

Robberson Bernal Setubal

Contribuições ao conhecimento taxonômico e
filogenético das espécies americanas de
Strychnos L. (Loganiaceae)

Contributions to the taxonomic and phylogenetic
knowledge of the American species of *Strychnos* L.
(Loganiaceae)

São Paulo

2024

Versão corrigida

Robberson Bernal Setubal

Contribuições ao conhecimento taxonômico e
filogenético das espécies americanas de
Strychnos L. (Loganiaceae)

Contributions to the taxonomic and phylogenetic
knowledge of the American species of *Strychnos* L.
(Loganiaceae)

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências Biológicas, na
Área de Botânica.

Orientador(a): Rafaela Campostrini
Forzza

São Paulo

2024

Versão corrigida

Resumo

Strychnos (Loganiaceae: Gentianales) é um gênero de plantas lenhosas predominantemente lianescente, menos frequentemente na forma de árvores ou arbustos. Possui ca. 200 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais do globo, eventualmente com algumas espécies em regiões subtropicais. Sua importância econômica se deve principalmente ao metabolismo secundário de alcaloides tóxicos utilizados para a caça, pesca, controle de roedores e outras pragas. Dentre essas moléculas, destaca-se a estricnina, um alcaloide terciário de ação convulsiva e letal, extraído das sementes de *S. nux-vomica*, uma espécie de árvore que ocorre no sudeste da Ásia. Entre as espécies americanas e africanas, o princípio ativo mais conhecido são os alcaloides quaternários de ação relaxante-muscular paralisante extraídos de cascas de troncos e raízes de algumas espécies de *Strychnos* e utilizados como ingredientes primários ou secundários do veneno curare, usado em flechas e dardos por populações tradicionais. Parte dessas moléculas também possui propriedades farmacológicas de uso terapêutico, enquanto algumas espécies são utilizadas na alimentação humana, dentre outras inúmeras aplicações etnobotânicas. Muitos pesquisadores nomearam e descreveram centenas de espécies de *Strychnos* desde a descrição do gênero por Linnaeus. No século XX, destacam-se os trabalhos do botânico russo Boris A. Krukoff (1898-1893), o holandês Anthonius J. M. Leeuwenberg (1930-2010) e o escocês Norman G. Bisset (1925-1993), especialistas na taxonomia de espécies americanas, africanas e asiáticas de *Strychnos*, respectivamente. Após a morte desses pesquisadores, foram publicados apenas levantamentos florísticos com enfoque regional sobre *Strychnos*, carecendo a realização de novos estudos sistemáticos e análises filogenéticas. Além disso, muitos dos táxons já publicados em *Strychnos* ainda continuam com sua posição e status taxonômicos incertos. Dessa forma, o presente trabalho busca preencher parte dessa lacuna, trazendo resultados sobre: a filogenia de *Strychnos* em nível global com base em caracteres moleculares de 103 espécies e que suporta o gênero como monofilético; a revisão taxonômica e nomenclatural de um grupo infragênico americano e monofilético (*Strychnos* sect. *Breviflorae* subsect. *Eriospermae*); e o esclarecimento nomenclatural de *S. bredemeyeri* e do gênero *Lasiostoma* (um dos sinônimos de *Strychnos*). Esperamos com esses resultados motivar uma nova geração de pesquisadores para a realização de estudos morfológicos, anatômicos, biogeográficos, evolutivos, dentre outros aspectos chave sobre o gênero.

Palavras-chave: classificação, Gentianales, morfologia, nomenclatura, sistemática

Abstract

Strychnos (Loganiaceae: Gentianales) is a genus of woody plants predominantly lianescent, less frequently in the form of trees or shrubs. It has ca. 200 species distributed in all tropical regions of the globe, sometimes with some species occurring in subtropical regions. Its economic importance is mainly due to the secondary metabolism of toxic alkaloids used for hunting, fishing, and control of rodents and other pests. Among these molecules, the best-known is the strychnine, a tertiary alkaloid with convulsive and lethal action, extracted from the seeds of *S. nux-vomica*, an arboreal species that occurs in Southeast Asia. Among American and African species, the best-known active principle are the quaternary alkaloids with a paralyzing muscle-relaxing action, extracted from the bark of trunks and roots of some species of *Strychnos* and used as primary or secondary ingredients in the dart poison curare. Some of these molecules also have pharmacological properties for therapeutic use, while some species are used as human food, among countless other ethnobotanical applications. Many researchers have named and described hundreds of species of *Strychnos* since the genus was described by Linnaeus. In the 20th century, stands out the works of the Russian botanist Boris A. Krukoff (1898-1893), the Dutch Anthonius J. M. Leeuwenberg (1930-2010), and the Scottish Norman G. Bisset (1925–1993) specialists in the taxonomy of species of *Strychnos* from America, Africa, and Asia, respectively. After the decease of these researchers, only floristic surveys with a regional focus on *Strychnos* were published, requiring new systematic studies and phylogenetic analyzes. Furthermore, many of the taxa already published in *Strychnos* still have uncertain status and taxonomic position. Thus, our work seeks to fill part of this gap, bringing results about: the phylogeny of *Strychnos* at a global level based on molecular characters of 103 species that supports the genus as monophyletic; the taxonomic and nomenclatural revision of an American infrageneric and monophyletic group (*Strychnos* sect. *Breviflorae* subsect. *Eriospermae*); and clarification of the nomenclatural status of *S. bredemeyeri* and the genus *Lasiostoma* (one of the synonyms of *Strychnos*). We hope that these results will motivate a new generation of researchers to carry out morphological, anatomical, biogeographical, and evolutionary studies, among other key aspects of the genus.

Keywords: classification, Gentianales, morphology, nomenclature, systematics

Introdução Geral

Strychnos L. é um gênero de lianas, árvores, ou arbustos, com ca. 200 espécies e distribuição pantropical (Setubal et al., 2021). Está posicionado em Loganiaceae (Gentianales), uma família com 16 gêneros e ca. 460 spp., dentre os quais *Strychnos* é o maior (Struwe et al., 2018). Atualmente, o gênero possui ca. 75 espécies na África e Madagascar, 46 espécies na Ásia, quatro espécies na Austrália e 85 espécies na América, onde possui centro de diversidade na bacia Amazônica (Leeuwenberg, 1969; Krukoff, 1972; Bisset et al., 1973; Conn, 1996; Setubal, 2020). Ocorre desde florestas tropicais (úmidas ou secas, alagadas ou não) até savanas e áreas abertas, desde o nível do mar até 2000 m de elevação (Setubal et al., 2021).

Strychnos possui importância econômica pelo metabolismo secundário de inúmeros alcaloides tóxicos (Bisset, 1980). O nome *Strychnos* provém do grego ("acre", "amargo"), e era usado para designar várias plantas venenosas das Solanáceas (Gledhill 2002). A mais conhecida dessas moléculas é a estricnina, um alcaloide terciário de ação letal mesmo em baixas concentrações, extraído comercialmente de *S. nux-vomica* L., espécie tipo do gênero que ocorre no sudeste da Ásia (Índia, Vietnã e China tropical) (Bisset & Phillipson, 1971). Entre as espécies americanas e africanas, o princípio ativo mais conhecido são os alcaloides quaternários de ação muscular-relaxante paralisante utilizado como um dos ingredientes do veneno curare, usado em flechas e dardos de caça por populações tradicionais (Marini-Bettòlo & Bisset, 1972). O curare despertou a curiosidade dos primeiros exploradores que chegaram à região das bacias do Amazonas e Orinoco na América do Sul nos séculos XVI e XVII, sendo que os primeiros naturalistas a relatar que espécies de *Strychnos* eram utilizadas nesta preparação foram Humboldt, Bonpland e Martius, no início do século XVIII (Sá 2012).

Strychnos é coesivo em sua circunscrição morfológica e suportado como monofilético por dados moleculares (Adebowale et al., 2016; Setubal et al., 2021). Os principais caracteres diagnósticos do gênero incluem folhas simples, opostas, e inteiras com venação acródroma, 3–5(–7)-nervadas; gavinhas geralmente lignificadas e em forma de ganchos concoides, arranjadas de forma solitária ou em 1–3(–4) pares sucessivos ao longo do caule; nós geralmente engrossados e com linhas estipulares conectando a base dos pecíolos (geralmente ciliadas), raramente com estípulas interpeciolares; floema interxilemático; inflorescências cimosas em dicásios ou tirsos; flores simpétalas, (4–)5-meras, relativamente pequenas (0.3–2(–3 cm)); ovário súpero, (1–)2-loculares; frutos

bagas, pequenos (1–2 cm) até relativamente grandes (6–10(–20 cm)), contendo 1–100 sementes (Krukoff & Monachino, 1942; Leeuwenberg & Leenhouts, 1980; Mennega, 1980; Setubal et al., 2021).

De Candolle (1845) e Bentham (1857) foram os primeiros botânicos a esboçarem um sistema infragenérico para *Strychnos*, mas foi Progel (1868), na *Flora Brasiliensis*, quem publicou o primeiro tratamento seccional para o gênero, descrevendo 31 espécies distribuídas em três seções: *S. sect. Longiflorae*, *S. sect. Rouhamon* e *S. sect. Breviflorae*. Estas seções foram baseadas principalmente na proporção do comprimento do tubo da corola em relação ao comprimento do lobo da corola (maior, igual, ou menor, respectivamente). Desde então, foram descritas 27 seções, quatro subseções, e sete séries em *Strychnos* (Setubal et al., 2021), destacando-se os tratamentos de Solereder (1892–1895), Hill (1917), Duvigneaud (1947, 1952), Krukoff & Barneby (1969), Leeuwenberg (1969) e Khánh (1987). Leeuwenberg & Leenhouts (1980) publicaram o último tratamento seccional em nível global para o gênero, reconhecendo 12 seções baseadas em diferentes caracteres morfológicos e anatômicos, mas mantendo a proporção do comprimento do tubo da corola/lobo da corola como um caráter central na circunscrição das seções. Entretanto, a maior parte desses grupos infragenéricos não foram recuperados como monofiléticos nas filogenias realizadas por Adebowale et al. (2016) e Setubal et al. (2021), a não ser por *S. sect. Spinosa* P.A.Duvign. (África) e *S. sect. Breviflorae* subsect. *Eriospermae* Krukoff & Barneby ex Krukoff (América).

Dentre os investigadores de espécies de *Strychnos* americanas, além do trabalho de Progel (1868), destacam-se ainda Sprague & Sandwith (1927), Sandwith (1933), Krukoff & Monachino (1942), Ducke (1945, 1955), Krukoff (1965, 1972, 1979), e Krukoff & Barneby (1969). Dentre estes autores, o taxonomista de maior expressão foi Boris A. Krukoff (1898–1983), botânico russo que imigrou para os Estados Unidos da América e foi curador honorário do Jardim Botânico de Nova York (Landrum, 1986). Krukoff dedicou boa parte da sua vida ao estudo da taxonomia de *Strychnos* neotropicais, publicando inúmeros trabalhos desde 1937 até 1983, onde foram descritas uma subseção, 31 novas espécies (quatro atualmente em sinonímia) e uma variedade. Além disso, Krukoff foi coautor ou colaborador de inúmeros artigos em fitoquímica que descreveram mais de uma centena de alcaloides presentes nas espécies americanas de *Strychnos*, documentando 21 espécies utilizadas como ingredientes do curare de diferentes tribos indígenas Amazônicas (Krukoff, 1972). Desde a morte de Krukoff em 1983, foram publicados apenas trabalhos florísticos com enfoque regional sobre *Strychnos* americanos

(Zappi, 1989, 1996, 2004, 2005, 2006; Nurit et al., 2005; Brant & Davidse, 2009; Manoel 2009; Zappi & Setubal, 2016; Brandão & Rapini, 2018; Macedo et al., 2022), porém não houve a publicação de novos trabalhos sistemáticos de maior abrangência sobre o gênero.

Buscando contribuir para o preenchimento dessa lacuna, o presente projeto de doutorado foi proposto como uma forma de compilar e atualizar dados sobre a nomenclatura, morfologia, ecologia, anatomia, filogenia, fitoquímica, dentre outros aspectos relevantes em *Strychnos*, buscando sistematizar caracteres representativos para a identificação de seções e espécies do gênero, especialmente de grupos monofiléticos. Dessa forma, nós realizamos: a revisão do maior número possível de obras taxonômicas em *Strychnos* através da consulta de bases de dados online (e.g., IPNI, POWO); a organização de um extenso banco de dados para comparação e padronização das diferentes descrições e terminologias utilizadas em *Strychnos*; a catalogação detalhada de todas as coleções e espécimes examinados em herbário; o cruzamento de informações taxonômicas com as atuais hipóteses filogenéticas em *Strychnos*, assim como a realização de procedimentos de laboratório buscando a obtenção de novos dados moleculares em bancada.

No total foram revisadas mais de 400 obras taxonômicas contendo dados sobre *Strychnos*, permitindo catalogar 13 táxons em nível genérico, 38 em nível infragenérico, e ca. 750 em nível específico e infraespecífico (a maior parte destes atualmente em sinonímia), sendo que muitos desses nomes ainda possuem posição ou status taxonômico incertos carecendo de estudos sistemáticos. O material de herbário examinado está localizado em 111 herbários, visitados pessoalmente em A, CHRB, F, GH, IAN, ICN, MBM, MG, MO, NY, R, RB, SP, SPF, e US; por empréstimo cedido pelo INPA; ou através de imagens digitais online disponibilizadas por AAH, ALCB, AMAZ, ASE, B, BHCB, BM, BNRH, BR, C, CAS, CAY, CEN, CEPEC, CGMS, COL, CPAP, CVRD, E, EAC, ESA, FI, FLOR, FSU, FURB, G, GOET, GRA, HAL, HEPH, HERBAM, HST, HTSA, HUA, HUEFS, HUEG, HUEM, HUFU, HUNEB, HURB, HUSC, HVASF, IAC, IPA, J, JPB, K, L, LAGU, LD, LP, M, MA, MAC, MBML, MEXU, MICH, MPU, NH, P, PEUFR, PH, PRE, PRU, RFA, RON, S, SI, SPSF, TANG, TCD, TEPB, TO, TRIN, U, UB, UC, UDBC, UDW, UEC, UESCM UFACPZ, UFMT, UFP, UPCB, UZL, VEN, VIC, VIES, W, WIND, WAG, WU, YU, e Z (acrônimos segundo Thiers, updated continuously).

Nós investigamos mais de 4.500 coletas de espécies americanas de *Strychnos*, além de ca. 150 coleções de espécies representativas de outros continentes, somando ca.

9.500 espécimes (i.e., exsiccatas) examinados, incluindo ca. 300 coleções tipo de 87 espécies e duas variedades americanas. Também foi organizado um acervo de ca. 20.000 imagens contendo fotos, ilustrações e imagens digitalizadas desse material. Dentre os coletores de *Strychnos* neotropicais de maior expressão estão (em ordem de maior número de coleções): R. L. Fróes, B. A. Krukoff, A. Ducke, J. M. Pires, G. Hatschbach, A. H. Gentry, R. E. Schultes, G. T. Prance, J. A. Steyermark, e G. A. Black.

É necessário mencionar ainda que os resultados obtidos e apresentados a seguir nos Capítulos 1–3 são resultado de uma rede de colaboração estabelecida com diferentes pesquisadores conectados durante a realização do trabalho em herbário e laboratório. Nesse sentido, destacamos o estágio sanduíche realizado no Jardim Botânico de Nova York (NYBG) entre 2017–2018 que permitiu contato com os pesquisadores Dr. Benjamin Torke (NYBG), Dra. Lena Struwe (Rutgers University – USA), e Dra. Cynthia Frasier (Omaha Zoo – USA). Através dessa colaboração foi possível realizar análises filogenéticas de *Strychnos* em nível global e que estão apresentados no capítulo 1. Através dessa rede colaborativa também foi possível ajustar o enfoque do tratamento taxonômico proposto no capítulo 2, tendo como objeto de revisão o clado infragenérico monofilético *Strychnos* sec. *Breviflorae* subsec. *Eriospermae*.

Também foi realizado estágio no Laboratório GaTE (Genomics and Transposable Elements Laboratory) da Universidade de São Paulo sob a supervisão da prof. Dra. Marie-Anne Von Sluys entre 2019 a 2021. Durante o estágio foram realizados inúmeros testes de laboratório para o estabelecimento de um protocolo de extração e amplificação de sequências moleculares de amostras frescas e herborizadas de *Strychnos*, buscando a realização de novas análises filogenéticas. Entretanto, não foi possível obter um resultado satisfatório com os testes realizados, muito provavelmente em função da presença dos inúmeros alcaloides secundários produzidos pelo metabolismo secundário de *Strychnos* e que podem ter interferido na qualidade dos produtos moleculares obtidos em bancada.

E através da realização das disciplinas previstas no curso de doutorado foi possível também o contato com o prof. Dr. Jefferson Prado do Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA) de São Paulo, o qual foi consultado e convidado como coautor do capítulo 3, referente ao esclarecimento nomenclatural de *Strychnos bredemeyeri* (Schult. & Schult.f.) Sprague & Sandwith e do gênero *Lasiosstoma* Schreb. (atualmente em sinonímia sob *Strychnos*).

Além dos três capítulos apresentados nesta tese, destacamos ainda o conjunto de dados sobre espécies de *Strychnos* brasileiras disponibilizados através do programa

Reflora – Plantas do Brasil, o qual inclui o Herbário Virtual Reflora e o catálogo Flora e Funga do Brasil. Este projeto representa um esforço cooperativo de mais de 900 taxonomistas, brasileiros e estrangeiros, com objetivo de divulgar descrições morfológicas, chaves de identificação e ilustrações para todas as espécies de plantas, algas e fungos conhecidos para o país (Flora e Funga do Brasil; <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>). Nesta plataforma, são apresentadas a descrição de 67 espécies e três variedades de *Strychnos* que ocorrem no Brasil, incluindo informações morfológicas, taxonômicas, chaves de identificação, imagens, e mapas de distribuição geográfica (Setubal, 2020).

Strychnos é um grupo de plantas biodiverso e que precisa de novas interpretações sobre sua história evolutiva. Dessa forma, nós acreditamos que a partir das informações apresentadas a seguir, assim como, através dos dados disponibilizados sobre *Strychnos* na base de dados do programa Reflora seja possível despertar a atenção de outros botânicos em nível global para a necessidade de novas investigações sistemáticas sobre o gênero. Nós esperamos em breve poder ampliar essa rede de pesquisadores colaboradores, fomentando assim a realização de novos trabalhos de sistemática, anatomia, biogeografia, desenvolvimento, genômica, e fitoquímica, buscando ampliar o conhecimento sobre *Strychnos*, assim como, potenciais propriedades farmacológicas de uso terapêutico, econômico e social sobre o gênero.

Referências Bibliográficas

- Adebowale, A., J. Lamb, A. Nicholas and Y. Naidoo. 2016. Molecular systematics of southern African monkey orange *Strychnos* L. (Loganiaceae). *Kew Bulletin* 71: 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12225-016-9630-0>
- Bentham, G. 1857. Notes on Loganiaceae. *Journal of the Proceedings of the Linnean Society, Botany*, 1: 52–114.
- Bisset, N.G. and J.D. Phillipson. 1971. The African species of *Strychnos*. Part II. The alkaloids. *Lloydia* 34: 1–60.
- Bisset, N.G., P.W. Leenhouts, A.J.M. Leeuwenberg, D. Philcox, C. Tirel–Roudet, and J.E. Vidal. 1973. The Asian species of *Strychnos*. Part II. Typification, miscellaneous notes, synoptic key, and sectional classification. *Lloydia* 36: 179–201.
- Bisset, N.G. 1980. Phytochemistry. Pp. 211–237 in Engler and Prantl's *Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Angiospermae: Ordnung Gentianales, Fam. Loganiaceae*, ed. A.J.M. Leeuwenberg. Berlin: Duncker and Humboldt.
- Brandão, E.K.S. and A. Rapini. 2018. Flora da Bahia: Loganiaceae. *Sitientibus série Ciências Biológicas* 18: 1–49. <https://doi.org/10.13102/scb2648>
- Brant, A.E. and G. Davidse. 2009. *Strychnos*. Pp. 637–640 in: Davidse, G., M. Souza, S. Knapp and F. Chiang (eds.), *Flora Mesoamericana*, vol. 4. Saint Louis: Missouri Botanical Garden Press.
- Conn, B.J., E.A. Brown, and C.R. Dunlop. 1996. Loganiaceae. Pp. 1–71 in *Flora of Australia*, vol. 28, Gentianales, ed. A.E. Orchard. Melbourne: CSIRO Publishing.
- De Candolle, A.P. 1845. Loganiaceae. Pp. 1–37 in: De Candolle A.P. (ed.), *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis* 9. Paris: Fortin, Masson et Sociorum.
- Ducke, A. 1945. O gênero *Strychnos* na Amazônia Brasileira, com a descrição de uma espécie nova: *Strychnos pachycarpa*. *Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte* 3: 1–23.
- Ducke, A. 1955. O gênero *Strychnos* no Brasil. *Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte* 30: 1–64.
- Duvigneaud, P. 1947. Le groupe du *Strychnos malacoclados* Wright en Afrique Equatoriale. *Lejeunia* 11: 55–79.
- Duvigneaud, P. 1952. Aperçu sur les sections africaines du genre *Strychnos* (Loganiaceae). *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 85: 9–37.

- Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 5 Mar 2024.
- Hill, A.W. 1917. The genus *Strychnos* in India and the East. Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew), 4/5: 121–210.
- Khánh, T.C. 1987. Beitrag zur kenntnis der sippestruktur des genus *Strychnos* L. (Loganiaceae) in der Flora Vietnams. Teil 2: Zur gliederung der gattung *Strychnos* in Vietnam. Feddes Repertorium 98: 75–104.
- Krukoff, B.A. and J.V. Monachino, 1942. The American species of *Strychnos*. Brittonia 4: 248–322. <https://doi.org/10.2307/2804715>
- Krukoff, B.A. 1965. Supplementary notes on the American species of *Strychnos*. VII. Memoirs of the New York Botanical Garden 12: 1–94.
- Krukoff, B.A. and R.C. Barneby. 1969. Supplementary notes on the American species of *Strychnos*. VIII. Memoirs of the New York Botanical Garden 20: 1–93.
- Krukoff, B.A. 1972. American species of *Strychnos*. Lloydia 35: 193–271.
- Krukoff, B.A. 1979. Supplementary notes on the American species of *Strychnos* XVII. Phytologia 41(4): 201–238.
- Landrum, L.R. 1986. The Life and Botanical Accomplishments of Boris Alexander Krukoff (1898–1983). Advances in Economic Botany, 2: 1–96.
- Leeuwenberg, A.J.M. 1969. The Loganiaceae of Africa VIII, *Strychnos* III: Revision of the African species with notes on the extra-African. Medelingen Landbouwhogeschool 69: 1–316.
- Leeuwenberg, A.J.M. and P.W. Leenhouts. 1980. Taxonomy. Pp. 8–96 in Engler and Prantl's Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Angiospermae: Ordnung Gentianales, Fam. Loganiaceae, ed. A.J.M. Leeuwenberg. Berlin: Duncker and Humboldt.
- Macedo, A.; Pessoa, E. and M. Alves. 2021. Synopsis of Loganiaceae in Pernambuco, Brazil. Rodriguésia 73. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202273053>
- Manoel, E.A. and E.F. Guimarães. 2009. O gênero *Strychnos* (Loganiaceae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia 60(4): 865–877. <https://doi.org/10.1590/2175-7860200960408>
- Marini-Bettòlo, G.B. and N.G. Bisset. 1972. Chemical studies on the alkaloids of American *Strychnos* species. Lloydia 35: 195–202.
- Mennega, A.M.W. 1980. Anatomy of the secondary xylem. Pp. 112–161 in Engler and Prantl's Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Angiospermae: Ordnung Gentianales, Fam. Loganiaceae, ed. A.J.M. Leeuwenberg. Berlin: Duncker and Humboldt.

- Nurit, K., M.F., Agra, I.J.L.D. Basílio and G.S. Baracho. 2005. Flora da Paraíba, Brasil: Loganiaceae. *Acta Botanica Brasilica* 19(2): 407–416. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062005000200024>
- Progel, A. 1868. Loganiaceae. Pp. 249–300 in: Martius, C.F.P. (ed.), *Flora Brasiliensis*, vol. 6(1), t. 67–82. München: Frid. Fleischer.
- Sá, M.R. 2012. Do veneno ao antídoto: Barbosa Rodrigues e os estudos e controvérsias científicas sobre o curare. *Revista Brasileira de História da Ciência*, 5 (suplemento): 12–21.
- Sandwith, N.Y. 1933. Contributions to the Flora of Tropical America: XVII. The Genus *Strychnos* in British Guiana and Trinidad. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew)*, 8: 390–400. <https://doi.org/10.2307/4113432>
- Setubal, R.B. 2020. *Strychnos* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8663>
- Setubal, R.B., C.L. Frasier, J. Molina, B.M. Torke, R.C. Forzza and L. Struwe. 2021. A Toxic Story: Phylogeny and Classification of *Strychnos* L. (Loganiaceae). *Systematic Botany* 46: 639–655. <https://doi.org/10.1600/036364421X16312067913444>
- Solereder, H. 1892-1895. Loganiaceae. Pp. 19–50 in Engler, A. and K. Prantl (eds.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* 4. Leipzig: Engelmann.
- Sprague, T.A. and N.Y. Sandwith. 1927. New species of *Strychnos* from Tropical America. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew)* 3: 127–133. <https://doi.org/10.2307/4107542>
- Struwe, L., K. Gibbons, B. Conn and T. Motley. 2018. Loganiaceae (including Antoniaceae, Geniostomaceae, Spigeliaceae, and Strychnaceae). In: J.W. Kadereit and V. Bittrich (eds.), *The Families and Genera of Flowering Plants*, 15: 511–526. Berlin: Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93605-5_8
- Thiers, B.M. (updated continuously). *Index Herbariorum*. <https://sweetgum.nybg.org/science/ih/>
- Zappi, D.C. 1989. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Loganiaceae. *Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo* 11: 85–97.
- Zappi, D.C. 1996. Loganiaceae. Pp. 9–13 in: Melo, M.M.R.F, F. Barros, S.A.C. Chiea, M. Kirizawa, S.L.J. Mendaçolli and M.G.L. Wanderley (eds.). *Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso*, vol.4. São Paulo: Instituto de Botânica.

- Zappi, D.C. 2004. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Loganiaceae. Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo 22(2): 273–276.
- Zappi, D.C. 2005. Loganiaceae. Pp. 261–272 in: Wanderley, M.G.L., G.J. Shepherd, T.S. Melhem, S.E. Martins, M. Kirizawa and A.M. Giullietti (eds.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo vol. 4. São Paulo: Instituto de Botânica.
- Zappi, D.C. 2006. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Loganiaceae. Rodriguésia 57(2): 193–204. <https://doi.org/10.1590/2175-7860200657206>
- Zappi, D.C. and R.B. Setubal. 2016. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Loganiaceae. Rodriguésia 67(5): 1405–1409. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667538>

Considerações Finais

Muitos desafios surgiram durante a realização deste projeto, exigindo resiliência e tomadas de decisões importantes a cada etapa de trabalho. Os reflexos da pandemia da COVID-19 e seus inúmeros prejuízos sociais, assim como aspectos de ordem familiar extraordinários, causaram uma série de restrições para a realização de algumas etapas previstas no projeto original. Destacamos a nossa impossibilidade de realizar expedições de coleta mais apuradas para avaliação de espécies e populações de *Strychnos* a campo. Da mesma forma, a impossibilidade de prosseguir com a revisão presencial de alguns herbários chave para *Strychnos*, como CEPEC e INPA, principalmente. Tentamos contornar essas dificuldades através de contatos com diferentes pesquisadores, incentivando a coleta de espécimes de *Strychnos* a campo, assim como a realização de empréstimos de material de herbário (como no caso do INPA e NY) e a obtenção de imagens digitalizadas disponíveis ou não online através da ajuda de muitos curadores e técnicos de herbário. Nesse sentido, nossa rede de colaboração se capilarizou através de inúmeras ‘pequenas’ ações, que somadas foram determinantes para se obter um nível de acurácia satisfatória para a obtenção de todos os dados apresentados.

É necessário destacar ainda os múltiplos e contínuos esforços de laboratório, realizados sob a supervisão da prof. Dra. Marie-Anne Von Sluys e acompanhamento da técnica Dra. Tatiana C. Silvera Correa (GaTE Laboratory – USP), as quais não mediram esforços buscando a obtenção de resultados moleculares de bancada que permitissem a realização de novas análises filogenéticas para *Strychnos*. Entre outubro de 2019 até março de 2021, foram realizadas técnicas de treinamento sobre as funções e desenho de um laboratório de análises moleculares, uso de equipamentos, recursos humanos disponíveis, uso de reagentes e soluções, assim como técnicas de delineamento de ensaios e redação de protocolos, incluindo a documentação, análise e apresentação de todos os resultados em reuniões semanais. Dentre as principais técnicas de rotina realizadas destacamos a extração, quantificação, PCR, eletroforese e sequenciamento, assim como a seleção de marcadores moleculares de interesse e seus respectivos primers: rbcL, ITS (Frasier, 2008), petD, ETS (Gibbons et al., 2012), e ITS2, trnL-trnF, trnS-trnG (Adebowale et al., 2016). Ao todo foram realizadas ca. 13 reações de extração, 23 reações de PCR e duas reações de sequenciamento distribuídas em 21 amostras de 12 espécies de *Strychnos* utilizando cinco kits de reagentes diferentes: CTAB, Qiagen (DNEasy Plant

Pro Kit), Sigma (Plant gDNA Miniprep Kit), Stratec (Invisorb Spin Plant Mini Kit), Thermo (MagMAX Plant DNA Kit).

Nossas amostras se concentraram majoritariamente em materiais de herbário os quais são uma fonte importante de espécimes raros, alguns provenientes de áreas de difícil acesso ou mesmo extintos em diferentes escalas. A extração de DNA do material herborizado, entretanto, requer um trabalho laborioso e de alto consumo de tempo para otimização de protocolos adequados devido as pequenas quantidades de tecidos secos disponíveis para uso, o metabolismo secundário das plantas, os métodos de secagem do material, e os tratamentos químicos utilizados na manutenção de coleções (desinfecções, fumigamentos; Drábková, 2014).

Dessa forma, nossos resultados de bancada geralmente produziram DNA altamente degradado e fragmentado, não permitindo resultados de amplificação por PCR satisfatório (muitos dos quais apresentaram algum tipo de contaminação) para posterior sequenciamento e realização de análises filogenéticas. Dentre os possíveis motivos que podem ter dificultado nosso trabalho estão os métodos de ruptura dos tecidos secos empregados por nós sobre o material de herbário utilizado, ocasionado a quebra das moléculas de DNA já altamente fragmentadas e degradadas; a indisponibilidade e/ou baixa concentração de DNA molde para as amplificações de uma ou mais regiões gênicas; e a oxidação do DNA por compostos químicos oriundos do metabolismo secundário de *Strychnos*. Dessa forma, nós optamos por descontinuar o trabalho em laboratório devido à escassez de tempo hábil para otimização de um protocolo aceitável frente as demais atividades previstas no cronograma do projeto (além dos efeitos da pandemia). Apesar disso, os treinamentos, ações e reuniões de apresentação e discussão de dados foram sobremaneira decisivos para a compreensão e desenvolvimento do capítulo 1 apresentado nessa tese, assim como, em uma melhor formação do aluno em todos os aspectos.

Por fim, é necessário destacar o apoio institucional integrado oferecido pela Universidade de São Paulo, Jardim Botânico do Rio de Janeiro e Jardim Botânico de Nova York e a rede de colaboração científica estabelecida através dessas experiências. Essas instituições, assim como os seus colaboradores, foram elementos chave para a conclusão do trabalho, sem os quais nada seria possível. Cabe a nós, alunos egressos, valorizar esses espaços através de resultados acadêmicos relevantes e de interesse econômico e social, permitindo assim visibilidade e estímulo por parte de órgãos de fomento de pesquisa e financiamento buscando a manutenção e ampliação de políticas públicas que viabilizem cada vez mais o desenvolvimento científico brasileiro.

Referências Bibliográficas

- Adebowale, A., J. Lamb, A. Nicholas and Y. Naidoo. 2016. Molecular systematics of southern African monkey orange *Strychnos* L. (Loganiaceae). *Kew Bulletin* 71: 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12225-016-9630-0>
- Drábková L.Z. (2014) DNA Extraction from Herbarium Specimens. In: Besse P. (eds) Molecular Plant Taxonomy. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1115. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_4
- Frasier, C. L. 2008. *Evolution and Systematics of the Angiosperm Order Gentianales with An In-Depth Focus on Loganiaceae and Its Species-Rich and Toxic Genus Strychnos*. PhD thesis, New Brunswick, New Jersey: Rutgers University.
- Gibbons, K. L., M. J. Henwood, and B. J. Conn. 2012. Phylogenetic relationships in Loganieae (Loganiaceae) inferred from nuclear ribosomal and chloroplast DNA sequence data. *Australian Systematic Botany* 25: 331–340. <https://doi.org/10.1071/SB12002>