

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Vinicius Souza Magalhães Leite

Diversidade genética intraespecífica de *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae) de duas localidades da Região dos Lagos, Rio de Janeiro

> Rio de Janeiro 2020

Vinicius Souza Magalhães Leite

Diversidade genética intraespecífica de *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae) de duas localidades da Região dos Lagos, Rio de Janeiro

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e Utilização da Biodiversidade.

Orientadora: Prof.^a Dra. Rachel Fátima Gagliardi Araujo Coorientador: Prof. Dr. Thiago Silva de Paula

> Rio de Janeiro 2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

L533	Leite, Vinicius Souza Magalhães. Diversidade genética intraespecífica de <i>Chrysobalanus icaco</i> L. (Chrysobalanaceae) de duas localidades da Região dos lagos, Rio de Janeiro/ Mariana Barbosa Ferreira Alves. – 2020. 102f. : il.
	Orientadora: Rachel Fátima Gagliardi Araujo Coorientador: Thiago Silva de Paula Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.
	1. Abajerú - Lagos (RJ : Microrregião) - Teses. 2. Abajerú - Genética - Teses. 3. Polimorfismo (Genética) – Teses. I. Araujo, Rachel Fátima Gagliardi. II. Paula, Thiago Silva de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título

Patricia Bello Meijinhos CRB-7/ 5217- Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Vinicius Souza Magalhães Leite

Diversidade genética intraespecífica de *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae) de duas localidades da Região dos Lagos, Rio de Janeiro.

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e utilização da Biodiversidade.

Orientadores:

Prof.^a Dra. Rachel Fatima Gagliardi Araujo (Orientadora) Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Thiago Silva de Paula (Coorientador) Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sebastião José da Silva Neto Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Anderson Vilasboa de Vasconcellos Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

> Rio de Janeiro 2020

DEDICATÓRIA

Ao Evandro, que iniciou uma nova jornada de sua existência ainda este ano. À Luciere e Ivson, os alicerces incansáveis durante mais essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) por ter sido minha segunda casa durante esses 8 anos de trajetória acadêmica. Ao Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes (IBRAG) pela formação. Meu amor, gratidão e devoção à instituição serão eternos.

À equipe Petiveria & Abajeru do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ: Bianka, Jamine, Leila, Ecktor, Camila, Alexia, Elizabeth, Washington e Ana Paula. Não possuo a pretensão de tentar descrever o que construímos juntos. Desde os primeiros dias de treinamento no laboratório até nossas últimas ocasiões juntos dividindo cheesecakes e gargalhadas (coronavírus, você me paga), vocês sempre estiveram e sempre estarão comigo em pensamento. Jamine, me lembro dos primeiros dias de treinamento no preparo de meios, repiques e soluções. Obrigado pelo apoio e companheirismo constantes. Bianka, Biazinha, Bibi (nome santo chamado por mim todo dia, o tempo todo), obrigado pelos ensinamentos, pela presteza de sempre, pelos puxões de orelha e pela paciência inesgotável em me acudir quando eu tinha alguma dúvida, algum receio ou questionamento. Pelas viagens de campo até a Região dos Lagos pra coletar abajeru, pelos almoços infinitos e fofocadinhas do bem em horários de intervalo. Vocês possuem um lugar cativo e eterno no meu coração!

À Mayara do Bio-Omics pela presteza e auxílio em ceder a centrífuga do laboratório quando estivemos temporariamente sem, no nosso.

Às minhas amigas "lab partners" Aninha, Amanda e Tielen. Sem vocês a experiência não teria tido a mesma cor. Aos amigos da BioUERJ, em especial, Orlando, Michelle e Rafa. Sinto saudades dos tempos simples da graduação!

À minha orientadora Rachel Gagliardi por tudo. Esses anos foram essenciais para o meu desenvolvimento não somente científico e acadêmico, mas pessoal também. Soube ler meus momentos avoados e apontar direções para que eu pudesse superar os percalços do caminho. Possuo muito orgulho em ter podido aprender contigo assim como ter sido orientado por você durante esses quatro anos. É de uma felicidade que não me cabe. Felizes são aqueles que tem Rachel em suas vidas! Obrigado por tudo! Meu carinho e gratidão serão eternos.

Ao meu coorientador Thiago de Paula pela parceria e carinho infinitos durante parte dessa jornada, além dos ensinamentos e conhecimentos passados. Obrigado!

Ao LABMIT pela acolhida e pelos momentos compartilhados. Vocês são demais!

Aos técnicos e servidores não só do laboratório, mas da instituição como um todo, que trabalham arduamente para que nossas pesquisas possam ter andamento e continuidade em tempos tão difíceis e sombrios.

À minha mãe Luciere e ao meu pai Ivson, fontes infinitas e incansáveis de amor, encorajamento, dedicação e entrega. Se cheguei aqui foi graças a vocês também. Mami, obrigado pelas conversas, brigas, quitutes-de-fim-de-semana e pelo apoio nas horas em que eu me encontrava no ápice da exaustão. Papi, obrigado pelas saídas noturnas ao McDonald's sempre embaladas por hits dos anos 80 e 90, além das piadas sem graça que eu rio só pra você não ficar no vácuo. À Marise, pelo acolhimento, carinho e solicitude indispensáveis à mim. Ao Peppe, meu irmão amado, pelo companheirismo, pelas conversas e momentos musicados compartilhados. Amo vocês que não cabe em mim!

À minha família amada, que garante a baguncinha gostosa e boa de cada encontro familiar. Amo vocês!

Aos meus amigos dos mais distintos e diametralmente opostos círculos: OTK,, BioUERJ, Martins, Umbralinos e PGBV: cada momento vivido, cada história contada e cada gargalhada compartilhada fizeram, fazem e farão parte da minha caminhada. Obrigado por tudo!

À CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Viver sem sentir vergonha e os rubores de admiração certamente seria uma vida miserável.

Gregor Johann Mendel

RESUMO

LEITE, VSM. **Diversidade genética intraespecífica de** *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae) de duas localidades da Região dos Lagos, Rio de Janeiro. 2020. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A diversidade genética populacional responsável pela estrutura dessas populações e sua relação com o meio, assim como pela relevância comercial e medicinal de espécies vegetais, desaparece conforme a ação antropogênica avança. O estudo da variabilidade genética intraespecífica através da utilização de marcadores moleculares constitui ferramenta valiosa para a obtenção de dados confiáveis acerca do grau de erosão genética de populações, visando o estabelecimento de estratégias eficazes e seguras de conservação. Chrysobalanus icaco L. (Chrysobalanaceae) é uma espécie vegetal conhecida popularmente como abajerú, no Rio de Janeiro. Sua ocorrência no estado do Rio de Janeiro se dá, majoritariamente, em ambientes de restinga aberta e semiaberta e, embora não seja uma espécie oficialmente ameaçada de extinção, esses ecossistemas encontram-se severamente antropizados. Esse trabalho objetivou caracterizar a variabilidade genética intraespecífica de Chrysobalanus icaco L. proveniente da Região dos Lagos, Rio de Janeiro, usando como marcador molecular o DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD). O material vegetal foi coletado em dois sítios distintos: Praia das Dunas, em Cabo Frio, e Restinga de Massambaba, em Arraial do Cabo. Para cada sítio de coleta, foram amostras 20 moitas distintas determinadas aleatoriamente, tendo sido destas coletadas 20 folhas do mesmo ramo de cada uma das moitas. Foi estabelecido os códigos de P1 a P20 para as plantas de Cabo Frio e P21 a P40 para as de Arraial do Cabo. Em laboratório, o DNA foi extraído a partir de folhas provenientes de ramos e após a extração, o DNA foi quantificado e, por meio da técnica de RAPD, amplificado utilizando 12 oligonucleotídeos iniciadores (primers) selecionados para a análise. As reações de amplificação realizadas resultaram na produção de bandas por todos os *primers* selecionados para o estudo. Do número amostral de 20 indivíduos provenientes da população de Cabo Frio, somente 14 foram amplificados com sucesso. Dos 12 primers analisados, todos apresentaram polimorfismo. Foi observado um total de 866 alelos positivos (bandas) amplificados e 132 loci gênicos. O primer OPL-07 foi o que mais produziu mais bandas e loci observados, enquanto o primer RAn-12 foi o mais polimórfico e com o maior valor de heterozigosidade média. O índice de Jaccard foi usado para estimar a similaridade e a distância genéticas, sendo a última utilizada em uma análise de agrupamento por UPGMA. Foi possível observar que as amostras P7 e P1 apresentaram maior distância genética para os loci examinados. Em contrapartida, as amostras P1 e P4 apresentaram o menor valor de distância genética. Da população de Cabo Frio, as amostras P5 e P7 foram as únicas a não se agruparem na hierarquia de duplas, enquanto que as amostras P7 e P22 foram apontados como as geneticamente mais distantes das demais analisadas. Não foi observada nenhuma evidência de clonalidade genética entre as amostras analisadas. As análises genéticas indicam variabilidade intraespecífica para as amostras analisadas, e sugerem que indivíduos provenientes de diferentes municípios da Região dos Lagos possam abranger uma única população. Além de ser uma técnica de fácil execução e rápido processamento, o RAPD se mostrou adequado e eficiente para a proposta de avaliação da variabilidade intraespecífica do abajerú da Região dos Lagos.

Palavras-chave: Polimorfismo. Abajeru. RAPD. Conservação de recursos genéticos.

ABSTRACT

LEITE, VSM. Intraspecific genetic diversity of *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae) from two sites of the Lake Region, Rio de Janeiro. 2020. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A population's genetic diversity is responsible for the structure of these systems and their relationship with the environment, as well as the commercial and medicinal relevance of plant species that disappears as the anthropogenic action advances. The study of intraspecific genetic variability through the use of molecular markers is a valuable tool for obtaining reliable data on the degree of genetic erosion of populations, aiming at the establishment of effective and safe conservation strategies. Chrysobalanus icaco L. (Chrysobalanaceae) is a plant species popularly known as abajerú, in Rio de Janeiro. Its occurrence in the Rio de Janeiro state is given, mainly, on environments of open and semi-open restinga, and although it is not an officially threatened species, these ecosystems are severely anthropized. This work aimed to characterize the intraspecific genetic variability of Chrysobalanus icaco L. from Região dos Lagos, Rio de Janeiro, using as molecular marker random amplified polymorphic DNA (RAPD). The plant material was collected at two different sites: Praia das Dunas, in Cabo Frio, and Restinga de Massambaba, in Arraial do Cabo. For each collection site, 20 different thickets were randomly determined, and 20 leaves from the same branch were collected from each of the thickets. Codes P1 to P20 were established for the plants in Cabo Frio and P21 to P40 for those in Arraial do Cabo. In the laboratory, DNA was extracted from the leaves originating from the collection sites. After extraction, the DNA was quantified and, through the RAPD technique, amplified using 12 primers selected for analysis. The amplification reactions carried out resulted in the production of bands by all the primers selected for the study. Of the sample number of 20 individuals from the population of Cabo Frio, only 14 were successfully amplified. Of the 12 primers analyzed, all showed polymorphism. A total of 866 positive alleles (bands) and 132 gene loci (markers) were observed. The OPL-07 primer was the one that produced the most bands and *loci* observed, while the primer RAn-12 was the most polymorphic and with the highest average heterozygosity value. The Jaccard index was used to estimate both genetic similarity and distance, the latter being used in a UPGMA cluster analysis. It was possible to observe that samples P7 and P1 showed the highest genetic distance for the examined *loci*. In contrast, samples P1 and P4 had the lowest value for genetic distance. From the population of Cabo Frio, samples P5 and P7 were the only ones not to be grouped in the hierarchy of pairs, while samples P7 and P22 were identified as the most genetically distant from the others analyzed. No evidence of genetic clonality was observed between the samples analyzed. Genetic analyzes indicate a high intraspecific variability for the analyzed samples, and suggest that individuals from different municipalities in the Lagos Region may comprise a single population. In addition to being a technique of easy execution and fast processing, the RAPD proved to be adequate and efficient for the proposal to evaluate the intraspecific variability of the abajerú from Região dos Lagos.

Palavras-chave: Polymorphism. Abajeru. RAPD. Conservation of genetic resources

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição geográfica mundial de Chrysobalanus icaco L	20
Figura 2 -	Aspectos morfológicos de C. icaco	22
Figura 3 -	Esquematização das etapas da reação em cadeia da polimerase (PCR)	28
Quadro 1-	Oligonucleotídeos iniciadores selecionados para as reações de	
	amplificação em amostras de C. icaco	38
Figura 4 -	Esquematização da amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD)	39
Figura 5 -	Relação entre os índices de conteúdo de informação polimórfica e	
	informatividade de banda	43
Figura 6 -	A: gel de RAPD; A.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; A.2: pico de detecção de cada	
	banda; A.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do	
	peso molecular (Rf). Indivíduo P1	49
Figura 7 -	B: gel de RAPD; B.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; B.2: pico de detecção de cada	
	banda; B.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso	
	molecular (Rf). Indivíduo P2	50
Figura 8 -	C: gel de RAPD; C.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; C.2: pico de detecção de cada	
	banda; C.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso	
	molecular (Rf). Indivíduo P3	51
Figura 9 -	D: gel de RAPD; D.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; D.2: pico de detecção de cada	
	banda; D.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do	
	peso molecular (Rf). Indivíduo P4	52
Figura 10-	E: gel de RAPD; E.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; E.2: pico de detecção de cada	
	banda; E.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso	
	molecular (Rf). Indivíduo P5	53

Figura 11-	F: gel de RAPD; F.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; F.2: pico de detecção de cada	
	banda; F.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso	
	molecular (Rf). Indivíduo P6	54
Figura 12-	G: gel de RAPD; G.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; G.2: pico de detecção de cada	
	banda; G.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do	
	peso molecular (Rf). Indivíduo P7	55
Figura 13-	H: gel de RAPD; H.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; H.2: pico de detecção de cada	
	banda; H.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do	
	peso molecular (Rf). Indivíduo P8	56
Figura 14-	I: gel de RAPD; I.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; I.2: pico de detecção de cada	
	banda; I.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso	
	molecular (Rf). Indivíduo P9	57
Figura 15-	J: gel de RAPD; J.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; J.2: pico de detecção de cada	
	banda; J.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso	
	molecular (Rf). Indivíduo P10	58
Figura 16-	K: gel de RAPD; K.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; K.2: pico de detecção de cada	
	banda; K.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do	
	peso molecular (Rf). Indivíduo P12	59
Figura 17-	L: gel de RAPD; L.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; L.2: pico de detecção de cada	
	banda; L.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso	
	molecular (Rf). Indivíduo P18	60
Figura 18-	M: gel de RAPD; M.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; M.2: pico de detecção de cada	
	banda; M.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do	
	peso molecular (Rf). Indivíduo P19	61

Figura 19-	N: gel de RAPD; N.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; N.2: pico de detecção de cada	
	banda; N.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do	
	peso molecular (Rf). Indivíduo P20	62
Figura 20-	O: gel de RAPD; O.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; O.2: pico de detecção de cada	
	banda; O.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do	
	peso molecular (Rf). Indivíduo P21	63
Figura 21-	P: gel de RAPD; P.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; P.2: pico de detecção de cada	
	banda; P.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso	
	molecular (Rf). Indivíduo P22	64
Figura 22-	Q: gel de RAPD; Q.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular	
	evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; Q.2: pico de detecção de cada	
	banda; Q.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do	
	peso molecular (Rf). Indivíduo P23	65
Figura 23-	Dendrograma hierárquico da distância global entre as amostras de	
	Chrysobalanus icaco estudadas	70
Figura 24-	Análises de cluster UPGMA realizadas a partir do coeficiente de Jaccard	
	para cada <i>primer</i> individualmente (primers 1-6)	97
Figura 25-	Análises de cluster UPGMA realizadas a partir do coeficiente de Jaccard	
	para cada primer individualmente (primers 7-12)	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Georreferenciamento dos indivíduos coletados neste estudo	35
Tabela 2 -	Concentração (ng/µl) das amostras de DNA obtidas a partir do tecido foliar	46
Tabela 3 -	Relação de sucesso x insucesso na amplificação pelos primers selecionados	66
Tabela 4 -	Índices estatísticos de diversidade genética analisados por primer	68
Tabela 5 -	Matriz binária de sucesso x insucesso de presença de loci referentes aos	
	primers analisados por amostra	88
Tabela 6 -	Cálculo estatístico relacionado aos loci gerados por primer	92
Tabela 7 -	Índice de similaridade de Jaccard (J) e distância genética (J') estimados a	
	partir da análise hierárquica de agrupamento	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA	Área de Proteção Ambiental
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio (Cetrimonium bromide)
CDVCF	Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EMR	Razão multiplex efetiva (Effective Multiplex Ratio)
Ib	Taxa de informação do amplicon (amplicon informativness)
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
MI	Índice de marcador (<i>Marker index</i>)
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
NL	Nitrogênio líquido
PIC	Conteúdo de Informação Polimórfica (Polymorphism Information Content)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
RAPD	Amplificação aleatória de DNA polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA)
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)
RPM	Rotações por minuto
Rp	Poder de resolução (Resolving Power)
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	Tris-EDTA
UC	Unidade de Conservação
UPGMA	Método de par de grupos não-ponderado por meio de média aritmética (Unweighted
	Pair Group Method with Arithmetic Mean)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1	Chrysobalanus icaco L	20
1.1.1	Taxonomia e caracterização botânica	21
1.1.2	Aspectos biológicos e ecológicos	23
1.1.3	Importância econômica	25
1.2	Diversidade Genética: aplicações para o estudo da biodiverisdade	26
1.3	Marcadores moleculares	28
1.3.1	Marcadores RAPD	31
2	OBJETIVOS	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Material vegetal e local de coleta	35
3.2	Extração e Quantificação de DNA	38
3.3	Seleção e preparação dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)	40
3.4	Amplificação in vitro por RAPD	43
3.5	Compilação dos perfis de bandas	44
3.6	Análise dos dados	45
3.6.1	Cálculo dos índices de diversidade	45
3.6.2	Análise de agrupamentos	47
4	RESULTADOS	50
4.1	Análise da extração e da quantificação de DNA	50
4.2	Análise da amplificação <i>in vitro</i> por RAPD	51
4.3	Análise da compilação dos perfis de bandas	53
4.4	Avaliação dos índices de diversidade genética	71
4.5	Análise de agrupamento	73
5	DISCUSSÃO	75
	CONCLUSÕES	79

REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A – Matriz binária de presença x ausência de <i>loci</i> referentes aos primers analisados por amostra	92
APÊNDICE B – Cálculo estatístico relacionado aos <i>loci</i> gerados por primer	96
APÊNDICE C – Índices de similaridade de Jaccard (J) e distância genética (J') estimados a partir da análise hierárquica de agrupamento	100
APÊNDICE D – Análises de <i>cluster</i> UPGMA realizadas a partir do coeficiente de Jaccard para cada <i>primer</i> individualmente (<i>primers</i> 1-6)	101
APÊNDICE E – Análises de <i>cluster</i> UPGMA realizadas a partir do coeficiente de Jaccard para cada <i>primer</i> individualmente (<i>primers</i> 7-12)	102

INTRODUÇÃO

É inegável a quantidade de estudos, pesquisas e até mesmo crenças de cunho religioso, filosófico e ético relacionadas ao valor e importância de se proteger e conservar as espécies e a vida natural. Isso se encontra presente em diversas culturas pelo mundo todo há milhares de décadas (HARGROVE, 1986; CALICCOT, 1994). De forma semelhante, as premissas atuais que norteiam a ideia do desenvolvimento sustentável também preconizam uma abordagem baseada na manipulação de recursos naturais para atender as necessidades humanas de forma a não prejudicar ou aviltar comunidades biológicas, considerando o usufruto desses recursos pelas futuras gerações (LUBCHENCO et al., 1991).

Comunidades e ecossistemas complexos e especializados, após anos de pressões seletivas e seleções naturais, vêm sendo devastados pelo ser humano por todos os cantos do globo. As transformações que os sistemas naturais passaram estão diretamente relacionadas com a atividade humana, que é interminável. Os efeitos são dos mais diversos e prejudiciais: inúmeras espécies diminuirão vertiginosamente em consequência da caça e coleta predatória e da destruição de habitats. Os ciclos biogeoquímicos vêm sendo perturbados pela devastação das terras, não só criminosamente, mas em decorrência do modo de exploração adotado pelo agronegócio e pelo desenvolvimento urbano, tecnológico e econômico (PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

Como consequência desses eventos, a variabilidade genética presente nos indivíduos também se perde. Genomas de importância para a manutenção de estruturas populacionais, assim como genomas de importância comercial (como no caso de espécies de uso medicinal e riqueza fitoquímica) desaparecem conforme a ação antropogênica avança. Essas ameaças à diversidade biológica aumentam de forma crescente em resposta às demandas populacionais decorrentes do desenvolvimento humano. São urgentes as ações efetivas de cunho conservacionista, na implementação de políticas ambientais, garantindo a utilização de recursos naturais de forma consciente e assistida, e não-predatória (PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

Espécies vegetais são mais suscetíveis a tais eventos de perda de diversidade genética e biológica, uma vez que são organismos sésseis e mais integrados aos ambientes que os animais. Ainda assim, os efeitos do desflorestamento em espécies de mamíferos, aves e répteis podem ser vistos em estudos sobre a Região Amazônica (VIEIRA et al., 2005), apontando que os danos são irreparáveis para todos os organismos e ecossistemas envolvidos.

Aproximadamente 5.000 km do litoral brasileiro são ocupados por ecossistemas de restinga e suas dunas de areia. Esse tipo de bioma, que se localiza na interface entre o ambiente

marinho e o continental, possui particularidades e uma especial fragilidade intrínseca à depredações e ações antrópicas (HOLZER et al., 2004). As restingas são ecossistemas afetados naturalmente pelos processos naturais de deposição marinha por conta da ação eólica e das próprias monções. As zonas costeiras do estado do Rio de Janeiro, por exemplo, representam exemplos marcantes de sequências sedimentares regressivas e transgressivas associadas às variações do nível do mar. Além disso, as restingas constituem um dos ambientes naturais mais visados pela indústria do turismo e das atividades de lazer, resultando em exploração e ocupação antrópica decorrente da urbanização. Dean (1996) afirma que as restingas foram um dos primeiros ambientes a sofrerem a ação antrópica através da urbanização.

Ao longo dessa presente dissertação, serão apresentados pontos indispensáveis para o desenvolvimento desta pesquisa relativos ao estudo da variabilidade genética vegetal para as 2 localidades estudadas da Região dos Lagos, mais especificamente à espécie vegetal utilizada como modelo, *Chrysobalanus icaco* L., conhecida popularmente como abajerú.

1 **REVISÃO DA LITERATURA**

1.1 Chrysobalanus icaco L.

Chrysobalanus icaco L. (Chrysobalanaceae) é uma espécie vegetal conhecida popularmente como abajerú, no Rio de Janeiro. Possui ainda outros nomes populares como ajiru, ajuru, guajiru, guajuru, bajuru, bajeru, bajirú ou ajeru dependendo da região de ocorrência. Os indivíduos dessa espécie podem apresentar porte arbustivo, subarbusto, árvore ou liana (SOUZA & LORENZI, 2012) e são encontrados nas Regiões Norte (AM, AM e PA), Nordeste (AL, BA, CE, MA, PB, PI, RN e SE) e Sudeste (ES, RJ e SP) (Flora do Brasil, 2020), além de outros países latinomaericanos como a Colômbia e a Venezuela, e em alguns estados norteamericanos, como a Flórida (VARGAS 1998; FONSECA-KRUEL & PEIXOTO, 2004). A espécie é ainda conhecida por várias denominações em outros países, como Zicaque (Antilhas), Icacillo (Venezuela), Caramio (Guiana), Koenatepie (Suriname) e Cocoplum, (EUA) (FRANCIS, 2003). Na Região dos Lagos do Rio Janeiro (Arraial do Cabo), a espécie também é conhecida como maçãzinha-da-praia (FONSECA-KRUEL et al., 2006).

Chrysobalanus icaco se originou em áreas tropicais das Américas e da África Ocidental (PRANCE, 2014), colonizando posteriormente alguns países asiáticos – como Índia e Vietnã e Ilhas do Pacífico (Figura 1). Em relação à sua distribuição nas Américas, o abajerú pode ser encontrado desde a Flórida (sul dos Estados Unidos) até o sul do Brasil, principalmente em regiões costeiras e de restinga (AGUIAR, 2010). No continente africano, sua distribuição vai desde a Guiné até a Angola, sendo reportado também na Tanzânia, Camarões e Senegal (VARGAS et al., 2000).

Esta espécie possui alta adaptabilidade às condições ambientais, tolerando altas taxas de salinidade e níveis baixos de umidade em locais sob estresse hídrico, queimadas e/ou geadas moderadas (VARGAS, 1998). A espécie consegue se desenvolver também em áreas pantanosas e alagadas, além de regiões com solos lixiviados, arenosos ou rasos (SANTANA et al., 2000).

Sua ocorrência no estado do Rio de Janeiro se dá, majoritariamente, em ambientes de restinga aberta e semiaberta e, embora não esteja oficialmente ameaçada de extinção, esses ecossistemas encontram-se severamente antropizados. Além disso, as práticas de coleta predatória podem levar a uma redução qualitativa e quantitativa das populações naturais e, consequentemente, à erosão genética (MACHLINE, 2008; CARVALHO et al., 2018).



Figura 1 – Distribuição geográfica mundial de Chrysobalanus icaco L.

Fonte: PARACAMPO, 2017.

Em ambientes de restinga é possível encontrar uma ampla gama de plantas terrestres, que se desenvolvem sob a influência das monções oceânicas e da dinâmica eólica, resultando em mosaicos de tipos vegetais. Os ventos possuem um papel central na dinâmica de desenvolvimento de espécies costeiras, influenciando na formação de ondas que quebram no litoral e causam a erosão física do solo (CARVALHO et al. 2018).

1.1.1 <u>Taxonomia e caracterização botânica</u>

A espécie pertence à classe Angiospermae; subclasse Dicotiledonea; super ordem Rosidae; ordem Rosales; família Chrysobalanaceae e gênero *Chrysobalanus* (Flora do Brasil, 2020). A família Chrysobalanaceae é uma família com característica pantropical, abrangendo arbustos, subarbustos, árvores e lianas, consistindo em 18 gêneros e aproximadamente 530 espécies. No Brasil há a ocorrência de 13 gêneros e somente 2 espécies e subespécies: *Chrysobalanus icaco icaco* e *Chrysobalanus icaco prance* (SOTHERS et al., 2016; Flora do Brasil, 2020). As espécies da família são encontradas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente nos trópicos do "Novo Mundo", caracterizando uma das famílias lenhosas mais representativas da Amazônia em termos de número de espécies (FEITOSA et al., 2012; CORRÊA et al., 2015;).

Estudos taxonômicos de Chrysobalanaceae costumam ser baseados em características morfológicas da flor, como a presença de estilete filiforme e ginobásico que caracterizam a

família (PRANCE, 1972; LORENZI, 2008; EL OTTA et al., 2008; HEMSING e ROMERO, 2010). Entretanto, estudos sobre outras características morfológicas – como, por exemplo, estruturas vegetativas – também são úteis para a identificação e classificação taxonômica das espécies (CUTLER et al., 2011). De acordo com Prance e Sothers (1999), tais características vegetativas como estípulas e glândulas podem ser altamente eficazes na identificação de espécies desta família.

Outros trabalhos anatômicos acerca da família são escassos e muito antigos. Dentre eles, destaca-se o de Bonne (1926) que analisou pela primeira vez o gineceu de flores de crisobalanáceas e Kuster (1897), que analisou diferentes estruturas vegetativas de crisobalanáceas herborizadas. Atualmente, já foi identificada a anatomia foliar definitiva de várias espécies, como: *Licania cariae*, *Licania pittieri* e *Hirtella paniculata* (JÁUREGUI e CARDOZO, 2000).

Quanto aos aspectos morfoanatômicos de *C. icaco*, os ramos apresentam coloração acinzentada com a presença de lenticelas esbranquiçadas no caule. As folhas apresentam coloração verde escura na face adaxial e verde clara na face abaxial (SOUSA, 2016). As folhas são simples, alternas e semi-coriáceas, com formato orbicular e subsésseis. O pecíolo possui em média 3 milímetros e há, em sua base, duas estípulas caducas. A lâmina foliar mede de 3 a 8 centímetros de comprimento por 2 a 5 centímetros de largura (MATOS, 1999), mas estas medidas podem variar conforme o ambiente de ocorrência da espécie.

O hábito floral das espécies que ocorrem no ambiente de restinga costuma se caracterizar por inflorescências que apresentam flores bem pequenas, hermafroditas e urceoladas, com cerca de 7 a 11 milímetros de comprimento, além de uma corola pentâmera ou tetrâmera com coloração clara. As flores podem ser actinomorfas ou zigomorfas, assim como heteroclamídeas ou diclamídeas. São monóclinas (androceu e gineceu presentes simultaneamente num mesmo verticilo reprodutor), (SÁ e LOCATELLI, 2012) com 4 a 5 sépalas e muitos estames. O ovário é súpero, piloso, unilocular e uniovular, e o estigma possui cerca de 7 milímetros. O androceu é formado por aproximadamente 16 estames unidos na base, separados, respectivamente, 4 a 4, e as anteras possuem coloração amarela com abertura longitudinal (GIULIETTI et al., 2009).

Os frutos são do tipo drupa – de característica carnosa, contendo apenas uma semente aderida ao endocarpo –, com cerca de 3cm de diâmetro e coloração que varia do vermelho para o alaranjado (quando maduros) e polpa branca e macia (FONSECA-KRUEL e PEIXOTO, 2004). Os processos de frutificação e floração podem ocorrer potencialmente o ano todo, tendo maior intensidade nos meses de agosto a dezembro (LORENZI, 2002).



Figura 2 – Aspectos botânicos de Chrysobalanus icaco L.

Legenda: A – folhas e fruto. B – inflorescência. Fonte: Bianka Soares de Oliveira (esq.) e John Prince Park Lake (dir.).

1.1.2 Aspectos biológicos e ecológicos

O abajerú é uma espécie bastante polimórfica, que varia principalmente quanto à cor, tamanho do fruto, forma, tamanho da folha, hábito de crescimento e propagação. Esses diferentes morfotipos da espécie podem crescer e se desenvolver lado a lado, sem qualquer individualização ecológica, não sendo possível subdividir a espécie tomando por base apenas materiais herborizados (PARACAMPO, 2017).

A espécie ainda apresenta baixa exigência nutricional quanto às características edáficas para se desenvolver, ocorrendo em regiões litorâneas e zonas costeiras formadas por dunas e restingas (FRANCIS, 2003).

Dentre os principais ecossistemas, as restingas com sua vegetação típica representavam, até o início da década de 1980, 70% do litoral (ARAÚJO, 1992). Nesses biomas ocorre grande diversidade ecológica, dividida em comunidades chamadas edáficas por dependerem mais do solo do que do clima (BRECHEZ e PENTEADO, 2007). *Chrysobalanus icaco* é uma espécie arbustiva, possuindo altura que varia entre 1,5 a 3 metros e ocorre preferencialmente nas áreas de restinga aberta, onde exerce uma fundamental função ecológica, promovendo a fixação das dunas e fornecendo abrigo e alimento à fauna local (SÁ e LOCATELLI, 2012).

As populações de *C. icaco* da Região dos Lagos do Rio de Janeiro apresentam um padrão de distribuição espacial agrupado: os supostos indivíduos (moitas) encontram-se cerca

de 2 a 10 metros afastados uns dos outros, padrão este que costuma estar presente na maioria dos indivíduos de espécies de restinga (ARAÚJO e PEREIRA, 2009).

A distribuição dessas espécies permite uma reprodução que ocorre por fecundação cruzada, pois existe uma proximidade geoespacial relativa entre os indivíduos, sendo a polinização tipicamente entomófila e anemófila (BROWN e COOPRIDER, 2011). A estrutura morfológica das flores da espécie – como, por exemplo, a presença de uma corola encurtada -, facilita o acesso dos insetos polinizadores às nectarinas, sendo uma das formas de polinização mais presentes em ambientes de restinga (FREITAS e LOCATELLI, 2009).

O processo de polinização de *C. icaco* é considerado generalista, podendo ser realizado por qualquer tipo de animal devido à floração semi constante e à liberação contínua do néctar produzido no tecido secretor. Esse néctar se encontra armazenado no disco nectarífero e apresenta concentrações altas de açúcares, atraindo uma gama diversa de polinizadores, contudo, insetos ainda constituem os agentes polinizadores mais recorrentes. Estudos apontam que as vespas, particularmente, são as entomopolinizadoras mais importantes para o aumento do fluxo gênico e da eficiência reprodutiva da espécie. (SÁ e LOCATELLI, 2012).

A propagação natural do abajerú ocorre principalmente pela dispersão de sementes, embora indícios de propagação clonal sejam relatados na literatura (FRANCIS, 2003; WILLIAMS, 2007; BROWN e COOPRIDER, 2011). A propagação vegetativa por estaquia foi descrita após o tratamento com auxinas em altas concentrações, objetivando o enraizamento e a produção de mudas (VARGAS-SIMÓN, 1999). De acordo com Santana e colaboradores (2000), o ambiente em que o abajerú se desenvolve está intimamente relacionado com a altura que suas plantas alcançam. Indivíduos que se desenvolvem em substrato arenoso apresentam um hábito de crescimento rasteiro com o diâmetro de copa variado conforme a idade da planta.

Em outros ambientes, como manguezais e encostas de solo franco-argiloso, as condições edáficas permitem um maior crescimento vertical em detrimento do horizontal. Na restinga, o desenvolvimento ocorre horizontalmente fazendo com que a planta, em contato com o solo arenoso, produza raízes a partir de nós caulinares que tocam o solo. Assim, as plantas espalhamse radialmente, conforme as raízes não encontrem obstáculos e impedimentos físicos (ARAÚJO e PEREIRA, 2009).

O crescimento de plantas de *Chrysobalanus icaco* ocorre principalmente em áreas de restinga fechada, longe da costa, onde as plantas apresentam menor tolerância à salinidade e um crescimento mais rápido. A altura atingida pelos indivíduos que ocorrem em restingas fechadas pode variar entre 4 a 7 metros de altura, podendo apresentar mais de um tronco por indivíduo, e seu hábito de crescimento está relacionado ao local de ocorrência devido à pressão

seletiva exercida pelo ambiente. Algumas outras características fenotípicas, como tamanho e cor do fruto e da folha, também podem sofrer mudanças em função das condições edafoclimáticas existentes (FRANK e BROWN, 2018). Com base nesse fenômeno, as moitas naturais de abajerú podem ser constituídas por indivíduos geneticamente distintos - originados a partir da germinação de diversas sementes - e indivíduos geneticamente idênticos - provenientes da propagação clonal vegetativa (BROWN e COOPRIDER, 2011).

Quanto às respostas fisiológicas relativas à intensidade luminosa, o abajerú se desenvolve tanto frente a luminosidade moderada quanto intensa, além de possuir alta tolerância para ambientes secos ou molhados, o que explica a recalcitrância de suas sementes. Além disso, as plantas recém-formadas são mais suscetíveis a estresse por frio que indivíduos fisiologicamente mais velhos ou senescentes (BROWN E COOPRIDER, 2011).

1.1.3 Importância econômica

Em relação ao uso alimentar, o abajerú é consumido normalmente *in natura* no Brasil, (LORENZI, 2002). Em outros países, sua importância para a indústria alimentícia é mais representativa, uma vez que grande parte de sua produção é industrializada na forma de conservas e doces em calda (AGUIAR et al., 2011). No México, o doce da polpa de abajerú configura uma das iguarias mais popularmente apreciadas (VARGAS et al., 2000). Além disso, suas sementes possuem altos teores de óleos essenciais, sendo comestíveis também (AGUIAR et al., 2011).

Na indústria, em geral, várias crisobalanáceas são utilizadas na fabricação de barcos na região amazônica, e também na construção civil, por apresentarem madeira firme e resistente ao intemperismo biológico causado por microorganismos (BRITO, 2010). Em relação ao potencial ornamental, o abajerú é bastante explorado nos Estados Unidos – principalmente, no sul do estado da Flórida –, sendo largamente utilizado em projetos paisagísticos devido às suas características estéticas de comportamento arbustivo (geralmente em jardins) e de cerca viva para a delimitação de espaços entre propriedades (SOUSA, 2016).

Além disso, o abajerú possui diversos efeitos medicinais e, por esta razão é alvo de intensa utilização na medicina popular. O efeito mais conhecido e visado pela medicina popular e pela etnobotânica é a ação hipoglicemiante obtida a partir da infusão de suas folhas (BARBOSA et al., 2013; FERREIRA-MACHADO et al., 2014; WHITE et al., 2016). Estudos com camundongos apontaram que a emulsão feita com as folhas do abajerú reduziu a glicemia

através do bloqueio da absorção intestinal da glicose numa taxa maior que 60% (VARGAS et al., 2010).

A utilização medicinal da espécie no Brasil também se dá a partir do óleo extraído de suas sementes e de infusões da casca e raiz para o preparo de soluções e emulsões com ação antidiarreica e usadas no combate à outras doenças infecciosas, além da leucorréia (SILVA e PEIXOTO, 2009). Além disso, estudos farmacológicos identificaram propriedades antiinflamatórias e antinociceptivas (OLIVEIRA et al., 2014), antileishmania (RIBEIRO et al., 2014), antioxidantes (FERREIRA-MACHADO et al., 2004; PRESTA et al., 2007; BARBOSA et al., 2013; PORT'S, et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014), genotóxicas (FERREIRA-MACHADO, 2004, 2014), antimicrobianas (CASTILHO e KAPLAN, 2011), anticancerígenas (FERNANDES et al., 2003), antifúngicas (PERES, 2012), antirretrovirais (GUSTAFSON et al., 1991) e antiangiogênicas (DE PAULO et al., 2000; FERNANDES et al., 2003)

Os estudos fitoquímicos revelaram a presença de moléculas farmacologicamente ativas da classe dos flavonoides e dos terpenoides (CORADIN et al.; 1985; GUSTAFSON et al., 1991; CASTILHO e KAPLAN, 2011; BARBOSA et al., 2006; VARGAS et al., 2010; PORT'S et al., 2013; WHITE et al., 2016;). Como exemplo, miricetinas e quercitinas foram identificadas em extratos aquosos e hidroalcoólicos como flavonoides (BARBOSA et al., 2006) e saponinas, taninos, alcaloides e lactonas também identificadas em extratos hidroalcoólicos e aquosos (PERES, 2012),. As pesquisas em andamento acerca dos potenciais medicinais e dos efeitos biológicos de *C. icaco* justificam a elaboração de estratégias de conservação *ex situ* de germoplasma da espécie a curto, médio e longo prazo.

1.2 Diversidade Genética: aplicações para o estudo da biodiversidade

A biodiversidade como definimos atualmente é resultado de anos de evolução biológica. Essa enorme variedade de formas é resultado também de pressões seletivas, processos evolutivos e variações hereditárias, sendo polimórficas dentro de espécies que posteriormente se fixam em categorias taxonômicas. Toda a diversidade biológica, então, tem como base a diversidade genética. Diversidade genética pode ser definida como toda e qualquer variação biológica hereditária gerada por mutações nas sequências nucleotídicas durante a replicação do DNA e que é acumulada durante os processos evolutivos (SANTOS et al., 2009).

Por mais de 80 anos, estudos na área de diversidade genética foram comandados por biólogos evolucionistas (WRIGHT, 1920; FISHER, 1930). Essa área de estudo permitiu aos pesquisadores ponderarem que somente o fato de existir a presença de variedade genética hereditária, por exemplo, não necessariamente implica que essa variabilidade ou diversidade seja expressa em indivíduos e, a posteriori, em populações (HUGHES et al., 2008).

Conhecer e compreender a biodiversidade genética presente em níveis intra e interespecíficos, é de extrema importância para o monitoramento e manejo da biodiversidade existente (SANTOS et al., 2009). Dentre os variados objetivos e utilidades que os estudos de diversidade genética podem ser aplicados, destacam-se: os estudos de genética das populações, como por exemplo, sobre a variação existente para um determinado caráter (polimorfismo); estudos sobre o mecanismo de agrupamento e reagrupamento de alelos e como esses *loci* afetam determinada característica e estudos sobre a frequência de um genótipo ou gene em uma determinada população (como eles segregam no genoma, em que grau eles afetam o caráter em questão e em que extensão a ação do gene é influenciada pelo ambiente) (BROWN et al., 1978).

Ainda, em trabalhos acerca da análise da diversidade genética, normalmente costumase fazer o levantamento dessa variabilidade em várias populações da espécie a ser estudada, através do uso de um conjunto particular de marcadores moleculares. Verifica-se, então, como esta variabilidade se distribui entre as populações, permitindo fazer inferências quanto aos padrões de cruzamentos, dispersão, fluxo gênico e histórico biogeográfico da espécie, entre outros aspectos (SCHNABEL et al., 1998).

É indispensável ressaltar a importância da variabilidade intraespecífica especialmente de espécies nativas. A variabilidade existente é resultante da pressão ambiental nos diversos biomas, produzindo características que são muito importantes nos trabalhos de conservação. O *status* da variabilidade genética das plantas medicinais, por exemplo, resulta na necessidade de se estabelecer diferentes estratégias de manejo e conservação: a existência de diferentes tipos de metabólitos, de desenvolvimentos fisiológicos e adaptações edafoclimáticas distintas podem resultar em usos diferenciados e consequentes estratégias conservacionistas diferentes (SCHEFFER, MING e ARAUJO, 1998).

O estudo da biodiversidade veiculada ao estudo molecular da diversidade genética possui aplicabilidades não apenas puramente conservacionistas, mas financeiras e estratégicas também. Informações sobre o desenvolvimento e a variação genética de espécies vegetais nativas de interesse medicinal, ornamental, comercial (e outros) são fundamentais, uma vez que a domesticação e a incorporação dessas espécies nos sistemas produtivos regionais, bem como o desenvolvimento de estratégias de conservação eficientes estão estreitamente relacionadas ao conhecimento da magnitude e da distribuição da variabilidade genética em populações naturais, sejam elas endêmicas ou não (COSTA et al., 2011).

Na sequência dos estudos genéticos, fundamentais para entender a herança e fundamentar estudos de técnicas agronômicas de produção e melhoramento (no caso de espécies economicamente importantes), o estudo da variabilidade genética intraespecífica é fundamental para a obtenção de dados confiáveis acerca do grau de erosão genética dessas populações, visando o estabelecimento de estratégias eficazes e seguras de conservação (KARP et al., 1997).

1.3 Marcadores moleculares

Pesquisas e estudos sobre a variabilidade genética populacional podem ser desenvolvidos através das mais diversas abordagens biotecnológicas. Contudo, a maioria das abordagens utilizadas analisam fenótipos ou apenas algumas características expressas, e não oferecem cobertura ampla de análise do genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o surgimento e popularização da reação em cadeia da polimerase (*PCR - Polymerase Chain Reaction*), por volta de meados da década de 80, houve uma revolução nas pesquisas científicas no campo da genética (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; NEWTON et al., 1999). Nesse cenário, o advento dos marcadores moleculares representou um avanço inestimável para a área. Por definição, marcadores moleculares são sequências provenientes de um gene ou de um segmento específico de DNA que correspondem a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Com base nos conhecimentos e técnicas provenientes da biologia molecular, representam um avanço significativo na área de identificação e mapeamento da diversidade e variabilidade genética. Esse avanço permite a comparação de muitos segmentos de DNA – codificantes ou não – que permitem a análise dessa variabilidade independentemente do estágio de desenvolvimento da planta e dos fatores abióticos envolvidos (LACERDA et al., 2002).



Figura 3 – Esquematização da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Fonte: ALBERTS et al., 2011. Legenda: A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método baseado em ciclos de amplificação do material genético amostral, onde novas fitas de DNA são sintetizadas a partir da fita molde em etapas que variam conforme a temperatura.

Técnicas de análise genética que empregam segmentos de DNA como marcadores moleculares têm sido tradicionalmente utilizadas para a identificação de polimorfismos entre espécies de plantas e dentro de suas populações (EL-DOMYATI et al., 2011). Diversas técnicas de análise molecular estão atualmente sendo utilizadas para a detecção da variabilidade genética em sequências de DNA. Tais técnicas permitem a obtenção de um número tecnicamente ilimitado de marcadores, sendo possível abranger todo o genoma do organismo.

Marcadores moleculares vêm sendo utilizados em análises genéticas com diversos fins como identificação de clones; linhagens; híbridos; de cultivares obtidas e utilizadas no setor agronômico e comercial; para estudos sobre fluxo gênico e taxas de cruzamento; e para a análise de parentesco filogenético e construção de mapas gênicos (BUSO et al., 2009). Esses marcadores baseados em segmentos específicos de DNA são estáveis e detectáveis em todos os tecidos, independentemente da diferenciação ou do estádio de desenvolvimento do organismo, e não sofrem influência do ambiente e dos efeitos pleiotrópicos (múltiplos efeitos resultantes de um único gene) e epistáticos (interações gênicas) (JOSHI et al., 2004; AGARWAL et al., 2008). Existem diversos tipos de marcadores moleculares e a seleção de um ou mais desses requer o conhecimento de suas propriedades, características, objetivos e aplicações (SEMAGN et al., 2006).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos básicos de acordo com os procedimentos metodológicos utilizados na sua identificação e aplicação: marcadores de hibridização e marcadores de amplificação de DNA. Em relação aos primeiros, utiliza-se sondas de DNA marcadas com isótopos radioativos ou fluorescentes que são complementares à região do genoma que se pretende estudar. Nos marcadores de amplificação, que se caracterizam por serem mais diversos, complexos e abrangentes, são utilizados oligonucleotídeos sintéticos de DNA e complementares para uma dada região do genoma, permitindo assim uma multiplicação exponencial da cópia de DNA através da PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998; BUSO et al., 2009).

A necessidade de conhecimentos prévios sobre a sequência nucleotídica da espécie a ser estudada e os altos custos para a obtenção destes conhecimentos, assim como para a realização das análises, limitou durante alguns anos a aplicação das novas técnicas, até então, baseadas em PCR. Foi somente com o desenvolvimento de técnicas de amplificação de DNA utilizando *primers* (iniciadores) pequenos e de sequências arbitrárias/aleatórias, que o uso da PCR se difundiu, permitindo análises genéticas de diversas espécies à um custo relativamente baixo e simplificado (HADRYS et al., 1992).

Cada marcador apresenta vantagens e desvantagens baseadas em diversos critérios como a quantidade de polimorfismos gerados, a complexidade metodológica de obtenção, a infraestrutura necessária, a velocidade de obtenção dos marcadores, a possibilidade de obtenção de informações multialélicas (marcadores codominantes) e a reprodutibilidade, precisão e acurácia dos marcadores obtidos (AMABILE, VILELA e PEIXOTO, 2018).

Ainda que exista um grande número de marcadores moleculares desenvolvidos atualmente, o princípio da análise destes marcadores é o mesmo: marcadores comuns a determinadas espécies significam semelhança genética e marcadores não comuns significam diferenças. Esse raciocínio segue um princípio científico adotado no uso de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de estudo e melhoramento genético. (FALEIRO, 2011a).

As informações geradas por marcadores moleculares representam uma amostra considerável do DNA ou do genoma de cada material, indicando, possivelmente, uma porção

significativa das informações responsáveis direta e indiretamente – em função das interações moleculares e ambientais – pelas características de um determinado indivíduo ou população.

Faleiro e colaboradores (2011b) enumeram algumas das principais análises que podem ser realizadas através do uso de marcadores moleculares, tais como o mapeamento da diversidade genética e de análises filogenéticas associadas a esses mapeamentos. Nessas análises, diferentes etapas estão envolvidas na metodologia científica, desde a extração das amostras de DNA com qualidade e quantidade favoráveis, até a amplificação, separação e detecção dos marcadores por meio de corantes, radioatividade ou fluorescência, de acordo com o marcador empregado.

1.3.1 Marcadores RAPD

O marcador de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*) consiste na amplificação do DNA genômico através da reação em cadeia da polimerase utilizando *primers* de sequência arbitrária com 10 nucleotídeos. Utiliza-se apenas um tipo de primer em cada reação, sendo este normalmente formado por diferentes combinações das bases nitrogenadas com um conteúdo combinatório de G+C (guanina e citosina) entre 50 e 70%, aproximadamente (FRITSCH e RIESEBERG, 1996). As bases da técnica são consideravelmente simples. Inicialmente, o *primer* se liga às sequências complementares em fitas opostas ao DNA alvo, resultando na amplificação do segmento de DNA entre dois *primers* adjacentes por ação da enzima *Taq* polimerase (Figura 4).



Figura 4 – Esquematização do DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD)

Legenda: Esquema da reação de RAPD com visualização de bandas polimórficas para dado locus. Verde: primer que hibridiza em duas posições permitindo a amplificação do marcador/locus gênico em questão. Vermelho: primer que hibridiza também na região mas necessita de outro primer para amplificar. Amarelo: Locus monomórfico. Azul: Locus polimórfico com alelos positivos compartilhados. Rosa: Locus polimórfico com alelo positivo único. MW: padrão de peso molecular Fonte: O autor

Os sítios de ligação dos *primers* devem se encontrar separados por, no máximo, 3 a 4 mil pares de base, uma vez que a *Taq* polimerase não possui capacidade de percorrer grandes segmentos nas condições normalmente utilizadas durante a amplificação (FRITSCH & RIESEBERG, 1996; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998;). Devido ao fato de serem pequenos, a possibilidade de que os *primers* encontrem diversas regiões do genoma para se ligarem é grande, fazendo com que fragmentos aleatórios de tamanhos diferentes resultem ao final da reação (WILLIAMS et al., 1990).

Um aspecto importante a ser considerado ao se utilizar da técnica de RAPD é a competição que ocorre entre os fragmentos amplificados ao longo dos diversos sítios do genoma, fenômeno natural inerente à técnica. Em cada um destes sítios há um par de sequências

que não são perfeitamente complementares ao iniciador utilizado e são separadas por centenas de pares de bases. Nesses casos, todos esses sítios competirão por substrato (no caso, dNTPs) e enzima (a *Taq* polimerase) durante a reação da PCR. Logo, tendem a ser amplificados com diferentes rendimentos, resultando em fragmentos de intensidades distintas quando vistos sob a luz UV.

A quantidade de fragmentos gerados para uma análise é ilimitada, dependendo apenas do número de *primers* utilizados. A reação gerará um perfil formado pelo conjunto dos produtos de amplificação de diversos *primers* diferentes. A separação dos produtos é obtida por eletroforeses em gel de agarose (em concentrações que variam, normalmente, de 0,8 a 2%) ou em gel de poliacrilamida (BINNECK et al., 2002).

Os marcadores RAPD são dominantes, significando que indivíduos homozigotos dominantes para um determinado loco e indivíduos heterozigotos não podem ser diferenciados a partir do perfil de amplificação, uma vez que ambos serão representados pela presença de fragmentos no gel. Além disso, tais marcadores também são indicados para estudos de estrutura populacional por permitirem a detecção de polimorfismos em regiões codificantes e não-codificantes no genoma tanto nuclear quanto mitocondrial e cloroplastídico (ANBALAGAN et al., 2012).

Os polimorfismos de marcadores RAPD são visualizados a partir de presenças e ausências de bandas em um gel de eletroforese e podem ser interpretados e convertidos em dados diagnósticos de similaridade e dissimilaridade molecular entre indivíduos e entre populações, além de outras aplicações (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A aplicação e uso dos marcadores moleculares enquanto ferramentas de caracterização da variabilidade inter e intraespecífica, em populações vegetais, cresceu incrivelmente ao longo das décadas, conforme apontam estudos disponíveis na literatura. Em relação à populações que sofrem pressão antrópica direta, os marcadores moleculares mostram-se ainda mais urgentes e importantes aliados na área da Conservação. Sobre *Chrysobalanus icac*o, este conhecimento é fundamental para se identificar as regiões prioritárias para conservação. Não foram encontrados registros de marcadores moleculares em estudos genéticos nesta espécie, portanto, o uso da técnica de RAPD neste trabalho pode fornecer subsídios importantes para a implementação de esforços visando ao controle e sustentabilidade dos recursos genéticos vegetais da espécie.

2 **OBJETIVOS**

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a variabilidade genética intraespecífica de *Chrysobalanus icaco* L. proveniente de duas populações da Região dos Lagos, Rio de Janeiro, por meio do marcador molecular de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD).

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo eficiente de extração de DNA para a espécie;
- Determinar a presença de polimorfismos intraespecíficos em duas populações de *Chrysobalanus icaco* L. proveniente da Região dos Lagos/RJ;
- Comparar geneticamente os indivíduos das duas populações (intrapopulacionalmente) de *Chrysobalanus icaco* L., por meio de testes estatísticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e local de coleta

O material vegetal foi coletado em dois sítios distintos, na Região dos Lagos: Praia das Dunas, em Cabo Frio e na Restinga de Massambaba em Arraial do Cabo. A Praia das Dunas forma um dos complexos de praia presentes em Cabo Frio, sendo um destino comum de turistas e viajantes. A área em questão não se enquadra em nenhuma unidade de conservação. A escolha dos sítios de coleta se deu por conta da ocorrência da espécie e facilidade de coleta uma vez que havia, previamente, a licença de coleta obtida pelo grupo do Laboratório de Marcadores Moleculares em Plantas.

Em contrapartida, a Restinga de Massambaba é uma APA (área de proteção ambiental), criada pelo Decreto Estadual nº 9.529C, de 15 de dezembro de 1986. Possui uma extensão geográfica de 9.134 hectares de área e abrange os municípios de Araruama, Arraial do Cabo e Saquarema. Conforme consta no INEA, essa APA foi criada, à época, com o intuito de proteger um dos últimos fragmentos remanescentes de biomas, como os de restingas, lagoas costeiras e brejos em bom estado de conservação, que servem de abrigo para diversas espécies de aves migratórias e de espécies vegetais endêmicas. Além disso, também foi criada com o objetivo de preservar sítios arqueológicos e manter a fixação e sequência das dunas ali existentes, que são revestidas pela vegetação protetora.

Os sítios de coleta são definidos pelos limites do Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio. O Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio (CDVCF) encontra-se na Região dos Lafos, no estado do Rio de Janeiro, Brasil, compreendido pelas coordenadas 22°30'-23°00'S e 41°52'-42°42'W e possuindo cerca de 1.500 km². Integra-se pelos municípios de Araruama, Armação de Búzios, Arraial do Cabo, Cabo Frio, Iguaba, Saquarema e São Pedro da Aldeia. A região é delimitada a leste e sul pelo Oceano Atlântico, a oeste pela Serra do Mato Grosso e ao norte peLA Lagoa de Araruama (RIBEIRO e LIMA, 2009; BOHRER et al., 2009). Possui aproximadamente 1.500 km², com uma composição fisiográfica predominada por planícies arenosas costeiras, depósitos aluviais, lagunas e morros baixos peninsulares (ARAÚJO et al., 2009). O clima da região é constituído por dois tipos distintos: no extremo ocidental, apresenta clima tropical com chuvas de verão e secas de inverno e no extremo oriental, apresenta variações de clima semiárido quente (BARBIERI, 1997). Em detrimento do clima, a cobertura vegetal das regiões (Cabo Frio e Arraial do Cabo) está condicionada pela história paleoevolutiva das espécies ocorrentes, compondo a composição de floresta ombrófila densa e a floresta estacional semidecidual, em partes diferentes (ARAÚJO et al., 2009).

Para ambos os sítios de coleta foram determinadas 20 moitas distintas de forma aleatória, sendo coletadas 20 folhas do mesmo ramo de cada uma das moitas. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos e identificadas conforme códigos determinados pelo autor para categorizar os indivíduos, organizados de 1 a 40: P1; P2; P3; P4; P5; P6; P7; P8; P9; P10; P11; P12; P13; P14; P15; P16; P17; P18; P19; P20; P21; P22; P23; P24; P25; P26; P27; P28; P29; P30; P31; P32; P33; P34; P35; P36; P37; P38; P39; P40.

Os 20 primeiros indivíduos referem-se, na ordem, à população de Cabo Frio e os 20 últimos, à de Arraial do Cabo. Além disso, as coordenadas georreferenciadas de cada moita foram coletadas também a fim de obter uma precisão maior da localização de cada moita.

Das amostras coletadas, foi selecionada uma referente ao sítio de coleta de Cabo Frio para ser depositada no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro com número de tombo HRJ00011715. O material coleado em Arraial do Cabo se encontra em processo de registro no Herbário da Universidade com número de tombo a ser fornecido.
Tabela 1 – Georreferenciamento dos indivíduos coletados neste estudo. Os indivíduos (P, plantas) foram numerados sequencialmente (1–40) e codificados de acordo com a localidade de origem: CF, Praia das Dunas, Cabo Frio/RJ; e AC, Restinga de Massambaba, Arraial do Cabo/RJ

Indivíduo	Latitude	Longitude	Data de coleta	Coletor
P1	22°54'22''S	42°01'58"W	03/04/2019	B.O. Soares
P2	22°54'22"S	42°01'58"W	03/04/2019	B.O. Soares
P3	22°54'22"S	42°01'58"W	03/08/2018	B.O. Soares
P4	22°54'22"S	42°01'58"W	03/08/2019	B.O. Soares
P5	22°54'22"S	42°01'58"W	03/08/2019	B.O. Soares
P6	22°54'32"S	42°02'05"W	03/08/2019	B.O. Soares
P7	22°54'91''S	42°03'49"W	03/08/2018	B.O. Soares
P8	22°54'88''S	42°03'48"W	03/08/2018	B.O. Soares
P9	22°54'90"S	42° 03'53"W	03/08/2018	B.O. Soares
P10	22°54'89"S	42°03'51"W	03/08/2018	B.O. Soares
P11	22°54'28"S	42°02'06"W	27/10/2019	O autor
P12	22°54'33"S	42°02'07"W	27/10/2019	O autor
P13	22°54'33"S	42°02'08"W	27/10/2019	O autor
P14	22°54'36"S	42°02'06"W	27/10/2019	O autor
P15	22°54'37"S	42°02'07"W	27/10/2019	O autor
P16	22°54'38"S	42°02'07"W	27/10/2019	O autor
P17	22°54'44"S	42°02'08''W	27/10/2019	O autor
P18	22°54'46"S	42°02'08''W	27/10/2019	O autor
P19	22°54'48"S	42°02'09"W	27/10/2019	O autor
P20	22°54'52"S	42°02'11"W	27/10/2019	O autor
P21	22°56'49"S	42°04'11''W	24/04/2019	O autor
P22	22°56'49"S	42°04'10"W	24/04/2019	O autor
P23	22°56'48"S	42°04'09"W	24/04/2019	O autor
P24	22°56'48''S	42°04'08''W	24/04/2019	O autor
P25	22°56'46"S	42°04'07"W	24/04/2019	O autor
P26	22°56'46''S	42°04'06"W	24/04/2019	O autor
P27	22°56'31''S	42°04'21''W	24/04/2019	O autor
P28	22°55'09"S	42°02'22''W	24/04/2019	O autor
P29	22°55'10"S	42°02'28"W	24/04/2019	O autor
P30	22°55'07"S	42°02'26"W	24/04/2019	O autor
P31	22°55'12"S	42°02'34"W	24/04/2019	O autor
P32	22°57'06"S	42°02'37"W	24/04/2019	O autor
P33	22°57'03"S	42°02'31"W	24/04/2019	O autor
P34	22°57'02''S	42°02'30"W	24/04/2019	O autor
P35	22°57'47"S	42°02'35"W	27/10/2019	O autor
P36	22°57'22"S	42°03'04"W	27/10/2019	O autor
P37	22°56'47"S	42°04'25"W	27/10/2019	O autor
P38	22°56'48"S	42°04'27"W	27/10/2019	O autor
P39	22°56'49"S	42°04'24"W	27/10/2019	O autor
P40	22°56'21"S	42°04'25"W	27/10/2019	O autor

Fonte: O autor.

3.2 Extração e Quantificação de DNA

Após a coleta, as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos identificados a fim de facilitar a triagem do material. A etapa experimental constituinte deste trabalho foi realizada no Laboratório de Marcadores Moleculares em Plantas (LMMP), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ. No laboratório, o material foi mantido congelado em freezer para viabilizar a obtenção do material genético a ser extraído e analisado. O DNA genômico foi extraído a partir de folhas provenientes de ramos originários dos sítios de coleta analisados. O protocolo utilizado foi elaborado por Healey e colaboradores (2014), desenvolvido para espécies recalcitrantes. Tal protocolo consiste de uma variação do protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle (1987).

Para a aplicação do protocolo de extração, foram utilizados 1 grama de folhas previamente congeladas em freezer, com o uso de uma balança de precisão. Foram pesadas 4 folhas por amostra, todas do mesmo indivíduo, com o objetivo de otimizar o rendimento de DNA obtido ao final do protocolo. Antes da moagem, o material utilizado para a maceração foi pré-resfriado em freezer (HEALEY et al., 2014).

Foi realizado o preparo da solução de extração contendo 10 mL de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) e 300 μ L de β -mercaptoetanol. Esse tampão, após o preparo, é préaquecido a 65° em banho-maria, enquanto acontece a moagem do material vegetal. As folhas, depois de pesadas, foram maceradas em NL (nitrogênio líquido) com o uso de cadinhos e pistilos. O macerado obtido foi, depois, depositado em tubos do tipo Falcon e foi adicionado 10mL da solução de CTAB+ β -mercaptoetanol em cada tubo, para que as amostras pudessem ficar incubadas em banho-maria, a 65°C, durante 1 hora. Passado esse tempo, as amostras foram homogeneizadas por inversão e em seguida centrifugadas durante 10 minutos a uma rotação de 5.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante da solução bifásica recém-formada de cada tubo foi transferido para outros 4 novos tubos do tipo Falcon, e adicionando-se à uma outra solução contendo 1 mL de clorofórmio + álcool isoamílico na proporção 24:1 (672 μ L de clorofórmio + 28 μ L de álcool isoamílico). Em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 5.000 rpm para haver precipitação e formação de uma solução bifásica, onde a fase aquosa de cada amostra foi retirada e depositada em novos tubos Falcon.

Após essa etapa, foi adicionado 5 µL da enzima RNAse pré-aquecida em banho-maria a 37°C durante 15 minutos.

Ao final do tempo de incubação, foi adicionado, mais uma vez, 1 mL da solução de clorofórmio e álcool isoamílico em cada tubo, seguindo-se mais uma centrifugação e transferência do sobrenadante aquoso para outros 4 novos tubos.

Na etapa seguinte, foram adicionados 500 uL de NaCl 5M e 3 mL de isopropanol. As amostras permaneceram em freezer durante 30 minutos.

A seguir, as amostras foram centrifugadas, deixando visível o sedimentado de DNA ao fundo do tubo. A fase líquida foi toda descartada e as amostras de DNA foram lavadas com 3mL de etanol 70% e centrifugadas pela última vez, conforme protocolo, durante 10 minutos a 5.000 rpm. Ao final da centrifugação, o álcool foi descartado e as amostras nos tubos foram deixadas secando durante 15 minutos em estufa a 60°C e foram ressuspendidas em 100 μ L de tampão TE (Tris-EDTA) cada uma e estocadas em freezer a -20°C.

Após a etapa completa de extração, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% e coradas com loading Neobio Brilliant Green a 10 uL, para estimar a concentração obtida para cada indivíduo, em nanogramas por mililitro. Essa etapa consistiu numa aferição visual, por comparação da intensidade das bandas de cada amostra com a intensidade luminosa das bandas geradas pelo DNA lambda, padrão de peso molecular comercial, em diferentes concentrações.

Os lambdas utilizados para o preparo dos padrões de visualização das bandas foram $\lambda 10$ e $\lambda 50$, no preparo dos padrões de 25, 50, 75, 100 e 150 nanogramas. Em relação ao preparo das amostras para a corrida de quantificação, foram elaboradas as seguintes soluções baseando-se em misturas proporcionais do lambda, água mQ e corante, conforme quadro a seguir.

A visualização dos fragmentos gerados pela corrida de eletroforese foi possível através de equipamento fotodocumentador com emissão de luz ultravioleta do modelo Transilluminator L-PIX Molecular Imaging, e a estimação do peso do valor quantificado de cada amostra foi feito por comparação dos fragmentos gerados pela corrida, levando em consideração a intensidade e a espessura desses fragmentos visualizados no gel.

3.3 Seleção e preparação dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para as reações de amplificação por RAPD foram selecionados após uma triagem inicial, na qual foram analisados, 89 *primers* disponíveis no estoque do Laboratório de Marcadores Moleculares em Plantas (LMMP), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (NBV-UERJ), além de 10 iniciadores sintetizados conforme a literatura disponível (Quadro 1) sobre análises moleculares para a espécie em questão (PARACAMPO et al., 2020).

Os iniciadores foram testados em reações de amplificação utilizando a amostra P5, por ter sido este um dos indivíduos que apresentou uma maior concentração de DNA extraído (~100 ng/µl) e com pouca ou nenhuma degradação. Foram então selecionados os 12 iniciadores utilizados nas amplificações, levando em consideração número, quantidade e qualidade das bandas geradas nas amostras testadas. Dos 89 iniciadores disponíveis no estoque laboratorial (Quadro 1), somente 2 foram selecionados conforme os resultados da triagem segundo critérios de número e resolução das amplificações resultantes para análise dos 40 indivíduos provenientes das duas populações a serem analisadas.

Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores triados para as reações de amplificação nas amostras de *C. icaco* e suas respectivas referências. Os iniciadores de 1 a 89 representam os disponíveis no estoque do LMMP (cont.)

Iniciador	Sequência (5'-3')	Refs.	Iniciador	Sequência (5'-3')	Refs.				
01	CCGGCCTTAC		51	GAGAGCCAAC					
02	AAAACCGGGC		52	CAGAAGCGGA					
03	GTCCCAGAGC		53	GTCAGAGTCC					
04	GAGCTC GTGT		54	TTCAGGGCAC					
05	GCGGCTGGAG	SEMAGM, STEDJE e	55	ACGGGCCAGT	K'OPONDO,				
06	AGTAGACGGG	BJORNSTs, 2001	56	CAGTGCCGGT	RHEENEN e				
07	TACGATGACG		57	GTCCGGAGTG	MUASYA, 2009				
08	GCTGCGTGAC		58	ACCTCGGCAC					
09	CGACCAGAGC		59	ACAGCCCCCA					
10	CTGAAGCGGA		60	TGAGCGGACA					
11	CTCGGGTGGG		61	AATCGGGCTG					
12	AGTAGACGGG		62	GTCCACACGG					
13	GCTTGTGAAC		63	CCACAGCAGT					
14	TGACCGAGAC		64	ACCCCCGAAG					
15	TTCCGCGGGC	VIEIRA, 1997;	65	GGCACCCTTAC					
16	GTAGACGAGC	SURAMNIAN et al.,	66	ACCAGGTTGG					
17	GTCTTTCAGG	2000; DWIVEDI et al.,	67	TGCCGTGAGA					
18	GCGGTTGAGG	2001	68	ACGGAAGTGG					
19	CTTTCGTGCT		69	CAAAGGGCGG					
20	ATCTGGCAGC		70	CAATCGGGTC	CROCHEMORE,				
21	ACTCCACGTC		71	GAACGAGGGT	MOLINARI e VIEIRA,				
22	CACCGCAGTT		72	AACGGGCGTC	2003				
23	AGCCAGGCTG	CLAIN et al., 2004	73	CTTGGCACGA					
24	GGCGTAAGTC		74	TGAGGGCCGT					
25	GGGTGCAGTT		75	CTGGCTCAGA					
26	CCGGGGTTAA		76	TGCCAAGAGG					
27	TTAACCGGGG		77	CTGAAGCGCA					
28	GAGCACGGGA	STEDJE e ZIRABA,	78	GAGAGGCTCC					
29	GAGCCCGTAG	2003	79	CTGGTGCTGA					
30	GCAAGTCACT		80	GACAGTCCCT					
31	TGCCGAGCTG		81	ND					
32	GGGTAACGCC		82	ND					
33	TCTGTGCTGG		83	ND					
34	CCACAGCAGT	ROUT et al., 2006.	84	ND					
35	GATGACCGCC		85	ND	SERVGEN-UERJ				
36	TGGACCGGTG		86	ND					
37	GAGGGACCTC	OFFEI, ASANTE e	87	ND					
38	ACCCCCGAAG	DANQUAH, 2004	88	GGGTAACGCC					

Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores triados para as reações de amplificação nas amostras de *C. icaco* e suas respectivas referências. Os iniciadores de 1 a 89 representam os disponíveis no estoque do LMMP (conclusão)

39	GATGACCGCC		89	GTAGACCCGT	SERVGEN-UERJ
40	TTCCCCCAG		90	GTGATCGCAG	
41	ACCGCGAAGG	OFFEI, ASANTE e	91	CAATCGCCGT	
42	CTTCACCCGA	DANQUAH, 2004	92	GGCTGTGTGG	
43	CCCGGCATAA		93	CCAGCCTCAG	
44	AGGGGTCTTG		94	GTGCGAGAAC	
45	ACGCCCAGGT	HU et al., 2008.	95	TGCGTTCCAC	PARACAMPO et al,
46	CCACACTACC		96	GGGTCGCATC	2020
47	GTGACCGACT		97	CCACAGCCGA	
48	ACACCGGAAC	LAKHANPAUL,	98	AGGCGGGAAC	
49	CAGCCTACCA	VELAYUDHAN e	99	CTGAGGTCTC	
50	GTAGCCGTCT	BHAT, 2004.	-	-	-

3.4 Amplificação in vitro por RAPD-PCR

Para o preparo do *mix* de PCR num volume final de 25 uL, foram elaboradas soluções estoque de cada amostra de DNA na concentração de 10 ng/ul, num volume de 50 ul. O preparo dessas soluções levou em consideração o volume de solução trabalho utilizada, na concentração final de 100 ng/uL.

Após a pipetagem, os tubos foram depositados, de tampa aberta, em termociclador a 95°C durante 5 minutos para secagem do DNA através da evaporação da solução-tampão presente. Para o preparo do *mix* de PCR, levou-se em consideração os valores para uma unidade de tubo do tipo eppendorf de volume 0,5 mL: 2,5 uL de tampão *buffer*; 2,5 uL de dNTPs; 3 uL de MgCl₂; 2,5 uL do *primer* utilizado (que variou a cada vinte amostras); 0,3 uL da enzima *Taq* polimerase e a avolumação, em água milliQ, para completar o volume de 25 uL

A reação de RAPD foi realizada conforme ciclagem em condições previamente estabelecidas (GUIMARÃES, 2007) em: 94°C por 2 minutos, com 45 ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, seguido por uma extensão final de 72°C por 5 minutos. As reações foram realizadas em termociclador Eppendorff Flexlid Mastercycler Nexus Gradient.

Para a visualização das bandas, foram realizadas corridas de eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,4%, em cuba horizontal de dimensões 20cm x 25cm. A agarose foi pesada em balança de precisão e diluída em tampão TBE 1x em volume 300 mL. A corrida de eletroforese foi realizada em cuba horizontal Loccus Biotecnologia LCH 20x25 com fonte elétrica Kasvi K33-300m, na configuração de voltagem a 200V, corrente elétrica de 120mA e duração de corrida de 150 minutos (2 horas e 30 minutos). As amostras foram preparadas utilizando a concentração de 8 uL delas e 2 uL de NeoTaq 6x Loading Buffer.

A relação de amostras por corrida levou em consideração a quantidade de *primers* selecionados. Foram realizadas 13 corridas com as 23 amostras disponíveis (ocupando 23 poços na cuba), com 3 uL de *ladder* GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder e 2 uL de loading NeoTaq 6x Loading Buffer para cada corrida feita. O número de corridas realizadas corresponde à quantidade de amostras disponíveis (23) em detrimento do número de poços disponíveis em cada pente de gel (foram utilizados 2 pentes de 20 poços cada). A visualização dos fragmentos gerados foi feita em transiluminador L-PIX Molecular Imaging, com fotodocumentador acoplado, e os fragmentos contabilizados em relação a cada *primer* analisado.

3.5 Compilação dos perfis de bandas

Após a amplificação, foi realizada a compilação dos perfis de bandas gerados pela corrida eletroforética e visualizados em gel de agarose. As fotos dos géis (obtidas através de fotodocumentação) foram editadas em relação a cor, limpeza de ruídos e alinhamento no software *GNU Image Manipulation Program (GIMP)*, versão 2.10.20, de edição e tratamento de imagem. Posteriormente, as fotos dos géis foram submetidas ao software *Gel Analyzer* versão 19.1, para detecção, compilação e avaliação dos perfis de bandas.

No programa, as bandas foram detectadas a partir do contraste de picos de luminosidade na relação claro (os fragmentos de bandas) com escuro (a cor de fundo do gel). Após a definição das *lanes* e da detecção das bandas, as informações relativas ao peso molecular geradas pelo ladder utilizado foram inseridas para a estimativa do peso de cada banda das amostras. Além disso, foi realizada a calibração do *Rf*, que é a mobilidade relativa, do inglês *retention factor* (é a distância migrada por uma banda, dividido pela distância migrada pelo corante que corre no gel) de cada *lane*, bem como a definição da linha de base e da curva de calibração de cada pico.

Para a produção da matriz binária, após a compilação dos dados por meio da presença ou ausência de bandas amplificadas, foram registrados para cada *primer*:

- i) o tamanho amostral (*n*);
- ii) o número total de *loci* (marcadores) amplificados (*L*);
- iii) a proporção de *loci* (marcadores) únicos ($\alpha = l_u/L$), onde l_u é o número de *loci* únicos, i.e., que apresentam alelos amplificados em somente um único indivíduo da amostra;
- iv) a proporção de *loci* (marcadores) polimórficos ($\beta = L_p/L$), onde l_p é o número de *loci* polimórficos para aquele *primer*;
- v) o número total de alelos amplificados (bandas)(*A*);
- vi) o número médio de alelos amplificados (bandas) por *loci* (a = A/L);
- vii) a proporção de bandas informativas (γ = A_i/A), onde A_i é o número de alelos amplificados informativos, i.e., em *loci* (marcadores) polimórficos somente.
 (HUFF et al., 1993).

3.6 Análise dos dados

3.6.1 <u>Cálculo dos índices de diversidade</u>

Para avaliar a diversidade genética recuperada pelo método de RAPD, para cada *primer*, foi calculada a heterozigosidade média corrigida (\overline{H}^* , do inglês *corrected mean heterozygosity*), calculada como:

$$\overline{H}^* = \left(\frac{n}{n-1}\right) \frac{\sum H_i}{n}$$

onde n/(n-1) é o fator de correção para o tamanho da amostra n, e H_i é a heterozigosidade esperada (do inglês *expected heterozygosity*) do *i*-nésio locus gênico, calculada segundo Powel e colaboradores (1996) como:

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

onde p_i é a frequência do *i*-nésio alelo daquele locus gênico.

Como em marcadores RAPD, e outros marcadores do tipo impressão digital, somente é possível a detecção de dois alelos, um alelo amplificado (com frequência p) e um alelo nulo (com frequência q = 1 - p). Por se tratar de um marcador dominante – onde não é possível a detecção de indivíduos heterozigotos – em alternativa à heterozigosidade esperada, é recorrente a utilização de um índice que informe o conteúdo de informação de polimorfismo (*PIC*, do inglês *polymorphism information content*) como meio para estimar a diversidade de um locus gênico, a partir de um dado *primer*. O *PIC* pode ser calculado segundo De Riek e colaboradores (2001) como:

$$PIC = 1 - p^2 - (1 - p)^2$$

ou, por meio do rearranjo da fórmula anterior, segundo Roldán-Ruiz e colaboradores (2000), como:

$$PIC = 2p(1-p)$$

onde, em ambos os casos, p é a frequência do alelo amplificado. Seja como for calculado, tanto pela heterozigosidade esperada (H) quanto pelo conteúdo de informação de polimorfismo (*PIC*), os resultados são idênticos e o valores máximos observados em ambos os casos para cada *loci* de RAPD é igual a 0,5, quando a frequência dos alelos amplificados e nulos forem iguais.

Também foi calculado para cada *primer* seu Índice de Marcador (*MI*, do inglês *marker index*), calculado como:

$$MI = L \times \beta \times PIC$$

onde *L* é o número total de *loci* amplificados por um conjunto de *primers* e β é a proporção de *loci* polimórfico. Desta forma, quanto maior o valor MI, maior o número esperado de marcadores polimórficos para um ensaio individual, neste caso, para o *primer* de RAPD.

Por fim, foi calculado o poder de resolução (R_p , do inglês *resolution power*) de cada primer, que expressa a capacidade de um *primer* ou técnica de distinguir entre um grande número de genótipos, definido por Prevost & Wilkinson (1999) como:

$$R_p = \sum I_{bi}$$

onde I_b é a informatividade de uma banda, que pode ser representada em uma escala de 0–1 pela fórmula:

$$I_b = 1 - 2|0,5 - f_i|$$

onde f_i é a frequência do alelo amplificado no *i*-nésio *loci* gênico.

Ambos os índices *PIC* e I_b estão relacionados, e expressam a diversidade em um locus gênico em proporção à frequência esperada de indivíduos heterozigotos, como pode ser visto na Figura 5.

Figura 5 – Relação entre os índices de conteúdo de informação polimórfica (PIC) e informatividade de

banda (Ib) O eixo das abscissas corresponde às frequências alélicas expressas pelos índices.



3.6.2 Análise de agrupamento

A similaridade genética entre pares de amostras foi estimada a partir do Índice ou Coeficiente de Similaridade de Jaccard (J, originalmente *coefficient de communauté*; JACCARD, 1901). Aplicado ao contexto de marcadores de impressão digital de DNA, no qual duas amostras, $A \in B$, apresentam cada uma *n loci* gênicos binários, i.e., alelos nulos (0) e alelos positivos (1), o coeficiente de Jaccard mede a sobreposição que $A \in B$ compartilham da sua composição genética, sendo:

$$J = \frac{M_{11}}{M_{10} + M_{01} + M_{11}}$$

onde M_{11} é o número total de alelos positivos (1) compartilhados pelas amostras $A \in B$, M_{10} é o número total de alelos positivos (1) exclusivos da amostras A, e M_{01} é o número total de alelos positivos (1) exclusivos da amostras B. O índice de Jaccard é igual a 0 quando não há nenhum alelo positivo compartilhado entre duas amostras (ausência de similaridade), e é igual a 1 quando as duas amostras compartilham os mesmos alelos positivos em todos seus *loci* gênicos (similaridade completa)

A distância genética entre pares de amostras foi estimada pela distância de Jaccard (d_J) , que mede a dissimilaridade entre conjuntos de amostras, e é complementar ao coeficiente de Jaccard, de forma que:

$$d_J = 1 - J = \frac{M_{01} + M_{10}}{M_{10} + M_{01} + M_{11}}$$

As distâncias genéticas pareadas foram utilizadas em uma análise multivariada de agrupamento usando o método de par de grupos não-ponderado por meio de média aritmética (UPGMA, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*; SOKAL & MICHENER, 1958). Este consiste em um método simples de agrupamento hierárquico aglomerativo de baixo para cima (*bottom-up*), o qual constrói uma árvore enraizada (dendrograma) que reflete a estrutura observada na matriz de distância genética.

O algoritmo UPGMA produz dendrogramas enraizados e requer uma suposição de taxa constante, *i.e.*, ele assume uma árvore ultramétrica na qual as distâncias da raiz à ponta de cada ramo são iguais. Neste tipo de relação, os elementos de um grupo estão equidistantes do nó que os une, de forma que os ramos que unem $A \in B$ ao nó (u) têm comprimentos:

$$d_{A,u} = d_{B,u} = \frac{d_{A,B}}{2}$$

Em cada etapa do algoritmo de UPGMA, os dois grupos (*clusters*) mais próximos (menor distância genética) são combinados em um grupo de nível superior. Em outras palavras, em cada etapa de agrupamento, a distância genética atualizada entre o grupo unido as amostras $A \in B$ e uma outra amostra X é dada pela média proporcional das distâncias entre as amostras, de forma que:

$$d_{(A,B),X} = \frac{d_{A,X} + d_{B,X}}{2}$$

onde $d_{A,X}$ é a distância genética entre as amostras $A \in X$, e $d_{B,X}$ é a distância genética entre as amostras $B \in X$.

As análises de agrupamento foram realizadas usando o programa PAST v3.26 (HAMMER et al., 2001). Para tal, uma matriz binária de alelos positivos (1) e alelos nulos (0) para cada loci gênico (marcador) de cada conjunto de primer, para todas as amostras, foi inserida no programa.

A partir destes dados, foi possível construir dendrogramas de distância genética em um nível global, i.e., abrangendo todos os *loci* gênicos de todos os *primers* de RAPD, e em níveis locais, abrangendo os *loci* gênicos amplificados por cada primer separadamente.

4 **RESULTADOS**

4.1 Análise da extração e quantificação de DNA

Dos 89 iniciadores disponíveis no estoque laboratorial, somente 2 foram selecionados conforme os resultados da triagem segundo critérios de número e resolução das amplificações resultantes para análise dos 40 indivíduos provenientes das duas populações a serem analisadas.

Os ajustes aplicados ao protocolo de extração permitiram um rendimento satisfatório de DNA por amostra (Tabela 4), atendendo ao protocolo de amplificação por RAPD realizado. O restante das amostras provenientes da população de Arraial do Cabo (17 amostras) não foi extraída e analisada de forma subsequente devido à pandemia do novo coronavírus. O protocolo de extração utilizado permitiu a obtenção de um DNA limpo e de qualidade suficientes para as análises de amplificação.

Amostra	Concentração de DNA (ng/µl)
P1	150
P2	150
P3	25
P4	200
P5	50
P6	50
P7	10
P8	150
P9	200
P10	150
P11	25
P12	50
P13	30
P14	10
P15	10
P16	10
P17	50
P18	50
P19	100
P20	100
P21	50
P22	50
P23	50

Tabela 2 – Concentração (ng/µl) das amostras de DNA obtidas a partir do tecido foliar

Fonte: O autor.

4.2 Análise da amplificação *in vitro* por RAPD

A presença e ausência de bandas amplificadas por cada marcador pode ser observada na Tabela 4 e nas Figuras 6 a 22.

As reações de amplificação realizadas apontaram a formação de bandas por todos os *primers* selecionados para o estudo. Entretanto, nem todos os *primers* amplificaram todas as amostras: algumas amostras não apresentaram produtos de amplificação. Do n amostral de 20 indivíduos provenientes da população de Cabo Frio, somente 14 foram amplificados (Tabela 5).

É interessante observar que o indivíduo P23 foi o indivíduo com os menores valores de amplificação em detrimento dos *primers* que o reconheceram (somente 3), seguido pelos indivíduos P19 e P10, respectivamente (Tabela 4).

O indivíduo P22 foi amplificado por 11 dos 12 *primers* aplicados e o restante apresentou bandas amplificadas por todos os 12 *primers* utilizados no estudo. O indivíduo P6 só não foi amplificado pelo *primer* OPU-02. O mesmo foi observado para o indivíduo P7 em relação ao *primer* OPA-10 e o indivíduo P8 em relação ao *primer* OPC-05. Esses resultados apontam principalmente o caráter de arbitrariedade presente nos marcadores de RAPD (Tabela 4).

O indivíduo P10 apresentou amplificação somente por 4 *primers*, enquanto os indivíduos P19 e P23 foram amplificados somente por 3 marcadores cada. Dos 17 indivíduos analisados, 10 apresentaram resultado positivo de amplificação por todos os 12 *primers* selecionados (Tabela 4).

Os indivíduos P11, P13, P14, P15, P16 e P17 não foram amplificados por nenhum *primer* conforme explicitado anteriormente. Logo, não foram considerados para as análises posteriores (Tabela 5).

Em relação à população de Arraial do Cabo, três indivíduos somente (P21, P22 e P23) foram amplificados por questões de logística e tempo, frente ao cenário de pandemia do novo coronavírus. Os outros 17 indivíduos restantes da população foram coletados e triados, mas por falta de tempo hábil, não puderam ser extraídos, amplificados e submetidos às análises moleculares.

Primer														
Amostra	OPA-10	OPA-11	OPAZ-03	OPAZ-04	OPBA-03	OPBA-05	OPBA-07	OPBA-08	OPL-07	OPU-02	OPC-05	RAn1	Positivo	Negativo
P1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	0
P2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	0
P3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	0
P4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	0
P5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	0
P6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	11	1
P7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	1
P8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	11	1
P9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	0
P10	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	5	7
P12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	0
P18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	0
P19	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	4	8
P20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	0
P21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	0
P22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	11	1
P23	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	3	9
Positivo	15	14	15	15	15	15	15	15	16	12	14	15	n/n	n/n
Negativo	2	3	2	2	2	2	2	2	1	5	3	2	n/n	n/n

Tabela 3 – Relação de presença x ausência na amplificação pelos primers selecion

4.3 Análise da compilação dos perfis de bandas

A partir da etapa de detecção e compilação dos perfis de bandas foi possível identificar os diferentes *loci* gerados por marcador, com base no padrão de peso molecular utilizado para as reações, além do fornecimento de informações gráficas acerca dos intervalos de pico de cada banda detectada e das funções exponenciais da mobilidade relativa das bandas para gel analisado.

As informações gráficas geradas apresentam os valores estimados, pelo programa, para o peso molecular de cada banda com base no padrão de peso molecular utilizado. Cabe ressaltar que as corridas de eletroforese foram realizadas na relação indivíduo por *primer* (Figuras 6 a 22).

Figura 6 - A: gel de RAPD; A.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; A.2: pico de detecção de cada banda; A.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P1.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 7 - B: gel de RAPD; B.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; B.2: pico de detecção de cada banda; B.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P2.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 8 - C: gel de RAPD; C.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; C.2: pico de detecção de cada banda; C.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P3.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 9 - D: gel de RAPD; D.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; D.2: pico de detecção de cada banda; D.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P4.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 10 - E: gel de RAPD; E.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; E.2: pico de detecção de cada banda; E.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P5.



R² = 0,998

Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 11 - F: gel de RAPD; F.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; F.2: pico de detecção de cada banda; F.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P6.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 12 - G: gel de RAPD; G.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; G.2: pico de detecção de cada banda; G.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P7.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 13 - H: gel de RAPD; H.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; H.2: pico de detecção de cada banda; H.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P8.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 14 - I: gel de RAPD; I.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; I.2: pico de detecção de cada banda; I.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P9.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 15 - J: gel de RAPD; J.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; J.2: pico de detecção de cada banda; J.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P10.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 16 - K: gel de RAPD; K.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; K.2: pico de detecção de cada banda; K.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P12.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 17 - L: gel de RAPD; L.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; L.2: pico de detecção de cada banda; L.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P18.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 18 - M: gel de RAPD; M.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; M.2: pico de detecção de cada banda; M.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P19.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 19 - N: gel de RAPD; N.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; N.2: pico de detecção de cada banda; N.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P20.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 20 - O: gel de RAPD; O.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; O.2: pico de detecção de cada banda; O.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P21.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 21 - P: gel de RAPD; P.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; P.2: pico de detecção de cada banda; P.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P22.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

Figura 22 - Q: gel de RAPD; Q.1: detecção das bandas pelo padrão de peso molecular evidenciando 14 bandas de 1000 a 50 pb; Q.2: pico de detecção de cada banda; Q.3: função exponencial prevendo o tamanho de cada banda do peso molecular (Rf). Indivíduo P23.



Legenda: Géis analisados em contraste com suas respectivas detecções de bandas, gráficos de pico e função exponencial da mobilidade relativa (Rf) para cada marcador.

4.4 Avaliação dos índices de diversidade genética

Os índices de diversidade (Tabela 5) expostos apresentaram alguns valores significativos no que diz respeito à presente análise. Dos 12 *primers* analisados, todos apontaram a presença de polimorfismos de DNA e apresentaram também presença de amplificação nas amostras em questão. Em relação ao tamanho amostral (índice **n**), o *primer* OPU-02 foi o que apresentou o menor valor (presença de amplificação em 12 do total de 17 indivíduos), enquanto os marcadores OPA-10, OPAZ-03, OPAZ-04, OPBA-03, OPBA-05, OPBA-07, OPBA-08, OPL-07 e RAn-1 amplificaram o maior número de amostras. Nenhum dos 12 *primers* analisados apresentou resultado de amplificação para as 17 amostras deste estudo. Em relação ao número total de *loci* (marcadores) amplificados (índice **L**), o *primer* OPL-07 foi o que gerou o maior número (L_{OPL-07} = 21), enquanto OPBA-05 e OPBA-08 geraram os menores (L_{OPBA-05;OPBA-08} = 8 para ambos). Foram gerados um total de 132 *loci* a partir dos 12 *primers* analisados.

Quanto à proporção de *loci* (marcadores) únicos (índice α), índice que representa os alelos amplificados em somente um único indivíduo, os *primers* OPBA-05 e OPBA-07 foram os que apresentaram os maiores índices ($\alpha_{OPBA-05; OPBA-07} = 0,125$), enquanto OPL-07 apresentou o menor ($\alpha_{OPL-07} = 0,047$), conforme o esperado. Já em relação à proporção de *loci* (marcadores) polimórficos (índice β), os *primers* OPA-11, OPBA-05, OPBA-08, OPL-07, OPU-02 e OPC-05 apresentaram as maiores frequências ($\beta = 1$ para todos), enquanto OPAZ-04 foi o marcador com a menor frequência ($\beta_{OPAZ-04} = 0,777$). Foi gerado um total de 866 alelos amplificados (índice **A**). OPL-07 foi o marcador que mais gerou bandas ($A_{OPL-07} = 111$), representando 12,5% do total de alelos positivos observados. Já OPU-02 foi o marcador com o menor número de bandas geradas ($A_{OPU-02} = 43$), representando 4,8% do total.

Quanto ao número médio de alelos amplificados (bandas) por *loci* (índice **a**), o *primer* OPAZ-04 apresentou o maior valor ($a_{OPAZ-04} = 9,8$), enquanto OPU-02 apresentou o menor ($a_{OPU-02} = 3,9$). É interessante observar que mesmo que o *primer* OPL-07 tenha sido o marcador que mais gerou *loci*, esse valor não refletiu no número de alelos amplificados por cada loco.

A proporção de bandas informativas (índice γ), representada pela informação genética relacionada à alelos amplificados por *loci* (marcadores) polimórficos somente, teve o *primer* OPL-07 como representante de maior valor ($\gamma_{OPL-07} = 0,990$). Já OPBA-07 foi o *primer* que apresentou a menor proporção de bandas informativas ($\gamma_{OPBA-07} = 0,764$).

Quanto à heterozigosidade média estimada (índice **H***), OPU-02 foi o *primer* mais expressivo ($H^*_{OPU-02} = 0,384$), enquanto OPAZ-04 mostrou o menor valor relativo ($H^*_{OPAZ-04}$

= 0,213). Para os valores de informação polimórfica (PIC), o *primer* RAn-1 foi o que apresentou o maior valor, indicando o maior nível de polimorfismo encontrado comparativamente aos outros *primers* (PIC_{*RAn-1*} = 0,3556). Os valores do PIC podem variar de 0 a 1 e quanto maior for (mais próximo de 1), maior é a frequência de reprodução do alelo para o dado marcador. Em contrapartida, OPAZ-04 foi o marcador que apresentou os menores valores de informação polimórfica (PIC_{OPAZ-04} = 0,1995).

Em relação ao MI (índice de marcador), o *primer* OPL-07 foi o que apresentou os maiores índices (MI_{OPL-07} = 5,972), ao passo que OPAZ-04 foi apontado com o menor (MI_{OPAZ-04} = 1,086). Já para os valores de Rp (poder de resolução) de cada marcador, o *primer* OPL-07 apresentou o maior valor (Rp_{OPL-07} = 8,667), enquanto OPBA-05 e OPBA-07 apresentaram os menores valores respectivamente (Rp_{OPBA-05}; $_{OPBA-07}$ = 2,133). As informações relativas ao status dos marcadores, o número de bandas geradas por cada *loci*, o status da cada banda, o cálculo estimado da frequência de alelos amplificados (p), da frequência de alelos nulos e o quadrado destes (p² e q²), além dos valores referentes à informatividade das bandas para cada *loci* gerado, podem ser visualizadas no Apêndice C.

Primer	n	L	α	β	Α	a	γ	H*	PIC	MI	Rp
OPA-10	15	10	0,100	0,900	64	6,4	0,765	0,310	0,290	2,347	3,867
OPA-11	14	9	0,111	1,000	62	6,8	0,774	0,283	0,263	2,367	3,143
OPAZ-03	15	11	0,090	0,909	102	9,2	0,852	0,296	0,276	2,513	4,933
OPAZ-04	15	9	0,111	0,777	89	9,8	0,988	0,213	0,200	1,086	2,533
OPBA-03	15	12	0,083	0,916	67	5,5	0,776	0,285	0,267	2,689	4,267
OPBA-05	15	8	0,125	1,000	49	6,1	0,979	0,245	0,229	1,831	2,133
OPBA-07	15	8	0,125	0,875	68	8,5	0,764	0,226	0,211	1,293	2,133
OPBA-08	15	12	0,083	1,000	88	7,3	0,988	0,306	0,286	3,431	4,533
OPL-07	15	21	0,047	1,000	111	5,2	0,990	0,324	0,284	5,972	8,667
OPU-02	12	11	0,090	1,000	43	3,9	0,976	0,384	0,352	3,875	5,833
OPC-05	14	10	0,100	1,000	51	5,1	0,980	0,317	0,295	2,949	4,143
RAn-1	15	11	0	0,909	72	6,5	0,791	0,380	0,356	3,233	6,000

Tabela 4 – Índices estatísticos de diversidade genética estimados para cada primer (cont.)

Legenda: n: tamanho amostral; #L: número total de *loci* (marcadores) amplificados; α: proporção de *loci* únicos; β: proporção de *loci* (marcadores) polimórficos; A: número total de alelos amplificados; a: média de bandas por *loci*; γ: proporção de bandas/alelos informativas(os); H*: heterozigosidade média; PIC: conteúdo de informação polimórfica; MI: índice de marcador; Rp: poder de resolução do marcador. Ver item 3.6 para mais detalhes.
4.5 Análise de agrupamento

As matrizes com os valores do coeficiente de similaridade e da distância Jaccard podem ser vistas nos Apêndices D e E. Em relação à distância, foi possível observar que a maior distância genética estimada se encontra entre os indivíduos P7 e P1. Em contrapartida, o menor valor de distância foi apontado entre os indivíduos P1 e P4.

A análise de agrupamento feita a partir da distância Jaccard, para fins de análise da distância genética global, é mostrada na Figura 23. O agrupamento hierárquico gerou 13 *clusters* baseados na dissimilaridade genética entre os indivíduos. Nesta, é possível observar que indivíduos coletados de moitas localizadas geograficamente mais afastadas umas das outras, apresentaram um alto valor de similaridade genética (como, por exemplo, os indivíduos P9 e P18, cujas moitas se encontravam afastadas uma da outra.

O mesmo foi observado para os indivíduos P12 e P20, conforme aponta o dendrograma. Além disso, pode-se observar os agrupamentos entre os pares de indivíduos P1 e P2, P3 e P4 e P6 e P8, dada a alta similaridade genética entre os mesmos. Além disso, foi observado também altos valores de similaridade entre os indivíduos P1 e P2 ($s_J = 0,6707$), P3 e P5 ($s_J = 0,6623$), P2 e P4 ($s_J = 0,6341$), P1 e P3 ($s_J = 0,6368$), P3 e P6 ($s_J = 0,6250$), P2 e P3 ($s_J = 0,6234$), P9 e P18 ($s_J = 0,6232$), P6 e P8 ($s_J = 0,6190$), P9 e P18 ($s_J = 0,6232$), P4 e P5 ($s_J = 0,6118$), P6 e P8 ($s_J = 0,6190$), P5 e P6 ($s_J = 0,6133$), P9 e P20 ($s_J = 0,6087$) e entre P1 e P6 ($s_J = 0,6026$) (Apêndice D).

Da população de Cabo Frio, os indivíduos P5 e P7 foram os únicos a não serem agrupados na hierarquia de duplas. Os indivíduos P7 e P22 foram apontados como os geneticamente mais distantes das outras amostras analisadas, com um alto suporte de *Boostrap*.

De modo contrário, as amostras P3 e P4 foram apontadas como as mais próximas geneticamente, muito embora a distância genética entre elas tenha sido relativamente elevada $(d_J = 0,2949)$, em contraste com o maior valor de distância genética observado entre os indivíduos P7 e P8 ($d_J = 0,6951$). A distância genética também foi observada com alto valor entre os indivíduos P2 e P7 ($d_J = 0,6067$), P7 e P12 ($d_J = 0,6203$), P7 e P18 ($d_J = 0,6279$) e entre P7 e P6 (0,6220).

As análises de agrupamento usando distâncias genéticas locais, i.e., com base no *loci* gênicos observados em cada primer de RAPD individualmente, podem ser vistas no Apêndice D.

Figura 23 – Dendrograma hierárquico da distância genética global entre as amostras de *Chrysobalanus icaco* L. A análise de agrupamento foi conduzida através do método UPGMA usando a distância Jaccard pareada obtida a partir da matriz binária de alelos amplificados e nulos de todos os *loci* amplificados por RAPD



Legenda: Os indivíduos com fonte de cor vermelha representam os provenientes da população de Cabo Frio, e os azuis, de Arraial do Cabo. Números na base dos ramos representam o *bootstrap*. Fonte: o autor

DISCUSSÃO

Neste trabalho, a extração de DNA de C. icaco revelou-se uma etapa complicada, na medida em que a presença de impurezas e substâncias fenólicas, que surgem de forma inerente ao processo de extração, impediu a amplificação na primeira etapa do trabalho. Após tentativas de extração de DNA baseadas em outros protocolos com uso de CTAB e MATAB (DOYLE & DOYLE, 1990; LANZA et al., 1997), foi necessária realização de ajustes no protocolo escolhido (HEALEY et al., 2014) para a obtenção de DNA de qualidade e amplificável pela técnica de RAPD. É importante ressaltar que o desenvolvimento e a aplicação de marcadores moleculares dependem da disponibilidade de DNA com alta pureza e concentração suficiente (MARSAL et al., 2013), principalmente em estudos de diversidade genética. A etapa de extração de DNA pode apresentar entraves por conta de muitos fatores relacionados não só à automatização dos protocolos, mas também a aspectos genéticos e fisiológicos da espécie vegetal. C. icaco é uma espécie lenhosa e, como tal, armazena grandes quantidades de compostos fenólicos e polissacarídeos no tecido foliar, dificultando a extração de DNA genômico pelos métodos usados tradicionalmente (KRIŽMAN et al. 2006; TIBBITS et al. 2006). Diversos critérios são importantes na hora de se escolher a metodologia de análise da diversidade genética intra ou interpopulacional, como, por exemplo, a interação entre os genótipos e o meio ambiente no qual estão inseridos (CHESNOKOV e ARTEMYEVA, 2015).

O RAPD se mostrou um marcador adequado e eficiente para a proposta de avaliação da variabilidade intrapopulacional pois, além da facilidade de automatização e rapidez de processamento, requer quantidades mínimas de material genético e possibilita a detecção de alterações pontuais na molécula de DNA, amplificando tanto regiões repetitivas, como genes, sendo, por essa razão, considerado altamente polimórfico e especialmente adequado à análise de indivíduos com baixa divergência genética (WILLIANS et al., 1993). Além disso, é uma técnica de baixo custo relativo (SANTOS, 1998; CONTI et al., 2002).

Entretanto, RAPDs são marcadores dominantes, e o fato do polimorfismo ser de natureza binária, não detectando o heterozigoto, não permite a análise de parentesco entre organismos diploides pelo cálculo das frequências alélicas. Esse fato, que denota uma limitação do RAPD para análises filogenéticas, por outro lado, é uma característica muito adequada à aquisição de dados e automatização dentro da sistemática binária dos ambientes computacionais (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998). Dados de RAPD requerem tratamento estatístico apropriado, como matrizes binárias, a partir das quais são calculados os coeficientes de similaridade (BUSO et al., 2009). Neste contexto a técnica de RAPD é, ainda hoje, uma das

mais adequadas para caracterização de bancos de germoplasma e para a análise da diversidade genética em populações naturais (DILIPAN et al., 2016; SHIFDAR et al., 2018; ALMEIDA NETO et al., 2019). Além disso, a reprodutibilidade presente na técnica de RAPD é um prérequisito determinante para a utilização de dados estimativos sobre identificação da variabilidade genética (VIRK et al., 1995).

Não foram encontrados, na literatura disponível, trabalhos sobre a diversidade genética recuperada por marcadores RAPD para espécies de *Chrysobalanus*, tampouco em outros gêneros da família Chrysobalanacea. Neste trabalho foram usados 12 *primers*, dos quais 5 detectaram o nível de polimorfismo visualizado entre os indivíduos.

Muitos pesquisadores têm usado essa técnica para estudos de diversidade intrapopulacional em diferentes famílias e espécies (IQBAL et al., 1997; JUN et al., 1997; DWIVEDI et al., 2001; RAM et al., 2008; CUI et al., 2017; BAJPE et al., 2018;). Assim, Barros e colaboradores (2005) analisaram a variabilidade genética de *Stylosanthes macrocephala* usando 161 *primers* e verificaram alta variabilidade entre os acessos, com valores de distância genética variando entre 0,02 e 0,42. Pessanha e colaboradores (2011) avaliaram a diversidade genética em acessos de *Psidum* spp. com 28 *primers* e observaram alta taxa de diversidade com a presença de mais de 95% de polimorfismo. Os marcadores RAPD também foram corroborados por Gomes Filho e colaboradores (2010), afirmando que OPA-03, OPA-05, OPA-10, OPA-12 e OPC-19 são os marcadores mais indicados para estudos de diversidade genética em goiabeiras, por apresentarem maiores taxas de polimorfismos.

Em relação aos mecanismos de reprodução e dispersão, Kamada e colaboradores (2009) analisaram a diversidade genética de 4 populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.), em localidades distintas, com 67 *primers* de RAPD e observaram que três das populações apresentaram baixos índices de diversidade por possuírem o mesmo modo reprodutivo. De forma contrária, ao contrastar este resultado com os resultados desta presente pesquisa, é interessante observar que as moitas de *C. icaco* amostradas (bem próximas entre si) não apresentaram níveis baixos de polimorfismo intrapopulacional, em decorrência, provavelmente, do seu modo reprodutivo (dispersão das sementes por polinização).

Gois e colaboradores (2014), ao avaliarem a variabilidade genética em populações naturais de *Ziziphus joazeiro* por meio de 20 *primers* de RAPD, identificaram polimorfismo numa taxa de 58 a 66%, com similaridade genética de 44 a 54% e concluíram que essa similaridade genética não estava correlacionada com a distância geográfica. De similar modo, em paralelo com os resultados do presente trabalho, é possível hipotetizar que a distância

geográfica entre as moitas de *C. icaco* também não representou um entrave para que houvesse o nível de diversidade genética encontrado.

Gajera e colaboradores (2010) avaliaram a diversidade genética presente em *Ricinus communis* L. usando 200 *primers* de RAPD e observaram taxas de 80% de polimorfismo. Os *primers* utilizados pelos autores neste e nos trabalhos citados anteriormente corroboram a ampla utilização do RAPD para o levantamento e a análise da diversidade genética em populações, acessos e genótipos.

Uma questão importante a ser discutida nessa linha é a reprodução e propagação desta espécie em ambientes de restinga, como as amostras usadas neste trabalho. Os resultados mostraram que a estratégia de coletar as folhas de um único ramo por moita avaliada, permitiu selecionar os indivíduos oriundos de sementes, em detrimento dos indivíduos clonais, que são comuns na composição das moitas (WILLIAMS, 2007; ARAÚJO e PEREIRA, 2009; BROWN e COOPRIDER, 2011). Por tal motivo, não foi observado nenhum traço de clonalidade entre os indivíduos analisados. Ainda assim, informações sobre a origem dessas moitas presentes na restinga da Região dos Lagos, são escassas. As moitas observadas apresentam um aspecto denso e numeroso de ramos e folhas, não sendo possível afirmar se uma moita equivale a apenas um indivíduo ou se uma moita pode ser constituída por indivíduos diferentes. Vale ressaltar que, durante a amostragem, não foi observado um número alto de moitas de *C. icaco*, mas sim, um número reduzido em comparação com outras espécies vegetais presentes na área.

Os resultados obtidos após as análises genéticas de dissimilaridade entre as amostras indicaram a presença de variabilidade intraespecífica para os indivíduos analisados, inclusive entre indivíduos provenientes das duas populações. A partir da análise de agrupamento, foi possível observar que os valores obtidos de distância genética entre as amostras agrupadas podem refletir o comportamento dispersivo adotado pela espécie. É sabido pela literatura que espécies de *C. icaco* ocorrentes de restinga apresentam mecanismos para evitar autofecundação, o que pode, possivelmente, explicar também o nível de diversidade genética observado (SÁ e LOCATELLI, 2012).

Os indivíduos presentes numa mesma moita estão relacionados por um certo nível de parentesco genético (podendo ter sido gerados através de sementes de uma única planta), possivelmente fazendo com que os valores de heterozigosidade média observada tenham sido baixos. Ainda assim, através dos resultados obtidos pelos índices de diversidade genética observada, é possível afirmar que esses indivíduos não estão nem próximos de serem clones, mesmo com baixos valores de heterozigosidade média observada e alta similaridade de Jaccard. Uma hipótese para explicar a presença da alta variabilidade genética poderia ser algum fator de

resistência presente nas plantas da área, como por exemplo, resistência a eventos de variação ambiental.

Infelizmente, a impossibilidade de continuar o trabalho durante a quarentena imposta pela pandemia de Coronavírus, há mais de oito meses, impediu que as análises relativas ao restante das 17 amostras provenientes da população de Arraial do Cabo fossem realizadas, o que enriqueceria os valores de diversidade genética em populações de *C. icaco* da Região dos Lagos do Rio de Janeiro. Em relação à região de Cabo Frio, a variabilidade observada em indivíduos presentes nas diferentes moitas indica que não há limitações para o que se conservar, em relação às áreas amostradas. Algumas estratégias conservacionistas, como a conservação *in vitro*, representada pela cultura de tecidos vegetais ou pela criopreservação, podem ser viáveis para auxiliar a recuperação e conservação da variabilidade genética relacionada ao potencial medicinal de *C. icaco*, através da seleção de genótipos com elevada produção de metabólitos (THAKUR et al., 2016).

Por outro lado, a conservação *in situ* seria a melhor aliada na conservação não somente da diversidade da espécie, mas também do meio no qual ela se insere. Embora algumas áreas da Região dos Lagos já constituam áreas de preservação, as estratégias de conservação de restingas ainda precisam ser elaboradas em níveis microssistêmicos (a nível de espécie) e macrossistêmicos (a nível de habitats, populações e comunidades) para garantir o sucesso desta estratégia.

CONCLUSÕES

- Foi estabelecido um protocolo eficiente de extração de DNA para o estudo da variabilidade intraespecífica nas populações de *Chrysobalanus icaco* L. estudadas;
- A técnica de RAPD foi adequada à avaliação da variabilidade genética intraespecífica de *Chrysobalanus icaco* L.
- A variabilidade genética nas amostras das populações analisadas foi elevada, apesar da heterozigosidade média ter sido relativamente baixa, se comparada com outros trabalhos da literatura;
- A presença de polimorfismos intraespecíficos nas populações estudadas, foi compatível com o mecanismo de propagação cruzada;
- A metodologia de coleta possibilitou que todos amostras de indivíduos analisados fossem oriundos a partir de sementes, já que não foram detectados clones, através das análises moleculares;
- A análise do grau de semelhanças e diferenças genéticas intrapopulacionais mostrou a dissimilaridade entre as amostras, indicando a presença de uma alta variabilidade intraespecífica em relação aos indivíduos selecionados na população da região amostrada.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se que seja possível a continuidade dos estudos sobre a diversidade populacional de indivíduos de *Chrysobalanus icaco*, a partir da análise de marcadores moleculares. Ainda, espera-se utilizar do *barcoding* como ferramenta de análise e estudo molecular e abranger os sítios e coleta para além do estado do Rio de Janeiro, aumentando assim o escopo da diversidade obtida e esperada.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JONHSON, A.; LEWIS, J.; ROBERTS, K.; WALTER P.; RAFF, M. Biologia Molecular da Celula. 5 ed. ArtMed: 2011, p. 545.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports.** v. 27, n. 4, p. 617-631, 2008.
- AGUIAR, T. M. Caracterização química e física de folhas, frutos e sementes do bajuru (Chrysobalanus icaco L) e avaliação do chá dessas folhas em camundongos (swiss) normais e diabéticos. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.
- AGUIAR, T. M.; SABAA-SRUR, A. U. O.; SAMICO, G. F. Potencial nutritivo e características físicas e químicas do abajerú. Pesq. Agropec. Trop. Goiânia. v. 41, p. 102-109, 2011.
- ALMEIDA NETO, J. X.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; SILVA, A. P. G. Genetic diversity among and within brave bean (*Capparis flexuosa* L.) populations assessed using RAPD markers. **Rev. Caatinga.** v. 32, n. 1, p. 81-91, 2019.
- AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J. R. Melhoramento de plantas: variabilidade genética, ferramentas e mercado. Proimpress: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas. 100p. Brasília/DF, 2018.
- ANBALAGAN, S.; BHARATHIRAJA, C.; PANDIARAJAN, J.; DINAKARAN, S; KRISHNAN, M. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to study genetic diversity within a population of blackfly, *Simulium gravelyi* from Palni hills, peninsular India. **Biologia**. v. 67, n. 6, p. 1195-1203, 2012.
- ARAÚJO, D. S. D. Vegetation types of Sandy coastal plains of tropical Brazil: a first aproximation. In: SEELIGER, U. Coastal plant communities of Latin America. New York: Academic Press, p. 337-347, 1992.
- ARAÚJO, D. S. D.; SÁ, C. F. C.; FONTELLA-PEREIRA, J.; GARCIA, D. S.; FERREIRA, M. V.; PAIXÃO, R. J.; SCHNEIDER, S. M.; FONSECA-KRUEL, V. S. Área de Proteção Ambiental de Massambaba, Rio de Janeiro: Caracterização Fitofisionômica e Florística. Rodriguésia. v. 60, n. 1, p. 67-96, 2009.
- ARAÚJO, D. S. D.; PEREIRA, M. C. A. Sandy Coastal Vegetation. International Comission on Tropical Biology and Natural Resources. Encyclopedia of Life Support Systems. 2009.
- BAJPE, S. N.; BHARATI, T. R.; MARULASIDDASWAMY, K. M.; KUMARA, K. K, S.; PRAKASH, H. S.; KINI, R. K. Efficiency of RAPD, ISSR and ITS markers in detecting genetic variability among *Salacia* species sampled from the Western Ghats of Karnataka. **Molecular Biology Reports**. v. 45, p. 931-941, 2018.

- BARROS, A. M.; FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; SHIRASUCHI, L. S.; ANDRADE, R. P; LOPES, G. K. B. Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesq. Agropec. Bras.** v.40, n. 9, p. 899-909, 2005.
- BARBIERI, E. B. Flutuações climáticas em Cabo Frio. Revista do Departamento de Geografia da USP. v. 11, p. 95-112, 1997.
- BARBOSA, A. P. O.; SILVEIRA, G. O.; MENEZES, I. A. C.; REZENDE-NETO, J. M.; BITENCURT, J. L. C.; ESTAVAN, C. S.; LIMA, A. C. B.; THOMAZZI, S. M.; GUIMARÃES, A. G.; QUITANS-JÚNIOR, L. J.; SANTOS, M. R. V.; Antidiabetic effect of the *Chrysobalanus icaco L*. aqueous extract in rats. J. Med. Food. n. 16, p. 538-543, 2013.
- BARBOSA, W. L. R.; PERES, A.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 16, n. 3, p. 333-337, 2006.
- BINNECK, E., NEDEL, J. L.; DELLAGOSTIN, O. A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil? Revista Brasileira de Sementes. v. 24, n. 1, p. 183-196, 2002.
- BOHRER, C. B. A.; DANTAS, H. G. R.; CRONEMBERGER, F. M.; VICENS, R. F.; ANDRADE, S. F. Mapeamento da vegetação e do uso do solo no Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia. v. 60, n. 1, p. 1-23, 2009.
- BONNE, G. Sur la constituition du gynécée chez les Chrysobalanées. Acad. Sci. Paris. v. 182, p. 1404-1406, 1926.
- BRASIL. Decreto nº 9.529C, de 15 de dezembro de 1986. Cria a Área de Proteção Ambiental na Lagoa de Araruama e Praia de Massambaba (APA de Massambaba) e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**.
- BRECHEZ, F. A. S.; PENTEADO, P. Restinga: um ambiente bastante complexo. 2007. Disponível em: http://www.ib.usp.br/ecosteiros/textos_educ/restinga/index.htm. Acesso em: 12/01/2019.
- BRITO, M. F. M. A família Chrysobalanaceae R. Br no estado da Paraíba. Monografia -Bacharelado em Ciências Biológicas. 56f. João Pessoa, Paraíba. 2010.
- BROWN, A. H. D.; NEVO, E.; ZOHARY, D.; DAGAN, O. Genetic variation in natural population of wild barley (*Hordeum stenostachys*). Genetica. v. 49, p. 97-108, 1978.
- BROWN, S. H.; COOPRIDER, K. **The Institute of Food and Agriculture Sciences** (*IFAS*). Disponível em: http://lee.ifas.ufl.edu/hort/GardenHome.shtml>. 2011.
- BUSO, G. S. C.; YAMAGUISHI, A. T.; AZEVEDO, V. C. R.; LEÃO, D. A.; FERREIRA, M. A.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; MAZZUCATO, A. Manual de Utilização de Marcadores Moleculares para Análise de Diversidade Genética. EMBRAPA, 2009.

CARVALHO, A. S. R.; ANDRADE, A. C. S.; SÁ, C. F. C.; ARAUJO, D. S. D.; TIERNO, L. R.; FONSECA-KRUEL, V. S. Restinga de Massambaba: vegetação, flora, propagação e usos. Vertentes Edições. Rio de Janeiro, 2018.

CASTILHO R. O.; KAPLAN, M. A. C. Phytochemical study and antimicrobial activity of *Chrysobalanus icaco*. Chemistry of Natural Compounds, v. 47, n. 3, 2011.

- CHESNOKOV, Y. V.; ARTEMYEVA, A. M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. **Agricultural Biology**. v. 50, n. 5, p. 571-578, 2015.
- CLAIN, C.; DA SILVA, D.; FOCK, I.; VANIET, S.; CARMEILLE, A.; GOUSSET, C.; SIHACHAKR, D.; LUISETTI, J.; KODJA, H.; BESSE, P.; RAPD genetic homegeity and high levels of bacterial wilt tolerante in *Solanum torvum* Sw. (Solanaceae) accessions from Reunion Island. **Plant Sciente**. v. 166, n. 6, p. 1533-1540, 2004.
- CONTI, J. H.; MINAMI, K.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares do morangueiro por análise de RAPD. **Horticultura Brasileira**. v. 2, n. 2, p. 145-152, 2002.
- CORRÊA, M. M.; SCUDELLER, V. V.; ARAÚJO, M. G. P. Comparative leaf morphological analysis of 20 species of Chrysobalanaceae. Acta Amazonica. v. 45, n. 1, p. 13-20, 2015.
- COSTA, T. S.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S.; SANTOS, A. R. F.; JÚNIOR, J. F. S. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 46, n. 5, p. 499-508, 2011.
- CORADIN, L.; GIANNASI, D. E.; PRANCE, A. T. Chemosystematic studies in the Chrysobalanaceae: Flavonoids in Parinari. **Britton.** v. 37, n. 2, p. 169-178, 1985.
- CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B. C.; VIEIRA, L. G. E. Genetic diversity in Passion Fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, n. 4, p. 521-527, 2003.
- CUI, C.; LI, Y.; LIU, Y.; LI, X.; LUO, S.; ZHANG, Z.; WU, R.; LIANG, G.; SUN, J.; PENG, J.; TIAN, P. Determination of genetic diversity among *Saccharina* germplasm using ISSR and RAPD markers. **Comptes Rendus Biologies**. v. 340, p.76-86, 2017.
- CUTLER, D. F.; BOTHA, T.; STEVENSON, D. S. Anatomia vegetal: uma abordagem aplicada. 340p. Editora Artmed, Porto Alegre. Rio Grande do Sul, 2011.DAHLGREN, R. M. T. A revised system of classification of the angiosperms. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 80, n. 2, p. 91-124, 1980.
- DEAN, W. A ferro e fogo: A história e a devastação da mata atlântica brasileira. São Paulo: Companhia das Letras, 1996.
- DE PAULO, S. A.; BALASSIANO, I. T.; SILVA, N. H.; CASTILHO, R. O.; KAPLAN, M. A. C.; CABRAL, M. C.; CARVALHO, M. G. *Chrysobalanus icaco* L. extract for antiangiogenic potential observation. **Int. J. Mol. Med.** v. 5, p. 667-669, 2000.

- DE RIEK, J.; CALSYN, E.; VAN BOCKSTAELE, E.; LOOSE, M. D. AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. **Theor. Appl. Genet.** n. 103, p. 1254-1265, 2001.
- DILIPAN, E.; PAPENBROCK, J.; THANGARADJOU, T. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints evidencing high genetic variability among marine angiosperms of India. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. v. 6, p. 1-9, 2016.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus (Madison). v. 12, p. 13-15, 1990.
- DWIVEDI, S. L.; GURTU, S.; CHANDRA, S.; YUEJIN, W.; NIGAM, N. Assessment of genetic diversity among selected groundnut germplasm - I: RAPD analysis. Plant Breeding. v. 120, p. 345-349, 2001.
- EL-DOMYATI, F. M.; YOUNIS, R. A.; EDRIS, S.; MANSOUR, A.; SABIR, J.; BAHIELDIN, A. Molecular markers associated with genetic diversity of some medicinal plants in Sinai. J. Med. Plant. v. 5, n. 10, p. 1918-1929, 2011.
- EL OTTA, J. H. L.; PIRANI, J. R.; PRANCE, G. T. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Chrysobalanaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**. n. 26, p. 155-160, 2008.
- FALEIRO, F. G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. M. R.; REIS JÚNIOR, F. B. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 54-118, 2011a.
- FALEIRO, F. G. Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 31-52, 2011b.
- FEITOSA, E. A.; XAVIER, H. S.; RANDAU, K. P. Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Rev. Bras. Farmacogn. v. 22, n. 5, p. 1181-1186, 2012.
- FERNANDES, J., CASTILHO, R. O.; COSTA, M. R.; SOUSA, K. W.; KAPLAN, M. A. C.; GATTAZZ, C. R. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. Cancer Letters. n. 190. p. 165-169, 2003.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília. Embrapa-Cenargen. 1998.

- FERREIRA-MACHADO, S. C.; RODRIGUES, M. P.; NUNES, A. P. M.; DANTAS, F. J. S.; MATTOS, J. C. P.; SILVA, C. R.; MOURA, E. G. BEZERRA, R. J. A. C.; CALDEIRA, A. A. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco L*. leaves. **Toxicol. Lett.** v. 151, p. 481-487, 2004.
- FERREIRA-MACHADO, S. C.; GAGLIARDI, R. F.; NUNES, A. P. M.; RODRIGUES, M. P. DANTAS, F. J. S.; MATTOS, J. C. P.; PEREGRINO, C. A. F.; MOURA, E. G.; CALDEIRA, A. A. Antidiabetic and genotoxic effectz on Wistar rats treated with aqueous extract from *Chrysobalanus icaco* L. J. Med. Plants. Res. n. 8, p. 52-57. 2014.
- FISHER, R. A. The Genetical Theory of Natural Selection. **Oxford University Press**, Oxford. 1930.
- FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na reserva extrativista marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. Acta Botânica Brasileira. Porto Alegre, v. 18, n. 1, p. 177-190, 2004.
- FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A. L.; SÁ, C. F. C.; ARAÚJO, D. S. D.; SILVA, W. L.; FERREIRA, A. J. Plantas úteis da restinga: o saber dos pescadores artesanais de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2006.
- FRANCIS, J. Chrysobalanus icaco L. coco-plum. Forest Service of United Estates Department of Agriculture (USDA). 2003.
- FRANK, M. S.; BROWN, S. H. Cocoplum (*Chrysobalanus icaco* L.) identification and uses. UF/IFAS Plant Identification and Information Service. University of Florida: Herbarium Extension. Gainesville, 2018.
- FREITAS, T.; LOCATELLI, E. Ecologia da polinização de *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae): uma espécie fixadora de dunas. In: Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil. p. 1-3, 2009.
- FRITSCH, P.; RIESEBERG, L. H. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. *In:* SMITH, T. B.; WAYNER, R. K. Molecular genetic approaches in conservation. Oxford University Press, p. 54-73. New York. 1996.
- GAJERA, B. B.; KUMAR, N.; SINGH, A. S.; PUNVAR, B. S.; RAVIKIRAN, R.; SUBHASH, N.; JADEJA, G. C. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. Industrial Crops and Products. v. 32, p. 491-498, 2010.
- GIULIETTI, A. M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M. J. G.; QUEIROZ, L. P.; SILVA, J. M. C. Plantas raras do Brasil. 498p. Conservação Internacional, Universidade Estadual de Feira de Santana. 2009.
- GOIS, I. B.; FERREIRA, R. A.; SILVA-MANN, R.; PANTALEÃO, S. M.; GOIS, C. M.; OLIVEIRA, R. S. C. Variabilidade genética em populações naturais de *Ziziphus joazeiro* Mart., por meio de marcadores moleculares RAPD. Revista Árvore. v. 38, n. 4, p. 621-630, 2014

- GOMES FILHO, A. OLIVEIRA, J. O.; VIANA, A. P.; SIQUEIRA, A. P. P.; OLIVEIRA, M. G.; PEREIRA, M. G. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.) Acta Scientiarum Agronomy. v. 32, n. 4, p. 627-633, 2010.
- GUIMARÃES, A. P. M. Avaliação da estabilidade genética de plantas de berinjela (Solanum melongena) obtidas por diferentes mecanismos de regeneração in vitro. 2007. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2007.
- GUSTAFSON, K. R.; MUNRO, M. H. G.; BLUNT, J. W.; CARDELLINA II, J. H.; MCHAMON, J. B.; GULAKOWSKI, R. J.; CRAGG, G. M.; COX, P. A.; BRINEN, L. S.; CLARDY, J.; BOYD, M. R. HIV inhibitory natural products. 3 diterpenes from *Homalanthus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco*. **Tetrahedron**. v. 26, n. 47, p. 4547-4554, 1991.
- HADRYS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology.** v. 1, p. 55-63, 1992.
- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontol Electron.** v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- HARGROVE, E. C. **Religion and Environmental Crisis**. University of Georgia Press. Athens. 1986.
- HEMSING, P. K. B.; ROMERO, R. Chrysobalanaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**. v. 61. p. 281-288. 2010.
- HEALEY, A.; FURTADO, A.; COOPER, A.; HENRY, R. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. **Plant Methods**. v. 10, n. 21, 2014.
- HOLZER, W.; CRICHYNO, J.; PIRES, A. C. Sustentabilidade da urbanização em áreas de restinga: uma proposta de avaliação pós-ocupação. Paisagem Ambiente: ensaios. n. 19, p. 49-66, 2004.
- HU, J.; GAO, X.; LIU, J.; XIE, C.; LI, J. Plant regeneration from petiole callus of *Amorphophallus albus* and analysis of somaclonal variation of regenerated plants by RAPD and ISSR markers. **Botanical Studies**. v. 49, p. 189-197, 2008.
- HUFF, D. R.; PEAKAL, R.; SMOUSE, P. E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing bufalograss [*Butchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm]. Theor. Applied. Gen. v. 86, n. 8, p. 927-934. 1993.
- HUGHES, A. R.; INOUYE, B. D.; JOHNSON, N. U. VELLEND, M. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters**. v. 11, p. 609-623, 2008.

- IQBAL, M. J.; AZIZ, N.; SAEED, N. A.; ZAFAR, Y.; MALIK, K. A. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. **Theor. Appl. Genet.** v. 94, p. 139-144, 1997.
- JACCARD, P. Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles 37, 241-272, 1901.
- JÁUREGUI, D.; CARDOZO, A. Anatomía foliar de dos especies de Chrysobalanaceae presentes en el Parque Nacional Henri Pittier. Acta Botanica Venezuelica. v. 23, n.1, p. 9-18, 2000.
- JOSHI, K., CHAVAN, P.; WARUDE, D.; PARWARDHAN, B. Molecular markers in herbal drug technology. **Current Science**. v. 87, n. 2, p. 159-165, 2004.
- JUN, Y. H.; DAI, S. L.; WU, N. H. RAPD analysis of natural populations of *Acanthopanax* brachyp us. Cell Research. v. 7, p. 99-106, 1997.
- KAMADA, T.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; CRUZ, C. D.; VIEIRA, R. F.; OTONI,
 W. G. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.)
 Pedersen estimada por marcadores RAPD. v. 21, n. 3, p.403-409, 2009.
- KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K.V.; AYAD, W.G.; HODGKIN, T. Molecular tools in plant genetic resources conservation: A guide to the Technologies. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 1997.
- K' OPONDO, F. B. O.; RHEENEN, H. A.; MUASYA, R. M. Assessment of genetic variation of selected spiderplant (*Cleome gynandra* L.) morphotypes from western Kenya. African Journal of Biotechnology. v. 8, n. 18, p. 4325-4332, 2009.
- KRIŽMAN M.; JAKŠE, J.; BARIČEVIČ, D.;, JAVORNIK, B.; PROSEK M. Robust CTABactivated charcoal protocol for plant DNA extraction. Acta. Agric. Slov. v. 87, n. 2, p. 427-433, 2006.
- KUSTER, E. Die anatomischen Charakten der Chrysobalaneen, insbesondere ihre Kieselablagerungen. Bot. Centralbl. n. 69, p. 129-139, 1897.
- LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P. FILHO, J. P. L.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**. n. 3, v. 2, p. 87-92, 2002.
- LAKHANPAUL, S.; VELAYUDHAN, K. C.; BHAT, K. V. Analysis of genetic diversity in Indian taro *Colocasia esculenta* (L.) Schott] using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Genetic Resources and Crop Evolution. v. 50, n. 6, p. 603-609, 2004.
- LANZA, L. L. B.; SOUZA JUNIOR, C. L.; OTTOBONI, L. M. M.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, A. P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics. v. 94, p. 1023-1030, 1997.

- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- LORENZI, H. F. MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil, nativas e exóticas.** 1 ed. p. 544, São Paulo: Instituto Plantarum. 2002.
- LUBCHENCO, J.; OLSON, A. M.; BRUBAKER, S. R.; CARPENTER, M. M.; HOLLAND, S. P.; HUBBELL, S. A.; LEVIN, J. A.; MACMAHON, P. A.; MATSON, P. A.; MELILLO, .H .A; MOONEY, C. H.; PETERSON, H. R.; PULLIAM, L. A.; REAL, L. A.; REGAL, P. J.; RISSER, P. G. The sustainable biosphere initiative: An ecological research agenda. Ecology. v. 72, p. 371-412, 1991.
- MACHLINE, I. S. A. **Etnobotânica e a medicina popular em mercados na cidade do Rio de Janeiro.** Tese – Doutorado em Botânica. Instituto de Pesquisas Jardim Botânica do Rio de Janeiro, Escola de Botânica Tropical, 2008.
- MATOS, F. J. A. Plantas da medicina popular no nordeste. UFC Edições, 1999.
- MARSAL, G.; BORONAT, N.; CANALS, J. M.; ZAMORA, F.; FORT, F. Comparison of the efficiency of some of the most usual DNA extraction methods for woody plants in different tissues of *Vitis vinifera* L. J. Int. Sci. Vigne Vin. v. 47, n. 4, p.227-237, 2013.
- MILACH, S, C. K. Marcadores de DNA: aplicações no melhoramento de plantas. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. v. 1, n. 5, p. 14-17, 1998.
- NEWTON, A. C.; ALLNUTT, T. R.; GILLIES, A. C. M. LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Molecular phylogeography, intraespecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**. n. 14, p. 140-146, 1999.
- OFFEI, S. K.; ASANTE, I. K.; DANQUAH, E. Y. Genetic structure of seventy cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (Schott) accessions in Ghana based on RAPD. **Hereditas**. v. 140, n. 2, p. 123-128, 2004.
- OLIVEIRA, T. B.; CARVALHO-JUNIOR, C. H. R.; MOTA, F. V. B.; ARAÚJO, L. C. C.; MAIA, M. B. S.; RANDAU, K. P.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, T. G. Antiinflamatory and antinoceptive effects of the aqueous extract of the bark of *Chrysobalanus icaco* Linnaeus. Br. J. Pharm. Res. v. 4, p. 1253-1268, 2014.
- PARACAMPO, N. E. N. P. Fingerprinting e análise multivariada aplicados ao estudo de identidade e qualidade de fitoproduto de ajuru (*Chrysobalanus icaco Linnaeus*). 2017. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, 2017.
- PARACAMPO, N. E. E. P; OLIVEIRA, M. S. P.; PRANCE, G. T.; POPPI, R. J.; SILVA, J. A. F. Genetic fingerprinting of the Brazilian medicinal plant *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). Brazilian Journal of Development. v. 6, n. 11, p. 86190-86202, 2020.
- PERES, A. R. M. N. Caracterização farmacognóstica e avaliação antifúngica das folhas de *Chrysobalanus icaco* (Lin) em espécies de *Candida*. 2012. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, 2012.

- PESSANHA, P. G. O.; VIANA, A. P.; JÚNIOT, A. T. A.; SOUZA, R. M.; TEIXEIRA, M. C.; PEREIRA, M. G. Avaliação da diversidade genética em acessos de *Psidum* spp. via marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura. v. 33, n. 1, p. 129-136, 2011.
- PORT'S, P. S. P.; CHISTÉ, R. C.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. The phenolic compounds and the antioxidante potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. Food. Res. Int. v. 53, p. 875-881, 2013.
- POWEL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALKSJI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**. v. 2, p. 225-238, 1996.
- PRANCE, G. T. Monograph of Chrysobalanaceae. Flora Neotropica. v. 9, 1-406. 1972.
- PRANCE, G. T. Chrysobalanaceae. In: KUBITZKI, K. The families and genera of vascular plants: Flowering Plants - Eudicots Malpighiales. v. 11, Springer-Verlag, New York. 331p, 2014.
- PRANCE, G. T.; SOTHERS, C. Chrysobalanaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. INPA, Manaus. 816p, 1999.
- PRESTA, G. A.; FONSECA, A. S.; BERNARDO-FILHO, M. A *Chrysobalanus icaco* extract alters the plasmid topology and the effects of stannous chloride on the DNA of plasmids. **Rev Bras Farmacogn.** v. 17, p. 331-335, 2007.
- PREVOST, A.; WILKINSON, M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theor. Appl. Genet.** v. 98, p. 107-112, 1999.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. Biologia da Conservação. 1. ed. Londrina: Editora Planta, 2001.
- RIBEIRO, R. D.; LIMA, H. C. Riqueza e distribuição geográfica de espécies arbóreas da família Leguminosae e implicações para conservação no Centro Vegetal de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**. v. 1, p. 111-127, 2009.
- RIBEIRO, T. G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; FRANCA, J. R.; LAGE, P. S.; DUARTE, M. C.; ANDRADE, P. H. C.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; ARRUDA, A. L. A.; FARACO, A. A. G.; COELHO, E. A. F.; CASTILHO, R. O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Exp. Parasitol.** v. 143, p. 60-68, 2014.
- ROLDÁN-RUIZ, I.; DENDAW, J.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEPICKER, A.; DE LOOSE, M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasse (*Lolium* spp.). Molecular Breeding. v. 6, p. 125-134, 2000.
- ROUT, G. R.; DAS, P.; GOEL, S.; RAINA, S. S. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger show in random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Botanical Bulletin of Academia Sinica. v. 39, p. 23-27, 2006.

- SÁ, T. F. F.; LOCATELLI, E. Floral Biology and Pollination Ecology of *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae) in Environmental Protection Area (EPA) within the Restinga of Barra do Rio Mamanguape, Paraíba, Brazil. Brazilian Journal of Ecology. v. 01, p. 7/14-129, 2012.
- SANTANA, L. M.; RÊGO, F. A. O., SILVA, A. F. Características de frutos e morfológicas de plantas de guajuru (*Chrysobalanus iaco* L.) desenvolvidas no litoral paraibano. Revista Ceres. 47(270), p. 181-187, 2000.
- SANTOS, J. B. Emprego de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. Horticultura Brasileira. v. 12, n. 2, p. 282-286, 1998.
- SANTOS, F. R.; LACERDA, D. R.; REDONDO, R. A. F.; NASCIMENTO, A. M. A.; CHARTONE-SOUZA, E.; BORBA, E. L.; RIBEIRO, E. L.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Diagnóstico do Conhecimento sobre a Biodiversidade no Estado de Minas Gerais. Programa BIOTA MINAS. Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.
- SILVA, I. M.; PEIXOTO, A. L. O abajerú (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar.) comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 19, n. 1, p. 325-332, 2009.
- SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, v. 38, p. 1409–1438, 1958.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II. Nova Odesssa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.
- SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAUJO, A. J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: Simpósio de Recursos Genéticos do Semi-Árido. Petrolina: Embrapa Semiárido (in press), 1998.
- SEMAGM, K.; STEDJE. B., BJORNSTAD, A. Analysis of genetic diversity and structure in Ethiopian populations of *Phytolacca dodecandra* using RAPD. Hereditas, v. 135, p. 51-50, 2001.
- SCHNABEL, A.; BEERLI, P. ESTOUP, A. HILLIS, D. A guide to software packages for data analysis in molecular ecology. Advances in Molecular Ecology. Amsterdam: IOS Press, p. 291-303, 1998.
- SOTHERS, C. A.; PRANCE, G. T.; CHASE, M. W. Towards a monophyletic *Licania*: a new generic classification of the polyphyletic Neotropical genus *Licania* (Chrysobalanaceae). **Kew Bulletin**. v. 1, n. 68, 2016.
- SOUSA, V. F. Levantamento florístico e potencial ornamental de plantas da restinga do Rio Grande do Norte, Brasil: Subsídios para um paisagismo sustentável. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2016.

- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3 ed. São Paulo: Editora Plantarum. 2012.
- STEDJE, B.; BUKENYA-ZIRABA, R. RAPD variation in *Solanum anguivi* Lam. and *S. aethiopicum* (Solanaceae) in Uganda. **Euphytica**. v. 131, p. 293-297, 2003.
- SUMBRAMANIAN, V.; GURTU, S. NAGESWARA, R. C.; NIGAM, S. N. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Genome. v. 43, p. 656-660, 2000.
- THAKUR, J.; DWIVEDI, M. D.; SOURABH, P.; UNIYAL, P. L.; PANDEY, A. K. Genetic homogeneity revealed using SCoT, ISSR and RAPD markers in micropropagated *Pittosporum eriocarpum* Royle – and endemic and endangered medicinal plant. PLoS ONE. v. 11, n. 7, p.1-17, 2016.
- TIBBITS, J. F. G.; MCMANUS, L. J.; SPOKEVICIUS, A. V.; BOSSINGER, G. A rapid method for tissue collection and high-throughput isolation of genomic DNA from mature trees. **Plant. Mol. Biol. Rep.** v. 24, p. 81-91, 2006.
- VARGAS, C. E.; MENDES, M. F.; AZEVEDO, D. A.; PESSOA, F. L. P.; ULLER, A. C. Extraction of the essential oil of abajeru (*Chrysobalanus icaco*) using supercritical CO₂. J. Supercrit. Fluids. v. 54, p. 171-177, 2010.
- VARGAS, S. G. Icaco (*Chrysobalanus icaco L.*): análisis químico de flavonoides y propagación por estacas. 1998. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo Edo. de México, 1998.
- VARGAS-SÍMON, G.; MARES, F. M.; MARTÍNEZ, R. F. M.; SÁNCHEZ, A. S. Frutales Tropicales de Tabasco. 2^a ed. Villahermosa: Centro de Investigación de Ciencias Biológicas, 2000.
- VIEIRA, M. L. C.; FUNGARO, M. H. P.; JUBIER, M. F.; LEJEUNE, B. Determination of taxonomic relationships among Brazilian taxa of *Stylosanthes* Sw, Leguminosae, using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V. 32, p. 305-310, 1997.
- VIEIRA, I. C. G.; DA SILVA, J. M. C.; TOLEDO, P. M. Estratégias para evitar a perda de biodiversidade na Amazônia. **Estudos Avançados**. v. 19, n. 54, p.153-164, 2005.
- VIRK, P.; FORD-LLOYD, B. V.; JACKSON, M. T.; NEWBURY, H. J. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. **Heredity**. n. 74, p. 170-179, 1995.
- WHITE, P. A. S.; CERCATO, L. M. BATISTA, V. S.; CAMARGO, E. A.; LUCCA-JÚNIOR, W. OLIVEIRA, A. S.; SILVA, F. T.; GOES, T. C.; OLIVEIRA, E. R. A; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; SILVA, A. M. O.; QUITANS-JUNIOR, L. J.; LIMA, B. S.; ARAÚJO, A. A. S. SANTOS, M. R. V. Aqueous extract of *Chrysobalanus icaco* leaves, in lower doses, prevent fat gain in obese high-fat fed mice. J. Ethnopharmacol. v. 179, p. 92-100, 2016.

- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. RAFALSKI, J. A.; TINGREY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. Nucleic Acids Research. v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. S.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods in Enzymology. v. 218. p. 704-740, 1993.
- WILLIAMS, M. J. Native Plants for Coastal Dune Restoration: What, When, and How for Florida. USDA, NCRS, Brooksville Plant Materials Center, Brooksville, FL. 51p. 2007.
- WRIGHT, S. The relative importance of heredity and environment in determining piebald pattern of guinea pigs. **Proc. Natl Acad. Sci.** U.S.A., v. 6, p. 320–332, 1920.

	D1	D 2	D 2	D 4	D7	D	D7	БО	DO	D10	D14	D10	D10	D20	D41	D 22	D 22
Marcador/Loco	<u>- 11</u>	P2	<u>P3</u>	<u>P4</u>	<u>P5</u>	<u>P6</u>	P/	<u>P8</u>	<u>P9</u>	<u>P10</u>	P12	<u>P18</u>	P19	P20	P21	P22	<u>P23</u>
OPA-10_2527	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
OPA-10_1338-1295	1	0	0	1	1	0	-	1	0	0	0	0	-	0	1	0	0
OPA-10_1120-1065	0	1	0	0	1	1	-	0	0	1	0	0	-	0	0	0	0
OPA-10_0956-905	1	1	1	1	1	1	-	1	1	0	1	1	-	1	1	0	0
OPA-10_0800-751	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1
OPA-10_0684-643	1	1	1	1	1	1	-	1	1	0	1	1	-	1	1	1	0
OPA-10_0569-563	0	0	0	0	0	0	-	0	0	1	0	0	-	0	0	1	0
OPA-10_0529-502	0	0	0	0	1	0	-	1	1	0	0	0	-	0	0	0	0
OPA-10_0449-416	0	0	0	0	1	1	-	1	0	0	0	0	-	1	0	0	0
OPA-10_0335-926	0	0	0	0	1	0	-	0	1	0	0	1	-	0	1	1	0
OPA-11_2168	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0	0	-	0	0	0	-
OPA-11_1953-1921	1	1	1	0	1	0	1	0	0	-	0	0	-	0	0	0	-
OPA-11_1879-1620	0	0	0	1	0	0	1	0	0	-	0	0	-	0	0	0	-
OPA-11_1491-1469	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-	0	0	-	0	0	0	-
OPA-11_1340-1260	0	0	1	1	1	0	1	0	0	-	0	0	-	0	0	0	-
OPA-11_1143-1044	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-	1	1	-	0	1	0	-
OPA-11_0932-848	1	1	1	1	1	1	0	1	0	-	1	0	-	0	1	1	-
OPA-11_0733-532	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	-	1	1	1	-
OPA-11_0475-339	1	1	1	1	1	1	1	0	1	-	1	1	-	1	1	1	-
OPAZ-03_3247	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-
OPAZ-03_2201-2018	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	-	0	0	0	-
OPAZ-03_1888-1697	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	-	1	1	0	-
OPAZ-03_1573-1521	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	-	0	0	0	-
OPAZ-03_1353-1258	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	0	-
OPAZ-03_1073-986	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	0	-
OPAZ-03_0881-819	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	-	0	0	1	-
OPAZ-03_0736-725	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	-	1	0	1	-
OPAZ-03_0621-515	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-
OPAZ-03_0454-301	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-
OPAZ-03_0314-262	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	-	0	1	1	-
OPAZ-04_3582	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-
OPAZ-04_3482-3271	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	-	0	0	0	-
OPAZ-04_2371-1981	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	-	0	1	0	-
OPAZ-04_1825-1636	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	-	1	1	0	-
OPAZ-04_1482-1317	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-
OPAZ-04 1101-995	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	0	0	-
OPAZ-04 0923-694	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-
 OPAZ-04_0615-492	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	_	1	1	1	-
OPAZ-04 0385-334	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-
OPBA-03 2287	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	_	0	0	0	-
OPBA-03 2090-2093	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	_	0	0	0	_
OPBA-03 2039-1940	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-

APÊNDICE A - Matriz binária de presença x ausência de *loci* referentes aos primers analisados por amostra (cont.)

all	ans	auos	s poi	an	iosu	a (C	ont.)									
OPBA-03_1742-1719	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-	0	0	0	-
OPBA-03_1545-1487	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	-	0	0	0	-
OPBA-03_1445-1084	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-
OPBA-03_0958-956	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0	0	1	-
OPBA-03_0910-761	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-	1	0	1	-
OPBA-03_0752-711	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-	0	0	1	-
OPBA-03_0672-450	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	-	1	1	1	-
OPBA-03_0385-340	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	-	1	0	1	-
OPBA-03_0340-278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-	0	1	0	-
OPBA-05_2377	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	1	0	-
OPBA-05_1846-1625	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	-	0	0	0	-
OPBA-05_1582-1449	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	-	1	1	0	-
OPBA-05_1189-984	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	-	1	1	1	-
OPBA-05_0910-796	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	-	0	1	0	-
OPBA-05_0697-544	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	-	1	1	1	-
OPBA-05_0389-364	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	-	0	0	0	-
OPBA-05_0313-122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-	0	1	0	-
OPBA-07_5230	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
OPBA-07_2785-2713	0	0	0	0	1	1	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
OPBA-07_2593-2418	1	1	0	1	0	0	0	0	1	-	1	0	0	0	0	0	-
OPBA-07_2258-2018	1	0	1	0	0	0	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
OPBA-07_1800-1545	1	1	1	1	1	1	0	1	1	-	1	1	0	1	1	1	-
OPBA-07_1302-1123	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	0	1	1	1	-
OPBA-07_0919-541	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	-
OPBA-07_0492-271	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	0	1	1	1	-
OPBA-08_2993	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
OPBA-08_2824-2683	1	1	1	1	1	0	1	0	1	-	1	0	0	0	0	0	-
OPBA-08_2497-1913	0	0	0	0	0	1	1	0	0	-	0	0	0	0	0	1	-
OPBA-08_1667-1478	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	0	1	1	0	-
OPBA-08_1421-1373	0	1	1	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	1	-
OPBA-08_1311-1202	1	1	1	1	1	0	1	1	1	-	1	1	0	1	1	0	-
OPBA-08_1164-1116	0	0	0	0	0	1	1	0	0	-	0	0	0	0	1	0	-
OPBA-08_1036-839	1	1	1	1	1	1	1	0	1	-	1	1	0	1	1	1	-
OPBA-08_0805-779	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0	0	0	1	1	0	-
OPBA-08_0715-484	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	0	-
OPBA-08_0429-387	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	1	0	0	0	1	-
OPBA-08_0323-224	1	1	1	1	1	0	0	1	1	-	0	1	1	1	1	1	-
OPL-07_3333	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
OPL-07 3274-3189	0	0	0	1	0	0	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
OPL-07_3166-3145	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	0	1	0	0	0	0	-
OPL-07_3076-3016	1	1	0	0	0	0	0	0	0	-	1	0	0	1	0	0	-
OPL-07_2898-2855	0	0	0	0	1	1	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
OPL-07_2791-2719	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	1	0	0	-

APÊNDICE A - Matriz binária de presença x ausência de *loci* referentes aos primers analisados por amostra (cont.)

a	nans	auo	<u>, po</u>		iosu		on	•)									
OPL-07_2768-2659	1	0	1	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	1	-
OPL-07_2621-2596	0	1	0	0	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
OPL-07_2457-2246	0	0	0	0	0	0	1	1	0	-	0	0	0	0	1	0	-
OPL-07_2237-2074	1	1	1	1	1	1	0	1	1	-	1	0	0	1	0	0	-
OPL-07_2037-2003	0	0	1	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1	0	-
OPL-07_1948-1947	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	1	0	0	-
OPL-07_1774-1698	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	1	0	1	-
OPL-07_1469-1460	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	-
OPL-07_1416-1216	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	0	1	1	1	-
OPL-07_1187-1127	1	1	1	1	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	1	0	-
OPL-07_1093-978	1	1	1	1	1	0	1	0	1	-	0	1	0	0	0	1	-
OPL-07_0932-864	0	0	1	1	0	1	1	0	0	-	1	1	0	1	1	0	-
OPL-07_0829-527	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	-
OPL-07_0471-326	1	1	1	1	1	1	0	1	1	-	1	1	0	1	1	1	-
OPL-07_0247-235	1	0	0	1	0	1	0	0	0	-	0	1	0	0	0	0	-
OPU-02_2207	0	0	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	-	0	0	-	-
OPU-02_1979-1885	0	0	1	1	1	-	1	1	0	-	0	1	-	0	0	-	-
OPU-02_1851-1760	1	1	0	0	0	-	1	0	1	-	1	0	-	1	0	-	-
OPU-02_1637-1630	0	0	0	0	1	-	0	0	0	-	0	0	-	0	1	-	-
OPU-02_1574-1520	1	0	0	1	0	-	1	0	0	-	0	0	-	0	0	-	-
OPU-02_1465-1283	0	1	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	-	0	0	-	-
OPU-02_1277-1227	1	1	0	0	0	-	0	1	0	-	0	0	-	0	0	-	-
OPU-02_1158-1014	1	1	0	1	0	-	0	0	1	-	0	1	-	1	1	-	-
OPU-02_0917-860	0	0	0	0	0	-	0	1	0	-	0	0	-	0	1	-	-
OPU-02_0653-530	1	0	0	1	0	-	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-	-
OPU-02_0486-344	1	1	1	1	0	-	0	1	1	-	0	1	-	1	1	-	-
OPC-05_3199	1	0	0	0	0	0	0	-	0	-	0	0	-	0	0	0	0
OPC-05_2573-2563	1	0	0	1	0	0	0	-	0	-	0	0	-	0	0	0	0
OPC-05_2416-2360	1	1	0	0	1	0	0	-	0	-	0	0	-	0	0	0	0
OPC-05_1752-1571	1	1	1	1	1	1	1	-	1	-	0	1	-	1	1	0	1
OPC-05_1449-1383	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	1	0	-	0	0	1	0
OPC-05_1340-1313	0	0	0	1	0	0	1	-	1	-	0	1	-	0	0	0	0
OPC-05_1265-1180	1	0	0	0	0	1	0	-	0	-	1	0	-	1	1	0	0
OPC-05_1127-968	1	1	0	1	1	0	1	-	0	-	0	1	-	0	0	1	0
OPC-05_0897-605	1	1	1	1	1	1	1	-	1	-	1	1	-	1	1	1	0
OPC-05_0581-345	0	1	0	0	0	0	0	-	0	-	0	1	-	0	0	0	0
RAn-1_2016-1965	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	1	0	1	0	0	-
RAn-1_1910-1882	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-	0	0	0	0	1	0	-
RAn-1_1573-1416	0	1	0	1	1	0	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
RAn-1_1343-1252	1	1	1	1	1	1	0	1	0	-	0	0	0	1	0	0	-
RAn-1_1209-1084	1	1	1	1	0	1	1	1	1	-	1	1	0	1	1	1	-
RAn-1_1047-976	0	0	0	0	0	1	0	1	0	-	0	0	1	1	1	1	-
RAn-1_0944-735	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	-
RAn-1_0697-648	1	0	0	0	0	1	0	1	1	-	0	1	0	0	0	1	-

APÊNDICE A - Matriz binária de presença x ausência de *loci* referentes aos primers analisados por amostra (cont.)

RAn-1_0592-880	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	1	1	0	-
RAn-1_0529-478	1	0	1	1	1	1	0	0	1	-	0	0	0	0	0	0	-
RAn-1_0439-375	1	1	0	0	0	0	0	1	0	-	0	1	1	0	1	0	-

APÊNDICE A - Matriz binária de presença x ausência de *loci* referentes aos primers analisados por amostra (conclusão)

Marcador (loci)	Status do Marcador	Bandas/l <i>o</i> ci	Status da Banda	р	(p)2	q	(q) 2	Hn	Ib
OPA-10_2527	Único	1	Polimórfico	0,07	0,0044	0,93	0,8711	0,1244	0,1333
OPA-10_1338-1295	Compartilhado	5	Polimórfico	0,33	0,1111	0,67	0,4444	0,4444	0,6667
OPA-10_1120-1065	Compartilhado	4	Polimórfico	0,27	0,0711	0,73	0,5378	0,3911	0,5333
OPA-10_0956-905	Compartilhado	12	Polimórfico	0,80	0,6400	0,20	0,0400	0,3200	0,4000
OPA-10_0800-751	Compartilhado	15	Monomórfico	1,00	1,0000	0,00	0,0000	0,0000	0,0000
OPA-10_0684-643	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
OPA-10_0569-563	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPA-10_0529-502	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPA-10_0449-416	Compartilhado	4	Polimórfico	0,27	0,0711	0,73	0,5378	0,3911	0,5333
OPA-10_0335-926	Compartilhado	5	Polimórfico	0,33	0,1111	0,67	0,4444	0,4444	0,6667
OPA-11_2168	Único	1	Polimórfico	0,07	0,0051	0,93	0,8622	0,1327	0,1429
OPA-11_1953-1921	Compartilhado	5	Polimórfico	0,36	0,1276	0,64	0,4133	0,4592	0,7143
OPA-11_1879-1620	Compartilhado	2	Polimórfico	0,14	0,0204	0,86	0,7347	0,2449	0,2857
OPA-11_1491-1469	Compartilhado	2	Polimórfico	0,14	0,0204	0,86	0,7347	0,2449	0,2857
OPA-11_1340-1260	Compartilhado	4	Polimórfico	0,29	0,0816	0,71	0,5102	0,4082	0,5714
OPA-11_1143-1044	Compartilhado	11	Polimórfico	0,79	0,6173	0,21	0,0459	0,3367	0,4286
OPA-11_0932-848	Compartilhado	10	Polimórfico	0,71	0,5102	0,29	0,0816	0,4082	0,5714
OPA-11_0733-532	Compartilhado	14	Monomórfico	1,00	1,0000	0,00	0,0000	0,0000	0,0000
OPA-11_0475-339	Compartilhado	13	Polimórfico	0,93	0,8622	0,07	0,0051	0,1327	0,1429
OPAZ-03_3247	Único	1	Polimórfico	0,07	0,0044	0,93	0,8711	0,1244	0,1333
OPAZ-03_2201-2018	Compartilhado	7	Polimórfico	0,47	0,2178	0,53	0,2844	0,4978	0,9333
OPAZ-03_1888-1697	Compartilhado	12	Polimórfico	0,80	0,6400	0,20	0,0400	0,3200	0,4000
OPAZ-03_1573-1521	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPAZ-03_1353-1258	Compartilhado	14	Polimórfico	0,93	0,8711	0,07	0,0044	0,1244	0,1333
OPAZ-03_1073-986	Compartilhado	14	Polimórfico	0,93	0,8711	0,07	0,0044	0,1244	0,1333
OPAZ-03_0881-819	Compartilhado	8	Polimórfico	0,53	0,2844	0,47	0,2178	0,4978	0,9333
OPAZ-03_0736-725	Compartilhado	7	Polimórfico	0,47	0,2178	0,53	0,2844	0,4978	0,9333
OPAZ-03_0621-515	Compartilhado	15	Monomórfico	1,00	1,0000	0,00	0,0000	0,0000	0,0000
OPAZ-03_0454-301	Compartilhado	14	Polimórfico	0,93	0,8711	0,07	0,0044	0,1244	0,1333
OPAZ-03_0314-262	Compartilhado	8	Polimórfico	0,53	0,2844	0,47	0,2178	0,4978	0,9333
OPAZ-04_3582	Único	1	Polimórfico	0,07	0,0044	0,93	0,8711	0,1244	0,1333
OPAZ-04_3482-3271	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPAZ-04_2371-1981	Compartilhado	9	Polimórfico	0,60	0,3600	0,40	0,1600	0,4800	0,8000
OPAZ-04_1825-1636	Compartilhado	6	Polimórfico	0,40	0,1600	0,60	0,3600	0,4800	0,8000
OPAZ-04_1482-1317	Compartilhado	14	Polimórfico	0,93	0,8711	0,07	0,0044	0,1244	0,1333
OPAZ-04_1101-995	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
OPAZ-04_0923-694	Compartilhado	15	Polimórfico	1,00	1,0000	0,00	0,0000	0,0000	0,0000
OPAZ-04_0615-492	Compartilhado	15	Polimórfico	1,00	1,0000	0,00	0,0000	0,0000	0,0000
OPAZ-04_0385-334	Compartilhado	14	Polimórfico	0,93	0,8711	0,07	0,0044	0,1244	0,1333
OPBA-03_2287	Único	1	Polimórfico	0,07	0,0044	0,93	0,8711	0,1244	0,1333
 OPBA-03_2090-2093	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPBA-03 2039-1940	Compartilhado	4	Polimórfico	0.27	0.0711	0.73	0.5378	0.3911	0,5333
	T	-		-,_ <i>·</i>	.,	3,	.,		.,

APÊNDICE B – Cálculo estatístico relacionado aos *loci* gerados por *primer* (cont.)

APÊNDICE B – Cálculo estatístico relacionado aos *loci* gerados por *primer* (cont.)

Marcador (<i>loci</i>)	Status do Marcador	Bandas/l oci	Status da Banda	р	(p)2	q	(q) 2	Hn	Ib
OPBA-03_1742-1719	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPBA-03_1545-1487	Compartilhado	4	Polimórfico	0,27	0,0711	0,73	0,5378	0,3911	0,5333
OPBA-03_1445-1084	Compartilhado	15	Monomórfico	1,00	1,0000	0,00	0,0000	0,0000	0,0000
OPBA-03_0958-956	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPBA-03_0910-761	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
OPBA-03_0752-711	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPBA-03_0672-450	Compartilhado	8	Polimórfico	0,53	0,2844	0,47	0,2178	0,4978	0,9333
OPBA-03_0385-340	Compartilhado	12	Polimórfico	0,80	0,6400	0,20	0,0400	0,3200	0,4000
OPBA-03_0340-278	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPBA-05_2377	Único	1	Polimórfico	0,07	0,0044	0,93	0,8711	0,1244	0,1333
OPBA-05_1846-1625	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPBA-05_1582-1449	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
OPBA-05_1189-984	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
OPBA-05_0910-796	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPBA-05_0697-544	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
OPBA-05_0389-364	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPBA-05_0313-122	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPBA-07_5230	Único	1	Polimórfico	0,07	0,0044	0,93	0,8711	0,1244	0,1333
OPBA-07_2785-2713	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPBA-07_2593-2418	Compartilhado	5	Polimórfico	0,33	0,1111	0,67	0,4444	0,4444	0,6667
OPBA-07_2258-2018	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPBA-07_1800-1545	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
OPBA-07_1302-1123	Compartilhado	14	Polimórfico	0,93	0,8711	0,07	0,0044	0,1244	0,1333
OPBA-07_0919-541	Compartilhado	15	Monomórfico	1,00	1,0000	0,00	0,0000	0,0000	0,0000
OPBA-07_0492-271	Compartilhado	14	Polimórfico	0,93	0,8711	0,07	0,0044	0,1244	0,1333
OPBA-08_2993	Único	1	Polimórfico	0,07	0,0044	0,93	0,8711	0,1244	0,1333
OPBA-08_2824-2683	Compartilhado	8	Polimórfico	0,53	0,2844	0,47	0,2178	0,4978	0,9333
OPBA-08_2497-1913	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPBA-08_1667-1478	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
OPBA-08_1421-1373	Compartilhado	4	Polimórfico	0,27	0,0711	0,73	0,5378	0,3911	0,5333
OPBA-08_1311-1202	Compartilhado	12	Polimórfico	0,80	0,6400	0,20	0,0400	0,3200	0,4000
OPBA-08_1164-1116	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPBA-08_1036-839	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
OPBA-08_0805-779	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPBA-08_0715-484	Compartilhado	14	Polimórfico	0,93	0,8711	0,07	0,0044	0,1244	0,1333
OPBA-08_0429-387	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPBA-08_0323-224	Compartilhado	12	Polimórfico	0,80	0,6400	0,20	0,0400	0,3200	0,4000
OPL-07_3333	Único	1	Polimórfico	0,07	0,0044	0,93	0,8711	0,1244	0,1333
OPL-07_3274-3189	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPL-07_3166-3145	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPL-07_3076-3016	Compartilhado	4	Polimórfico	0,27	0,0711	0,73	0,5378	0,3911	0,5333
OPL-07_2898-2855	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
	I								

APÊNDICE B – Cálculo estatístico relacionado aos *loci* gerados por *primer* (cont.)

Marcador (loci)	Status do Marcador	Bandas/l oci	Status da Banda	р	(p)2	q	(q)2	Hn	Ib
OPL-07_2791-2719	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPL-07_2768-2659	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPL-07_2621-2596	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPL-07_2457-2246	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPL-07_2237-2074	Compartilhado	10	Polimórfico	0,67	0,4444	0,33	0,1111	0,4444	0,6667
OPL-07_2037-2003	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPL-07_1948-1947	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
OPL-07_1774-1698	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPL-07_1469-1460	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
OPL-07_1416-1216	Compartilhado	14	Polimórfico	0,93	0,8711	0,07	0,0044	0,1244	0,1333
OPL-07_1187-1127	Compartilhado	6	Polimórfico	0,40	0,1600	0,60	0,3600	0,4800	0,8000
OPL-07_1093-978	Compartilhado	9	Polimórfico	0,60	0,3600	0,40	0,1600	0,4800	0,8000
OPL-07_0932-864	Compartilhado	8	Polimórfico	0,53	0,2844	0,47	0,2178	0,4978	0,9333
OPL-07_0829-527	Compartilhado	14	Polimórfico	0,93	0,8711	0,07	0,0044	0,1244	0,1333
OPL-07_0471-326	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
OPL-07_0247-235	Compartilhado	4	Polimórfico	0,27	0,0711	0,73	0,5378	0,3911	0,5333
OPU-02_2207	Único	1	Polimórfico	0,08	0,0069	0,92	0,8403	0,1528	0,1667
OPU-02_1979-1885	Compartilhado	6	Polimórfico	0,50	0,2500	0,50	0,2500	0,5000	1,0000
OPU-02_1851-1760	Compartilhado	6	Polimórfico	0,50	0,2500	0,50	0,2500	0,5000	1,0000
OPU-02_1637-1630	Compartilhado	2	Polimórfico	0,17	0,0278	0,83	0,6944	0,2778	0,3333
OPU-02_1574-1520	Compartilhado	3	Polimórfico	0,25	0,0625	0,75	0,5625	0,3750	0,5000
OPU-02_1465-1283	Compartilhado	2	Polimórfico	0,17	0,0278	0,83	0,6944	0,2778	0,3333
OPU-02_1277-1227	Compartilhado	3	Polimórfico	0,25	0,0625	0,75	0,5625	0,3750	0,5000
OPU-02_1158-1014	Compartilhado	7	Polimórfico	0,58	0,3403	0,42	0,1736	0,4861	0,8333
OPU-02_0917-860	Compartilhado	2	Polimórfico	0,17	0,0278	0,83	0,6944	0,2778	0,3333
OPU-02_0653-530	Compartilhado	2	Polimórfico	0,17	0,0278	0,83	0,6944	0,2778	0,3333
OPU-02_0486-344	Compartilhado	9	Polimórfico	0,75	0,5625	0,25	0,0625	0,3750	0,5000
OPC-5_3199	Único	1	Polimórfico	0,07	0,0051	0,93	0,8622	0,1327	0,1429
OPC-5_2573-2563	Compartilhado	2	Polimórfico	0,14	0,0204	0,86	0,7347	0,2449	0,2857
OPC-5_2416-2360	Compartilhado	3	Polimórfico	0,21	0,0459	0,79	0,6173	0,3367	0,4286
OPC-5_1752-1571	Compartilhado	12	Polimórfico	0,86	0,7347	0,14	0,0204	0,2449	0,2857
OPC-5_1449-1383	Compartilhado	2	Polimórfico	0,14	0,0204	0,86	0,7347	0,2449	0,2857
OPC-5_1340-1313	Compartilhado	4	Polimórfico	0,29	0,0816	0,71	0,5102	0,4082	0,5714
OPC-5_1265-1180	Compartilhado	5	Polimórfico	0,36	0,1276	0,64	0,4133	0,4592	0,7143
OPC-5_1127-968	Compartilhado	7	Polimórfico	0,50	0,2500	0,50	0,2500	0,5000	1,0000
OPC-5_0897-605	Compartilhado	13	Polimórfico	0,93	0,8622	0,07	0,0051	0,1327	0,1429
OPC-5_0581-345	Compartilhado	2	Polimórfico	0,14	0,0204	0,86	0,7347	0,2449	0,2857
Ran-1_2016-1965	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
Ran-1_1910-1882	Compartilhado	2	Polimórfico	0,13	0,0178	0,87	0,7511	0,2311	0,2667
Ran-1_1573-1416	Compartilhado	4	Polimórfico	0,27	0,0711	0,73	0,5378	0,3911	0,5333
Ran-1_1343-1252	Compartilhado	8	Polimórfico	0,53	0,2844	0,47	0,2178	0,4978	0,9333
Ran-1_1209-1084	Compartilhado	13	Polimórfico	0,87	0,7511	0,13	0,0178	0,2311	0,2667
Ran-1_1047-976	Compartilhado	6	Polimórfico	0,40	0,1600	0,60	0,3600	0,4800	0,8000
	· ·							-	

Marcador (<i>loci</i>)	Status do Marcador	Bandas/l oci	Status da Banda	р	(p) 2	q	(q) 2	Hn	Ib
Ran-1_0944-735	Compartilhado	15	Monomórfico	1,00	1,0000	0,00	0,0000	0,0000	0,0000
Ran-1_0697-648	Compartilhado	6	Polimórfico	0,40	0,1600	0,60	0,3600	0,4800	0,8000
Ran-1_0592-880	Compartilhado	3	Polimórfico	0,20	0,0400	0,80	0,6400	0,3200	0,4000
Ran-1_0529-478	Compartilhado	6	Polimórfico	0,40	0,1600	0,60	0,3600	0,4800	0,8000
Ran-1_0439-375	Compartilhado	6	Polimórfico	0,40	0,1600	0,60	0,3600	0,4800	0,8000

APÊNDICE B – Cálculo estatístico relacionado aos *loci* gerados por *primer* (conclusão)

Legenda: p: frequência do alelo positivo; p2: frequência do alelo positivo ao quadrado; q: frequência do alelo nulo; q2: frequência do alelo nulo ao quadrado; Hn: taxa de heterozigose Ib: taxa de informação do amplicon.

APÊNDICE C – Índice de similaridade de Jaccard (J) e distância genética (J') estimados a partir da análise hierárquica de agrupamento.

(J)

	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P12	P18	P20	P21	P22
P01	1,0000													
P02	0,6707	1,0000												
P03	0,6386	0,6234	1,0000											
P04	0,6860	0,6341	0,7051	1,0000										
P05	0,5730	0,5926	0,6623	0,6118	1,0000									
P06	0,6026	0,5753	0,6250	0,5974	0,6133	1,0000								
P07	0,3500	0,3933	0,4253	0,4348	0,4643	0,3780	1,0000							
P08	0,5867	0,5278	0,5556	0,5325	0,5616	0,6190	0,3049	1,0000						
P09	0,5732	0,5733	0,5600	0,5750	0,5921	0,5352	0,4024	0,5294	1,0000					
P12	0,5316	0,5714	0,5571	0,5325	0,4868	0,5846	0,3797	0,5000	0,6190	1,0000				
P18	0,5233	0,5000	0,5256	0,5422	0,5185	0,5000	0,3721	0,4857	0,6232	0,5072	1,0000			
P20	0,5663	0,5455	0,5733	0,5301	0,4878	0,5942	0,3605	0,5217	0,6087	0,6613	0,5479	1,0000		
P21	0,5000	0,4762	0,5185	0,5000	0,4767	0,5405	0,3596	0,5278	0,5065	0,5000	0,5733	0,5811	1,0000	
P22	0,4250	0,4247	0,4521	0,4359	0,4103	0,4306	0,2593	0,4219	0,4848	0,4839	0,4925	0,4559	0,4110	1,0000

(J')

	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P12	P18	P20	P21	P22
P01	0,0000													
P02	0,3293	0,0000												
P03	0,3614	0,3766	0,0000											
P04	0,3140	0,3659	0,2949	0,0000										
P05	0,4270	0,4074	0,3377	0,3882	0,0000									
P06	0,3974	0,4247	0,3750	0,4026	0,3867	0,0000								
P07	0,6500	0,6067	0,5747	0,5652	0,5357	0,6220	0,0000							
P08	0,4133	0,4722	0,4444	0,4675	0,4384	0,3810	0,6951	0,0000						
P09	0,4268	0,4267	0,4400	0,4250	0,4079	0,4648	0,5976	0,4706	0,0000					
P12	0,4684	0,4286	0,4429	0,4675	0,5132	0,4154	0,6203	0,5000	0,3810	0,0000				
P18	0,4767	0,5000	0,4744	0,4578	0,4815	0,5000	0,6279	0,5143	0,3768	0,4928	0,0000			
P20	0,4337	0,4545	0,4267	0,4699	0,5122	0,4058	0,6395	0,4783	0,3913	0,3387	0,4521	0,0000		
P21	0,5000	0,5238	0,4815	0,5000	0,5233	0,4595	0,6404	0,4722	0,4935	0,5000	0,4267	0,4189	0,0000	
P22	0,5750	0,5753	0,5479	0,5641	0,5897	0,5694	0,7407	0,5781	0,5152	0,5161	0,5075	0,5441	0,5890	0,0000



APÊNDICE D – Análises de *cluster* UPGMA realizadas a partir do coeficiente de Jaccard para cada *primer* individualmente (primers 1-6)

Legenda: a: OPA-10; b: OPA-11; c: OPAZ-03; d: OPAZ-04; e: OPBA-03; f: OPBA-05

0.450

0.375

0.3

0.2





Legenda g: OPBA-07; h: OPBA-08; i: OPL-07; j: OPU-02; k: OPC-5; l: Ran-1