAO *et al.*, 2010).

Os microssatélites, também chamados de *Simple Sequence Repeats* (SSR), possuem comprimento variando de 2 a 5 pb e matriz de tamanho de 10 a 100 unidades (MEHROTRA; GOYAL, 2014). O número de cópias de microssatélites varia dentro dos genomas, por isso, essas sequências apresentam grande polimorfismo quanto ao número de repetições entre e dentro das espécies. Essas características possibilitam o uso dos microssatélites como marcadores moleculares, os quais flanqueiam as regiões de microssatélites e amplificam a região interna flanqueada, correspondente à região de interesse (MIAH *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2016).

Os DNA satélites são constituídos por sequências que variam de 150 a 400 pb, formando matrizes de tamanho de até 100 Mb (megabases) (MEHROTRA; GOYAL, 2014). O monômero é a unidade que se repete e pode ocupar centenas a milhares de cópias repetidas no genoma dos organismos (RICHARD; KERREST; DUJON, 2008). Essas sequências são ricas em repetições AT (adenina e timina) e se localizam em regiões heterocromáticas que permanecem condensadas ao longo do processo de divisão celular, como nas regiões centroméricas, pericentroméricas e subteloméricas (GARRIDO-RAMOS, 2017).



Os DNA satélite possuem alto grau de polimorfismo ocasionado por variações no número de unidades repetidas e na diversidade de sequências decorrente de mutações e/ou rearranjos. Pela natureza do arranjo das sequências satélites, elas são um obstáculo para montagem dos genomas a partir de dados de sequenciamento e acabam sendo sub-representadas nas análises de bioinformáticas (MEHROTRA; GOYAL, 2014). Contudo, com o desenvolvimento de novos *softwares* dedicados à análise da fração repetitiva, uma nova possibilidade foi criada para os estudos genômicos envolvendo tais sequências (NOVÁK *et al.*, 2013).

Essas ferramentas permitiram explorar a composição, organização e evolução da fração repetitiva do genoma em diversas espécies (NOVÁK *et al.*, 2013), fornecendo excelentes marcas cromossômicas para uma cariotipagem mais precisa. Além disso, o polimorfismo dessas sequências de DNA permitiu que elas fossem usadas em outras diferentes aplicabilidades, como importantes marcadores para caracterização e mapeamento genômico, seleção assistida por marcadores, correlação genótipo-fenótipo e estudos de diversidade genética (THAKUR, PACKIARAJ, HENIKOFF, 2021).

#### **2.4.2 Família *Dispersed Repeats***

A família *Dispersed Repeats* contém os genes parálogos, genes do RNA transportador (RNAt) e transposons. Os genes parálogos são genes homólogos que derivaram de um ancestral comum pelo processo de duplicação e podem sofrer mutações ao longo da evolução, adquirindo novas funções ou influenciando no padrão de expressão gênica (SHUM *et al.*, 2016; INNAN; KONDRASHOV, 2010). DNAt são sequências repetitivas de DNA transcritas em RNA transportador (RNAt) que serão utilizados no pareamento de códons de RNAm com o RNAt conjugado com o aminoácido correspondente para síntese de proteínas.

Os elementos transponíveis (TEs) também chamados de “elementos móveis” ou “sequências saltadoras” apresentam grande abundância nos vegetais, podendo corresponder até 80% do genoma (WICKER; KELLER, 2007) e serem encontrados em regiões específicas do genoma do hospedeiro, como nas regiões não codificadoras de proteínas (VARANI *et al.*, 2015). Os TEs são capazes de se movimentarem dentro do genoma por um processo denominado de transposição (KOJIMA, 2019) e, de acordo com o mecanismo usado, eles são classificados na Classe I e Classe II (BOURQUE *et al.*, 2018).

Além da divisão em classes, os elementos de transposição também são classificados a nível hierárquico em ordem, superfamília, família. As ordens permitem a separação dos

elementos com base nas especificidades organizacionais e enzimáticas, enquanto as superfamílias separam elementos conforme similaridade de sequências e as famílias agrupam elementos com maiores semelhanças das regiões codificantes ou das repetições terminais (WICKER; KELLER, 2007).

A classe I abrange os elementos transponíveis cuja transposição é feita pela ação da transcriptase reversa utilizando o RNA como molde para a síntese de DNA do elemento transponível (VARANI *et al.*, 2015). No núcleo, esse retroelemento é inserido em outra posição no genoma do eucarioto pela ação da enzima integrase ou endonuclease, em um mecanismo conhecido como “copia-e-cola”. Em virtude do RNA ser transcrito em DNA de forma reversa, esses elementos são denominados de retrotransposons (WICKER; KELLER, 2007).

A cada ciclo de replicação um novo retroelemento é produzido, aumentando o número de retrotransposons e, conseqüentemente, o tamanho do genoma do hospedeiro (VARANI *et al.*, 2015). Essa replicação torna os retrotransposons os elementos transponíveis mais abundantes nos genomas, devido sua capacidade de deixar cópias a cada transposição. Os retrotransposons são divididos em cinco ordens: LTR (*Long Terminal Repeat*), DIRS (*Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence*), Penelope-Like Elements (*PLEs*), LINEs (*Long Interspersed Nuclear Elements*) e SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements*) (WICKER; KELLER, 2007).

Os retrotransposons da ordem LTR contêm, nas extremidades, sequências repetitivas de nucleotídeos que não codificam proteínas e, entre as extremidades, região codificadora. Retrotransposons sem LTR codificam endonucleases que cortam o DNA para a transcrição reversa e possuem sequências de poli (A) ou repetições simples na extremidade 3'. Esses retrotransposons se dividem em elementos interdispersos longos (*LINEs*) ou curtos (*SINEs*) (KOJIMA, 2019).

Os retrotransposons LTR compõem a principal fração repetitiva dos genomas vegetais tendo as superfamílias *Ty1-Copia* e *Ty3-Gypsy* como as mais abundantes (WON *et al.*, 2018). A superfamília *Ty1-Copia* é formada por diferentes famílias, como *Ale*, *Angela*, *Ivana*, *TAR*, *Tork* e *Maximus*, que variam em abundância de acordo com a espécie (WICKER; KELLER, 2007).

Na superfamília *Ty3-Gypsy* as famílias que predominam nos genomas vegetais são: *Athila*, *Ogre* e *Chromovirus* (NEUMANN *et al.*, 2019). *Athila* é uma família que codifica genes retrovírus infecciosos, presentes em grande proporção em *Populus trichocarpa* (NATALI *et al.*, 2015) e em menor abundância em leguminosas (MACAS *et al.*, 2015). A família *Ogre* também é conhecida como elementos "gigantes", pois os elementos transponíveis podem ser longos,

com até 25 kb (NEUMANN *et al.*, 2019). São elementos que possuem baixa conservação de suas sequências observadas nos genomas de Fabaceae e Solanaceae (MACAS; NEUMANN, 2007).

Os Chromovirus são elementos que possuem um chromodomínio (CHD) na extremidade 5' da região C-terminal da integrase e foram divididos em seis clados: *Chlamyvir* (ocorrência em algas); *Tcn1* (ocorrência em fungos); *Galadriel*, *CRM*, *Tekay* e *Reina* (ocorrência em plantas). Os Chromovirus podem ser encontrados em regiões de heterocromatina, como nos centrômeros (NEUMANN *et al.*, 2019).

Os LTR já foram identificados como os retrotransposons mais abundantes para as espécies basais *Liriodendron chinense*, *Cinnamomum kanehirae*, *Amborella trichopoda* e *Piper nigrum* em comparação com os retrotransposons NonLTR. Além disso, a superfamília LTR/Gypsy predominou em relação à superfamília LTR/Copia nessas espécies, sendo uma característica comum em magnoliídiadas (HU *et al.*, 2019).

A Classe II contém os transposons de DNA caracterizados pela transposição (movimento) das sequências repetitivas na ausência de RNA, como ocorre nos elementos da Classe I. Nesses elementos transponíveis, as proteínas transposases (TNP) podem ser inseridas em suas estruturas de repetição, sendo as responsáveis pelo corte e movimentação do TE (elemento transponível) para outra posição. Por isso, o número de cópias dos transposons geralmente é menor que a dos retrotransposons (VARANI *et al.*, 2015).

A subclasse I dos transposons é composta por duas ordens: TIR com nove superfamílias (*EnSpm\_CACTA*, *hAT*, *Mutator*, *PIF\_Harbingere*, *Merlin*, *P*, *PiggBack*, *Tc1-Mariner* e *Transib*) e Crypton com uma superfamília de mesmo nome. A subclasse II também possui duas ordens, chamadas de Helitron e Maverick, cada uma com uma superfamília de mesmo nome (WICKER *et al.*, 2007).

De modo geral, os TEs desempenham diversas funções e impactam o genoma do hospedeiro em diferentes modos, diretos e indiretos (BOURQUE *et al.*, 2018). Eles são considerados fontes de mutações e polimorfismos, atuando na inativação de genes, bem como na formação de novos genes, uma vez que promotores de genes podem ter sido derivados ou originados de duplicações induzidas pelos transposons (BENNETZEN *et al.*, 2014; BOURQUE *et al.*, 2018).

Os TEs também são considerados reguladores e modificadores da transcrição e pós transcrição, modificando padrões epigenéticos, gerando pequenos (RNAs) e modulando a expressão gênica (BENNETZEN *et al.*, 2014; BOURQUE *et al.*, 2018). Adicionalmente, os TEs também atuam nos mecanismos de respostas das plantas submetidas às condições de

estresses bióticos e abióticos, tornando-as mais tolerantes aos agentes estressores, pela super expressão de genes próximos a eles (CHÉNAIS *et al.*, 2012; MAKAREVITCH *et al.*, 2015).

O conhecimento sobre a distribuição e abundância das sequências repetitivas aqui mencionadas (DNAsat, DNAr e TEs) pode contribuir para a compreensão sobre a evolução de genomas, reestruturação de cromossomos (fusão, fissão, translocação e inversão), especiação e hibridização (MEHROTRA; GOYAL 2014; GARRIDO-RAMOS, 2015). Por isso, torna-se importante realizar pesquisas voltadas para a caracterização e anotação dos elementos repetitivos nos genomas vegetais.

## 2.5 Filogenia molecular

A filogenia molecular estuda as diferenças moleculares entre os organismos visando obter informações sobre suas relações evolutivas (AJAWATANAWONG, 2016). As diferenças moleculares são baseadas em sequências de DNA, RNA ou aminoácidos e por meio desses caracteres é possível inferir as relações genômicas, transcriptômicas e proteômicas, respectivamente, entre os indivíduos a nível de espécie ou população (PAVAN; MONTEIRO, 2014).

A filogenia molecular é representada através de uma árvore filogenética formada por nós, ramos e/ou raiz. O nó corresponde à sequência estudada do organismo, os ramos são as linhas que conectam os nós e a raiz representa o ancestral em comum. Um grupo externo, divergente do organismo de interesse também pode ser adicionado, permitindo o enraizamento dessa árvore filogenética (SCHNEIDER, 2017).

A construção da árvore requer: escolha de sequências cuja homologia se baseia na premissa de que são derivadas de ancestral comum; alinhamento entre sequências em busca de similaridades; reconstrução da árvore a partir de uma matriz de distância ou métodos probabilísticos; teste de confiança do suporte de cada nó (*bootstrap*) e interpretação da árvore (AJAWATANAWONG, 2016; CALDART *et al.*, 2016).

As espécies são organizadas em táxons, formando grupos monofiléticos, parafiléticos ou polifiléticos. Os grupos monofiléticos possuem um ancestral comum, enquanto os grupos parafiléticos não descendem de um mesmo ancestral, e os grupos polifiléticos incluem mais de um ancestral comum (AJAWATANAWONG, 2016). Para que a filogenia molecular seja uma ferramenta eficiente, ela deve possuir uma hipótese científica fundamentada, apresentar uma boa qualidade de inferência e possuir o consentimento da comunidade científica (PAVAN; MONTEIRO, 2014; CALDART *et al.*, 2016).

Regiões repetitivas de DNA das ordens Lamiales, Fabales, Liliales, Gentianales e Solanales foram utilizadas por Dodsworth *et al.* (2015) em análises filogenéticas. Genomas de diferentes tamanhos e frações repetitivas foram testados e forneceram resultados similares aos da análise filogenética usando dados moleculares-padrão. Esses autores propuseram que regiões repetitivas de DNA podem ser usadas em estudos comparativos e em espécies que possuem baixa diferenciação genética (DODSWORTH *et al.*, 2015).

Essa abordagem foi confirmada por Vitales, Garcia e Dodsworth (2020) que utilizaram matrizes de similaridade de sequências repetidas de análises comparativas do RepeatExplorer, transformadas em matrizes de distância entre as mesmas cinco ordens analisadas por Dodsworth *et al.* (2015). Essas matrizes pairwise resultaram em hipóteses evolutivas congruentes, permitindo que as semelhanças de sequências repetidas fossem úteis na determinação das relações filogenéticas baseadas no repeatoma (VITALES; GARCIA; DODSWORTH, 2020).

No gênero *Piper*, as análises de filogenia molecular se restringem a sequências da região ITS do DNAr e íntron e genes (*rbcL*, *trnH-psbA*) do cloroplasto, pois são regiões de rápida evolução e que variam intraespecificamente, sendo usadas como marcadores na taxonomia de *Piper* (JARAMILLO; CALLEJAS, 2004; JARAMILLO *et al.*, 2008; BRANDÃO *et al.*, 2020). Logo, torna-se necessário identificar outros marcadores que também sejam eficientes na elucidação taxonômica, permitindo o desenvolvimento de novas abordagens, como o uso dos elementos repetitivos em estudos filogenéticos, especialmente de táxons sub-representados ou espécies com taxonomia não bem definida (NEUMANN *et al.*, 2019), como as do gênero *Piper*.

## **2.6 Genoma cloroplastidial**

### **2.6.1 Características e origem dos cloroplastos**

Os cloroplastos são organelas que apresentam formato discoide, com um sistema de membranas denominado tilacoide, onde se encontram os fotossistemas responsáveis pela fase fotoquímica da fotossíntese, mergulhado em um fluido chamado estroma. Nessa matriz estão presentes também cópias da molécula de DNA circular que constitui o genoma cloroplastidial (DOBROGOJSKI; ADAMIEC; LUCIŃSKI, 2020).

Os cloroplastos são plastídios metabolicamente ativos, presentes em cianobactérias, algas e plantas, cuja função principal é capturar energia luminosa e convertê-la em energia química durante o processo de fotossíntese. Além da biossíntese de compostos orgânicos, os cloroplastos também participam da síntese de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos,

fitohormônios e vitaminas. Esses metabólitos desempenham diferentes funções nos vegetais, incluindo comunicação entre os diferentes órgãos da planta e reação das plantas aos estresses ambientais (DOBROGOJSKI; ADAMIEC; LUCIŃSKI, 2020).

Com relação à origem evolutiva, acredita-se que os cloroplastos tenham se originado há bilhões de anos, por meio de uma relação endossimbiótica em que organismos procariontes foram fagocitados por células primitivas eucarióticas. Durante esse processo, as cianobactérias precursoras dos cloroplastos foram se incorporando nas células hospedeiras, permitindo a transferência do seu material genético para o núcleo da célula eucariótica (GRAY, 1999).

Dessa forma, os genomas dos cloroplastos sofreram alterações estruturais ao longo da evolução, ocasionando uma redução de tamanho, mas mantiveram em seus genomas, dezenas de genes codificadores de proteínas que comprovam sua ancestralidade procariótica (MARTIN *et al.*, 2002). Por outro lado, a maioria dos genes que codificam as proteínas cloroplastidiais foi transferida para núcleo celular, atuando no controle da biogênese dos cloroplastos (MARTIN *et al.*, 2002; TIMMIS *et al.*, 2004).

### 2.6.2 Herança e estrutura genômica

Assim como o núcleo celular e as mitocôndrias, os cloroplastos possuem um genoma próprio, caracterizado por uma molécula de DNA de fita dupla circular (DOBROGOJSKI; ADAMIEC; LUCIŃSKI, 2020). Os cloroplastos são herdados de modo não-Mendeliano e, na maioria dos vegetais, essa herança é comumente materna, havendo exceções em coníferas, Actinidia, Cyperaceae, Cactaceae, Dipsacaceae, Fabaceae e outras famílias de gminosperma e angiosperma que apresentam herança paterna ou biparental (KOPERLAINEN, 2004; ZHANG; LIU; SODMERGEN, 2003).

A variação no padrão de herança é resultante da exclusão ou degeneração do citoplasma feminino antes da fusão gamética ou da degradação do DNA cloroplastidial dentro das células germinativas (BRUMS; OWENS, 2000). Essa variação da herança cloroplastidial também tem sido relatada em híbridos interespecíficos ou intragenéricos desenvolvidos artificialmente, como ocorre no gênero *Larrea* que apresenta herança plastidial paterna (YANG *et al.*, 2000). Em *Piper*, não há relatos sobre o modo de herança dos cloroplastos, pois as pesquisas se concentram na caracterização do genoma cloroplastidial, não avaliando o modo de herança.

O genoma cloroplastidial apresenta uma estrutura quadripartida, para a maioria dos vegetais, composta por duas regiões repetidas invertidas (IRA e IRB) e duas regiões de cópias únicas, sendo uma região grande (LSC: *Large Single Copy*) e outra curta (SSC: *Small Single*

*Copy*) (PALMER, 1985). O tamanho do genoma cloroplastidial nos vegetais é bem variável, de 107 kb na conífera *Cathaya argyrophylla* a 218 kb em *Pelargonium* spp. (CHENG *et al.*, 2013). Essas variações de tamanho podem ocorrer devido às variações das regiões IRs (CHUMLEY *et al.*, 2006), perda de genes durante a evolução (WAKASUGI *et al.*, 1994) e variações nas regiões intragênicas (GREINER *et al.*, 2008).

O DNA cloroplastidial codifica genes relacionados ao processo de transcrição, como genes que codificam os RNAr, RNAt, proteínas ribossomais e RNA polimerase. Há também os genes que codificam componentes do sistema fotossintético, como os genes da enzima Rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxidase); genes que atuam no complexo do fotossistema I e II; do citocromo b/f e da enzima ATP sintase e NADH desidrogenase (ZHANG; HU; LIU, 2021; GENG *et al.*, 2022).

Como os cloroplastos apresentam uma estrutura e composição gênica conservadas, se comparados com os genomas nucleares e mitocondriais (ASAF *et al.*, 2017), seus genomas compõem uma importante ferramenta valiosa para análises comparativas e filogenéticas em plantas (ALWADANI; JANES; ANDREW, 2019), como ocorre nas subfamílias Monsteroideae (HENRIQUEZ *et al.*, 2020) e Papilionoideae (SILVA *et al.*, 2023).

Monsteroideae é uma subfamília de Araceae que apresenta uma filogenia não bem resolvida a nível de espécie. Análises genômicas dos cloroplastos de quatro espécies dessa subfamília (*Spathiphyllum patulinervum*, *Stenospermation multiovulatum*, *Monstera adansonii* e *Rhaphidophora amplissima*) identificaram regiões polimórficas que podem ser usadas para desenho de marcadores únicos visando inferir a filogenia e a filogeografia entre espécies próximas ou distantes dentro de Monsteroideae (HENRIQUEZ *et al.*, 2020).

Em Papilionoideae, os genes cloroplastidiais *matK*, *psaA*, *psbA*, *psbD*, *rbcL* e *rpoC2* de 117 espécies foram analisados objetivando solucionar relações filogenéticas entre elas. A análise filogenética resultou em uma árvore monofilética, confirmando a divisão da subfamília em quatro clados principais: NPAAA, ADA, Genistóides e Dalbergioides, que divergiram a partir do Paleoceno. O clado ADA é irmão ao clado Genistoids e em ADA há espécies que não possuem nódulos de rizóbio, representado uma sinapomorfia desse grupo (SILVA *et al.*, 2023).

### 2.6.3 Genoma cloroplastidial em *Piper*

O genoma cloroplastidial de espécies do gênero *Piper* vem sendo estudado desde 2006 quando Cai *et al.* (2006) sequenciaram e montaram o primeiro genoma de cloroplasto em *Piper cenocladum* (NC\_008457.1). Atualmente, apesar dos avanços tecnológicos de sequenciamento

e bioinformática em organelas plastidiais, apenas 29 espécies de *Piper* tiveram seus genomas de cloroplastos sequenciados e depositados no NCBI: *Piper kadsura* (NC\_027941.1, LEE *et al.*, 2015), *Piper nigrum* (NC\_034692.1, não publicado e MK883818, GAIKWARD *et al.*, 2023), *Piper laetispicum* (NC\_042254.1, WANG *et al.*, 2018), *Piper hancei* (MZ046380, ZHANG; HU; LIU, 2021), [*Piper amalago* (MZ308624), *Piper auritum* (MZ308631), *Piper borbonense* (MZ308636), *Piper caninum* (MZ308639), *Piper capense* (MZ308627), *Piper commutatum* (MZ308626), *Piper darienense* (MZ308625), *Piper guahamense* (MZ308629), *Piper hederaceum* (MZ308640), *Piper insectifugum* (MZ308634), *Piper mestonii* (MZ308643), *Piper ponapense* (MZ308635), *Piper puberulum* (MZ308630) (SIMMONDS *et al.*, 2021)], *Piper sarmentosum* (MZ958833, GENG *et al.*, 2022), [*Piper boehmeriifolium* (OM717256.1), *Piper austrosinese* (OM717257.1), *Piper mutabile* (OM717258.1), *Piper bonii* (OM717259.1), *Piper betle* (OM717260.1), *Piper retrofractum* (OM717261.1), *Piper hainanense* (OM717262.1), *Piper umbellatum* (OM717263.1) (LI *et al.*, 2022)], *Piper bambusifolium* (NC\_062129.1, não publicado), e *Piper longum* (NC\_047247.1, não publicado).

Esses genomas de *Piper* são típicos das angiospermas, pois são circulares, com uma configuração quadripartida, composta pelas regiões LSC, SSC, IRa e IRb. Apresentam tamanho variando de 159,909 (*P. auritum*) a 161,721 pb (*P. laetispicum*) e genes que codificam proteínas relacionadas com os fotossistemas I e II, do complexo do citocromo b/f, a síntese de ATP, síntese de RNA, modificação do NADH, além de proteínas ribossomais, da subunidade maior da Rubisco e genes de RNAt, RNAr (ZHANG; HU; LIU, 2021; GENG *et al.*, 2022).

Os genomas de cloroplastos desse gênero são bem conservados, havendo similaridades entre os tamanhos e a composição genômicas entre as espécies (TABELA 1.1). Portanto, torna-se importante realizar mais pesquisas envolvendo o sequenciamento completo do genoma de cloroplasto de outras espécies de *Piper*, bem como desenvolver análises comparativas e filogenéticas dos genomas dessa organela visando elucidar as relações genômicas, evitar erros taxonômicos e contribuir para o melhoramento genético dessas espécies (LI *et al.*, 2022; GAIKWARD *et al.*, 2023).



Tabela 1.1 – Composição do genoma cloroplastidial de espécies de *Piper*.

Espécie	Identificação	Localidade	Genoma (pb)	Tamanho LSC (pb)	Tamanho SSC (pb)	Tamanho IR (pb)	Total de genes	Autores
<i>Piper amalago</i>	MZ308624	México	160.885	87.987	18.149	54.749	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper auritum</i>	NC_034697.1	-	159.909	87.608	18.250	54.127	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper austrosinense</i>	OM717257.1	China	161.230	88.948	18.252	54.030	128	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper betle</i>	OM717260.1	China	161.359	89.015	18.206	54.138	128	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper boehmeriifolium</i>	OM717256.1	China	161.426	89.028	18.274	54.124	128	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper borbonense</i>	MZ308636	Réunion	160.095	87.866	18.701	54.669	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper bonii</i>	OM717259.1	China	161.349	88.967	18.246	54.136	128	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper caninum</i>	MZ308639	Austrália	160.967	88.033	18.266	54.668	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper capense</i>	MZ308627	Quênia	161.445	88.459	18.329	54.657	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper cenocladum</i>	NC_008457.1	-	160.624	87.668	18.878	54.078	113	Cai <i>et al.</i> (2006)
<i>Piper commutatum</i>	MZ308626	México	161.011	87.814	18.845	54.351	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper darienense</i>	MZ308625	Costa Rica	161.264	88.364	18.927	54.973	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper guahamense</i>	MZ308629	-	160.657	88.037	18.267	54.353	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper hainanense</i>	OM717262.1	China	161.291	88.915	18.212	54.164	128	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper hancei</i>	MZ046380	China	161.476	89.144	18.216	54.116	113	Zhang, Hu e Liu (2021)
<i>Piper hederaceum</i>	MZ308640	Austrália	161.338	88.306	19.168	53.864	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper insectifugum</i>	MZ308634	New Caledonia	161.722	88.727	18.443	54.552	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper kadsura</i>	NC_027941.1	-	161.486	89.099	18.233	54.154	131	Lee <i>et al.</i> (2015)
<i>Piper laetispicum</i>	NC_042254.1	China	161.721	89.224	18.247	54.250	114	Wang <i>et al.</i> (2018)
<i>Piper mestonii</i>	MZ308643	Austrália	160.910	87.993	18.240	54.677	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper mutabile</i>	OM717258.1	China	161.385	88.937	18.272	54.176	128	Lee <i>et al.</i> (2015)
<i>Piper nigrum</i>	NC_034692.1	-	161.522	89.153	18.255	54.114	131	Gaikward <i>et al.</i> (2023)
<i>Piper retrofractum</i>	OM717261.1	China	161.346	88.927	18.275	54.144	127	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper ponapense</i>	MZ308635	Pohnpei	161.690	89.300	18.230	54.160	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper puberulum</i>	MZ308630	Samoa (Savaii)	161.178	89.021	17.983	54.174	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper sarmentosum</i>	MZ958833	China	161.389	88.979	18.274	54.136	130	Geng <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper umbellatum</i>	OM717263.1	China	160.783	88.411	18.241	54.086	128	Li <i>et al.</i> (2022)

Fonte: Da autora (2023).

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S.G.; MOMIN, A.H.; GAJJAR, A.V. Review of Piperine as a Bio-enhancer. **American Journal of Pharmtech Research**, v. 2, n. 2, 2012.
- AJAWATANAWONG, P. Molecular Phylogenetics: Concepts for a Newcomer. In: NOOKAEW, I. (ed.). **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 123 p. 185-196, 2016. DOI: 10.1007/10\_2016\_49
- ALWADANI, K. G., JANES, J. K.; ANDREW, R. L. Chloroplast genome analysis of box-ironbark *Eucalyptus*. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 136, p. 76–86, 2019. DOI: 10.1016/j.ympev.2019.04.001
- ANDRÉS, M. F. *et al.* Biocidal effects of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil and synergism among its main components. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1086-1092, 2017.
- ASAF, S. *et al.* Comparative analysis of complete plastid genomes from wild soybean (*Glycine soja*) and nine other *Glycine* species. **PLoS ONE**, v. 12, e0182281, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0182281
- BARGHINI, E. *et al.* Analysis of the repetitive component and retrotransposon population in the genome of a marine angiosperm, *Posidonia oceanica* (L.) Delile. **Marine Genomics**, v. 3, p. 397-404, 2015. DOI: 10.1016/j.margen.2015.10.002.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 555–557, 2004. DOI: 10.1590/s0100-41582004000500016
- BENNETZEN, J. L.; WANG, H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 505–530, 2014. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-035811.
- BERGO, C. L. *et al.* Cultivo de Pimenta longa (*Piper hispidinervum*) na Amazônia Ocidental. **Embrapa Acre. Sistemas de Produção**, v. 1, p. 29, 2002.
- BIZZO, H. R. *et al.* Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC (long pepper). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 2, p. 113–115, 2001. DOI: 10.1002/ffj.957.
- BOCK, R. Structure, function, and inheritance of plastid genomes. In: BOCK, R. (eds) **Cell and Molecular Biology of Plastids**. Topics in Current Genetics, vol 19. Berlin: Springer, Heidelberg. 2007. DOI: 10.1007/4735\_2007\_0223
- BOURQUE, G. *et al.* Ten things you should know about transposable elements. **Genome Biology**, v. 19, n. 199, 19 dez. 2018. DOI: 10.1186/s13059-018-1577-z.
- BRANDÃO, A.P.M.E. *et al.* Evaluation of DNA markers for molecular identification of three *Piper* species from Brazilian Atlantic Rainforest. **PLoS One**, v. 19, n. 15(10), e. 0239056, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0239056.

CAI, Z. *et al.* Complete plastid genome sequences of *Drimys*, *Liriodendron*, and *Piper*: Implications for the phylogenetic relationships of magnoliids. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, n. 77, 2006. DOI:10.1186/1471-2148-6-77

CALDART, E.T. *et al.* Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 44, p. 1–20, 2016.

CANCINI, N.S. *et al.* Activity of Piperaceae extracts and fractions in the control of *Phytomonas serpens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 50, n. 10, e. 20200343, 2020. DOI: 10.1590/0103-8478cr20200343

CHANCHAL, C.; THONGAM, B.; HANDIQUE, P.J. Diversidade morfológica e caracterização de algumas das espécies selvagens de *Piper* do Nordeste da Índia. **Recursos Genéticos e Evolução das Culturas**, v. 62, n. 2, p. 303–313, 2014. DOI:10.1007/s10722-014-0172-8

CHÉNAIS, B. *et al.* The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: from genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. **Gene**, v. 509, n. 1, p. 7–15, 2012. DOI: 10.1016/j.gene.2012.07.042.

CHENG, J. *et al.* CGAP: a new comprehensive platform for the comparative analysis of chloroplast genomes. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 95, 2013.

CHUMLEY, T.W. *et al.* The complete chloroplast genome sequence of *Pelargonium × hortorum*: Organization and evolution of the largest and most highly rearranged chloroplast genome of land plants. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 11, p. 2175–2190, 2006.

CRIA (Centro de Referência e Informação Ambiental). 2011. **Flora brasiliensis**. Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/opus>. Acesso em: 18 out. 2020.

CALDART, E.T. *et al.* Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 44, p. 1–20, 2016.

DIERCKXSENS, N.; MARDULYN, P.; SMITS, G. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 45(4), e. 18, 2017. DOI: 10.1093/nar/gkw955.

DOBROGOJSKI, J.; ADAMIEC, M.; LUCIŃSKI, R. The chloroplast genome: a review. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 98, 2020. DOI:10.1007/s11738-020-03089-x

DODSWORTH, S. *et al.* Genomic Repeat Abundances Contain Phylogenetic Signal. **Systematic Biology**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 112–126, 1 jan. 2015. DOI: 10.1093/sysbio/syu080.

FAZOLIN, M. *et al.* **Potencialidades da Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): Características gerais e resultados de pesquisa**. 2006. 53p. (Embrapa Acre, Documentos 103).

FAZOLIN, M. *et al.* Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper affinis hispidinervum* para insetos pragas das culturas do milho e feijão. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS*, 5., 2011, Jaguariúna. **Anais [...]**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011.

FAZOLIN, M. *et al.* Sinérgico alternativo para o manejo da resistência da lagarta-do-cartucho do milho a piretróides. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.14, n.3, p. 316-325, 2015.

FAZOLIN, M. *et al.* Synergistic potential of dillapiole-rich essential oil with synthetic pyrethroid insecticides against fall armyworm. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p.382-388, 2016. DOI: 10.1590/0103-8478cr20141500.

FIGUEIREDO, R.A. **Fenologia e ecologia da polinização de espécies de Piperaceae em mata semidecídua do sudeste brasileiro**. 1997. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

GENG, X. *et al.* The complete chloroplast genome of *Piper sarmentosum* roxburg 1820 (Piperaceae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 7, n. 5, p. 854–855, 2022. DOI: 10.1080/23802359.2022.2074805

GAIKWAD, A.B. *et al.* The chloroplast genome of black pepper (*Piper nigrum* L.) and its comparative analysis with related Piper species. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, n. 1095781, 2023. DOI: 10.3389/fpls.2022.1095781

GARCIA, S.; KOVAŘÍK, A. Dancing together and separate again: Gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 35S rRNA gene (rDNA) organisation. **Heredity**, v. 111, n. 1, p. 23–33, 2013. DOI: 10.1038/hdy.2013.11.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in plants: More than just rubbish. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 146, n. 2, p. 153–170, 2015. DOI: 10.1159/000437008.

GENG, X. *et al.* The complete chloroplast genome of *Piper sarmentosum* roxburg 1820 (Piperaceae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 7, n. 5, p. 854–855, 2022. DOI: 10.1080/23802359.2022.2074805

GARRIDO-RAMOS, M. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 230, 18 set. 2017. DOI: 10.3390/genes8090230.

GOULART, J. C. **Aspectos citogenéticos, morfopolínicos e anatômicos de *Piper* L. nativas da Amazônia brasileira**. 2011. 127 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

GRAY, M. W. Evolution of organellar genomes. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 9, n. 6, p. 678–687, 1999. DOI: 10.1016/S0959-437X(99)00030-1.

GREINER, S. *et al.* The complete nucleotide sequences of the five genetically distinct plastid genomes of *Oenothera*, subsection *Oenothera*: I. Sequence evaluation and plastome evolution. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 7, p. 2366–2378, 2008. DOI: 10.1093/nar/gkn081

GROUP, T. A. P. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: Apg IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 1–20, 2016. DOI:10.1111/boj.12385

GUIMARÃES, E.F. *et al.* **Piperaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB190>>. Acesso em: 10 mar. 2023

HENRIQUEZ, C.L. *et al.* Molecular evolution of chloroplast genomes in Monsteroideae (Araceae). *Planta*, v. 251, n. 72, 2020. DOI: 10.1007/s00425-020-03365-7

HERRON, P. R. Mobile DNA II. *Heredity*, v. 92, n. 5, p. 476–476, 2004. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800416.

HESLOP-HARRISON, J.; SCHMIDT, T. Plant Nuclear Genome Composition. **Encyclopedia of Life and Science.** In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2012. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002014.pub2.

HU, L. *et al.* The chromosome-scale reference genome of black pepper provides insight into piperine biosynthesis. *Nature Communication*, v. 10, n. 4702, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12607-6>

INNAN, H.; KONDRASHOV, F. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, p. 97–108, 2010.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, v. 88, p. 706–716, 2001.

JARAMILLO, M. A.; CALLEJAS, R. Current Perspectives on the Classification and Phylogenetics of the Genus *Piper* L. In: DYER, L.A.; PALMER, D.N. **Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution.** New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. p. 179–198.

JARAMILLO, M. A. *et al.* A Phylogeny of the Tropical Genus *Piper* Using ITS and the Chloroplast Intron *psbJ-petA*. *Systematic Botany*, Washington, v. 33, n. 4, p. 647–660, 1 out. 2008. DOI: 10.1600/036364408786500244.

KOBAYASHI, T. Ribosomal RNA gene repeats, their stability and cellular senescence. **Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences**, Tokyo, v. 90, n. 4, p. 119–129, 2014. DOI: 10.2183/pjab.90.119.

KOJIMA, K. K. Structural and sequence diversity of eukaryotic transposable elements. **Genes & Genetic Systems**, Mishima, v. 94, n. 6, p. 233–252, 2019. DOI: 10.1266/ggs.18-00024.

LEE, J.H. *et al.* The complete plastid genome of *Piper kadsura* (Piperaceae), an East Asian woody vine. **Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal**, v. 27, n. 5, p. 3555–3556, 2015. DOI: 10.3109/19401736.2015.1074216

LI, J. *et al.* Comparative analysis of the chloroplast genomes of eight *Piper* species and insights into the utilization of structural variation in phylogenetic analysis. **Frontiers in**

- Genetics**, v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fgene.2022.925252
- LIM, J. Y. *et al.* Multiple colonizations of the Pacific by *Peperomia* (Piperaceae): Complex patterns of long-distance dispersal and parallel radiations on the Hawaiian Islands. **Journal of Biogeography**, v. 6, n. 130, 2019. DOI: 10.1111/jbi.13717.
- LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M.A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Genome Dynamics**, v. 7, p. 1-28, 2012. DOI: 10.1159/000337118.
- MACAS, J.; NEUMANN, P. Ogre elements—a distinct group of plant Ty3/gypsy-like retrotransposons. **Gene**, v. 390, e. 1-2, p. 108–116, 2007. DOI: 0.1016/j.gene.2006.08.007
- MACAS, J. *et al.* In depth characterization of repetitive DNA in 23 plant genomes reveals sources of genome size variation in the legume tribe Fabaeae. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. 1–23, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0143424
- MAKAREVITCH, I. *et al.* Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 10, 2015. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005566
- MARTIN, W. *et al.* Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 19, p. 12246–12251, 2002.
- MARTÍNEZ, C. *et al.* A Late Cretaceous *Piper* (Piperaceae) from Colombia and diversification patterns for the genus. **American Journal of Botany**, v. 102, p. 273-289, 2015.
- MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, Pequim, v. 12, n. 4, p. 164–171, ago. 2014. DOI: 10.1016/j.gpb.2014.07.003.
- MIAH, G. *et al.* Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 11, p. 22499–22528, 2013. DOI: 10.3390/ijms141122499.
- MIQUEL, F.A.W. **Systema Piperacearum**. Rotterdam, H.A. Kramers, p. 64 -199, 1843.
- NAKAMURA, A. *et al.* Origin of the subepidermal tissue in *Piper* L. leaves. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 368–371, 2015. DOI: 10.1590/1519-6984.13713.
- NATALI, L. *et al.* survey of Gypsy and Copia LTR-retrotransposon superfamilies and lineages and their distinct dynamics in the *Populus trichocarpa* (L.) genome. **Tree Genet Genomes**, v. 11, n. 107, 2015. DOI 10.1007/s11295-015-0937-z
- NEGREIROS, J.R.; MIQUELONI, D.P. Morphological and phytochemical characterization of *Piper hispidinervum* DC. and *Piper aduncum* L. populations in the state of Acre. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 62, n.1, p. 078-086, 2015. DOI: 10.1590/0034-737X201562010010.
- NEUMANN, P. *et al.* Systematic survey of plant LTRretrotransposons elucidates phylogenetic

relationships of their polyprotein domains and provides a reference for element classification. **Mobile DNA**, v. 10, p. 1–17, 2019. DOI: 10.1186/s13100-018-0144-1.

NOVAK, P. *et al.* RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 792–793, 2013. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt054.

NOVAK, P. *et al.* Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, v. 15, n. 11, p. 3745–3776, 2020. DOI: 10.1038/s41596-020-0400-y

NUNES, J. D. *et al.* Cytogenetics of *Piper hispidinervum* and *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 1049–1052, 2007. DOI: 10.1590/s0100-204x2007000700019.

OLIVEIRA, J. V. *et al.* Fumigation and repellency of essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in cowpea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 1, p. 10–17, 2017. DOI: 10.1590/S0100-204X2017000100002

PALMER, J. D. Comparative organization of chloroplast genomes. **Annual review of genetics**, v. 19, p. 325-54, 1985. DOI: 10.1146/annurev.ge.19.120185.001545.

PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F. A. Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial. In: GALVÃO, C (Org.). **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 241–260.

PIEDNOËL, M. S. A; RENNER, S.S. Transposable elements in a clade of three tetraploids and a diploid relative, focusing on Gypsy amplification. **Mobile DNA**, v. 6, n. 5, 2015.

PITON, L. P. *et al.* Natural insecticide based-leaves extract of *Piper aduncum* (Piperaceae) in the control of stink bug brown soybean. **Ciência Rural**, v. 44, n. 11, p. 1915–1920, 2014. DOI: 10.1590/0103-8478cr20131277.

POLTRONIERI, M.C. *et al.* **Estado da arte do melhoramento genético de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2020. (Documentos 452).

QUIJANO-ABRIL, M. R.; CALLEJAS, D.; MIRANDA-ESQUIVEL. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal of Biogeography**, v. 33, p. 1266-1278, 2006.

RAO, S. R. *et al.* DNA repetitive sequences-types, distribution and function: A review. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Elkridge, v. 7–8, n. 2–1, p. 1–11, 2010.

RANIERI, G.R. **Guia prático sobre PANCs: plantas alimentícias não convencionais**. 1. ed. São Paulo: Instituto Kairós, 2017.

RICHARD, G.-F.; KERREST, A.; DUJON, B. Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 72, n. 4, p. 686–727, 2008. DOI: 10.1128/MMBR.00011-08.

RICHARD, G.-F. Eukaryotic Pangenomes. In: TETTELIN, H.; MEDINI, D. (ed.). **The Pangenome**. Cham: Springer International Publishing, 2020.

ROCHA, S.F.R.; MING, L.C. ***Piper hispidinervum*: a sustainable source of safrole**. In: JANICK, J. (ed.). Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, 1999.

RODRIGUES, M.R.; MESSIAS, B.S. Plantas Alimentícias Não Convencionais-PANCs. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2020.

SALEHI, B. *et al.* Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 7 abr. 2019. DOI: 10.3390/molecules24071364.

SCHNEIDER, H. **Métodos de Análise filogenética: um guia prático**. 4. ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2017.

SHUM, E.Y. *et al.* The Antagonistic Gene Paralogs Upf3a and Upf3b Govern Nonsense-Mediated RNA Decay. **Cell**, v. 165, n. 2, p. 382-395, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.046.

SILVA, M.H.L. **Tecnologia de cultivo e produção racional de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC)**. 1993. 87p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) –Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1993.

SILVA, A. C. P. R.; OLIVEIRA, M. N. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre**. 2000a. 13p. (Embrapa, Boletim de Pesquisa Número 23).

SILVA, A.C.P.R. da; OLIVEIRA, M.N.de. **Produção e dispersão de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervum*)**. 2000b. 14p. (Embrapa Acre, Boletim de Pesquisa Número 24).

SILVA, A. L. *et al.* Rendimento e composição do óleo essencial de *Piper aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 15, n. 1, p. 670–674, 2013. DOI: 10.1590/S1516-05722013000500007.

SILVA, J. K. da. *et al.* Essential Oils from Neotropical Piper Species and Their Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 12, p. 2571, 14 dez. 2017. DOI: 10.3390/ijms18122571.

SILVA, L.S. *et al.* Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* Essential Oils in Gelatin Nanoparticles: A Possible Sustainable Control Tool of *A. aegypti*, *T. urticae* and *C. lataniae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, p.685-695, 2019. DOI: 10.1002/jsfa.9233.

SILVA, F.G. *et al.* Plastid marker-based phylogeny reveals insights into relationships among Papilionoideae species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 70, e. 6, 2023. DOI: 10.1007/s10722-023-01637-1.



- SIMMONDS, S.E. *et al.* Phylogenetics and comparative plastome genomics of two of the largest genera of angiosperms, *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 163:107229, 2021. DOI: 10.1016/j.ympev.2021.107229.
- SMITH, J. F. *et al.* Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic, and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 275, n. 9, 2008. DOI: 10.1007/s00606-008-0056-5.
- SIVIERO, A. *et al.* A contribuição de espécies do gênero de *Piper* para a agroecologia no Acre. In: DOS SANTOS, R. C.; SIVIERO, A. (ed.). **Agroecologia no Acre**. Acre, AC: IFAC, 2015.
- SOARES, N. R. *et al.* Comparative cytogenetics of three economically important *Piper* L. species from the Brazilian Amazon. **Protoplasma**, 2022. DOI: 10.1007/s00709-021-01721-2.
- SONG, Y. *et al.* Piperine Attenuates TBI-Induced Seizures via Inhibiting Cytokine-Activated Reactive Astrogliosis. **Frontiers in Neurology**, v. 11, n. 431, 2020. DOI: 10.3389/fneur.2020.00431
- SUWANPHAKDEE, C. *et al.* Taxonomic notes on the genus *Piper* (Piperaceae). **Nordic Journal of Botany**, Lund, v. 34, n. 5, p. 605–618, 2016. DOI: 10.1111/njb.01114.
- THAKUR, J.; PACKIARAJ, J.; HENIKOFF, S. Sequence, Chromatin and Evolution of Satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/ijms22094309.
- THIN, D.B. *et al.* Chemical Analysis of Essential Oils of *Piper laosanum* and *Piper acre* (Piperaceae) from Vietnam. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, n. 1, p. 181-188, 2018.
- TIMMIS, J. N. *et al.* Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 2, p. 123–135, 2004.
- VALENTIN-SILVA, A. *et al.* What factors can influence the reproductive phenology of Neotropical *Piper* species (Piperaceae) in a semi-deciduous seasonal forest? **Botany**, v. 96, p. 675–684, 2018. DOI: 10.1139/cjb-2018-0029.
- VARANI, A. M. *et al.* **Elementos de transposição: classificação e mecanismos de mobilização**. In *Elementos de transposição: diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos*. Rio de Janeiro: SBG/FIOCRUZ. 2015.
- VELLOZO, J. M. C. **Florae Fluminensis... Icones Fundamentales**. Paris: Oficina Litográfica Senefelder, 1827.
- VIEIRA, M. L. C. *et al.* Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312–328, 2016. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.

VITALES, D.; GARCIA, S.; DODSWORTH, S. Reconstructing phylogenetic relationships based on repeat sequence similarities. **Molecular Phylogenetics Evolution**, v. 147:106766, 2020. DOI: 10.1016/j.ympev.2020.106766.

WADT, L. H. de O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of “Pimenta longa” genotypes (Piper spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 74-82, 2004. DOI: 10.1590/s1415-47572004000100013.

WAKASUGI, T. *et al.* Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p. 9794-9798, 1994.

WANG, M. T.; *et al.* Complete plastome sequence of *Piper laetispicum* (Piperaceae): An endemic plant species in south China. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 3, n. 2, p. 1035-1036, 2018. DOI: 10.1080/23802359.2018.1511850

WICKER, T.; KELLER, B. Genome-wide comparative analysis of copia retrotransposons in Triticeae, rice, and *Arabidopsis* reveals conserved ancient evolutionary lineages and distinct dynamics of individual copia families. **Genome Research**, v. 17, n. 7, p. 1072-1081, 13 jun. 2007. DOI: 10.1101/gr.6214107.

WON, S.Y. *et al.* Identification of repetitive DNA sequences in the *Chrysanthemum boreale* genome. **Scientia Horticulturae**, v. 236, p. 238-243, 2018. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.03.055

WU, Y. *et al.* Comparative Chloroplast Genomics of *Gossypium* Species: Insights Into Repeat Sequence Variations and Phylogeny. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-14, 2018.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil I: *Piper* - Group I, II, III, IV. **Hoehnea**, São Paulo, v.2, n. 19, p. 219-366, 1972.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil II: *Piper* - Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorhachis*. **Hoehnea**, São Paulo, v. 3, p. 29-284, 1973.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil III – *Peperomia*; Taxa of uncertain status. **Hoehnea**, São Paulo, v. 4, p. 71-413, 1974.

ZHANG, L.; HU, X.; LIU, M. Complete chloroplast genome sequences of the medicinal plant *Piper hancei*. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 6, n. 9, p. 2775–2776, 2021. DOI: 10.1080/23802359.2021.1967217

ZIMATH, P. L. *et al.* Avaliação psicofarmacológica do óleo essencial de *Piper amplum*. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 11(2), 119-249, 2017. Doi I: 10.5935/2446-4775.20170024.

ZUCCOLO, A. *et al.* Transposable element distribution, abundance and role in genome size variation in the genus *Oryza*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 152, 2007. DOI: 10.1186/1471-2148-7-152.

**CAPÍTULO 2**  
**FRAÇÃO DO DNA REPETITIVO E FILOGENIA DOS DOMÍNIOS PROTEICOS EM**  
*Piper L.*

## RESUMO

O gênero *Piper* L. possui diversas espécies utilizadas como condimentos, aromatizantes, plantas medicinais e, principalmente, como produtoras de óleos essenciais. Em avaliações de germoplasma de *Piper* da Embrapa Acre, *Piper hispidinervum* C.DC, *Piper aduncum* L. e *Piper* aff. *hispidinervum* C.DC foram identificadas como promissoras para produção comercial de dilapiol, safrol e sarisan, respectivamente. Essas espécies possuem caracteres morfológicos e citogenéticos muito semelhantes, impossibilitando uma separação de forma clara. Considerando a necessidade de identificar características que ajudem a definir as relações genômicas e filogenéticas entre essas espécies, objetivou-se caracterizar e comparar a fração repetitiva de DNA presente nos genomas de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*. O DNA genômico foi extraído e sequenciado na plataforma Illumina MiSeq e os dados de sequenciamento do genoma de *Piper nigrum* (grupo externo) foram obtidos do banco ENA (*European Nucleotide Archive*). As análises individuais e comparativas das sequências repetitivas foram realizadas na plataforma RepeatExplorer. Domínios proteicos conservados da retrotransposase (RT) foram extraídos da superfamília *Ty3-Gypsy* para análise filogenética. As sequências de aminoácidos foram alinhadas e as relações filogenéticas foram estabelecidas pelo método Neighbor-Joining. Os elementos repetitivos representaram 60% do genoma em *P. hispidinervum*, 62% em *P. aduncum* e em *P. aff. hispidinervum* e 27% em *P. nigrum*. Os retrotransposons corresponderam à classe mais abundante de sequências repetitivas, sendo a ordem LTR a mais abundante nos quatro genomas. Dentro desta ordem, as superfamílias *Ty3-Gypsy* e *Ty1-Copia* foram identificadas. Quanto aos transposons, houve predominância das famílias *hAT* e *MuDR\_Mutador* em *P. nigrum* e da família *EnSpm-CACATA* nas demais espécies. A proporção de sequências DNAr 5S e 35S foi inferior a 1% em todos os genomas. Satélites de DNA foram identificados em todos os genomas e classificados em nove famílias. O satélite PafSat1 foi o único compartilhado em todas as espécies, enquanto os satélites PadSat1 e PadSat2 foram exclusivos de *P. aduncum* e os satélites PniSat1 e PniSat2 foram exclusivos de *P. nigrum*. A superfamília *Ty3-Gypsy* se diferenciou através da evolução, formando seis clados. A maioria dos clados apresentou linhagens RT comuns nos quatro genomas e apenas dois clusters, um em Reina e outro em Tekay, apresentaram linhagens específicas de *P. nigrum*. Os genomas de *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* possuem relações genômicas muito próximas entre si e mais distantes de *P. aduncum*.

**Palavras-chave:** *Piper hispidinervum*. *Piper aduncum*. *Piper* aff. *hispidinervum*. DNA satélites. Relações genômicas.

## ABSTRACT

The genus *Piper* L. has several species used as condiments, flavorings, medicinal plants and, mainly, as producers of essential oils. In germplasm evaluations of *Piper* from Embrapa Acre, *Piper hispidinervum* C.DC, *Piper aduncum* L. e *Piper* aff. *hispidinervum* C.DC were identified as promising for commercial production of dillapiol, safrole and sarisan, respectively. These species have very similar morphological and cytogenetic traits, what impair their distinction from each other. Considering the need to identify traits that help to define the genomic and phylogenetic relationships between these species, the aim was to characterize and compare the repetitive fraction of DNA present in the genomes of *P. hispidinervum*, *P. aduncum* and *P. aff. hispidinervum*. Genomic DNA was extracted and sequenced on the Illumina MiSeq platform and sequencing data from the *Piper nigrum* genome (outgroup) was obtained from the ENA bank (European Nucleotide Archive). Individual and comparative analyzes of repetitive sequences were performed on the RepeatExplorer platform. Conserved retrotransposase (RT) protein domains were extracted from the Ty3-Gypsy superfamily for phylogenetic analysis. Amino acid sequences were aligned, and phylogenetic relationships were established by the Neighbor-Joining method. The repetitive elements represented 60% of the genome in *P. hispidinervum*, 62% in *P. aduncum* and in *P. aff. hispidinervum* and 27% in *P. nigrum*. Retrotransposons corresponded to the most abundant class of repetitive sequences, with the LTR order being the most abundant in the four genomes. Within this order, the Ty3-Gypsy and Ty1-Copia superfamilies were identified. As for transposons, there was a predominance of the hAT and MuDR\_Mutador families in *P. nigrum* and the EnSpm-CACATA family in the other species. The proportion of 5S and 35S rDNA sequences was less than 1% in all genomes. DNA satellites were identified in all genomes and classified into nine families. The PafSat1 satellite was the only one shared by all species, while the PadSat1 and PadSat2 satellites were exclusive to *P. aduncum* and the PniSat1 and PniSat2 satellites were exclusive to *P. nigrum*. The Ty3-Gypsy superfamily has differentiated through evolution, forming six clades. Most clades showed common RT lineages in the four genomes and only two clusters, one in Reina and the other in Tekay, showed specific lineages of *P. nigrum*. The genomes of *P. hispidinervum* and *P. aff. hispidinervum* have genomic relationships very close to each other and more distant from *P. aduncum*.

**Keywords:** *Piper hispidinervum*. *Piper aduncum*. *Piper* aff. *hispidinervum*. DNA satellites. Genomic relationships.

## 1 INTRODUÇÃO

Espécies de *Piper* L. nativas da Amazônia vêm despertando interesse como fonte alternativa de óleo essencial para extração comercial de safrol, dilapiol e sarisan (SILVA; OLIVEIRA, 2000). O safrol é um fenil-éter empregado na produção de perfumes, como fixador de fragrâncias (SIVIERO *et al.*, 2015), enquanto o dilapiol e sarisan são compostos propanoides com ação bioinseticida e sinérgicos contra pragas de grãos economicamente importantes, como milho, soja, feijão-comum e feijão-caupi (FAZOLIN *et al.*, 2011; PITON *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Devido ao interesse nesses óleos essenciais, a Embrapa Acre iniciou prospecções de espécies de *Piper* nativas da Amazônia Brasileira, na década de 90, levando à criação do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa-Acre. Esse banco contém acessos de *Piper hispidinervum* C.DC. (pimenta longa), *Piper aduncum* L. (pimenta-de-macaco) e *Piper* aff. *hispidinervum* C.DC. caracterizados por apresentarem altos teores de dilapiol, safrol e sarisan, respectivamente (SILVA; OLIVEIRA, 2000; BIZZO *et al.*, 2001).

Apesar do potencial para produção comercial de tais óleos essenciais (SILVA; OLIVEIRA, 2000; BIZZO *et al.*, 2001), essas espécies de *Piper* apresentam taxonomia controversa, em virtude de similaridades morfológicas e citogenéticas entre elas (WADT, EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004; SOARES *et al.*, 2022). Para *P. hispidinervum* há hipóteses de que seja uma variedade de *P. aduncum* (SILVA, 1993) ou uma espécie distinta (YUNCKER, 1972; WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004). Para *P. aff. hispidinervum*, há hipóteses de que seja um ecótipo de *P. hispidinervum* adaptado a região Tarauacá/Envira no Acre ou um híbrido entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum* (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

Essas semelhanças morfo-citogenéticas e a controvérsia taxonômica constituem um problema na manipulação do germoplasma, na coleta, identificação e diferenciação entre os acessos, dificultando a implementação de um programa de melhoramento genético (BERGO *et al.*, 2002). Esses problemas atrasam o desenvolvimento e lançamento de cultivares de *Piper* produtoras de óleo essencial (PIMENTEL; DE SÁ, 2001; MIRANDA, 2002).

A obtenção de novas informações sobre o genoma dessas espécies, por exemplo, sobre a fração repetitiva de DNA, pode fornecer informações de maior resolução, permitindo uma comparação mais conclusiva entre os genomas de interesse. Atualmente, apenas a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) teve a fração repetitiva de DNA caracterizada por Hu *et al.* (2019), no qual 54,85% do seu genoma é formado por elementos repetitivos, com predomínio de

retrotransposons da ordem LTR (40,5%) e das superfamílias *Ty3-Gypsy* (27,6%) e *Ty1-Copia* (10%). Essa escassez de dados demonstra a necessidade de caracterizar a fração repetitiva de DNA para o gênero.

Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar e comparar a fração repetitiva de DNA entre os genomas de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*, com relação ao tipo, abundância e evolução das sequências, a fim de contribuir para a definição do *status* taxonômico dessas espécies.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material genético, extração de DNA e sequenciamento genômico

Sementes de *Piper aduncum* (acesso A2000002), *Piper hispidinervum* (H269903) e *Piper aff. hispidinervum* (H1389602) (FIGURA 2.1) foram cedidas pelo Banco de Germoplasma de *Piper* da Embrapa Acre para realização das análises. *P. aduncum* apresenta um tamanho de genoma de 1,01 Gpb, *P. hispidinervum* de 1,05 Gpb e *P. aff. hispidinervum* de 0,98 Gpb e todas são diploides com  $2n=2x=26$  cromossomos (SOARES *et al.*, 2022). Essas espécies foram coletadas de populações naturais no estado do Acre e são conservados *ex-situ* na área experimental da Embrapa.

Figura 2.1 – *Piper aduncum* (a), *Piper hispidinervum* (b) e *Piper aff. hispidinervum* (c).



Fonte: Da autora (2023).

Folhas jovens desses três acessos foram utilizadas para extração de DNA genômico conforme protocolo do kit de extração *DNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen® Inc. Venlo, Netherlands). As bibliotecas de DNA genômico foram preparadas seguindo as recomendações do kit Nextera™ DNA Flex Library Prep com fragmentos de sequências *paired-end* de 300 pb (pares de base). O sequenciamento de baixa cobertura (1x) foi realizado na plataforma Illumina MiSeq em parceria do Laboratório de Citogenética da UFLA (Universidade Federal de Lavras) com o Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, Belo Horizonte - MG.

Os dados do sequenciamento do genoma de *Piper nigrum* (SRR5602591) foram obtidos no banco ENA (*European Nucleotide Archive*). Essa espécie tetraploide ( $2n=4x=52$ ) (SAMUEL; MORAWETZ, 1989) foi usada como grupo externo nas análises comparativa.

## 2.2 Pré-processamento e análise da fração repetitiva

Os dados de sequenciamento foram pré-processados na plataforma *RepeatExplorer* (NOVAK *et al.*, 2020), cuja qualidade dos *reads* foi avaliada pela escala *Phred quality score* ( $Q \geq 28$ ), seguida de filtragem dos *reads* (*Filter by quality*), corte das sequências (*Trim sequences*) e união das sequências *Forward* e *Reverse* (*Interlacer paired reads*) para cada espécie.

A análise de *clustering* (agrupamento baseado em gráficos de leituras de sequência curtas das sequências repetidas) foi feita com um conjunto de sequências correspondente a cerca de 0,1x o tamanho do genoma de cada espécie. As diferenças no nível de ploidia ( $Cx$ ) foram padronizadas para o valor correspondente a uma cópia do genoma (GAIERO *et al.*, 2019), uma vez que *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* são diploides e *P. nigrum* é tetraploide.

A proporção da fração repetitiva do genoma de cada espécie foi analisada individual e comparativamente. Individual para caracterização geral dos elementos repetitivos e identificação dos DNA satélites e comparativamente para identificação e comparação de *clusters* compartilhados entre elas.

Essas análises foram realizadas por meio da concatenação de *reads* de cada espécie e a anotação automática dos elementos repetitivos foi obtida usando o banco de dados Viridiplantae - REXdb (NEUMANN *et al.*, 2019; NOVÁK *et al.*, 2013) executada na ferramenta *RepeatExplorer2*. Os elementos repetitivos não classificados tiveram suas sequências comparadas e classificadas conforme semelhança entre as sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados *Giri Repbase* (BAO *et al.*, 2015). *Clusters* de DNA cloroplastidial e mitocondrial foram excluídos de ambas as análises.



As sequências de DNA satélites (alta e baixa confiança) foram identificadas pela ferramenta TAREAN (NOVAK *et al.*, 2017) da plataforma *RepeatExplorer*. Essas sequências foram analisadas por gráficos Dotplot na plataforma *Dotmatcher* – EMBOSS (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000), para verificar o padrão de repetição em tandem. As sequências satélites confirmadas pelo *Dotmatcher* foram submetidas a uma análise conjunta de *Dotplot* no *software* DOTTER para identificação de similaridade entre elas (SONNHAMMER; DURBIN, 1995). Essas mesmas sequências também foram submetidas às buscas por homologia no banco de dados de nucleotídeos do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

A similaridade e matriz identidade entre os monômeros de DNA satélites foram identificadas por meio do alinhamento local múltiplo MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013) no *software* UGENE (OKONECHNIKOV; GOLOSOVA; FURSOV, 2012). A partir das matrizes de identidade, os DNA satélites foram classificados em (RUIZ-RUANO *et al.*, 2016): Variante: sequências com similaridades superiores a 95%; Família: sequências com similaridades entre 80-95% ou Superfamília: sequências com similaridades inferiores a 80%.

Os DNA satélites confirmados foram nomeados pelo código de três letras equivalente à abreviação do nome da espécie (Pad para *P. aduncum*, Phs para *P. hispidinervum*, Paf para *P. aff. hispidinervum* e Pni para *P. nigrum*), seguido do sufixo “Sat” (de satélite) e posterior número para indicar a classificação a nível de variante, família ou superfamília. A abundância desses DNA satélites também foi determinada por meio do mapeamento por referência entre os monômeros dos satélites e o genoma de cada espécie de *Piper* (dados brutos) no *software* UGENE, sendo visualizada no gráfico *Bubble Chart* construído no *software* R (R CORE TEAM, 2023).

### 2.3 Filogenia dos domínios conservados

Para os retrotransposons da superfamília *Ty3-Gypsy* foi feita a análise filogenética baseada nos genes da Retrotransposase (RT). Essa superfamília foi selecionada por ser a mais abundante nos genomas de *Piper*. Os domínios proteicos conservados da Retrotransposase (RT) foram extraídos de cada família via ferramenta DANTE (*Domain based Annotation of Transposable Elements*) da plataforma *RepeatExplorer* (NEUMANN *et al.*, 2019).

As sequências dos aminoácidos obtidas foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE e as relações filogenéticas foram estabelecidas pelo método Neighbor-Joining com a inclusão de valores de 10.000 *bootstrap*. A árvore filogenética foi construída utilizando distâncias evolutivas calculadas pelo método de correção de Poisson e todas as posições ambíguas foram

removidas para cada par de sequências. O alinhamento e montagem da árvore filogenética foram realizadas no *software* MEGA-X (KUMAR *et al.*, 2018).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Caracterização da fração repetitiva

A análise comparativa de *clustering* envolveu cerca de 4,5 milhões de *reads*, sendo 3,7 milhões de *reads* classificados como elementos repetitivos e 800 mil classificados como *singlets*, isto é, não identificados como sequências repetitivas. Um total de 299 *clusters* foram identificados como os mais representativos, ou seja, com pelo menos 0,01% de abundância nos genomas de *Piper*.

Desconsiderando as sequências oriundas dos genomas cloroplastidiais e mitocondriais, os elementos repetitivos representaram, aproximadamente, 62% do genoma em *Piper aduncum*, 60% em *Piper hispidinervum*, 62% em *Piper aff. hispidinervum* e 27% em *Piper nigrum* (TABELA 2.1).

Retrotransposons e transposons de DNA foram identificados no genoma das quatro espécies de *Piper*, sendo que a classe I, constituída pelos retrotransposons, foi a mais abundante, correspondendo a 50% da fração repetitiva total em *P. nigrum* e cerca de 90% em *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*. A ordem LTR (*Long Terminal Repeats*), com representantes das superfamílias *Ty1-Copia* e *Ty3-Gypsy*, correspondeu a mais de 90% dos elementos da Classe I no genoma dos táxons brasileiros e a 77% no caso de *P. nigrum* (TABELA 2.1).

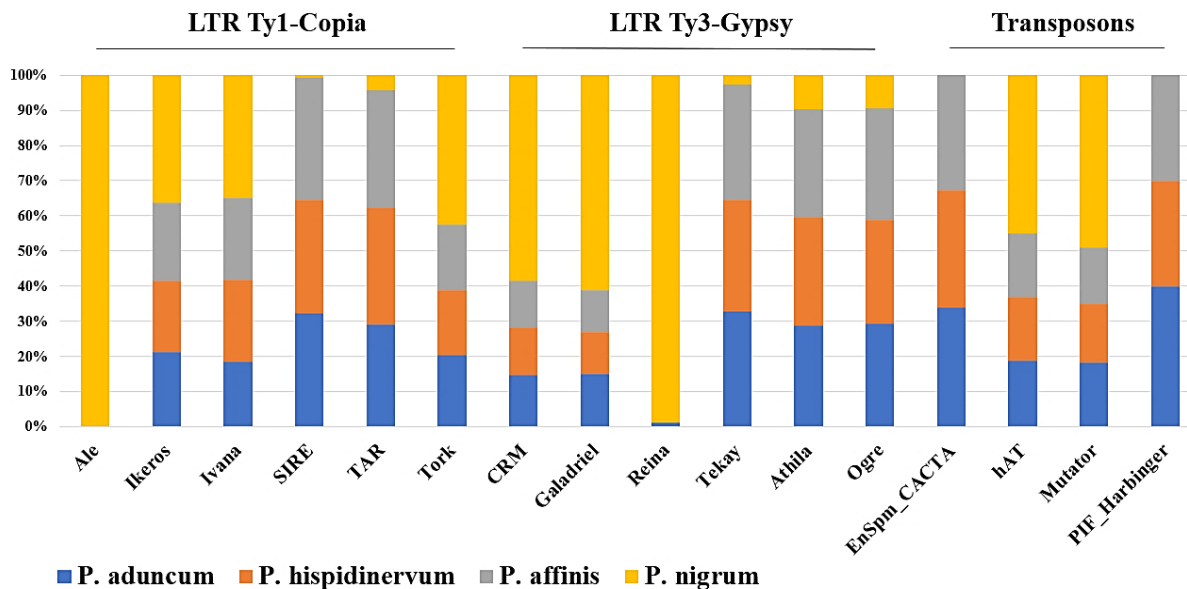
A superfamília *Ty3-Gypsy* foi a mais abundante, equivalendo a 55% da fração de elementos LTR do genoma de *P. nigrum* e a 96 % dos elementos LTR do genoma das demais espécies. As famílias de *Ty3-Gypsy* identificadas foram Chromovirus, Athila e Ogre. Na família Chromovirus foram identificados elementos de quatro clados, sendo que CRM, Galadriel e Reina apresentaram baixa frequência e Tekay foi o clado dominante em todas as espécies. Em *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*, o clado Tekay foi responsável por quase totalidade dos elementos da família Chromovirus e correspondeu a cerca de 86% da superfamília *Ty-Gypsy*. Em *P. nigrum* o clado Tekay também foi o mais abundante, sendo responsável por 62% da fração da família Chromovirus e 47% da superfamília, seguido do clado Reina, ausente nos demais genomas (TABELA 2.1, FIGURA 2.2).

Tabela 2.1 – Composição da fração repetitiva de DNA nos genomas de *Piper aduncum* (Pa), *Piper hispidinervum* (Ph), *Piper* aff. *hispidinervum* (Paf) e *Piper nigrum* (Pn).

Ordem	Superfamília	Família	Clado	Pa	Ph	Paf	Pn
Elementos transponíveis				Abundância (%)			
Retrotransposons - Classe I							
LTR	Ty1_Copia	<i>Ale</i>		0	0	0	0,15
		<i>Ikeros</i>		0,88	0,85	0,92	1,51
		<i>Ivana</i>		0,08	0,10	0,10	0,15
		<i>SIRE</i>		0,43	0,43	0,46	0,01
		<i>TAR</i>		0,07	0,08	0,08	0,01
		<i>Tork</i>		0,92	0,84	0,84	1,92
		Não classificado		0,07	0,07	0,07	0,04
		<b>Total Ty1 Copia</b>		<b>2,46</b>	<b>2,37</b>	<b>2,47</b>	<b>3,79</b>
	Ty3_Gypsy	<i>Chromovirus</i>	CRM	0,20	0,18	0,18	0,79
			Galadriel	0,10	0,08	0,08	0,41
			Reina	0,01	0	0	0,95
			Tekay	43,77	42,32	43,58	3,56
			Não classificado	0,40	0,40	0,42	0
		<i>Athila</i>		3,96	4,26	4,20	1,33
		<i>Ogre</i>		1,54	1,57	1,66	0,50
		Não classificado		0,18	0,14	0,16	0
		<b>Total Ty3 Gypsy</b>		<b>50,15</b>	<b>48,96</b>	<b>50,29</b>	<b>7,55</b>
	Não classificado		2,36	2,20	2,33	6,09	
	<b>Total LTR</b>		<b>52,50</b>	<b>51,16</b>	<b>52,62</b>	<b>13,65</b>	
	Pararetrovirus				0,42	0,36	0,35
Classe I não classificada				0,19	0,19	0,19	0,23
<b>Total Retrotransposons</b>				<b>55,58</b>	<b>54,08</b>	<b>55,62</b>	<b>17,76</b>
Transposons - Classe II							
TIR (Subclasse I)	<i>EnSpm_CACTA</i>		2,42	2,37	2,33	0	
	<i>hAT</i>		0,52	0,51	0,51	1,25	
	<i>Mutator</i>		0,39	0,36	0,34	1,05	
	<i>PIF_Harbinger</i>		0,04	0,03	0,03	0	
	<b>Total Transposons</b>		<b>3,37</b>	<b>3,27</b>	<b>3,21</b>	<b>2,30</b>	
DNA satélites				0,09	0,08	0,13	0,05
DNAr 5S				0,02	0,07	0,09	0,01
DNAr 35S				0,46	0,34	0,27	0,08
Elementos repetitivos não classificados				2,35	2,28	2,45	7,09
<b>Total Elementos Repetitivos</b>				<b>61,88</b>	<b>60,11</b>	<b>61,77</b>	<b>27,29</b>

Fonte: Da autora (2023).

Figura 2.2 – Abundância das superfamílias de LTR e transposons na análise comparativa de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum*, *Piper aff. hispidinervum* e *Piper nigrum*.



Fonte: Da autora (2023).

Com relação à superfamília *Ty1-Copia*, seis famílias foram identificadas: *Ale*, *Ikeros*, *Ivana*, *SIRE*, *TAR* e *Tork*. Com exceção de *Ale*, todas as famílias estiveram presentes nos quatro genomas, sendo a família *Ikeros* a mais representativa em *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum*, e a família *Tork* a mais abundante em *P. nigrum* e *P. aduncum*. Vale ressaltar que a abundância do elemento *Tork* em *P. hispidinervum* foi muito similar à do elemento *Ikeros*. A família *Ale* foi identificada como exclusiva em *P. nigrum* (TABELA 2.1, FIGURA 2.2).

A abundância dos elementos repetitivos da Classe II foi semelhante nos quatro genomas, com variação de 2,3% em *P. nigrum* a 3,4% em *P. aduncum*. Apenas a ordem TIR da Subclasse I foi identificada e essa ordem foi composta por quatro superfamílias: *EnSpm\_CACTA*, *hAT*, *Mutator* e *PIF\_Harbinger*. As superfamílias *hAT* e *MuDR\_Mutador* estiveram presentes em todos os genomas, enquanto, *EnSpm-CACATA* e *PIF\_Harbinger* estiveram presentes apenas nas espécies brasileiras, sendo a abundância dos elementos *EnSpm-CACATA* pelo menos quatro vezes superior às demais superfamílias (TABELA 2.1).

DNA satélites e DNA ribossômicos (DNAr 5S e DNAr 35S) também foram identificados. Essas sequências foram identificadas em pequenas quantidades, correspondendo, a menos de 1% em cada genoma. Os pararetrovírus, uma classe de elementos virais de DNA, também apresentaram abundância inferior a 1% do genoma de cada táxon. Elementos repetitivos não classificados variaram de 2,3 a 7% nos genomas de *Piper* (TABELA 2.1).

A análise individual de *clustering* envolveu cerca de 1 milhão de *reads* para *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*, 1,3 milhões de *reads* para *P. hispidinervum* e 1,8 milhões de *reads* para *P. nigrum*. Essas sequências analisadas corresponderam a cerca de 0,11x do genoma de cada espécie, tanto nas análises individuais, quanto na comparativa. Desconsiderando as sequências cloroplastidiais e mitocondriais, os elementos repetitivos representaram, aproximadamente, 59% do genoma de *P. aduncum*, 60% do genoma de *P. hispidinervum*, 58% do genoma de *P. aff. hispidinervum* e 27% em *P. nigrum* (ANEXO A).

A fração repetitiva de DNA nas análises individuais foi próxima à encontrada na análise comparativa, havendo algumas variações, especialmente, na menor abundância do clado *Tekay* e das famílias *Athila* e *Ogre* da Classe I em *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* e maior concentração das superfamílias *EnSpm\_CACTA* e *hAT* da Classe II em *P. hispidinervum*. Observou-se também uma maior quantidade de repeats não classificados nas análises individualizadas, sendo uma parte desses repeats identificados e classificados apenas na análise comparativa. DNA satélites e DNA ribossômicos também foram identificados em baixas quantidades e corresponderam a menos de 1% em cada genoma (ANEXO A).

### 3.2 Caracterização das sequências de DNA satélite

Um total de 22 sequências de DNA satélites (alta e baixa confiança) foram identificadas pelo TAREAN, sendo duas sequências de *Piper hispidinervum*, sete de *Piper aduncum*, quatro de *Piper aff. hispidinervum* e nove de *Piper nigrum*. Destas, nove sequências satélites foram confirmadas, com diferentes padrões de ocorrência nas quatro espécies: sete estiveram presentes no genoma de *P. aduncum* (PadSat1, PadSat2, PadSat3, PhsSat1, PhsSat2, PafSat1 e PafSat2), cinco em *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* (PadSat3, PhsSat1, PhsSat2, PafSat1 e PafSat2) e três em *P. nigrum* (PafSat1, PniSat1 e PniSat2).

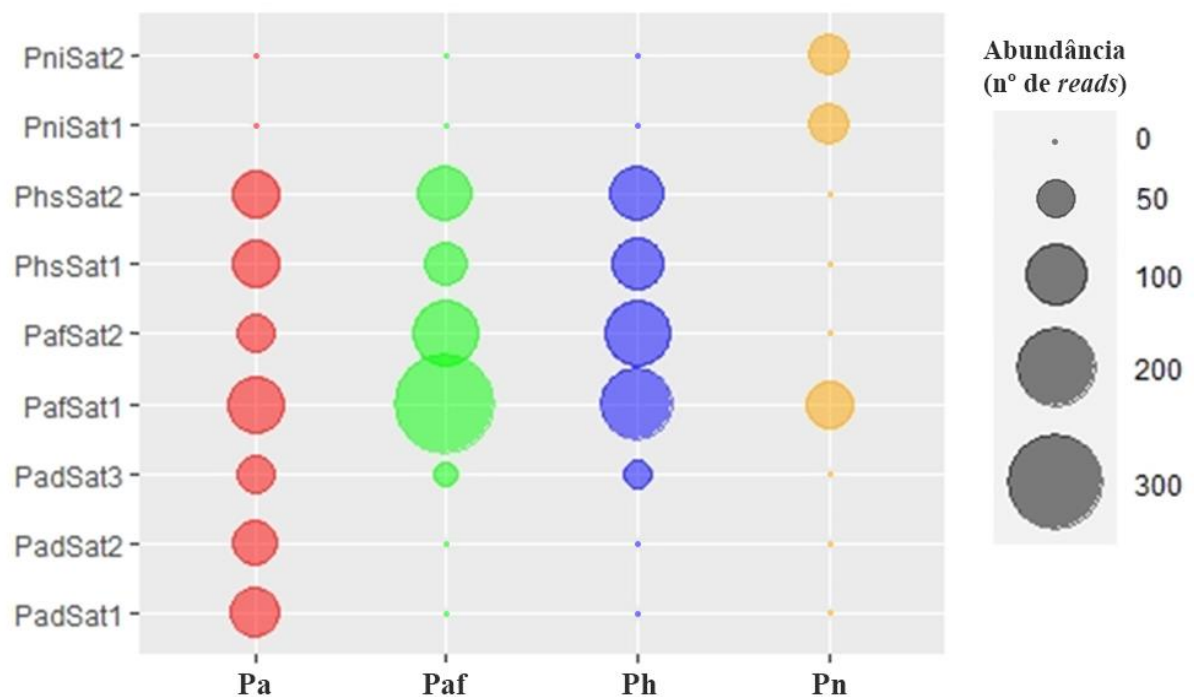
Os DNA satélites apresentaram comprimento variando de 152 (PadSat2) a 1.154 pb (PafSat1) e foram heterogêneos quanto à abundância, pois houve variação no número de *reads* mapeados contra o genoma de cada táxon (TABELA 2.2). Esses satélites foram classificados em nove famílias e nenhuma superfamília e variante foram identificadas (TABELA 2.2, FIGURA 2.3). O satélite PafSat1 foi o único compartilhado em todos os genomas e o mais abundante em todos eles. Os satélites PadSat1 e PadSat2 foram exclusivos de *P. aduncum*, enquanto os satélites PniSat1 e PniSat2 foram exclusivos de *P. nigrum*. As sequências PadSat3, PhsSat1, PhsSat2 e PafSat2 foram compartilhadas entre as espécies coletadas no Acre, com diferentes abundâncias (TABELA 2.2, FIGURA 2.3).

Tabela 2.2 – Classificação, comprimento e abundância das sequências satélites em *Piper aduncum* (Pad), *Piper hispidinervum* (Phs), *Piper aff. hispidinervum* (Paf) e *Piper nigrum* (Pni).

DNA satélite	Comprimento (pb)	Pad	Phs	Paf	Pni
		número de reads			
PadSat1	369	58	0	0	0
PadSat2	152	44	0	0	0
PadSat3	243	27	9	4	0
PhsSat1	279	51	69	37	0
PhsSat2	205	48	76	70	0
PafSat1	1.154	85	162	341	52
PafSat2	600	27	119	117	0
PniSat1	529	0	0	0	33
PniSat2	325	0	0	0	34

Fonte: Da autora (2023).

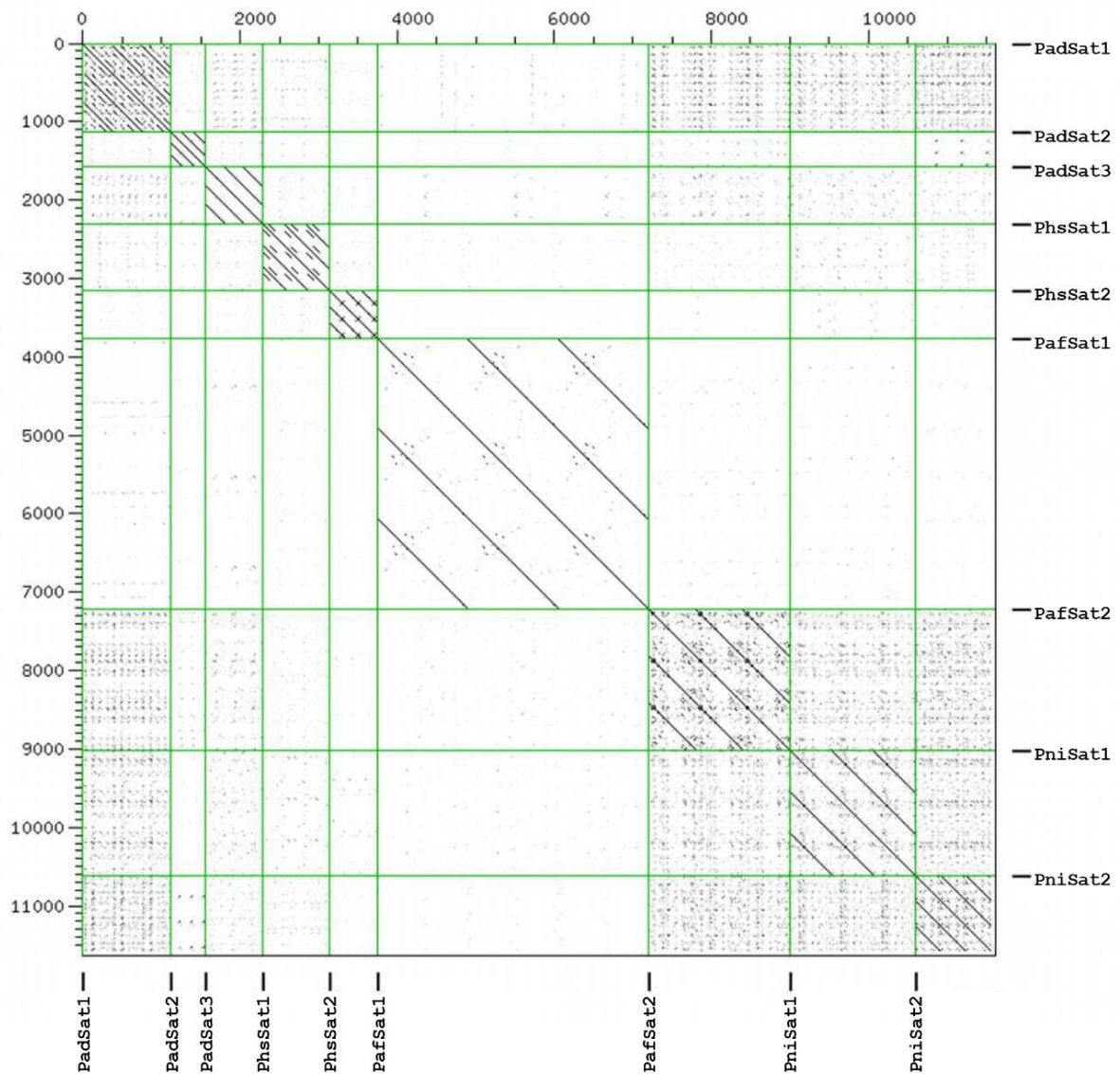
Figura 2.3 – Abundância das sequências de DNA satélites identificadas em *Piper aduncum* (Pa), *Piper aff. hispidinervum* (Paf), *Piper hispidinervum* (Ph) e *Piper nigrum* (Pn).



Fonte: Da autora (2023).

Na análise conjunta do Dotplot, observou-se que as sequências de DNA satélites não apresentaram regiões de similaridades entre si, indicando que são nove sequências satélites diferentes (FIGURA 2.4, ANEXO B). Nenhum desses satélites também apresentou homologia com as sequências de nucleotídeos do NCBI.

Figura 2.4 – Dotplot da análise conjunta das sequências de DNA satélites identificadas em *Piper aduncum* (Pad), *Piper hispidinervum* (Phs), *Piper aff. hispidinervum* (Paf) e *Piper nigrum* (Pni).

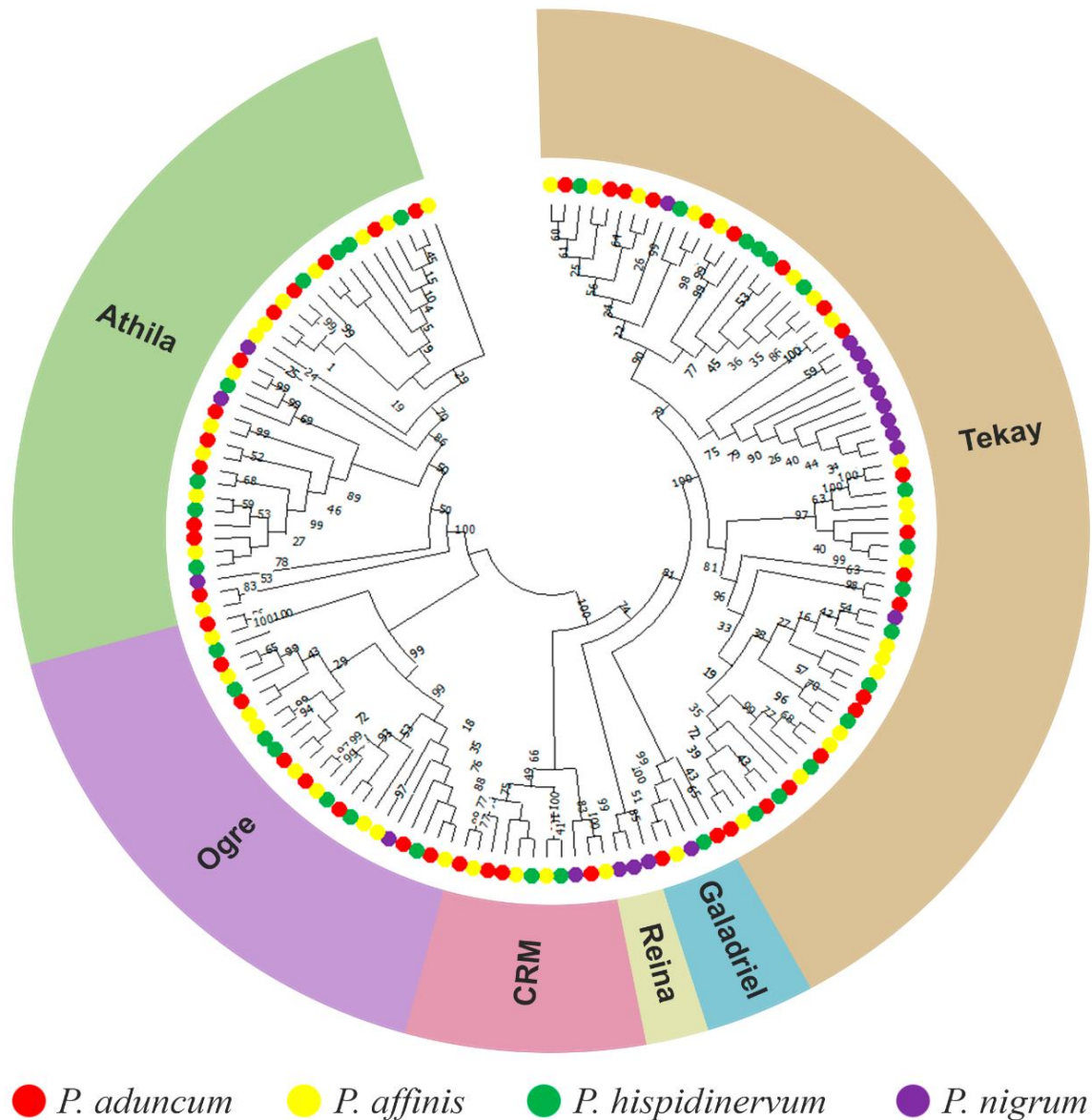


Fonte: Da autora (2023).

### 3.3 Filogenia dos domínios da retrotransposase (RT)

A superfamília *Ty3-Gypsy* foi selecionada para a análise filogenética por ser a mais abundante no genoma de *Piper* e se observou que essa superfamília se diferenciou ao longo da evolução, formando seis clados correspondentes às famílias Athila, Ogre e Chromovirus. Athila e Ogre agruparam linhagens dos quatro genomas, ou seja, linhagens que compartilham os mesmos domínios proteicos, havendo predomínio desses domínios em *Piper aduncum* e *Piper aff. hispidinervum* (FIGURA 2.5).

Figura 2.5 – Relações filogenéticas entre os domínios proteicos da retrotransposase (RT) da superfamília *Ty3-Gypsy* nos genomas de *Piper*. Valores de *bootstrap* localizados em cada nó da árvore filogenética.



Fonte: Da autora (2023).

A família Chromovirus foi dividida em quatro clados: CRM, Galadriel, Reina e Tekay. Essa família também agrupou linhagens em comum nos quatro genomas, com exceção do clado Reina que foi composto apenas por linhagens de *Piper nigrum*. Tekay se destacou como o clado mais divergente, correspondendo quase a metade dos agrupamentos formados (FIGURA 2.5). A maioria dos agrupamentos foram formados por linhagens em comum, que compartilham os mesmos domínios proteicos, com exceção de um agrupamento formado somente por linhagens de *P. nigrum* (FIGURA 2.5). Esses resultados demonstraram que a maioria das linhagens de RT



é compartilhada e não sofreu grande diferenciação dos domínios proteicos ao longo da evolução nos genomas de *Piper*.

#### 4 DISCUSSÃO

A composição da fração repetitiva de DNA foi bem semelhante entre *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*, uma vez que as análises revelaram baixas diferenças entre as classes de repetição. Essa baixa variação indica que os elementos repetitivos são compartilhados entre elas, por serem espécies relacionadas e com tamanho de genoma semelhante.

Os DNA repetitivos mais abundantes foram os elementos da ordem LTR, que correspondem a cerca de 85% da fração repetitiva total e 52% do genoma em cada espécie. Os elementos dessa ordem LTR já foram identificados como os predominantes para a maioria dos genomas vegetais (KIM, 2017), inclusive em espécies basais, com abundância variando de 28,4% em *Euryale ferox* a 65,2% em *Liriodendron chinense* (WANG *et al.*, 2021). A composição e abundância de LTR promovem uma maior expansão dos genomas e podem aumentar a diversidade genética nos vegetais (KIM; CHOI, 2018).

Também é importante destacar que os genomas de *Piper* avaliados nesse trabalho apresentaram somente a ordem LTR da classe dos retrotransposons. Entretanto, outras ordens como LINE e SINE, já foram identificadas nas espécies basais *Amborella trichopoda*, *Cinnamomum kanehirae*, *E. ferox* e *L. chinense*, com proporções variando de 2 a 7% para LINE e inferiores a 0,5% para SINE (WANG *et al.*, 2021). Essas diferenças observadas podem estar relacionadas aos eventos evolutivos de acúmulo e eliminação dos retrotransposons e à poliploidização, atuando como forças motrizes para a diferenciação entre gêneros das angiospermas basais (WANG *et al.*, 2021).

Dentro da ordem LTR, a superfamília *Ty3-Gypsy* foi predominante nos genomas de *Piper*, com proporção muito superior à da superfamília *Ty1-Copia*. Resultado semelhante foi identificado para a maioria das angiospermas, pois o acúmulo de *Ty3-Gypsy* funciona como um mecanismo importante na evolução desse elemento, apresentando maior quantidade e tamanho das sequências devido ao seu intenso processo de replicação, recombinação e transmissão (SUN *et al.*, 2008).

Nos elementos da Classe II a dinâmica de abundância também foi observada havendo maior acúmulo de *EnSpm\_CACTA* e baixa frequência em *PIF\_Harbinger*. Essas variações são comuns na composição desses transposons nos genomas vegetais, constituindo importante

ferramenta na evolução e comparação desses elementos entre espécies intimamente relacionadas (CAI *et al.*, 2014; SHUQIONG *et al.*, 2019).

Em experimentos de afinidade genômica envolvendo a localização cromossômica de DNA genômico em *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*, Soares *et al.* (2022) identificaram que a auto-GISH (hibridização com próprio genoma) destacou DNA repetitivo nas regiões centroméricas e pericentroméricas, e pelas hibridações recíprocas (hibridização usando gDNA de outra espécie), que um par de cromossomos concentrou o DNA repetitivo na região subtelomérica.

As descobertas de Soares *et al.* (2022) concordam com os resultados encontrados nesse trabalho, demonstrando que a fração de DNA repetitivo (proporção e tipo de sequências) é muito semelhante entre elas, sendo repetições conservadas. Por isso, a GISH não revelou um padrão diferente de hibridização de sondas genômicas nos cromossomos de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*.

Considerando a composição e abundância dos elementos repetitivos, a pimenta-do-reino (*P. nigrum*) é única espécie do gênero com a fração repetitiva caracterizada (HU *et al.*, 2019). Esses autores relataram que 54,85% do genoma dessa espécie é formado por elementos repetitivos, com predomínio de retrotransposons da ordem LTR (40,5%) e das superfamílias *Ty3-Gypsy* (27,6%) e *Ty1-Copia* (10%).

Neste trabalho, foi identificado que a fração repetitiva representa 27,24% do genoma de *P. nigrum*, sendo 13,65% correspondente a ordem LTR, 3,79% a superfamília *Ty1-Copia* e 7,55% a superfamília *Ty3-Gypsy*. As diferenças encontradas no nosso trabalho e no de Hu *et al.* (2019) podem estar relacionadas com a estratégia adotada na montagem do genoma de referência e com o efeito de correção da ploidia da espécie.

No presente estudo, utilizamos a *pipeline* computacional do *RepeatExplorer* que identifica as sequências de repetição a partir de leituras de sequências curtas, executando a quantificação e anotação automática dos elementos transponíveis, com correção para o nível de ploidia, já que *P. nigrum* é tetraploide e as demais diploides. Por outro lado, HU *et al.* (2019) utilizaram metodologias que geram leituras de sequências longas e envolvem diferentes estratégias para anotação das sequências repetitivas. Quanto à ploidia, esses autores utilizaram montadores de genoma com reconhecimento diploide, ou seja, consideraram valores para duas cópias do genoma.

Os genomas de *Piper* apresentaram baixa abundância de sequências satélites e o comprimento dos monômeros apresentou uma grande amplitude, variando de 152 a 1.154 pb. Para a maioria dos vegetais, o comprimento padrão observado das sequências satélites é em

torno de 165 pb ou múltiplos desse número (MACAS; MESZAROS; NOUZOVA, 2002). Esse comprimento fora do padrão identificado nos genomas de *Piper* pode indicar que esses DNA satélites não sofreram restrições estruturais pelo nucleossoma ou não sofreram ação dos mecanismos moleculares de amplificação ao longo da evolução (MACAS; MESZAROS; NOUZOVA, 2002; GARRIDO-RAMOS, 2015).

Dos nove satélites identificados, somente um satélite (PafSat1) foi compartilhado nos quatro genomas, enquanto dois foram exclusivos de *P. aduncum* (PadSat1 e PadSat2) e outros dois exclusivos de *P. nigrum* (PniSat1 e PniSat2). Esse resultado revela a existência de sequências antigas que descendem de uma sequência ancestral comum e sequências recentes que descendem de uma repetição comum ou sequências antigas que devem ter passado por um rápido processo de evolução e se diferenciaram entre as espécies de *Piper*.

Em função da falta de publicações sobre satelitoma de famílias do grupo das angiospermas basais, Poaceae foi a família mais próxima de *Piper* para comparação dos resultados obtidos. Um total de 27 DNA satélites foram identificados em análises comparativas nos genomas de *Deschampsia cespitosa*, *Deschampsia antarctica* e *Deschampsia sukatschewii*, gramíneas que crescem em regiões de estresses abióticos. Esses satélites corresponderam 1,61 a 2,85% de seus genomas e demonstraram alta similaridade entre essas espécies, indicando origem comum das sequências satélites (AMOSOVA *et al.*, 2022).

Em *Avena sativa*, outra espécie de Poaceae, 55 famílias de DNA satélites foram identificadas no genoma dessa espécie e representaram cerca de 2% do seu genoma (LIU *et al.*, 2019). Em espécies de *Spartina* as sequências satélites variaram de 3,71% no genoma de *S. maritima* a 8,40% no genoma de *S. alterniflora* (GIRAUD *et al.*, 2021). Comparativamente com as espécies de *Piper* avaliadas nesse trabalho, Poaceae apresentou uma maior abundância de sequências satélites nos genomas das espécies relatadas.

A ausência de *hits* das sequências satélites de *Piper* na análise BLASTn também revela que essas sequências não são similares a nenhuma outra sequência de DNA satélite já depositado no GenBank, demonstrando que os satélites de *Piper* apresentam um padrão diferenciado e podem estar entre os elementos genômicos de mais rápida evolução, sendo específico nessas espécies. Por isso, torna-se importante realizar pesquisas de caracterização de sequências satélites no gênero *Piper*. É importante também investigar se a baixa proporção (menor que 1%) e variações de sequências de DNA satélite são típicas das angiospermas basais que são compostas pelo grado ANA (Amborellales, Nymphaeales e Austrobaileyales), pela ordem Chloranthales e pelo clado das Magnoliídeas (Canellales, Laurales, Magnoliales e Piperales) (THE CATALOGUE OF LIFE PARTNERSHIP, 2017).

A extração dos domínios proteicos de RT permitiu a reconstrução da filogenia dos elementos *Ty3-Gypsy* em *Piper*. Os clados *Athila*, *Ogre* e *Chromovirus* (CRM, Galadriel, Reina e Tekay) estiverem presentes em todos os genomas estudados, havendo maior número de linhagens em *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* e menor número em *P. nigrum*. Esse resultado indica ancestral comum entre as linhagens da RT de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*.

Para *P. nigrum*, houve uma maior especificidade das linhagens de *Reina* e *Tekay*, inferindo um evento de acumulação dessas linhagens que permitiu a diferenciação de *Reina* e *Tekay* para com as demais linhagens (BENNETZEN *et al.*, 2014). As linhagens de RT de *P. nigrum* também foram mais distantes evolutivamente das espécies estudadas, sendo a pimenta-do-reino considerada uma espécie relacionada, mas não muito próxima de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*.

No gênero *Cucumis* as sequências repetitivas de *Ty3-Gypsy* e *Ty1-Copia* foram usadas na diferenciação entre cinco espécies relacionadas. A filogenia baseada nessas superfamílias identificou que *Cucumis sativus*, *Cucumis hystrix* e *Cucumis melo* são espécies intimamente relacionadas, enquanto *Cucumis anguria* e *Cucumis metuliferus* são mais próximas entre si e mais distantes das outras três (SHUQIONG *et al.*, 2019). Esse exemplo demonstra que as sequências repetitivas podem ser usadas na diferenciação entre espécies intimamente relacionadas, sendo capaz de fornecer relações filogenômicas bem suportadas.

De modo geral, a caracterização da fração repetitiva de DNA foi bem semelhante entre os genomas dos táxons brasileiros, não havendo diferenças significativas entre eles, uma vez que os elementos repetitivos representaram cerca de 61% do genoma desses táxons.

A descrição detalhada da fração repetitiva de DNA e dos domínios conservados da RT realizada no presente trabalho identificou alta similaridade em termos de composição e proporção dos elementos repetitivos nos genomas de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*. No entanto, as sequências satélites revelaram diferenças entre elas, pois as duas sequências satélites exclusivas de *P. aduncum* sugerem que há diferenças para com *P. hispidinervum*, corroborando com a hipótese de *P. hispidinervum* ser uma espécie distinta de *P. aduncum* (YUNCKER, 1972; WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004) e não uma variedade de *P. aduncum* como levantado por Soares *et al.* (2022).

Por outro lado, as mesmas sequências satélites exclusivas de *P. aduncum* não foram identificadas no genoma de *P. aff. hispidinervum*, podendo sugerir que *P. aff. hispidinervum* não é um híbrido e nem variedade de *P. aduncum*. Além disso, todas as sequências satélites de *P. hispidinervum* foram compartilhadas com *P. aff. hispidinervum*, corroborando com a

hipótese de ambas serem a mesma espécie, ou seja, *P. aff. hispidinervum* ser um ecótipo de *P. hispidinervum* (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

Esses resultados reforçam a importância de realizar análises comparativas dos genomas cloroplastidiais de *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* a fim de permitir uma comparação mais conclusiva e auxiliar na elucidação da controvérsia taxonômica entre elas.

## 5 CONCLUSÃO

Com relação à fração repetitiva de DNA nos genomas de *Piper*, *Piper hispidinervum* e *Piper aff. hispidinervum* são mais próximas entre si e mais distantes de *Piper aduncum*.

## REFERÊNCIAS

- AMOSOVA, A.V. *et al.* Repeatome Analyses and Satellite DNA Chromosome Patterns in *Deschampsia sukatschewii*, *D. cespitosa*, and *D. antarctica* (Poaceae). **Genes**, v. 13, n. 762, 2022. DOI: 10.3390/genes13050762
- BAO, W.; KOJIMA, K.K.; KOHANY, O. Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. **Mobile DNA**, v. 6, n.11, 2015. DOI: 10.1186/s13100-015-0041-9
- BENNETZEN, J. L.; WANG, H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 505–530, 2014. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-035811.
- BERGO, C. L. *et al.* Cultivo de Pimenta longa (*Piper hispidinervum*) na Amazônia Ocidental. **Embrapa Acre. Sistemas de Produção**, v. 1, p. 29, 2002.
- BIZZO, H. R. *et al.* Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC (long pepper). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 2, p. 113–115, 2001. DOI: 10.1002/ffj.957.
- CAI, Z.X. *et al.* Differential genome evolution and speciation of *Coix lacryma-jobi* L. and *Coix aquatica* Roxb. hybrid guangxi revealed by repetitive sequence analysis and fine karyotyping. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1025, 2014.
- DODSWORTH, S. *et al.* Genomic Repeat Abundances Contain Phylogenetic Signal. **Systematic Biology**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 112–126, 1 jan. 2015. DOI: 10.1093/sysbio/syu080.
- FAZOLIN, M. *et al.* Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper affinis hispidinervum* para insetos pragas das culturas do milho e feijão. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 5., 2011, Jaguariúna. **Anais [...]**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011.
- GAIERO, P. *et al.* Comparative analysis of repetitive sequences among species from the potato and the tomato clades. **Annals of Botany**, v. 123, n. 3, p. 521–532, 2019. DOI: 10.1093/aob/mcy186
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in plants: More than just rubbish. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 146, n. 2, p. 153–170, 2015. DOI: 10.1159/000437008.
- GIRAUD, D. *et al.* Evolutionary dynamics of transposable elements and satellite DNAs in polyploid *Spartina* species. **Plant Science**, v. 302, pp.110671, 2021. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110671
- HU, L. *et al.* The chromosome-scale reference genome of black pepper provides insight into piperine biosynthesis. **Nature Communication**, v. 10, n. 4702, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-12607-6

- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013. DOI: 10.1093/molbev/mst010.
- KIM, N.S. The genomes and transposable elements in plants: are they friends or foes? **Genes & Genomics**, v. 39, p. 359–370, 2017. DOI: 10.1007/s13258-017-0522-y
- KIM, S.; CHOI, D. New Role of LTR-Retrotransposons for Emergence and Expansion of Disease-Resistance Genes and High-Copy Gene Families in Plants. **BMB Reports**, v. 15, n. 2, p. 55-56, 2018. DOI: 10.5483/BMBRep.2018.51.2.010
- KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.
- LIU, Q. *et al.* The repetitive DNA landscape in Avena (Poaceae): chromosome and genome evolution defined by major repeat classes in whole-genome sequence reads. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 226, 2019. DOI: 10.1186/s12870-019-1769-z
- MACAS, J.; MESZAROS, T.; NOUZOVA, M. PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats. **Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 28–35, 2002. DOI: 10.1093/bioinformatics/18.
- MIRANDA, E. M. de. Caracterização e avaliação produtiva de uma população nativa de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC) no Seringal Cachoeira, AC, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 32, n. 1, p. 9–20, mar. 2002. DOI: 10.1590/1809-43922002321020.
- NEUMANN, P. *et al.* Systematic survey of plant LTRretrotransposons elucidates phylogenetic relationships of their polyprotein domains and provides a reference for element classification. **Mobile DNA**, v. 10, p. 1– 17, 2019. DOI: 10.1186/s13100-018-0144-1.
- NOVAK, P. *et al.* RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 792–793, 2013. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt054.
- NOVAK, P. *et al.* Genome-Wide Analysis of Repeat Diversity across the Family Musaceae. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, e. 98918, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0098918.
- NOVAK, P. *et al.* TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acid Research**, v. 45, e.111, 2017. DOI: 10.1093/nar/gkx257
- NOVAK, P.; NEUMANN, P.; MACAS, J. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, v. 15, n. 11, p. 3745–3776, 2020. DOI: 10.1038/s41596-020-0400-y
- OKONECHNIKOV, K.; GOLOSOVA, O.; FURSOV, M. UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, v. 28, e. 8, p. 1166-1167, 2012. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.

OLIVEIRA, J. V. *et al.* Fumigation and repellency of essential oils against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in cowpea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 1, p. 10–17, 2017. DOI: 10.1590/S0100-204X2017000100002

PIMENTEL, F. A.; DE SÁ, C. P. Estudo da produtividade e da viabilidade econômica de populações nativas de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) sob manejo. **Capítulo em livro técnico (CPAF-AC)**, p. 221–226, 2001.

PITON, L. P. *et al.* Natural insecticide based-leaves extract of *Piper aduncum* (Piperaceae) in the control of stink bug brown soybean. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 11, p. 1915–1920, 2014. DOI: 10.1590/0103-8478cr20131277.

R CORE TEAM (2023). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RICE, P.; LONGDEN I.; BLEASBY, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 6, p. 276-277, 2000.

RUIZ-RUANO, F. J. *et al.* High throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016. DOI: 10.1038/srep28333.

SAMUEL, R.; MORAWETZ, W. Chromosomal evolution within Piperaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 166, p. 105–117, 1989).

SHUQIONG, Y. *et al.* Comparative Cyto-molecular Analysis of Repetitive DNA Provides Insights into the Differential Genome Structure and Evolution of Five Cucumis Species. **Horticultural Plant Journal**, v. 5, n. 5, p. 192-204, 2019. DOI: 10.1016/j.hpj.2019.07.002.

SILVA, M.H.L. **Tecnologia de cultivo e produção racional de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC)**. 1993. 87p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) –Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1993.

SILVA, A. C. P. R. da; DE OLIVEIRA, M. N. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre**. 2000. 13p. (Embrapa, Boletim de Pesquisa Número 23).

SIVIERO, A. *et al.* A contribuição de espécies do gênero de *Piper* para a agroecologia no Acre. *In*: DOS SANTOS, R. C.; SIVIERO, A. (ed.). **Agroecologia no Acre**. Acre, AC: IFAC, 2015.

SOARES, N. R. *et al.* Comparative cytogenetics of three economically important *Piper* L. species from the Brazilian Amazon. **Protoplasma**, 2022. DOI: 10.1007/s00709-021-01721-2.

SONNHAMMER, E.L.; DURBIN, R. A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis. **Gene**, v. 29, n. 167, p. 1-2, 1995. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00714-8. PMID: 8566757.

SUN, H.-Y. *et al.* Genome-wide Characterization of Long Terminal Repeat -retrotransposons in Apple Reveals the Differences in Heterogeneity and Copy Number between Ty1-copia and Ty3-gypsy Retrotransposons. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 9, p. 1130–1139, 2008. DOI:10.1111/j.1744-7909.2008.00717.x



SUWANPHAKDEE, C. *et al.* Taxonomic notes on the genus *Piper* (Piperaceae). **Nordic Journal of Botany**, Lund, v. 34, n. 5, p. 605–618, 2016. DOI: 10.1111/njb.01114.

THE CATALOGUE OF LIFE PARTNERSHIP. **APG IV: Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.15468/fzuaam>> Acesso em: on 10 de fevereiro de 2023.

WADT, L. H. de O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of “*Pimenta longa*” genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 74–82, 2004. DOI: 10.1590/s1415-47572004000100013.

WANG, D. *et al.* Which factors contribute most to genome size variation within angiosperms? **Ecology and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 2660-2668, 2021. DOI: 10.1002/ece3.7222.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil I: *Piper* - Group I, II, III, IV. **Hoehnea**, São Paulo, v.2, n. 19, p. 219-366, 1972.

ANEXO A – Análise individual da fração repetitiva de DNA nos genomas de *Piper aduncum* (Pa), *Piper hispidinervum* (Ph), *Piper aff. hispidinervum* (Paf) e *Piper nigrum* (Pn).

Ordem	Superfamília	Família	Clado	Pa	Ph	Paf	Pn	
Elementos transponíveis				Abundância (%)				
<b>Retrotransposons - Classe I</b>								
LTR	<i>Ty1_Copia</i>	<i>Ale</i>		0	0	0	0,22	
		<i>Ikeros</i>		0,78	0,67	0,79	1,47	
		<i>Ivana</i>		0,02	0,02	0,07	0,15	
		<i>SIRE</i>		0,41	0,41	0,48	0,01	
		<i>TAR</i>		0,07	0,07	0,08	0,01	
		<i>Tork</i>		0,78	0,62	0,70	1,80	
		Não classificado		0,68	0,72	0,18	0,06	
		<b>Total Ty1 Copia</b>		<b>2,74</b>	<b>2,51</b>	<b>2,30</b>	<b>3,72</b>	
	<i>Ty3_Gypsy</i>	<i>Chromovirus</i>	CRM		0,07	0,18	0,06	0,78
			Galadriel		0,05	0,08	0,08	0,45
			Reina		0,01	0	0	1,07
			Tekay		39,38	26,06	42,90	3,28
			Não classificado		0,70	0,82	0,13	0
		<i>Athila</i>		3,82	2,18	4,04	1,33	
		<i>Ogre</i>		1,22	0,84	1,09	0,50	
		Não classificado		0,70	6,12	0,38	2,06	
		<b>Total Ty3 Gypsy</b>		<b>45,95</b>	<b>36,28</b>	<b>48,68</b>	<b>9,47</b>	
	Não classificado				5,69	1,84	3,06	8,04
	<b>Total LTR</b>				<b>54,38</b>	<b>38,12</b>	<b>51,74</b>	<b>21,23</b>
	Pararetrovirus				0,34	0,25	0,30	0,17
<b>Total Retrotransposons</b>				<b>54,72</b>	<b>38,37</b>	<b>52,04</b>	<b>21,40</b>	
<b>Transposons - Classe II</b>								
TIR (Subclasse I)	<i>EnSpm_CACTA</i>			2,44	10,73	2,10	0	
	<i>hAT</i>			0,47	1,71	0,60	2,31	
	<i>Mutator</i>			0,04	0,01	0,07	1,21	
	<i>PIF_Harbinger</i>			0,02	0,04	0,03	0,04	
	<b>Total Transposons</b>			<b>2,97</b>	<b>12,49</b>	<b>2,80</b>	<b>3,56</b>	
DNA satélites				0,19	0,07	0,07	0,06	
DNAr 5S				0,02	0,07	0,09	0,03	
DNAr 35S				0,47	0,58	0,47	0,08	
Elementos repetitivos não classificados				0,92	8,82	2,89	3,12	
<b>Total Elementos Repetitivos</b>				<b>59,29</b>	<b>60,40</b>	<b>58,36</b>	<b>28,25</b>	

Fonte: Da autora (2023).

ANEXO B – Sequências dos monômeros de DNA satélites identificados nos genomas de *Piper aduncum* (Pad), *Piper hispidinervum* (Phs), *Piper aff. hispidinervum* (Paf) e *Piper nigrum* (Pni).

<b>PadSat1</b>
TGAAATCAAIATTTTTTTAATTGATTTAATTAATTTTTTCATAGCCATTA AAAAGCAAACCTGGAAATCTATAATTTGCTTGATCA ACCTGGTAAAATACATCATTTTTTTTATATTTAATTTAATTTTTTCATAACCATTA AAAAAGCTTAGAAATCTATGATTGCTTGATC AACCATCGAATAAACTAATGAAATATAGCATTTTTTTTTCATTGATTTTTAACTTTTTTCATGGCCATTA AAAAAGCTTATAAATCTATT ACTGTA AAAATCTTGATCGAATAAGCTAG
<b>PadSat2</b>
CTACTTAATTAATAACAACCTCCGACATTAGTTGATGCGGGTAAAAGTTTGCTTGAGCAACTCCTGCTTTGCTCAAATTCGTCTTGTTT TGCTTGAGAGTTTGAGTCAAGTATATTAGTATTAGAGCTGATCCTAAATTTAAACTGAGTTCAAGC
<b>PadSat3</b>
AAGACGTTAGTGATAGCAAATCCAACATCCTTCTCCCTCTCTTTGTTATACACTAGCATATCACCTTTATATTACAGTCTATCTCT TTTGAGTCAATATTTAATATGAAAAAACCCGATGAAAGTTAAAATAAGTTGACAAAAAACCGTTGACGACAACATTCATTATCACG ATAGAAGCTAATATCTTAGTCAAATCACTTTAAGTTTTCGTTAACTTTGTGCTAATTTCACTACGTTATTT
<b>PhsSat1</b>
GTTATCACGATCATCTACAATAAAACAATATGCTACTGATGTTTGGTTGGCAACATGGATCTGAAAGGAACTGACAAATCGATTC AATATTGCGTTATCCATTGATGGTAAAGGTACCCTTAGATGGTGCATCAATGGTTACATCTACTTTTATCAATGACATAGAAT TGTTCTTACAAATATTATGTTCCCTC
<b>PhsSat2</b>
TGACTATTATCAAGTGTAGGCAACCTCGTTTGTCATTCATCTATGTTGGCCACACGCGCAACATGAAAAAGTTAGAAAGGGGCA TTCACTATCTCATAGGTAATATGTGAAAGTGCATTGATGACATTTCTACACCTGCGTCGTGACACTGATGGCACATAGATTGTC ATCAATGTGACATCTATGTCACAACGTAACGGACAG
<b>PafSat1</b>
ATATTACGCATTCGTTAAGCTCCCTTTTCTCAAGGACTCAGCTGCATTGAATTGCTTTACTCGAGTTTAGCCGTTTCGCTTCGCT CACTTCCTTTAGCTCAGGAGATGGGCGAGCCTTACTCTTCTCGAAGCGGGACGGGGCTTGAACCTGGCCTTCGGAAAAAACA GCTAGCTCATGAACCTCGGAGGAAGTCCGGCCGGCCGGATAGAGAGTTTATCTCGCTCAATCGGCGCTGGCCTCGCTCATCT GCTGGCGGTGTTCTCAATCGGCGAAGCCTCACATCCATGATCAGTACAGTACCGTTCTCCCGACTAGGGGAGATCCGGTTGCCT CCTTAGCGCAGACCGGCGACCGGATAGAGGAGTTAAACCTTAGCTCCTCATTATCGGGTCCCGGACTCATTAAATCCTT AACCTGCGGTGCGCCTCACTCAATCGGCGTTGCGCTCGTCCAGGAGTGAAAAAGCCCTTGCTTCGCATACACTTTACCGGAA AGTGGGAGCTCATTAAAGCCTTAAGGTTCTCAAATTATCGTAGTATGACTGCAGAAAAACAAGCTTCCCTTCTTTCTTGTTTC TGCTTGAAGGAGCCGATGCTATTATAAGTAGACTAAGAGCAGGAAGACTCTCAAATTTCCCGAGCTAGTGAAGGGGATTGGTA AGTAGCCCTTACTTTACCGAGTTAAGGGTGAGGACTGAAAACATCGGTTGGAGTAGGGACTTTGGAACCACTGTATACGGGAG CCCCAAGCGGGCAACAAGGAAGTCCGCTTTTGCTGGAATGAAAATGCTGCTAATGCAACGATTCAATAAAGTAAAGTAAAG GCTCGAGTACAAGAAGGCTGTAGTTGACAGGCGAAGGATTTCTTACTCGACATATTGCGCTGTGCGGAGTGTCTGTATAGT AGCAGTCCCATGCCAATTGAAGCGACGCTGGCTCCATAGCATGAAGTTGATTCTGACAAGAAATCAATAGAAAAGCTTTC ATCGGAGGAGAAGCAGAGCGAGAGAAGGCCCTCGGGAGGGTGTGATTGCAATGCACAAGGTTCTCTCGCCAAACACCCCT CAATGGGCTGTTGGCTTCTTTCCCTTATAACTGCATCTTTCCCTTGCTTTATAGGGG
<b>PafSat2</b>
AATAGGGCTTAATTTGACTATTTTCATGTATGATTAGTTAATTTGATTAGTTTATTTTTATTAGTTTATTTTTATTAGTTAGATGTTT GAATAATCTTGTTAGGGTATTTGAATCACCTTAAATAGATATATTATGATAAAATAGGGTTCATCTTAAAGCATATATTATTA TTAATTTAATAACTTATTTCAAACATGAAGCCAAACAATGATAATAAAATAAATACTCAATTAATATAATAACTCTTCTTATATA AGCCTCCGTAGGGGAAGGACGTTGATTCTATAAAAATGGATACAAATGACCGATATGCTCTTATTAGATGATAAAGAACTAAT TAATTAACCATGCATCCTCATTTTGTGGTGTATTGCATTGGTTTTCCCTAATAGTTTATTGTGGTAAATTAGGGTTTATTTTA GTTTATTTAAAATGTA AACCTGTTTATAAAAATGGCGTATGTTGTTTAAATTTGATTAGGTATAGTTTGATTAATCTTAAAT ACGGTTTAAATGAATTTGTTTATAAATAGGTTATTTATGGTAAATAAATTA AAAAATGGCGTATATTA
<b>PniSat1</b>
AAAAACATCTCAAATGACAAATATAAATTATAACATAGTCATGACGTCGGTAAAAAGTTTTAATAATTATTAGTAAGCTTATGTTT GGTTGGTATAAAAAATATATAATTTTTTAGTTATAATTAATTTAAAGAATTGGTTATGATGTA AATATGAAATGTA AAAAATTTTTAC AAAATTTATTTTCTATTTTATTTGTTTTTATAAAAAATTTATGTGATGAAATTTGTTGAGGACCCTTGGTGA AACTCTTGATC TCACCATAAAAATATTTAAAAATACATAACTTTTTAACGAAAGAATAATGCTTTTTAAAATAAATCACCGTTTATAGGCTTAGGCTT CATAGATATTTTTCATTTCTCGTCTTAGCCAAATATAGCCTAAATTAATAAAGGACTTATAAGTATGGGAGGCTGCTGATATTC ATCTATACTTTTAGTCATTCATTAGTTCAATTTATATCACATGATTGCGATTTTCTTTAAGTTAAAACATATTTCTCAATTAATTAATGA CCTAAA
<b>PniSat2</b>
GGATAATCTAATTC AATTTAAAAATAACAACATGGTTGTTAATTAATGTA AAAAAGGAAAAATTTAGACAATTTAAATATGGATC TGGATAGATATAATTA CTTTATAAAAAAATTGTTATTCTATCATATCTAAATAATCATATCACTTAAATCCATGAAAAACAAGCGTGT AGAAAGAAAATCATAATATTTAATTTCTGAAAAATTA AATAATTTATAGATGTTTTTAATCTTTTATTATAGTTCTTATAGGGGCG TCTAATATTAATATTAGTTCTTAACATATTTAATTAGAATTA AAAAAGAATAAGAAATATCT

Fonte: Da autora (2023).

**CAPÍTULO 3**  
**ANÁLISE COMPARATIVA DO GENOMA CLOROPLASTIDIAL DE *Piper* L.**

## RESUMO

*Piper hispidinervum* C.DC, *Piper aduncum* L. e *Piper* aff. *hispidinervum* C.DC são espécies produtoras de óleo essencial rico em compostos de alta importância econômica, mas que apresentam taxonomia não bem definida por apresentarem similaridades morfológicas e citogenéticas. Visando auxiliar na definição do status taxonômico dessas espécies, objetivou-se comparar os genomas cloroplastidiais de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*. A partir de dados de sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq, os genomas dos cloroplastos foram montados no NOVOPlasty, anotados via GeSeq-CHLOROBOX e Geneious Prime e os mapas gráficos circulares foram visualizados no OrganellarGenomeDRAW. A análise filogenética foi realizada pelo MAFFT e a árvore filogenética foi construída pelo método de Máxima Verossimilhança (ML), utilizando 32 espécies de *Piper* e *Saururus chinensis* como grupo externo. O genoma do cloroplasto de *Piper* apresentou estrutura quadripartida, com valores próximos de 18.500 pb na pequena região de cópia única (SSC), 27.025 pb em cada região de repetições invertidas (IRa e IRb) e 88.700 pb na grande região de cópia única (LSC). *Piper aduncum* apresentou genoma cloroplastidial com tamanho de 161.719 pb, *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* apresentaram tamanhos de 161.287 e 161.257 pb, respectivamente. Os três genomas cloroplastidiais foram compostos por 88 genes codificadores de proteínas, 34 genes de RNAt e 7 genes de RNAr. Diferenças na composição gênica foram identificadas entre elas, sendo os genes *trnC-ACA*, *trnR-ACG*, *pbf*, *pafI* e *pafII* exclusivos de *P. aduncum* e *psbN* exclusivos de *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum*. Os genomas cloroplastidiais de *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* foram mais próximos entre si e mais distantes de *P. aduncum*, corroborando para a hipótese de *P. hispidinervum* ser uma espécie distinta de *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* ser um ecótipo de *P. hispidinervum*, adaptado a região Tarauacá/Envira no Acre.

**Palavras-chave:** *Piper hispidinervum*. *Piper aduncum*. *Piper* aff. *hispidinervum*. Montagem do genoma.

## ABSTRACT

*Piper hispidinervum* C.DC, *Piper aduncum* L. and *Piper* aff. *hispidinervum* C.DC are species that produce essential oils enriched in compounds of high economical value, but whose taxonomy is not well defined due to their morphological and cytogenetic similarities. Aiming to assist in the definition of taxonomic status of these species, the objective was to compare the chloroplast genomes of *P. hispidinervum*, *P. aduncum* and *P. aff. hispidinervum*. Using sequencing data obtained by Illumina platform, chloroplast genomes were assembled in NOVOPlasty, annotated via GeSeq-CHLOROBOX and Geneious Prime, and circular graphical maps were visualized in OrganellarGenomeDRAW. The phylogenetic analysis was performed by MAFFT, and the phylogenetic tree was constructed by the Maximum Likelihood (ML) method, using 32 species of *Piper* and *Saururus chinensis* as an outgroup. The *Piper* chloroplast genome showed a quadripartite structure, with values close to 18,500 bp in the small single copy region (SSC), 27,025 bp in each inverted repeat region (IRa and IRb) and 88,700 bp in the large single copy region (LSC). *Piper aduncum* had a chloroplast genome with a size of 161,719 bp, *P. hispidinervum* and *P. aff. hispidinervum* had sizes of 161,287 and 161,257 bp, respectively. The three chloroplast genomes were composed of 88 protein-coding genes, 34 tRNA genes and 7 rRNA genes. Differences in the genetic composition were identified between them, with the genes *trnC-ACA*, *trnR-ACG*, *pbj*, *pafI* and *pafII* exclusive to *P. aduncum* and *psbN* exclusive to *P. hispidinervum* and *P. aff. hispidinervum*. The chloroplast genomes of *P. hispidinervum* and *P. aff. hispidinervum* were closer to each other and more distant from *P. aduncum*, supporting the hypothesis that *P. hispidinervum* is a distinct species from *P. aduncum* and *P. aff. hispidinervum* being an ecotype of *P. hispidinervum*, adapted to the Tarauacá/Envira region in Acre.

**Keywords:** *Piper aduncum*. *Piper hispidinervum*. *Piper* aff. *hispidinervum*. Genome assembly.

## 1 INTRODUÇÃO

*Piper* é um dos maiores gêneros da família Piperaceae e o segundo das angiospermas, com mais de 2.000 espécies de grande importância socioeconômica mundial por serem utilizadas como especiarias, aromatizantes, alimentícias e medicinais (SALEHI *et al.*, 2019; SIMMONDS *et al.*, 2021). O gênero surgiu durante o Cretáceo, sendo diversificado ao longo do Cenozoico (LIM *et al.*, 2019; MARTÍNEZ *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2008) e está distribuído em três linhagens biogeográficas: Neotrópicos, Pacífico Sul e Trópicos Asiáticos (JARAMILLO *et al.*, 2008; JARAMILLO; MANOS, 2001).

As espécies compartilham características marcantes do gênero, com padrões morfoanatômicos semelhantes e tamanho diminuto das inflorescências, o que ocasiona dificuldades para a definição taxonômica de algumas espécies (CHANCHAL, THONGAM; HANDIQUE, 2014; SUWANPHAKDEE *et al.*, 2016), como ocorre em *Piper hispidinervum* C.DC, *Piper aduncum* L. e nos exemplares de *Piper* aff. *hispidinervum* C.DC.

*Piper hispidinervum* é uma espécie nativa da Amazônia ocidental, com ocorrência confirmada nas demais regiões brasileiras e se desenvolve em ambientes com incidência direta da luz solar. As plantas são aromáticas, com folhas oblongo-lanceoladas ou oblongo-elípticas e ásperas na face adaxial (NEGREIROS, MIQUELONI, 2015; SIVIERO *et al.*, 2015). As flores são unissexuais, com sistema reprodutivo do tipo alogamia (SILVA; OLIVEIRA, 2000b; WADT; KAGEYAMA, 2004). Apresenta o safrol como principal componente de seu óleo essencial, acima de 90%, usado como fixador de fragrâncias na produção de perfumes e como inseticida no controle de pragas de importância econômica (SILVA *et al.*, 2019).

*Piper aduncum* é uma espécie nativa da América Tropical, com ampla dispersão no território brasileiro, principalmente na Amazônia. As plantas são aromáticas, com folhas elípticas ou lanceoladas, e ambas as faces são ásperas ao tato (SIVIERO *et al.*, 2015). As flores são hermafroditas, com sistema reprodutivo do tipo autogamia (VALENTIN-SILVA; BATALHA; GUIMARÃES, 2018). O dilapiol é o principal constituinte de seu óleo essencial, acima de 80%, e possui atividade de biopesticida e sinérgico (FAZOLIN *et al.*, 2006).

Os exemplares de *Piper* aff. *hispidinervum* são nativos da região Tarauacá/Envira no Acre e apresenta morfologia semelhante a *P. hispidinervum*, o que ocasiona dificuldades na sua identificação e classificação. Devido seu óleo essencial possuir o sarisan (74,3%) como componente majoritário, esse táxon foi denominado de *Piper* aff. *hispidinervum* (BIZZO *et al.*, 2001). O sarisan também possui atividade de bioinseticida, sendo usado no controle de pragas da cultura do milho e feijão (FAZOLIN *et al.*, 2011).

Essas piperáceas se destacam como produtoras de óleos essenciais, contudo, possuem classificação taxonômica controversa em decorrência de similaridades morfo-citogenéticas (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004; NUNES, *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2022). Em *Piper hispidinervum* já foi considerada a hipótese de ser uma variedade (SILVA, 1993) ou espécie distinta de *P. aduncum* (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004), enquanto, para *P. aff. hispidinervum*, as hipóteses são de que seja um ecótipo de *P. hispidinervum* ou um híbrido entre *P. hispidinervum* x *P. aduncum* (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

Pesquisas citogenéticas entre *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* já foram realizadas e revelaram similaridades entre os caracteres avaliados, uma vez que todas elas apresentam um cariótipo com  $2n = 26$  cromossomos pequenos e metacêntricos, sem alterações cromossômicas estruturais. Os padrões de hibridação genômica também foram semelhantes em termos de proporção, tipo de sequência e distribuição de DNA repetitivo nos cromossomos, com sinais GISH+ localizados nas regiões centromérica e pericentroméricas, um sítio de DNAr 5S e DNAr 35S localizados no par cromossômico 7 e par cromossômico 4, respectivamente (NUNES *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2022).

Ambos os trabalhos não geraram informações suficientes que permitissem a separação entre elas, por isso, torna-se importante realizar outras pesquisas que apresentem análises de maior resolução a fim de auxiliar delimitação taxonômica dessas espécies. Dentre os dados informativos, o genoma cloroplastidial vem sendo utilizado como alternativa dos métodos clássicos que usam características morfológicas, uma vez que o genoma de cloroplasto não é afetado pelas condições ambientais e sofre menos recombinação gênica. Por ter herança materna, mantém a estrutura, tamanho e conteúdo gênico conservados (VRIES; ARCHIBALD, 2018; NICK, 2020).

Apesar de *Piper* ser composta por um elevado número de espécies, apenas 29 tiveram seus genomas de cloroplastos sequenciados. O primeiro genoma cloroplastidial do gênero publicado foi relatado em *Piper cenocladum* (referência NC\_008457.1, CAI *et al.*, 2006), seguido de *Piper kadsura* (NC\_027941.1, LEE *et al.*, 2015), *Piper laetispicum* (NC\_042254.1, WANG *et al.*, 2018), e mais recentemente os genomas do cloroplasto de *Piper sarmentosum* (MZ958833, GENG *et al.*, 2022) e *Piper nigrum* (MK883818, GAIKWARD *et al.*, 2023) foram montados.

Estudos comparativos e filogenéticos entre 22 espécies de *Piper* demonstraram que o genoma cloroplastidial, de modo geral, apresenta variação de tamanho entre 160 e 161 kbp, com estrutura quadripartida composta por uma grande região de cópia única (LSC) de 87.608



a 91.123 pb, uma pequena região de cópia única (SSC) de 18.149 a 19.234 pb e duas regiões de repetição invertida (IRa e IRb) de 54.127 a 54.973 pb (SIMMONDS *et al.*, 2021).

Na análise filogenética, esses autores também demonstraram que genes cloroplastidiais e ribossomais podem atuar como importantes marcadores na elucidação taxonômica de *Piper*, permitindo a construção de uma árvore filogenética bem suportada. Além disso, o genoma de cloroplastos fornece dados úteis em estudos comparativos e evolutivos, contribuindo em análises de difíceis relações de algumas espécies de *Piper* (SIMMONDS *et al.*, 2021).

Portanto, o objetivo do trabalho foi comparar os genomas cloroplastidiais de *Piper*, com ênfase em *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*, a fim de contribuir com a verificação das hipóteses de relações genômicas entre elas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Montagem do genoma cloroplastidial das espécies de *Piper*

Sementes dos acessos de *Piper hispidinervum* (H269903), *Piper aduncum* (A2000002) e *Piper aff. hispidinervum* (H1389602) foram cedidas pelo Banco Ativo de Germoplasma de *Piper* da Embrapa Acre para realização das análises. Folhas jovens de cada acesso foram utilizadas para extração de DNA genômico, conforme protocolo do kit de extração *DNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen® Inc., Venlo, Netherlands). Bibliotecas de DNA genômico foram preparadas seguindo as recomendações do kit *Nextera™ DNA Flex Library Prep* com fragmentos de sequências *paired-end* de 300 pb (pares de base). O sequenciamento genômico de baixa cobertura foi realizado na plataforma Illumina MiSeq em parceria com o Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, Belo Horizonte/MG.

A montagem dos genomas cloroplastidiais dos táxons de *Piper* foi realizada *de novo* no *software* NOVOPlasty (DIERCKXSENS; MARDULYN; SMITS, 2017) adotando os parâmetros padrão: tamanho do genoma no intervalo de 120.000-200.000 pb, K-mer de 33, comprimento de reads de 151, tamanho da inserção de 350 para plataforma Illumina e sequências do tipo *paired-end*. A sequência da subunidade maior da RuBisCO (ribulose-1,5-Bifosfato carboxilase/oxigenase) de *Piper longum* (NC\_047247.1, não publicado) foi utilizada como *seed* (sequência de referência). Essa espécie foi escolhida por ser uma espécie próxima e que possui seu genoma cloroplastidial sequenciado e depositado no NCBI.

Para *Piper nigrum*, foram usados dados de sequenciamento do genoma completo de cloroplasto disponíveis no NCBI (NC\_034692.1) pelos autores Zhang *et al.* (2017). A

montagem do genoma dessa espécie se deu da mesma forma que em *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* e essa espécie foi usada como referência no Geneious Prime para corroborar com a montagem *de novo*. Para isso, os contigs identificados no Novoplasty foram mapeados na sequência de referência com a ferramenta de Mapeamento, adotando os parâmetros recomendados pelo fornecedor do *software*.

Os genomas cloroplastidiais das quatro espécies foram anotados pela ferramenta GeSeq (TILLICH *et al.*, 2017) presente no *software* online CHLOROBOX, guiada pela anotação do plastoma de *P. logum*. As anotações também foram verificadas manualmente no Geneious Prime. Os genes de RNA transpostador (RNAt) foram anotados pela ferramenta ARAGORN (LASLETT; CANBACK, 2004), presente no GeSeq. Os mapas gráficos das estruturas circulares dos quatro genomas cloroplastidiais foram construídos no OGDRAW-OrganellarGenomeDRAW (GREINER; LEHWARK; BOCK, 2019).

## 2.2 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada com as sequências do genoma de cloroplasto de 32 espécies de *Piper* (29 previamente publicadas e três analisadas nesse trabalho) e de *Saururus chinensis* (Piperales, NC\_050853.1, JIN *et al.*, 2019), usada como grupo externo (TABELA 3.1). Essas sequências foram retiradas do NCBI, alinhadas com MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013) e a árvore filogenética foi construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), adotando valores de 1000 *bootstrap*.

Tabela 3.1 – Composição do genoma cloroplastidial de espécies de *Piper*. N: Neotrópicos, TA: Trópicos Asiáticos, PS: Pacífico Sul.

Espécie	Linhagem	Identificação	Localidade	Genoma (pb)	Tamanho LSC (pb)	Tamanho SSC (pb)	Tamanho IR (pb)	Total de genes	Autores
<i>Piper amalago</i>	N	MZ308624	México	160.885	87.987	18.149	54.749	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper austrosinense</i>	TA	OM717257.1	China	161.230	88.948	18.252	54.030	128	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper betle</i>	TA	OM717260.1	China	161.359	89.015	18.206	54.138	128	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper boehmeriifolium</i>	TA	OM717256.1	China	161.426	89.028	18.274	54.124	128	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper borbonense</i>	TA	MZ308636	Reunion	160.095	87.866	18.701	54.669	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper bonii</i>	TA	OM717259.1	China	161.349	88.967	18.246	54.136	128	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper caninum</i>	TA	MZ308639	Austrália	160.967	88.033	18.266	54.668	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper capense</i>	PS	MZ308627	Quênia	161.445	88.459	18.329	54.657	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper cenocladum</i>	N	NC_008457.1	-	160.624	87.668	18.878	54.078	113	Cai <i>et al.</i> (2006)
<i>Piper commutatum</i>	N	MZ308626	México	161.011	87.814	18.845	54.351	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper darienense</i>	N	MZ308625	Costa Rica	161.264	88.364	18.927	54.973	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper guahamense</i>	PS	MZ308629	-	160.657	88.037	18.267	54.353	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper hainanense</i>	TA	OM717262.1	China	161.291	88.915	18.212	54.164	128	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper hancei</i>	TA	MZ046380	China	161.476	89.144	18.216	54.116	113	Zhang, Hu & Liu (2021)
<i>Piper hederaceum</i>	TA	MZ308640	Austrália	161.338	88.306	19.168	53.864	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper insectifugum</i>	TA	MZ308634	New Caledonia	161.722	88.727	18.443	54.552	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper kadsura</i>	TA	NC_027941.1	-	161.486	89.099	18.233	54.154	131	Lee <i>et al.</i> (2015)
<i>Piper laetispicum</i>	TA	NC_042254.1	China	161.721	89.224	18.247	54.250	114	Wang <i>et al.</i> (2018)
<i>Piper mestonii</i>	TA	MZ308643	Austrália	160.910	87.993	18.240	54.677	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper mutabile</i>	TA	OM717258.1	China	161.385	88.937	18.272	54.176	128	Lee <i>et al.</i> (2015)
<i>Piper nigrum</i>	TA	NC_034692.1	-	161.522	89.153	18.255	54.114	131	Gaikward <i>et al.</i> (2023)
<i>Piper retrofractum</i>	TA	OM717261.1	China	161.346	88.927	18.275	54.144	127	Li <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper ponapense</i>	TA	MZ308635	Pohnpei	161.690	89.300	18.230	54.160	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper puberulum</i>	PS	MZ308630	Samoa (Savaai)	161.178	89.021	17.983	54.174	113	Simmonds <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper sarmentosum</i>	TA	MZ958833	China	161.389	88.979	18.274	54.136	130	Geng <i>et al.</i> (2022)
<i>Piper umbellatum</i>	N	OM717263.1	-	160.783	88.411	18.241	54.086	128	Li <i>et al.</i> (2022)

Fonte: Da autora (2023).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Estrutura e composição dos genomas cloroplastidiais

O NOVOPlasty identificou três contigs para *Piper nigrum*, quatro para *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* e cinco para *Piper* aff. *hispidinervum*. Os genomas cloroplastidiais foram montados em sequências únicas circulares, com tamanho em torno de 161 kpb e apresentaram estrutura quadripartida, com valores semelhantes entre si em cada região entre os três genomas (TABELA 3.2).

Tabela 3.2 – Composição do genoma cloroplastidial de *Piper aduncum* (Pa), *Piper hispidinervum* (Ph) e *Piper* aff. *hispidinervum* (Paf).

Genoma cloroplastidial	Pa	Ph	Paf
Tamanho do genoma (pb)	161.719	161.287	161.257
Tamanho da LSC (pb)	88.728	88.692	88.696
Tamanho da SSC (pb)	18.897	18.545	18.515
Tamanho da IRa (pb)	27.047	27.025	27.023
Tamanho da IRb (pb)	27.047	27.025	27.023
Número total de genes	129	129	129
Número de genes duplicados	15	21	21
Número de genes CDS	88	88	88
Número de genes RNAr	7	7	7
Número de genes RNAt	34	34	34

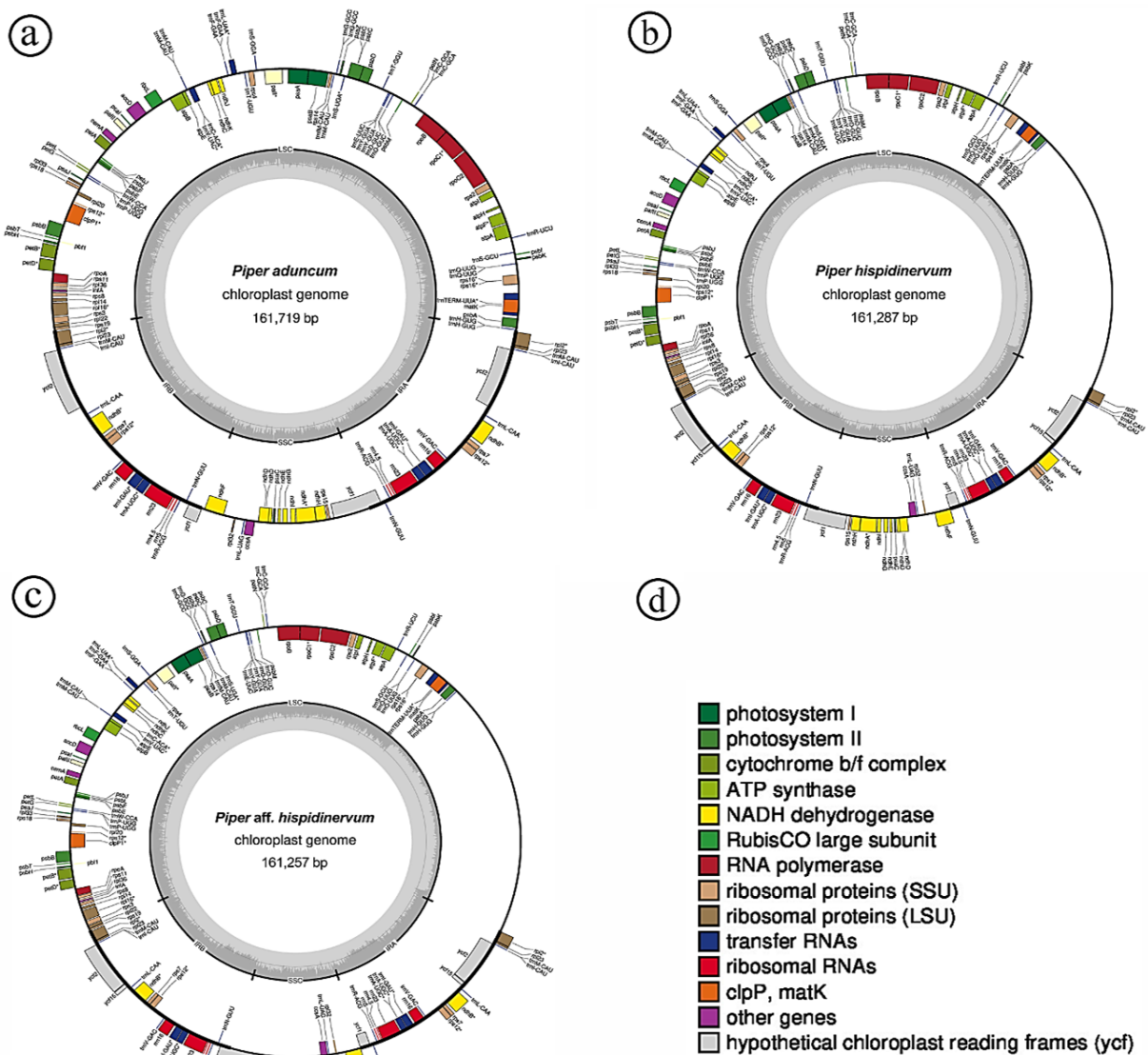
Fonte: Da autora (2023).

Observou-se que a composição do genoma cloroplastidial de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum*, de modo geral, foi semelhante às demais espécies de *Piper* já relatadas, demonstrando que o genoma cloroplastidial é conservado no gênero, independente da linhagem biogeográfica. A principal diferença encontrada ocorreu no número total de genes, em que as espécies avaliadas nesse trabalho apresentaram um número maior de genes em relação às demais, com exceção de *Piper sarmentosum* que possui 130 genes (TABELA 3.1).

Os genes *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* foram anotados para o fotossistema I, fotossistema II, complexo do citocromo b/f, ATP sintetase, NADH

desidrogenase, Rubisco, RNA polimerase, proteínas ribossômiais, RNA transportador, RNA ribossômico, genes *clpP* e *matK* e pseudogenes (FIGURAS 3.1a ao d).

Figura 3.1 – Mapas circulares do genoma de cloroplasto de *Piper aduncum* (a), *Piper hispidinervum* (b), *Piper* aff. *hispidinervum* (c) e Legenda (d). Genes internos ao mapa são transcritos em sentido horário e genes externos são transcritos em sentido anti-horário.



Fonte: Da autora (2023).

Considerando a classificação individual dos genes em grupos gênicos funcionais, observou-se similaridade entre os genomas cloroplastidiais de *Piper*, indicando conservação desses genomas, sobretudo, entre *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum*. Os genomas desses táxons foram constituídos pelos mesmos conteúdos gênicos, não havendo diferenças entre eles.

Contudo, pequenas diferenças entre alguns genes também foram observadas, sendo os genes *trnC-ACA*, *trnR-ACG*, *pbf*, *pafI* e *pafII* exclusivos de *P. aduncum* e *psbN* exclusivos de *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* (TABELA 3.3).

Tabela 3.3 – Conteúdo gênico do genoma cloroplastidial de *Piper aduncum* (Pa), *Piper hispidinervum* (Ph) e *Piper aff. hispidinervum* (Paf). \*Exclusivo de Pad. \*\*Exclusivo de Phi e Paf. +Genes duplicados. Genes sem asterisco indicam que são comum entre as espécies.

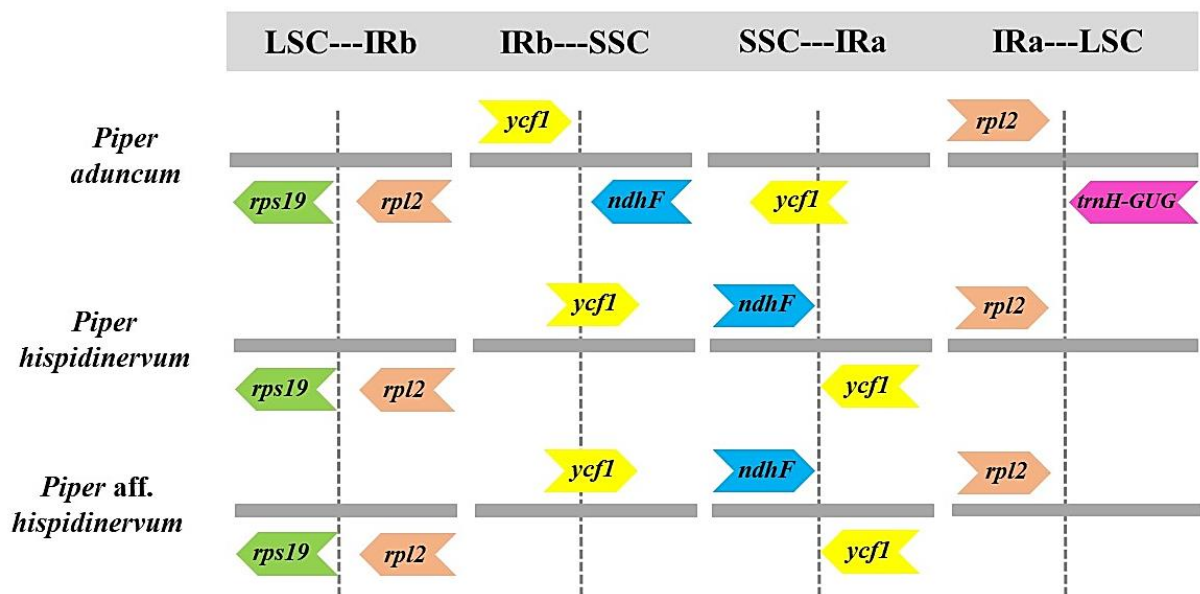
Categorias	Grupo gênico	Genes
Fotossíntese	Fotossistema I	<i>psaA, psaB, psaC, psal, psaj</i>
	Fotossistema II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN**, psbT, psbZ</i>
	Complexo citocromo b/f ATP-Sintetase	<i>petA, petB, petD, petG, petL e petN</i> <i>atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpII</i>
	NADH desidrogenase	<i>ndhA, ndhB<sup>+</sup>, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ ndhK</i>
	Rubisco	<i>rbcl</i>
Sínteses de proteínas e replicação de DNA	Subunidade RNA polimerase	<i>rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2</i>
	Subunidade maior do ribossomo	<i>rpl2<sup>+</sup>, rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23<sup>+</sup>, rpl32, rpl3, rpl36</i>
	Subunidade menor do ribossomo	<i>rps2, rps3, rps4, rps7<sup>+</sup>, rps8, rps11, rps12<sup>+</sup>, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19</i>
	RNA ribossômico (16S, 23S, 4.5S, 5S)	<i>rrn16<sup>+</sup>, rrn23<sup>+</sup>, rrn4.5<sup>+</sup>, rrn5<sup>+</sup></i>
	Acetil-CoA	<i>accD</i>
	Fator de iniciação da tradução	<i>infA</i>
	Citocromo C proteína heme de ligação	<i>ccsA</i>
Diversos	RNA transportador	<i>trnA-UGC<sup>+</sup>, trnC-ACA*, trnC-GCA, trnE-UUC, trnF-GAA, trnFM-CAU, trnG-GCC, trnH-GUG, trnI-CAU<sup>+</sup>, trnI-GAU<sup>+</sup>, trnK-UUU, trnL-CAA<sup>+</sup>, trnL-UAA, trnL-UAG, trnM-CAU<sup>+</sup>, trnN-GUU<sup>+</sup>, trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG*<sup>+</sup>, trnR-UCU, trnS-GCU, trnS-GGA, trnS-UGA, trnL-UAA, trnT-GGU, trnV-GAC<sup>+</sup>, trnV-UAC, trnW-CCA, trnY-GUA, trnD-GUC</i>
	Maturase	<i>matK</i>
	Protease	<i>clpP</i>
	Proteína de membrana envoltória	<i>cemA</i>
Outros genes	Fator de transcrição de proteína de armazenamento	<i>pbfI*</i>
	Montagem de fotossistema	<i>pafI, pafII*</i>
	Pseudogenes	<i>ycf1<sup>+</sup>, ycf2<sup>+</sup>, ycf3, ycf4, ycf15<sup>+</sup></i>

Fonte: Da autora (2023).

### 3.2 Limite entre as regiões gênicas

Considerando os limites entre as regiões LSC, SSC, IRa e IRb, identificou-se que a junção LSC e IRb foi semelhante entre os três genomas cloroplastidiais e as demais regiões apresentaram algumas diferenças (FIGURA 3.2). O gene *ndhF* (NADH desidrogenase) está presente na junção IRb e SSC em *P. aduncum*, enquanto em *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* está presente nas junções SSC e IRa. Apenas em *P. aduncum* foi identificado o gene *trnH-GUG* (RNAt) na junção IRa e LSC, enquanto para os demais táxons não foi identificado nenhum gene (FIGURA 3.2).

Figura 3.2 – Comparação entre os limites das regiões LSC (cópia única longa), SSC (cópia única curta) e IR (regiões invertidas a e b) no genoma de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum*, *Piper aff. hispidinervum*. As linhas pontilhadas verticais representam a junção entre duas regiões. Genes acima das linhas são transcritos em sentido horário e abaixo das linhas em sentido anti-horário.



Fonte: Da autora (2023).

O gene *rpl2* e pseudogene *ycf1* foram identificados em maior frequência e estiveram presentes na região IR. O último também apresentou uma extremidade localizada na região LSC e a outra extremidade na região IR (gene sobre a linha pontilhada), nos dois sentidos da transcrição nos táxons de *Piper* (FIGURA 3.2). No geral, algumas mudanças foram observadas na ordem gênica das espécies, havendo maiores similaridades entre as regiões limítrofes entre *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum*.

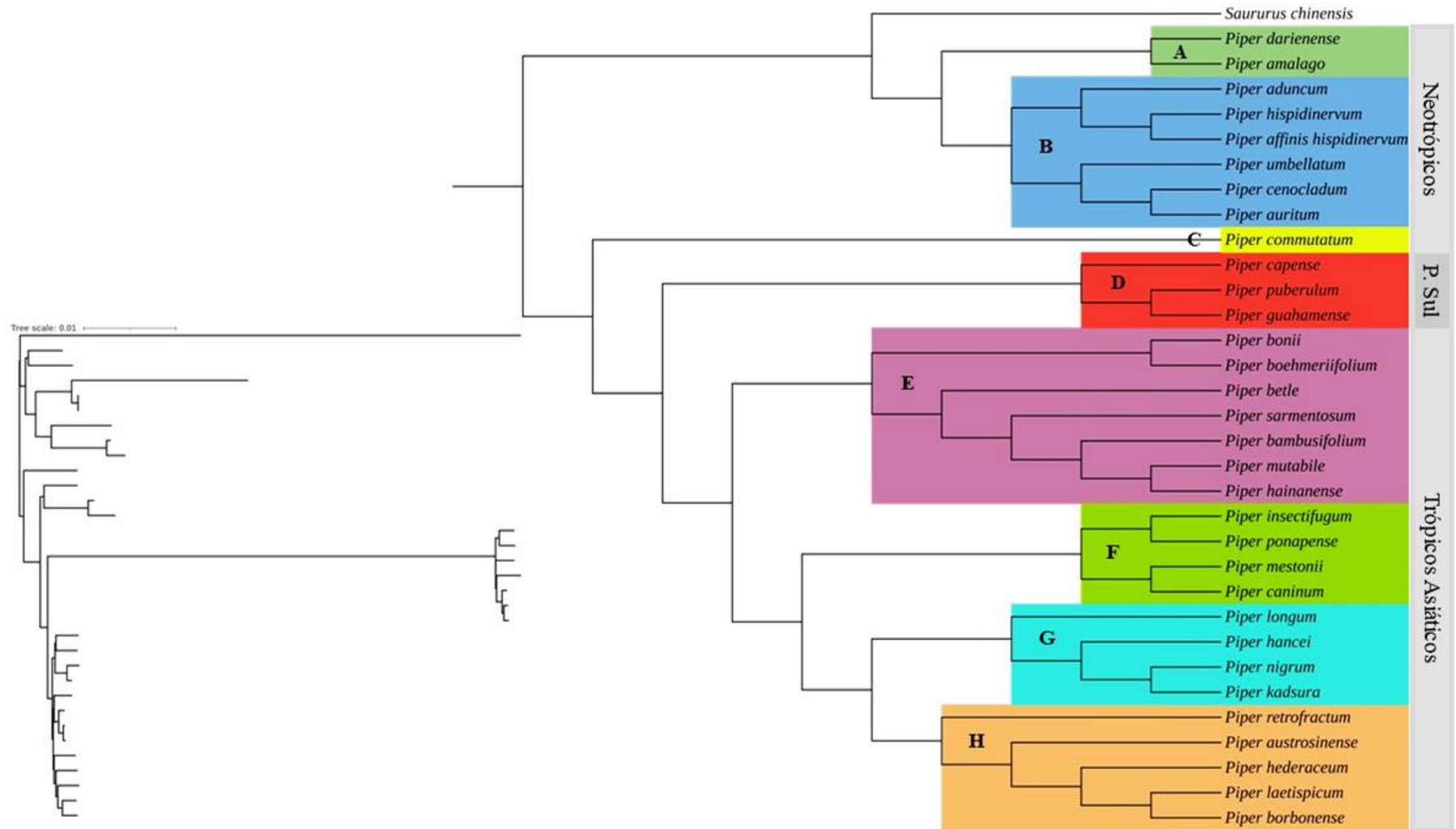
### 3.3 Análise filogenética

A análise de máxima verossimilhança resultou na construção de uma árvore filogenética com ramos bem suportados (FIGURA 3.3). Os genomas cloroplastidiais das espécies de *Piper* se diferenciaram ao longo da evolução formando oito clados. O clado A agrupou as espécies neotropicais da América Central, o clado B outras espécies neotropicais e as de interesse nesse trabalho (*Piper hispidinervum*, *Piper aduncum* e *Piper* aff. *hispidinervum*), o clado C foi formado apenas pela espécie mexicana *Piper commutatum*, o clado D agrupou as três espécies do Pacífico Sul, o clado E agrupou as espécies chinesas *Piper bonii* e *Piper boehmeriifolium* e mais cinco espécies dos Trópicos Asiáticos, e os clados F, G e H agruparam as demais espécies dos Trópicos Asiáticos (FIGURA 3.3).

*P. hispidinervum* formou um táxon irmão de *P. aff. hispidinervum* e essas duas foram irmãs de *P. aduncum*. Essas espécies são as únicas brasileiras que tiveram os genomas cloroplastidiais montados e foram agrupadas no mesmo grupo que incluiu *Piper umbellatum*, *Piper cenocladum* e *Piper auritum*, todas dos Neotrópicos. Esse clado B foi mais próximo ao clado A e mais distante ao clado H (FIGURA 3.3).



Figura 3.3 – Árvore filogenética de 32 genomas de cloroplastos de *Piper* e uma espécie de grupo externo.



Fonte: Da autora (2023).

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 *Piper hispidinervum* como uma espécie distinta de *Piper aduncum*

Neste estudo, os genomas cloroplastidiais sugerem que *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* são espécies distintas, pois diferenças foram encontradas nas análises de genômica comparativa. A composição dos genomas cloroplastidiais identificou diferenças entre ambas as espécies, pois genes exclusivos foram identificados em cada genoma e outras diferenças também foram observadas na constituição e ordem dos genes presentes nas junções das regiões cloroplastidiais, demonstrando dissimilaridades entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum*.

Essas diferenças demonstram que o genoma cloroplastidial de *P. aduncum* é mais divergente em relação à *P. hispidinervum* e as diferenças gênicas entre elas podem ser explicadas pela evolução do genoma de cloroplasto ao longo da especiação, havendo perdas e ganhos de alguns genes no plastoma de *Piper* (WANG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2022; GAIKWAD *et al.*, 2023).

Com relação às relações filogenéticas, a filogenômica de *Piper* revelou a reconstrução de uma árvore formada por clados bem suportados, agrupada nas três principais linhagens biogeográficas: Neotrópicos, Pacífico Sul, Trópicos Asiáticos (JARAMILLO *et al.*, 2008; JARAMILLO; MANOS, 2001). Quanto às espécies de interesse, as três pertencem ao mesmo clado, suportando a proximidade filogenética entre elas, sobretudo, entre *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum* e maior distanciamento para com *P. aduncum*.

Wadt, Ehringhaus e Kageyama (2004) sugerem que *P. hispidinervum* e *P. aduncum* são espécies distintas, pois o grau de polimorfismo e o número de marcadores RAPD amplificados foram diferentes entre elas em avaliações de diversidade genética do BAG da Embrapa Acre. Além disso, o componente majoritário encontrado no óleo essencial e o sistema reprodutivo são outros caracteres capazes de distinguir essas duas espécies. *Piper hispidinervum* apresenta teor de safrol superior a 80% e um sistema reprodutivo do tipo alogamia (SILVA; OLIVEIRA, 2000b; WADT; KAGEYAMA, 2004), enquanto o óleo essencial de *P. aduncum* é rico em dilapiol e a espécie possui um sistema reprodutivo do tipo autogamia (FIGUEIREDO, 1997; VALENTIN-SILVA; BATALHA; GUIMARÃES, 2018).

Considerando os dados mencionados e as variações da composição do genoma cloroplastidial entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum* avaliadas nesse trabalho, as diferenças encontradas dão suporte à hipótese de *P. hispidinervum* ser uma espécie distinta de *P. aduncum*.

#### 4.2 *Piper* aff. *hispidinervum* como ecótipo de *Piper hispidinervum*

Os genomas cloroplastidiais sugerem que *Piper hispidinervum* e *Piper* aff. *hispidinervum* são a mesma espécie, pois não foram encontradas diferenças na composição e ordem gênica de seus genomas cloroplastidiais, demonstrando similaridades entre elas nas análises comparativas.

A diversidade genética do BAG da Embrapa Acre também revelou semelhanças entre os marcadores RAPD nos genótipos de *P. hispidinervum* e *P. aff. hispidinervum*, sugerindo que os indivíduos coletados em Tarauacá pertencem à espécie *P. hispidinervum* e devem ser um ecótipo adaptado às regiões dos rios Tarauacá e Envira com características fitoquímicas diferentes, pois *P. hispidinervum* apresenta alto teor de safrol e *P. aff. hispidinervum* alto teor de sarisan (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

A plasticidade fenotípica de *P. aff. hispidinervum* (características mesofíticas), localização geográfica restrita (região oeste do Acre) e composição do óleo essencial (rico em sarisan) corroboram para rejeitar a hipótese de *P. aff. hispidinervum* ser um híbrido entre de *P. hispidinervum* e *P. aduncum*. Se *P. aff. hispidinervum* fosse um híbrido, essa espécie deveria estar localizada nas mesmas regiões de seus genitores (região leste), e não restrita somente na região Tarauacá/Envira (região oeste), e ter as mesmas características xeromórficas de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* decorrentes da localização geográfica. Além disso, nenhum marcador molecular foi exclusivo de *P. aduncum* ou *P. aff. hispidinervum*, sugerindo haver pouco fluxo gênico entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum* (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

Por outro lado, as características mesofíticas de *P. aff. hispidinervum* adaptadas à um ambiente específico, a localização restrita e as similaridades dos genomas cloroplastidiais com *P. hispidinervum* corroboram para a hipótese de *P. aff. hispidinervum* ser um ecótipo de *P. hispidinervum*, adaptado a região do Vale do Tarauacá/Envira.

## 5 CONCLUSÃO

A genômica comparativa revela proximidades entre *Piper hispidinervum* e *Piper* aff. *hispidinervum* e maior distância com *Piper aduncum*. Essas relações genômicas corroboram com as hipóteses de *P. hispidinervum* ser uma espécie distinta de *P. aduncum* e *P. aff. hispidinervum* ser um ecótipo de *P. hispidinervum*.

## REFERÊNCIAS

- BIZZO, H. R. *et al.* Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC (long pepper). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 2, p. 113–115, 2001. DOI: 10.1002/ffj.957.
- CAI, Z. *et al.* Complete plastid genome sequences of Drimys, Liriodendron, and *Piper*: Implications for the phylogenetic relationships of magnoliids. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, n. 77, 2006. DOI:10.1186/1471-2148-6-77
- CHANCHAL, C.; THONGAM, B.; HANDIQUE, P.J. Diversidade morfológica e caracterização de algumas das espécies selvagens de *Piper* do Nordeste da Índia. **Recursos Genéticos e Evolução das Culturas**, v. 62, n. 2, p. 303-313, 2014. DOI:10.1007/s10722-014-0172-8
- DIERCKXSENS, N.; MARDULYN, P.; SMITS, G. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 45(4), 2017. DOI: 10.1093/nar/gkw955.
- FAZOLIN, M. *et al.* **Potencialidades da Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): Características gerais e resultados de pesquisa.** 2006. 53p. (Embrapa Acre, Documentos 103).
- FAZOLIN, M. *et al.* Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper affinis hispidinervum* para insetos pragas das culturas do milho e feijão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS, 5., 2011, Jaguariúna. **Anais [...]**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011.
- FIGUEIREDO, R.A. **Fenologia e ecologia da polinização de espécies de Piperaceae em mata semidecídua do sudeste brasileiro.** 1997. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- GAIKWAD, A.B. FAZOLIN, M. *et al.* The chloroplast genome of black pepper (*Piper nigrum* L.) and its comparative analysis with related *Piper* species. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, n. 1095781, 2023. DOI: 10.3389/fpls.2022.1095781
- GREINER, S.; LEHWARK, P. BOCK, R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p. W59-W64, 2019.
- GROUP, T. A. P. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: Apg IV. **Bot. J. Linn. Soc.** 181, 1–20, 2016. DOI:10.1111/boj.12385
- GENEIOUS PRIME 2023.1.1. Disponível em: <https://www.geneious.com>
- GENG, X. *et al.* The complete chloroplast genome of *Piper sarmentosum* roxburg 1820 (Piperaceae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 7, n. 5, p. 854–855, 2022. DOI: 10.1080/23802359.2022.2074805

- HUANG, B. *et al.* Analyses of 202 plastid genomes elucidate the phylogeny of *Solanum* section Petota. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4454, 2019. DOI:10.1038/s41598-019-40790-5
- JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, v. 88, p. 706-716, 2001.
- JARAMILLO, M. A. *et al.* A Phylogeny of the Tropical Genus *Piper* Using ITS and the Chloroplast Intron *psbJ-petA*. **Systematic Botany**, Washington, v. 33, n. 4, p. 647-660, 2008. DOI: 10.1600/036364408786500244.
- JIN, L. *et al.* Characterization of the complete plastome of medicinal plant *Saururus chinensis* (Saururaceae). **Mitochondrial DNA B Resources**, v. 25, n. 4, e. 2, p. 3206-3207, 2019. DOI: 10.1080/23802359.2019.1667909.
- KAZUTAKA, K.; DARON, M.; STANDLEY. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013. DOI: 10.1093/molbev/mst010
- LASLETT, D.; CANBACK, B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. 11-16, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh152
- LEE, J.H. *et al.* The complete plastid genome of *Piper kadsura* (Piperaceae), an East Asian woody vine. **Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal**, v. 27, n. 5, p. 3555-3556, 2015. DOI: 10.3109/19401736.2015.1074216
- LI, J. *et al.* Comparative analysis of the chloroplast genomes of eight *Piper* species and insights into the utilization of structural variation in phylogenetic analysis. **Frontiers in Genetics**, v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fgene.2022.925252
- LIM, J. Y. *et al.* Multiple colonizations of the Pacific by *Peperomia* (Piperaceae): Complex patterns of long-distance dispersal and parallel radiations on the Hawaiian Islands. **Journal of Biogeography**, v. 6, n. 130, 2019. DOI: 10.1111/jbi.13717.
- MARTÍNEZ, C. *et al.* A Late Cretaceous *Piper* (Piperaceae) from Colombia and diversification patterns for the genus. **American Journal of Botany**, v. 102, p. 273-289, 2015.
- NEGREIROS, J.R.; MIQUELONI, D.P. Morphological and phytochemical characterization of *Piper hispidinervum* C.DC. and *Piper aduncum* L. populations in the state of Acre. *Revista Ceres, Viçosa*, v. 62, n.1, p. 078-086, 2015. DOI: 10.1590/0034-737X201562010010.
- NICK, P. Tracking footprints of plastid evolution. **Protoplasma**, v. 257, n. 4, p. 1019–1020, 2020. DOI:10.1007/s00709-020-01526-9
- NUNES, J. D. *et al.* Cytogenetics of *Piper hispidinervum* and *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 1049-1052, 2007. DOI: 10.1590/s0100-204x2007000700019.

SALEHI, B. *et al.* *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019. DOI: 10.3390/molecules24071364.

SILVA, M.H.L. **Tecnologia de cultivo e produção racional de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC)**. 1993. 87p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) –Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1993.

SILVA, A. C. P. R. da; OLIVEIRA, M. N. de. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre**. 2000a. 13p. (Embrapa Acre, Boletim de Pesquisa Número 23).

SILVA, A.C.P.R.da; OLIVEIRA, M.N.de. **Produção e dispersão de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervum*)**. 2000b. 14p. (Embrapa Acre, Boletim de Pesquisa Número 24).

SILVA, L.S. *et al.* Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* Essential Oils in Gelatin Nanoparticles: A Possible Sustainable Control Tool of *A. aegypti*, *T. urticae* and *C. lataniae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, p.685-695, 2019. DOI: 10.1002/jsfa.9233.

SIVIERO, A. *et al.* A contribuição de espécies do gênero de *Piper* para a agroecologia no Acre. *In*: DOS SANTOS, R. C.; SIVIERO, A. (Ed.). **Agroecologia no Acre**. Acre, AC: IFAC, 2015.

SIMMONDS, S. E. *et al.* Phylogenetics and comparative plastome genomics of two of the largest genera of angiosperms, *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 163, n. 107229, 2021. DOI: 10.1016/j.ympev.2021.107229

SMITH, J. F. *et al.* Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 275, n. 9, 2008. DOI: 10.1007/s00606-008-0056-5.

SOARES, N. R. *et al.* Comparative cytogenetics of three economically important *Piper* L. species from the Brazilian Amazon. **Protoplasma**, 2022. DOI: 10.1007/s00709-021-01721-2.

SUWANPHAKDEE, C. *et al.* Taxonomic notes on the genus *Piper* (Piperaceae). **Nordic Journal of Botany**, Lund, v. 34, n. 5, p. 605–618, 2016. DOI: 10.1111/njb.01114.

TILLICH, M. *et al.* GeSeq - Versatile and accurate annotation of organelle genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. W6-W11, 2017. DOI:10.1093/nar/gkx391.

VALENTIN-SILVA, A.; BATALHA, M.A; GUIMARÃES, E. Neotropical *Piper* species: Are they all hermaphroditic? **Flora**, v. 244-245, p. 8–14, 2018. DOI:10.1016/j.flora.2018.05.002

VRIES, J. DE.; ARCHIBALD, J. M. Plastid genomes. **Current Biology**, v. 28, n. 8, p. R336–R337, 2018. DOI:10.1016/j.cub.2018.01.027

WADT, L. H. de O. **Estrutura genética de populações naturais de Pimenta longa (*Piper hispidineroum* C.DC.) visando seu uso e conservação.** 2001. 95 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

WADT, L. H. de O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of “Pimenta longa” genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 74–82, 2004. DOI: 10.1590/s1415-47572004000100013.

WADT, L. H. de O.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética e sistema de acasalamento de *Piper hispidinervum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 2, p. 151-157, 2004.

WANG, M. T. *et al.* Complete plastome sequence of *Piper laetispicum* (Piperaceae): An endemic plant species in south China. **Mitochondrial DNA Part B**. v. 3, n. 2, p. 1035-1036, 2018. DOI: 10.1080/23802359.2018.1511850

WEATHER SPARK (Brasil). **Condições Meteorológicas Médias do Acre.** Elaborado por Cedar Lake Ventures, Inc. Disponível em: < <https://pt.weatherspark.com/>>. Acesso em: 29 maio de 2023.

ZHANG, L.; HU, X.; LIU, M. Complete chloroplast genome sequences of the medicinal plant *Piper hancei*. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 6, n. 9, p. 2775-2776, 2021. DOI: 10.1080/23802359.2021.1967217