



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ecktor Luiz Gomes de Souza

**Avaliação de marcadores moleculares para a caracterização de
Chrysobalanus icaco L. ocorrente em Cabo Frio, Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2022

Ecktor Luiz Gomes de Souza

**Avaliação de marcadores moleculares para a caracterização de
Chrysobalanus icaco L. ocorrente em Cabo Frio, 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

Coorientadora: Dra. Bianka de Oliveira Soares

Rio de Janeiro

2022

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

S729 Souza, Ektor Luiz Gomes de.
Avaliação de marcadores moleculares para a caracterização de
Chrysobalanus icaco L. ocorrente em Cabo Frio, Rio de Janeiro /
Ektor Luiz Gomes de Souza. – 2022.
79 f. : il.

Orientadora: Rachel Fátima Gagliardi Araujo.

Coorientadora: Bianka de Oliveira Soares.

Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do
Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara
Gomes.

1. Plantas medicinais - Teses. 2. Genética vegetal - Teses. I. Araujo,
Rachel Fátima Gagliardi. II. Soares, Bianka de Oliveira. III.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia
Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 633.88

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - 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

Ecktor Luiz Gomes de Souza

**Avaliação de marcadores moleculares para a caracterização de *Chrysobalanus icaco* L.
ocorrente em Cabo Frio, Rio de Janeiro.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial 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.

Aprovado em 07 de Julho de 2022.

Orientadores:

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

Prof.^a Dra. Bianka de Oliveira Soares (Coorientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Samara Cristina Ferreira-Machado
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Vítor Hugo dos Santos Gomes Maia
Pontifícia Universidade Católica - PUC

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

À Silvia, minha mãe e principal incentivadora da vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por todas as maravilhas e cuidados da minha vida.

Meus mais sinceros agradecimentos à equipe LMMP-UERJ, que vibraram comigo e participaram de cada etapa dessa árdua jornada: Jamine, Leila, Ana Paula, Vinicius, Camila, Marcelle, Alexia, Elizabeth e Thaiza. A cada um de vocês, meu muito obrigado por cada contribuição deixada nesse trabalho e na vida. Vini, jamais me esquecerei de todas as nossas tardes de selfies, coletas, aulas de campo, muitas risadas e dos flagras da Bianka em você dançando ao som de sirenes do trânsito da Tijuca. Sinto muito a sua falta, mas te carrego sempre comigo em cada lembrança, torcendo por você. Obrigado pela sua amizade e cumplicidade. Jamine, obrigado por sua calma e paciência sempre. Obrigado também pelos conselhos e pelos puxões de orelha de quando eu comia doces dizendo que estava de dieta. E não esqueça de olhar o cartaz do evento na porta do Labmit! Leila, obrigado por seus conselhos, sempre em tom materno e de acolhimento. Gostaria de ter te visto repicando mais, mas você também estará sempre aqui.

À toda a equipe NBV- UERJ, que também me acolheu e a todo o Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

Jéssica, a você eu devo um MUITO OBRIGADO. Você me incentivou a começar e esteve comigo em cada passo, sempre com os melhores conselhos, as intermináveis gargalhadas e as melhores broncas com toda a sua “delicadeza”. Obrigado por ter sido uma das minhas principais bases na vida, sempre segurando a minha mão em todas as vezes que eu achei que ia cair. Meu imenso carinho e admiração por você, que já vêm desde a graduação, quando planejávamos nosso futuro nas voltas exaustivas da faculdade e que hoje podemos compartilhar juntos a realização de cada sonho. Você faz parte de tudo isso. Eu te amo muito além dessa vida!

À minha orientadora Rachel Gagliardi por todo o ensinamento e acolhimento que me proporcionou dentro e fora do laboratório. Tenho um privilégio muito grande de dizer que pude integrar seu corpo discente e ter aprendido com você. Obrigado por cada vez que me sacudiu pra vida, sempre com ternura e paciência, mostrando o melhor caminho pra solucionar meus contratempos e por confiar no meu trabalho.

À minha coorientadora Bianka Soares por cada minuto que dedicou junto comigo no laboratório, me ajudando em cada etapa desse trabalho. Obrigado por me ajudar a enxergar a simplicidade em todos os problemas gigantes que eu achava que tinha, até falar com você. A Bianka sabe de tudo. É incrível! Obrigado por responder minhas mensagens quase de madrugada no Whatsapp, independente do que fosse, por me ouvir em cada desabafo, em cada conversa informal e em cada dúvida que me ocorreu, que você dedicou toda a sua atenção. Você, sem dúvidas, é alguém que me orgulho de ter conhecido e ter aprendido com você. Obrigado por ter sido mãe, irmã, amiga, orientadora e super heroína, porque só assim pra ter dado conta de tudo.

À minha irmã por me ensinar a ser paciente e maduro, mesmo com seu jeito sério, mas cheio de amor e cumplicidade. Você sabe mais do que qualquer um que eu te levo comigo em toda a vida.

À minha mãe, em especial, que tinha sempre colo e ouvidos pra me oferecer quando, por muitas vezes, eu estava à beira de um colapso emocional. Cada conquista que eu tive (e terei) nessa vida, eu dedico a você. Obrigado por confiar e acreditar em mim quando nem mesmo eu o fazia, me encorajando a continuar e torcendo por mim. Eu te amo! Devo tudo a você.

À minha família por todo o orgulho e incentivo que me foi dado. Amo vocês!

Aos meus amigos, em cada parte dessa vida, que de alguma forma estiveram comigo e me proporcionaram momentos de descontração e injeções de ânimo pra seguir em frente. Gratidão a tudo que vocês fizeram por mim.

À CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Maravilhar-se é o primeiro passo para um descobrimento.

Louis Pasteur

RESUMO

SOUZA, Eektor Luiz Gomes de. **Avaliação de marcadores moleculares para a caracterização de *Chrysobalanus icaco* L. ocorrente em Cabo Frio, Rio de Janeiro.** 2022. 79f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O abajeru (*Chrysobalanus icaco* L.) é uma espécie de planta nativa do estado do Rio de Janeiro que ocorre, majoritariamente, em regiões costeiras de ambientes de restinga aberta e semi-aberta. Esta espécie é muito utilizada na medicina popular para diversos fins de profilaxia e tratamento de diversas doenças, atuando como agente hipoglicemiante, antitumoral, antioxidante. Diversos métodos de análise molecular foram desenvolvidos a fim de monitorar variações genéticas em sequências de DNA de diversas espécies vegetais, promovidas por processos naturais de propagação e alterações antrópicas do ambiente. O objetivo deste projeto foi avaliar a utilização de dois marcadores moleculares dominantes para estudos de caracterização genética em *Chrysobalanus icaco*: (i) RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) e (ii) SCoT (Códon de Início Direcionado) em sua capacidade de detectar polimorfismos. 5 moitas da espécie foram divididas e separadas em 4 quadrantes cada, no qual 20 folhas do material vegetal foram excisadas de um mesmo ramo pertencente a cada quadrante das moitas, coletadas na Praia das Dunas em Cabo Frio – RJ e posteriormente submetidas à extração de DNA. As amostras foram posteriormente quantificadas qualitativamente em gel de agarose, utilizando padrões de peso molecular e quantitativamente, através de espectrofotometria e amplificadas por meio das técnicas de RAPD e SCoT. Os resultados demonstraram a eficiência dos marcadores testados, em revelar a presença de polimorfismos no DNA, indicando sua aplicação na conservação de recursos genéticos da espécie estudada. Todos os marcadores do tipo RAPD apresentaram resultado significativo no padrão de amplificação das amostras, resultando em bandas visíveis, que demonstram alto índice de monomorfismo entre os indivíduos, ao passo que os marcadores SCoT apresentaram o mesmo padrão visível somente em alguns dos iniciadores testados. Ambos os marcadores são de fácil manipulação e apresentam resultados rápidos e de interpretação simples, o que os torna fortemente indicados para os objetivos propostos neste trabalho, bem como em outros.

Palavras-chave: Recursos genéticos. Abajeru. PCR. Marcadores aleatórios.

ABSTRACT

SOUZA, Eektor Luiz Gomes de. **Evaluation of molecular markers for the characterization of *Chrysobalanus icaco* L. occurring in Cabo Frio, Rio de Janeiro.** 2022. 79f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The abajeru (*Chrysobalanus icaco* L.) is a species of plant native to the state of Rio de Janeiro that occurs mainly in coastal regions of open and semi-open restinga environments. This species is widely used in folk medicine for various purposes of prophylaxis and treatment of various diseases, acting as a hypoglycemic, antitumor, antioxidant agent. Several methods of molecular analysis were developed in order to monitor genetic variations in DNA sequences of several plant species, promoted by natural processes of propagation and anthropic changes in the environment. The objective of this project was to evaluate the use of two dominant molecular markers for genetic characterization studies in *Chrysobalanus icaco*: (i) RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) and (ii) SCoT (Directed Start Codon) in their ability to detect polymorphisms. 5 thickets of the species were divided and separated into 4 quadrants each, in which 20 leaves of the plant material were excised from the same branch belonging to each quadrant of the thickets, collected at Praia das Dunas in Cabo Frio - RJ and subsequently subjected to DNA extraction. . The samples were later qualitatively quantified in agarose gel, using molecular weight standards and quantitatively, through spectrophotometry and amplified through RAPD and SCoT techniques. The results demonstrated the efficiency of the tested markers, in revealing the presence of polymorphisms in the DNA, indicating its application in the conservation of genetic resources of the studied species. All RAPD markers showed a significant result in the amplification pattern of the samples, resulting in visible bands, which demonstrate a high level of monomorphism between individuals, while the SCoT markers showed the same pattern visible only in some of the tested primers. Both markers are easy to handle and present quick results and simple interpretation, which makes them strongly indicated for the objectives proposed in this work, as well as in others.

Key-words: Genetic Resources. Abajeru. PCR. Random Markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica mundial de <i>Chrysobalanus icaco</i> L (Chrysobalanaceae).....	18
Figura 2 -	Distribuição geográfica de <i>Chrysobalanus icaco</i> L no Brasil.....	18
Figura 3 -	Hábito de crescimento de <i>Chrysobalanus icaco</i> em diferentes ambientes.....	19
Figura 4 -	Aspectos morfológicos de <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	20
Figura 5 -	Esquematização do processo de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR).....	24
Figura 6 -	Esquematização do processo de amplificação de DNA por PCR utilizando iniciador RAPD.....	26
Figura 7 -	Esquematização do processo de amplificação de um fragmento de DNA por PCR utilizando iniciador SCoT.....	27
Figura 8 -	Local de coleta de <i>Chrysobalanus icaco</i> L, localizado na restinga da Praia das Dunas – Cabo Frio / RJ.....	30
Figura 9 -	Esquematização do processo de extração do DNA genômico.....	32
Figura 10 -	Gel de agarose contendo as amostras (P1X1 a P3X4) quantificadas por fluorescência.....	43
Figura 11 -	Géis de agarose representando a identidade genética de plantas componentes da moita 1, localizada na Praia das Dunas, Cabo Frio, RJ.....	45
Figura 12 -	Géis de agarose representando a identidade genética de plantas componentes da moita 2, localizada na Praia das Dunas, Cabo Frio, RJ.....	46
Figura 13 -	Géis de agarose representando a identidade genética de plantas componentes da moita 3, localizada na Praia das Dunas, Cabo Frio, RJ.....	47
Figura 14 -	Géis de agarose representando a identidade genética de plantas componentes da moita 4, localizada na Praia das Dunas, Cabo Frio, RJ.....	48
Figura 15 -	Géis de agarose representando a identidade genética de plantas componentes da moita 5, localizada na Praia das Dunas, Cabo Frio, RJ.....	49
Figura 16	Produtos gerados em gel de repetição com diferentes concentrações de DNA (4µl e 8µl).....	50
Figura 17 -	Concentrações de DNA testadas nas amostras.....	53
Figura 18 -	Géis de agarose representando as bandas geradas pelos iniciadores utilizados para a reação de amplificação por SCoT em amostras de <i>C. icaco</i>	54

Figura 19 -	Géis de agarose representando as bandas geradas pelos iniciadores utilizados para a reação de amplificação por SCoT em amostras de <i>C. icaco</i> , com destaque das bandas detectadas pelo software Gel Analyzer.....	56
Figura 20 -	Géis de agarose representando os iniciadores selecionados na reação de amplificação por SCoT em amostras de <i>C. icaco</i> após nova coleta das amostras estudadas.....	58
Figura 21-	Géis de agarose representando as bandas geradas pelo iniciador 21 na reação de SCoT em amostras de <i>C. icaco</i>	59
Figura 22 -	Géis de agarose representando as bandas geradas pelo iniciador 22 na reação de SCoT em amostras de <i>C. icaco</i>	60
Figura 23 -	Géis de agarose representando as bandas geradas pelo iniciador 28 na reação de SCoT em amostras de <i>C. icaco</i>	61

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 -	Georreferenciamento do local de coleta das moitas em Cabo Frio, RJ.....	31
Tabela 2 -	Concentrações utilizadas no preparo das amostras para a corrida de quantificação do DNA.....	33
Tabela 3 -	Iniciadores selecionados para as reações de amplificação RAPD em amostras de <i>C. icaco</i>	36
Tabela 4 -	Iniciadores selecionados para as reações de amplificação SCoT em amostras de <i>C. icaco</i>	38
Tabela 5 -	Quantificação do material por eletroforese em gel de agarose e por espectrofotometria.....	42
Quadro 1 -	Sequências dos iniciadores de RAPD avaliados para o estudo.....	35
Quadro 2 -	Iniciadores cedidos para as reações de amplificação SCoT em amostras de <i>C. icaco</i>	37
Quadro 3 -	Relação de bandas monomórficas e polimórficas detectadas por iniciador de RAPD para cada indivíduo testado.....	52
Quadro 4 -	Iniciadores selecionados para amplificação nas reações utilizando marcadores SCoT em amostras de <i>C. icaco</i>	57
Quadro 5 -	Novos iniciadores SCoT selecionados de para amostras de <i>C. icaco</i>	59
Quadro 6 -	Relação total de bandas monomórficas e polimórficas detectadas por iniciador de SCoT nas amostras de <i>C. icaco</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio (<i>Cetrimonium bromide</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
NBV	Núcleo de Biotecnologia Vegetal
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RNA	Ácido Ribonucléico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
Rpm	Rotações por minuto
SERVGEN	Serviço de Genética Humana
SCoT	<i>Start Codon Targeted</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	<i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	17
1.1.1	<u>Caracterização taxonômica</u>	19
1.1.2	<u>Aspectos biológicos e ecológicos</u>	21
1.1.3	<u>Importância econômica</u>	22
1.2	Marcadores moleculares	23
1.2.1	<u>Marcadores RAPD</u>	25
1.2.2	<u>Marcadores SCoT</u>	27
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Material vegetal	30
3.2	Extração do DNA genômico	31
3.3	Quantificação do DNA	33
3.4	Seleção e preparo dos iniciadores	34
3.5	Amplificação do DNA	38
3.5.1	<u>Amplificação do DNA por RAPD</u>	38
3.5.2	<u>Amplificação do DNA por SCoT</u>	39
3.6	<u>Análise dos dados</u>	40
4	RESULTADOS	41
4.1	Estração e Quantificação do DNA	41
4.2	Amplificação do DNA	44
4.2.1	<u>Amplificação do DNA por RAPD</u>	44
4.2.2	<u>Amplificação do DNA por SCoT</u>	53
5	DISCUSSÃO	63
	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68

INTRODUÇÃO

A diversidade genética é a base estrutural do que conhecemos acerca da diversidade das espécies, uma vez que está diretamente relacionada com a diferenciação e o potencial da evolução de espécies e populações, sendo um fator pioneiro em estudos de qualquer espécie (FUTUYMA, 2017). A diversidade genética se traduz por mudanças genômicas denominadas polimorfismos, podendo desencadear mudanças morfofisiológicas que podem ser monitoradas através de análises com diversos tipos de marcadores moleculares, de acordo com o objetivo de interesse de cada uma das diversas áreas que utilizam a técnica (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

O conhecimento acerca da biologia das espécies de plantas, principalmente aquelas com potencial medicinal, é de extrema relevância, não unicamente para fins de domesticação e obtenção de substâncias, mas também para estabelecer parâmetros de conservação e manejo eficiente (CARVALHO et al., 2009). Os estudos realizados agregam em dados que podem contribuir com o levantamento de informações acerca dos compostos secundários que podem ser encontrados nessas espécies de plantas, utilizadas na síntese de fitomedicamentos (LUZ, 2018).

Com o passar dos anos, o número de marcadores moleculares disponíveis para estudo e utilização aumentou em grande escala, tornando possível abranger, em teoria, todas as espécies de plantas. Isso se deu em virtude do surgimento de técnicas de amplificação de segmentos DNA, baseadas inicialmente em enzimas de restrição e posteriormente em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares e suas aplicações, ressalta-se alguns usos característicos importantes para pesquisas sobre as interações do genótipo com o ambiente, o desenvolvimento de mapas genéticos, testes de fidelidade parental, melhoramento genético e produção de híbridos, seleção artificial de indivíduos e avaliação e caracterização de germoplasma (RAFALSKI; TINGEY, 1993; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998a; MILACH, 1998b).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Chrysobalanus icaco* L

Chrysobalanus icaco L é uma espécie vegetal de ambientes litorâneos, de porte arbustivo, que pode ser encontrada em diversas regiões e países do mundo (Figura 1). Sua distribuição, nas Américas (PRANCE, 1988), abrange toda a Flórida, se estendendo por países latinoamericanos como Colômbia e Venezuela (VARGAS-SIMÓN, 1998; FONSECA-KRUEL; PEIXOTO, 2004). Em regiões da Ásia, já foi encontrada na Índia, no Vietnã, e em algumas ilhas do Pacífico – como Seychelles e Fidji (VARGAS-SIMÓN et al., 2000). No continente africano, sua distribuição vai desde a Guiné até Angola, sendo reportado também na Tanzânia, Camarões e Senegal (VARGAS-SIMÓN et al., 2000). Sua dispersão entre os continentes pode ter se dado através da água, por se tratar de uma espécie de característica insular e litorânea, justificando portanto a pouca variabilidade morfológica entre as populações (PRANCE, 1988).

No Brasil, a espécie pode ocorrer em diversos estados (Figura 2) – 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) e recebe diversos nomes dependendo da região que é encontrada. No Rio de Janeiro, a espécie é popularmente conhecida como abajeru ou maçãzinha da praia, e pode ser encontrada em ambientes de restinga aberta e semi-aberta (KRUEL; PEIXOTO, 2004; FONSECA-KRUEL et al., 2006).

As regiões de ocorrência no Rio de Janeiro, encontram-se amplamente degradadas pelo homem e, embora a espécie não esteja ameaçada de extinção, os impactos, incluindo a coleta indiscriminada, pode acarretar, em períodos variáveis, uma erosão genética importante nas populações naturais (MACHLINE, 2008; CARVALHO et al., 2018).

Chrysobalanus icaco L é uma espécie altamente tolerante às condições ambientais extremas, como altos índices de salinidade, estresse hídrico por baixa umidade, solo pobre e arenoso, podendo se desenvolver também em regiões pantanosas e/ou alagadas (VARGAS-SIMÓN, 1998; SANTANA et al., 2000).

Figura 1 : Distribuição geográfica mundial de *Chrysobalanus icaco* L (Chrysobalanaceae)



Legenda: Pontuadas em amarelo as regiões de ocorrência de *Chrysobalanus icaco* L.

Fonte: PARACAMPO, 2017.

Figura 2 : Distribuição geográfica de *Chrysobalanus icaco* L no Brasil



Legenda: Regiões destacadas em cores da ocorrência de *Chrysobalanus icaco* L. no Brasil

Fonte: FLORA DO BRASIL, 2020.

1.1.1 Caracterização Taxonômica

A primeira descrição da família, na literatura foi realizada pelo botânico Robert Brown, em 1816 (FEITOSA et al., 2012). São Angiospermas pertencentes à subclasse Dicotiledonea; super ordem Rosidae; ordem Rosales; família Chrysobalanaceae e gênero *Chrysobalanus* (DAHLGREN, 1980), que abriga em torno de 20 gêneros e cerca de 530 espécies de plantas (PEDRETE, 2018), distribuídas por várias partes do mundo, caracterizando-se como uma família pantropical, podendo manifestar-se em forma de arbustos, lianas ou até árvores, encontradas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente nas Américas (CORRÊA et al, 2015; YAKANDAWALA et al., 2010).

Na vegetação de restinga, o abajeru apresenta-se na sua forma arbustiva que varia de 1,5 a 3 metros de altura (Figura 3-A) (PERES, 2012; SÁ; LOCATELLI, 2012), podendo atingir até 6 metros de altura (Figura 3-B) (SILVA; PEIXOTO, 2009; BROWN; COOPRIDER, 2011; SOUSA, 2016) e com ramos rastejantes de coloração acinzentada e com presença de lenticelas esbranquiçadas (SOUSA, 2016; FRANK; BROWN, 2018).

Figura 3: Hábito de crescimento de *Chrysobalanus icaco* em diferentes ambientes.



Legenda: A - Crescimento horizontal, ocorrente em regiões de restinga aberta; B - Crescimento vertical, ocorrente em regiões de restinga fechada.

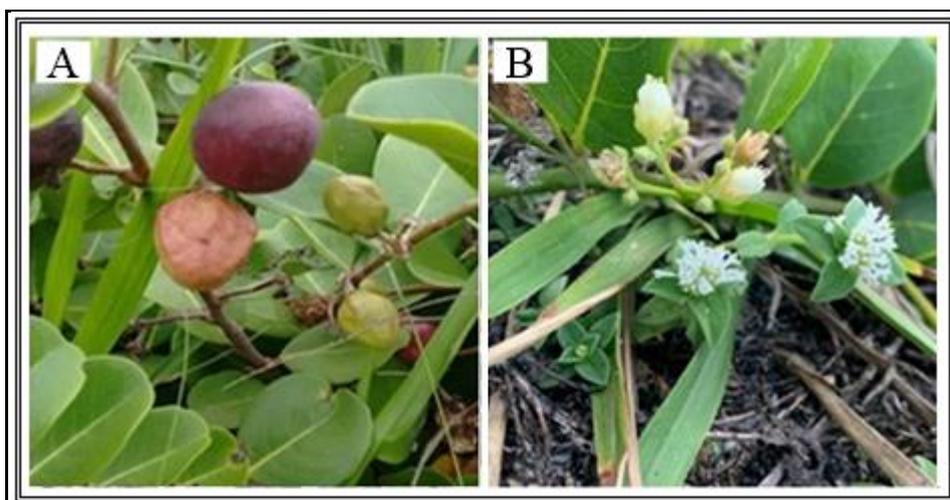
Fonte: BROWN, 2011; FRANK e BROWN, 2018.

De acordo com Silva e Peixoto (2009), suas folhas são geralmente orbiculares a ovado-elípticas, com variação de 2 a 8 cm de comprimento e 1,2 a 6,0 cm de largura, retusas, arredondadas ou com pequeno acúmulo no ápice, base sub-cuneada, glabras em ambas as faces e com pecíolo medindo 2 a 4 mm de comprimento. Sua caracterização florística é classificada como do tipo inflorescência, com pequenas flores de cor clara, com cerca de 7 a

11 milímetros de comprimento, geralmente vistosas, dotadas de brácteas, com tubo floral desenvolvido, pentâmera, ou seja, possuem cinco sépalas, cinco pétalas, dialipétalas, cinco estames a numerosos, às vezes dispostos unilateralmente, com filetes muitas vezes evidentes, exsertos e coloridos, ovário súpero, com estilete inserido na base (GIULIETTI et al., 2009; AGUIAR, 2010) (Figura 4).

A floração e frutificação do abajeru ocorre durante todo o ano (SOUSA, 2016), com frutos do tipo drupa seca ou carnososa (PRANCE, 1973). Com aproximadamente 3 cm de diâmetro, o fruto do abajeru apresenta coloração arroxeada, quando maduros, polpa branca, macia e adocicada comestível (SOUSA, 2016) (Figura 4). Sua semente é do tipo noz, possuindo uma casca dura e uma amêndoa tenra (VARGAS-SIMÓN et al., 2000).

Figura 4: Aspectos morfológicos de *Chrysobalanus icaco* L



Legenda: A- folhas e frutos do abajeru; B- inflorescência do abajeru.

Fonte: O autor, 2019.

Os indivíduos ocorrentes em restinga fechada podem apresentar múltiplos troncos por arbusto e apresentar características diferentes em relação ao tamanho e coloração de folhas e frutos (BROWN; COOPRIDER, 2011; FRANK e BROWN, 2018). Os indivíduos com tronco simples, apresentam diâmetro de aproximadamente 12 a 17 centímetros de espessura (FRANK; BROWN, 2018). A ramificação do tronco pode não ocorrer até que o crescimento atinja vários metros da altura, quando apresentam folhagem densa. Em plantas mais velhas com troncos múltiplos, a folhagem densa tocando o solo, apresenta um aspecto morfológico simétrico arredondado ou em forma de cúpula (FRANK; BROWN, 2018).

1.1.2 Aspectos Biológicos e Ecológicos

As plantas características do ambiente de restinga, cumprem um importante papel na conservação do ambiente, que é caracterizado por ventos constantes e dunas móveis de areia e praias. A fixação do solo das dunas é promovida por raízes das espécies vegetais que recobrem o substrato, protegendo-o da ação dos fortes ventos, que agem como potencial agente modificador das paisagens litorâneas (ASSUMPÇÃO; NASCIMENTO, 2000; DEPRÁ, 2018).

As plantas, como organismos sésseis, necessitam interagir com o ambiente no qual estão inseridas, favorecendo sua reprodução. Muitos dos recursos apresentados pelas plantas, compartilham uma interação mútua com animais, principalmente insetos (OLLERTON et al., 2011), que facilitam e possibilitam o cruzamento e o sucesso reprodutivo dessas plantas através da polinização, um processo fundamental de reprodução cruzada e diversificação intraespecífica das Angiospermas que, sem essa interação, sofreriam declínio populacional (KEARNS et al., 1998). Assim, a presença de polinizadores é essencial no estabelecimento de populações vegetais em diversas áreas, como as de restinga, sendo esse um dos ambientes mais degradados (DEPRÁ, 2018).

O abajeru depende de polinizadores para sua reprodução, podendo ser ocasionada pela ação do vento (anemofilia) ou principalmente por insetos (entomofilia) (BROWN; COOPRIDER, 2011), dentre estes, no entanto, os polinizadores mais frequentes, são as vespas, que realizam a dispersão do pólen e o cruzamento entre os indivíduos, favorecendo a diversificação genética da espécie (SÁ; LOCATELLI, 2012). Ainda sobre os agentes entomófilos, várias outras espécies podem realizar a polinização, devido à alta concentração de néctar presente nos discos nectaríferos nas flores, na maior parte do ano, devido à floração anual constante (SOUSA, 2016).

A polinização cruzada dos indivíduos de *Chrysobalanus icaco* é facilitada devido a sua distribuição geográfica local, ou seja, a proximidade entre os arbustos permite que agentes polinizadores atuem de maneira mais eficaz. Suas flores possuem características morfológicas que facilitam a polinização por meio da ação entomófila, como a presença de uma corola encurtada, por exemplo, o que facilita o acesso dos insetos polinizadores às nectarinas que, caracteriza este tipo de polinização (FREITAS;LOCATELLI, 2009).

A propagação do abajeru normalmente se dá com o auxílio de diferentes animais que atuam como agentes dispersores da semente ou frutos próximos à planta matriz, por abscisão do pedúnculo, podendo também ocorrer propagação vegetativa natural (FRANCIS, 2003; WILLIAMS, 2007; BROWN; COOPRIDER, 2011). No meio natural da restinga, sob a ação dos ventos, a planta assume uma conformação estrutural arbustiva e rasteira, na qual o caule se desenvolve próximo ao solo, o que permite que a planta, em contato com o substrato, produza raízes a partir de nós caulinares e espalhe-se radialmente (ARAÚJO;PEREIRA, 2009). Com base nesse mecanismo fisiológico, a propagação clonal foi obtida artificialmente por estaquia, em resposta ao tratamento com altas concentrações de auxinas (VARGAS-SIMÓN et al., 1999; LÓPEZ, 2004; RAMÍREZ-VILLALOBOS et al., 2004).

1.1.3 Importância Econômica

Diversos usos populares são descritos na literatura para *Chrysobalanus icaco*. Um levantamento realizado por Silva e Peixoto (2009) mostra que o abajeru é uma planta comumente utilizada na medicina tradicional, na alimentação, como tinturas e no comércio. Devido a alguns efeitos biológicos potenciais para o tratamento de doenças, muitas partes da planta são utilizadas no preparo de medicamentos, extratos, óleos e unguentos (SILVA; PEIXOTO, 2009). Suas atividades incluem principalmente um efeito hipoglicemiante, sendo muito utilizado no tratamento de diabetes, sob a forma de chá, a partir das folhas (BARBOSA et al., 2013; FERREIRA-MACHADO et al., 2014; WHITE et al., 2016). A planta também é usada no tratamento de disenterias e cálculos renais (FONSECA-KRUEL; PEIXOTO, 2004).

Além disso, apresenta propriedades farmacológicas comprovadas, como atividade antioxidante (FERREIRA-MACHADO et al., 2004; PRESTA et al., 2007; BARBOSA et al., 2013; PORT'S, et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014) e diurética (VENANCIO et al., 2018), antirretrovirais (GUSTAFSON et al., 1991), antiangiogênicas (FERNANDES et al., 2003), antileishmanias (RIBEIRO et al., 2014), e como agente anti-tumoral (FERNANDES et al., 2003). Estes efeitos estão associados a substâncias oriundas do metabolismo secundário, tais como terpenóides, flavonóides, esteróides e taninos (WHITE et al, 2016).

O abajeru é utilizado popularmente na América do Norte como planta ornamental ou em cercas vivas, devido a sua conformação arbustiva, podendo também ser utilizada para estabilização do solo, prevenindo a erosão (SOUSA, 2016). Em alguns países da América Latina o abajeru pode ser utilizado como fonte alimentar, uma vez que seus frutos, que

possuem polpa adocicada são comestíveis e em diversos países podem ser comercializados em feiras locais, sob a forma de geleias e compotas (SILVA; PEIXOTO, 2009).

Devido ao grande potencial econômico da espécie a exploração das plantas vêm sendo realizada de forma inadequada, já que não há cultivo convencional no Brasil. Assim, diversas atividades humanas vêm causando erosão genética e desaparecimento acelerado de populações (AGUIAR, 2011), afetando a diversidade da espécie e conseqüentemente o uso econômico de genótipos interessantes que podem desaparecer. Em áreas de restinga, destaca-se a coleta predatória que está associada à expansão imobiliária. Portanto, existe uma demanda urgente de estudos envolvendo a biologia, a fitoquímica e a conservação da biodiversidade da espécie.

1.2. Marcadores Moleculares

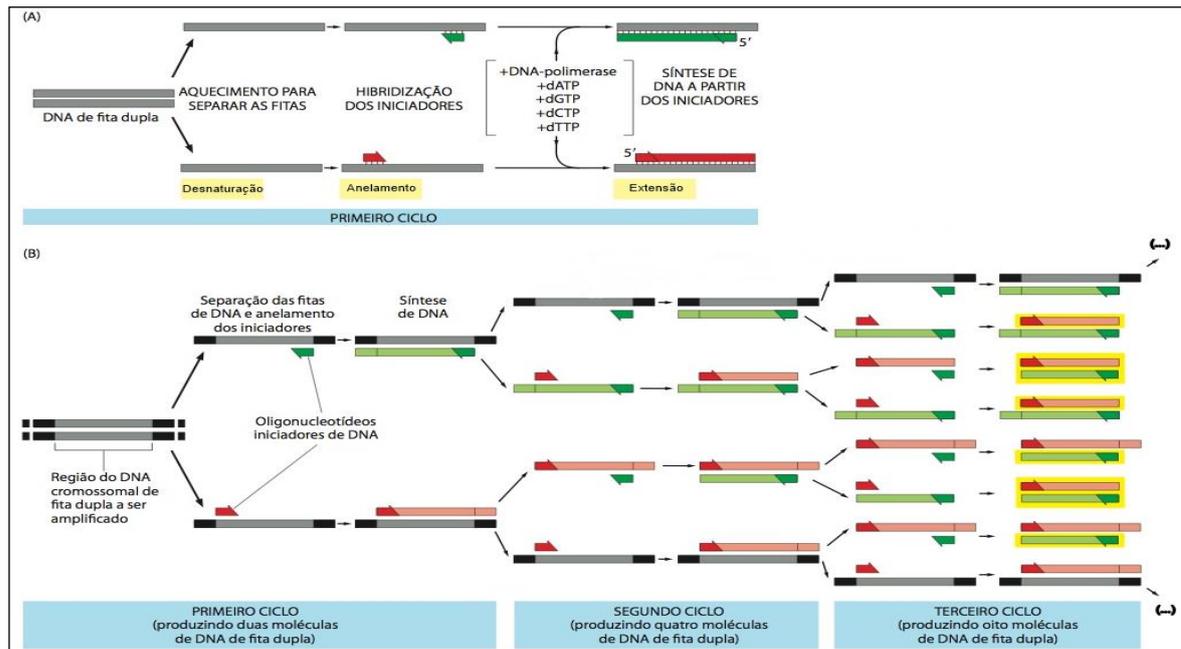
Diversos meios de análise comparativa foram desenvolvidos com o passar do tempo a fim de obter informações a respeito da diversidade das espécies. Os marcadores moleculares são sequências de DNA, que são capazes de revelar polimorfismos (padrões genéticos de diferenças) entre indivíduos relacionados. Atualmente constituem a principal ferramenta aplicada em inúmeros estudos de diversidade genética, constituindo um recurso biotecnológico importante para a obtenção de informações sobre padrões comparativos entre organismos a nível de genoma (BORÉM;MIRANDA, 2005; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Outros métodos, em geral mais antigos, como os marcadores morfológicos, possibilitam a análise das características morfológicas, ou seja, informações visuais expressas no fenótipo (FERREIRA;GRATTAPAGLIA, 1998). Estes marcadores ainda são considerados fundamentais ao melhoramento genético convencional, facilitando a seleção de algumas características desejáveis (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Em meados da década de 80, com o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), ou Reação em Cadeia da Polimerase, pelo bioquímico americano Kary Mullis (DAHM, 2005), houve uma mudança significativa nas pesquisas de estudo genético (LORENZ, 2012). Trata-se de uma metodologia fundamentada no processo natural de replicação, aplicada a segmentos do genoma, que são amplificados de forma rápida, utilizando-se quantidades pequenas de DNA. A técnica utiliza como base a enzima *Taq*

Polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus* descoberta por Thomas Brock em fontes termais em Yellowstone (BBC, 2020) e se baseia em oscilações de temperatura no termociclador, para produzir, exponencialmente, cópias da região selecionada através dos processos de desnaturação, anelamento e alongamento da fita de DNA (Figura 5) até que se obtenha milhares de cópias da região amplificada ao final do processo.

Figura 5: Esquematisação do processo de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR)



Fonte: Adaptado de Bruce, ALBERTS., JOHNSON, Alexander, LEWIS, Julian, ROBERTS, Keith, WALTER, Peter, and RAFF, Martin. *Biologia Molecular da Celula*, 5ª edição. ArtMed, 2011. pág 545.

Os marcadores moleculares são caracterizados em duas principais divisões: os marcadores baseados em hibridização e os marcadores baseados em PCR. Os marcadores baseados em hibridização caracterizam-se pelo uso de fragmentos de DNA como sondas, marcadas com isótopos radioativos ou fluorescentes, para detectar polimorfismos nas sequências do DNA que são homólogas ao marcador. Já os marcadores baseados em PCR são nucleotídeos sintéticos de DNA e que são complementares a uma região alvo específica, geralmente aleatória, do genoma, possibilitando a amplificação da sequência alvo e gerando grande quantidade de cópias (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Os marcadores moleculares podem, também, ser classificados de acordo com o tipo de herança alélica, sendo assim classificados como marcadores dominantes e codominantes. Marcadores codominantes, possibilitam o estudo dos indivíduos homocigotos e heterocigotos, procedimento que não é possível realizar utilizando marcadores dominantes,

onde só é possível observar a presença ou ausência do alelo dominante (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Os marcadores moleculares têm sido uma ferramenta de grande eficiência para estudos de genética e melhoramento vegetal (JOSHI et al., 2004; EL-DOMYATI et al., 2011). São aplicados em análises do grau de parentesco e linhagem entre indivíduos, no monitoramento de cultivares produzidas, na produção de clones e híbridos e na construção de mapas genéticos (BUSO et al., 2009). Uma grande vantagem em trabalhos com espécies vegetais, é a possibilidade de serem usados em todo o genoma, independentemente do estágio atual de desenvolvimento do indivíduo, permitindo a obtenção de um número extenso quase ilimitado de marcadores, ressaltando então sua aplicação em pesquisas de biotecnologia vegetal (LEITE, 2020).

Dentre os diversos tipos de marcadores baseados em PCR, os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e SCoT (*Start Codon Targeted*), descritos abaixo, apresentam diversas vantagens em relação aos marcadores baseados em hibridização, sendo uma importante delas, a demanda de concentrações muito baixas de DNA (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

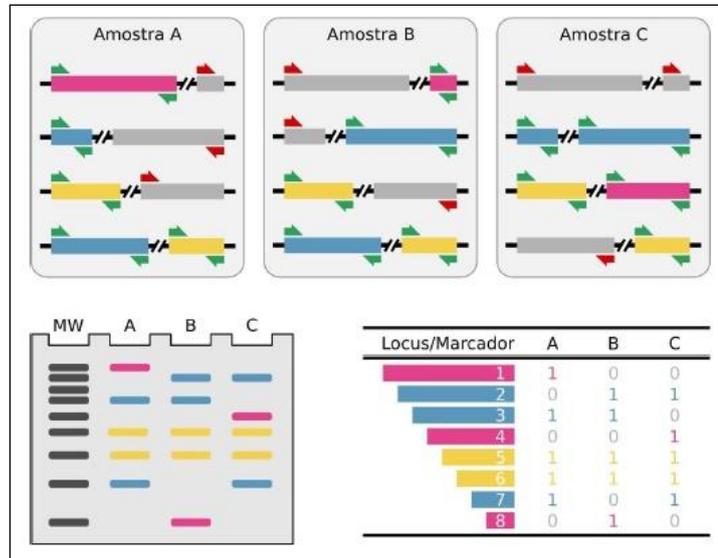
1.2.1. Marcadores RAPD

Os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) consistem, ainda atualmente, nos tipos de marcadores moleculares mais amplamente utilizados em pesquisas que dependem da identificação de polimorfismos de DNA vegetal (OLIVEIRA et al., 2001; LUZ, 2018). Esta técnica se baseia na utilização de iniciadores decâmeros (10 bases nitrogenadas) de uma sequência aleatória com 60% ou mais de conteúdo G+C (guanina + citosina) (FRITSCH; RIESEBERG, 1996; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

A amplificação se dá quando o iniciador se liga com a região complementar oposta na molécula de DNA alvo (Figura 6) dentro de aproximadamente 2000 bases, considerando que a enzima *Taq Polimerase* não possui a capacidade de percorrer grandes segmentos de bases do DNA (FRITSCH; RIESEBERG, 1996; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017), resultando em um padrão de bandas, produto do número de iniciadores utilizados na reação, e que podem ser visualizadas através de eletroforese em gel de agarose (1,4%) (BINNECK et al., 2002). A sequência de nucleotídeos da amostra de DNA analisada deve ser complementar à sequência do iniciador utilizado. Uma vez que haja

variação de nucleotídeos ou da sequência nas regiões de anelamento, essa ocorrência pode resultar em um polimorfismo de RAPD (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Figura 6 – Esquematização do processo de amplificação de um fragmento de DNA por PCR utilizando iniciador RAPD.



Fonte: Leite, 2020.

Legenda: Esquematização do processo da reação do marcador RAPD com visualização de bandas polimórficas para dado locus. Verde: iniciador RAPD hibridiza em duas posições permitindo a amplificação da sequência ligada ao marcador. Vermelho: iniciador que hibridiza também na região mas necessita de outro iniciador para amplificar. Amarelo: Locus monomórfico. Azul: Locus polimórfico com alelos positivos compartilhados. Rosa: Locus polimórfico com alelo positivo único. MW: padrão de peso molecular.

Por se tratar de um marcador dominante, o RAPD é incapaz de diferenciar indivíduos homocigotos de indivíduos heterocigotos, apresentando padrões de presença e ausência de bandas polimórficas, entre indivíduos e populações, a partir do produto amplificado (BORÉM; MIRANDA, 2005). No entanto, o marcador é amplamente utilizado também em estudos de diversidade e variabilidade genética, devido as modernas técnicas de análise disponíveis para estes objetivos (FUNGARO, 2000; DIAS et al, 2015; PIRES et al, 2015; SILVA et al, 2019).

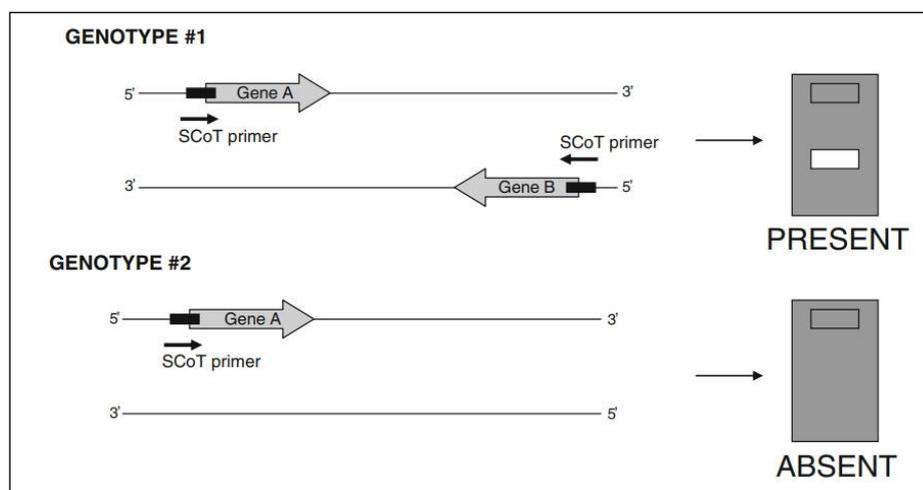
Trata-se de um marcador que apresenta algumas vantagens se comparado a outros marcadores e técnicas de análise genômica, como por exemplo: é um marcador molecular que relativamente não apresenta custos extensivos, é uma técnica não radioativa, demanda quantidades muito baixas de DNA (5-25ng), além de não demandar conhecimento prévio do genoma a ser analisado. A técnica pode ser realizada e apresentar resultados em poucas horas

e a facilidade de se obter um número extenso de marcadores aleatoriamente distribuídos ao longo do DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998b), sendo a última característica importante na escolha do marcador para estudos de genética em plantas.

1.2.2. Marcadores SCoT

SCoT (*Start Codon Targeted*) é um tipo de marcador molecular semelhante ao RAPD e também utiliza como mecanismo um único iniciador, também arbitrário, que se anela à região alvo correspondente à sequência do iniciador (Figura 7), mas que possui como característica exclusiva a sequência complementar à região alvo, a ser amplificada, flanqueada pelo códon inicial ATG do genoma de espécies vegetais.

Figura 7 – Esquematização do processo de amplificação de um fragmento de DNA por PCR utilizando iniciador SCoT.



Fonte: Collard e Mackill (2009).

Desenvolvido por Collard e Mackill (2009), esse marcador tem como vantagens sua simplicidade e alta reprodutibilidade, além de sua especificidade voltada ao genoma de plantas (COLLARD; MACKILL, 2009; SHEKHAWAT et al., 2018) e devido a isso, tem sido utilizado com eficiência em diversos tipos de estudos de espécies, como análises de diversidade (BHATTACHARYYA et al., 2013; SINGH et al., 2017), semelhança genética entre indivíduos de mesma espécie ou diferentes (XIONG et al., 2011; RAJESH et al., 2015) *loci* de características quantitativas (QTL), mapeamento e análise de segregação em massa (COLLARD; MACKILL, 2009), estudos de variabilidade genética de plantas *in vitro*

(AGARWAL et al., 2015; BHATTACHARYYA et al., 2015; VASUDEVAN et al., 2017), estudos relacionados a *Fingerprinting* (CABO et al., 2014) e análises de estrutura populacional (BHAWNA et al., 2017).

Dentre todos os marcadores moleculares baseados em PCR, o SCoT tem sido observado com frequência em estudos de genética, conservação e melhoramento (SATYA et al., 2015). A vantagem sobre os demais marcadores (como RAPD, por exemplo), está na sua maior capacidade de detectar polimorfismos genéticos, além de apresentar uma melhor resolução (GORJI et al., 2011). Assim como os demais marcadores simples, os produtos dos marcadores SCoT são visualizados por eletroforese em gel de agarose e coloração padrão, o que torna esta técnica acessível para a grande maioria dos laboratórios e instituições que realizam estudos e pesquisas com diversos tipos de plantas (COLLARD; MACKILL, 2009).

Os marcadores SCoT, em geral, são reprodutíveis, mas algumas exceções indicaram que o comprimento do iniciador e a temperatura de anelamento são fatores de alta relevância que determinam a reprodutibilidade do iniciador (COLLARD; MACKILL, 2009). Alguns outros estudos apontam, também, que iniciadores com sequências mais longas apresentam reprodutibilidade superior em relação aos demais (DEBENER; MATTIESCH, 1998; TANAKA ; TANIGUCHI, 2002). O SCoT, no entanto, foi limitado pelo número de bases altamente conservadas dentro da região ATG, e o comprimento máximo ideal foi estabelecido com 18 nucleotídeos (COLLARD; MACKILL, 2009). A temperatura de anelamento também afeta a reprodutibilidade do marcador, interferindo nos produtos. Temperaturas recomendadas não devem exceder 50°C, já que temperaturas de anelamento superiores a 55°C não possibilitaram a visualização de bandas consideráveis (ATIENZAR et al., 2000; JOHNSON; CLABOTS, 2000).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a utilização de marcadores moleculares RAPD e SCoT, na caracterização de diferentes genótipos de *Chrysobalanus icaco* L. oriundos da restinga da Praia das Dunas, localizada em Cabo Frio, RJ.

Objetivos específicos

- Padronizar o protocolo de extração e quantificação de DNA para a espécie estudada;
- Avaliar a detecção de polimorfismos de DNA pela técnica de RAPD;
- Estabelecer a técnica de SCoT, com a determinação de iniciadores polimórficos para a espécie estudada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

O material vegetal foi coletado na Praia das Dunas, situada no município de Cabo Frio (22°54'28.0"S 42°02'06.0"W), na Região dos Lagos do estado do Rio de Janeiro (Figura 8). Um exemplar do material coletado encontra-se depositado no Herbário da Universidade do Rio de Janeiro, sob número de registro HRJ00011715.

Figura 8: Local de coleta de *Chrysobalanus icaco* L, localizado na restinga da Praia das Dunas – Cabo Frio / RJ.



Legenda: A - Aspecto rasteiro das moitas de *Chrysobalanus icaco*, característico do ambiente de restinga, indicadas pelo apontamento através de setas vermelhas; B - pontos de coleta no parque das dunas (Cabo Frio) das 5 moitas.

Fonte: ARAUJO, 2019.

Em função da propagação natural da espécie no ambiente estudado, a coleta do material seguiu o seguinte protocolo: foram selecionadas 5 diferentes moitas, divididas em 4 quadrantes cada moita, e codificadas de forma que cada quadrante correspondesse a um indivíduo diferente (Tabela 1).

A coleta das folhas foi feita de forma aleatória, a partir de ramos com aproximadamente 20 folhas cada, excisados de cada quadrante e acondicionados em sacos

plásticos devidamente identificados e armazenados em freezer para conservação do material coletado. Todos os locais de coleta citados na figura 4 foram devidamente georreferenciados, como mostrado na tabela 1 a seguir, para obter uma localização posterior mais precisa das moitas.

Tabela 1 – Georreferenciamento do local de coleta das moitas em Cabo Frio, RJ.

Indivíduos	Georreferenciamento
P1X1, P1X2, P1X3 e P1X4	22°54'22"S 42°01'58"W
P2X1, P2X2, P2X3 e P2X4	
P3X1, P3X2, P3X3 e P3X4	
P4X1, P4X2, P4X3 e P4X4	
P5X1, P5X2, P5X3 e P5X4	

Legenda: P – numeração do indivíduo ou moita selecionada; X – quadrante relacionado ao indivíduo.

3.2 Extração de DNA genômico

O DNA a ser analisado foi extraído de folhas frescas, seguindo protocolo de extração de DNA para espécies recalcitrantes (HEALEY et al., 2014), com algumas modificações (Figura 9).

As folhas foram pesadas em balança de precisão e separadas em lotes contendo 1 g de folha cada, e mantidas sob refrigeração para evitar a degradação do material genético, juntamente com o material utilizado para realizar a maceração (pistilo e almofariz) (HEALEY et al., 2014). Para este estudo, foram feitas quadruplicatas do material a ser analisado.

1 g de folha pesada em balança de precisão, sem a nervura central, foi utilizada para uma solução tampão contendo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) + β -Mercaptoetanol, mantida em banho maria aquecido a 65 °C. Após a preparação deste tampão de extração, o material vegetal foi submetido a maceração para quebra da parede da célula vegetal, utilizando nitrogênio líquido (NL), com o auxílio de almofariz e pistilo até obter um pó fino. O macerado foi posteriormente depositado em tubos tipo Falcon de 50 ml e acrescido de 10 ml do tampão de extração, previamente preparado, misturado por inversão suave e colocado

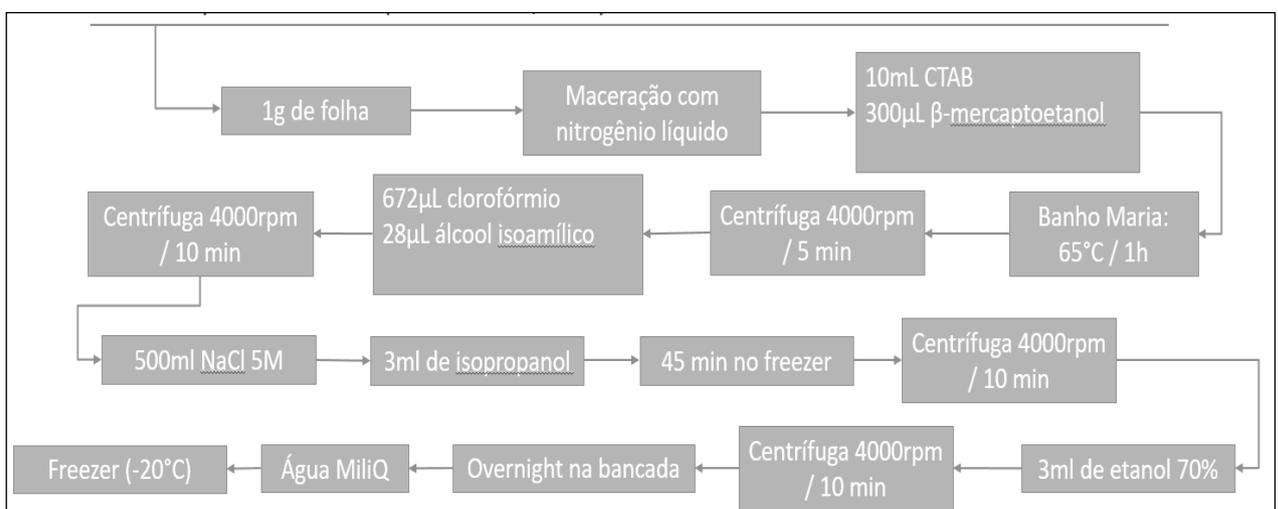
em repouso em banho maria a 65 °C, durante 1 hora, para lise da membrana da célula e exposição do material genético.

Após a incubação, os tubos contendo o material foram centrifugados a 4000 rpm (rotações por minuto) durante 5 minutos para sedimentação do tecido foliar não lisado, enquanto o conteúdo sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon. Em seguida, foi adicionado 1 volume (equivalente a 1000 µL) de uma solução pré preparada de 672 µL de clorofórmio + 28µL de álcool isoamílico em cada tubo contendo o material transferido e misturados suavemente por inversão. Foi realizada uma nova centrifugação das amostras, dessa vez a 4000 rpm durante 10 minutos, formando uma fase aquosa-orgânica no fundo e, novamente, o sobrenadante foi transferido a um novo tubo.

Foram acrescentados 500 ml de NaCl 5 M (cloreto de sódio), misturado suavemente por inversão, e em seguida adicionado 3 ml de isopropanol gelado em cada amostra, que foram acondicionadas por 45 minutos no freezer para precipitação do DNA genômico. Na sequência, o material foi centrifugado a 4000rpm por 10 minutos para sedimentação do DNA no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e o DNA sedimentado foi lavado com 3 ml de etanol 70%, agitado suavemente e centrifugado, a 4000 rpm por 10 minutos.

Por fim, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos sobre a bancada para secagem em temperatura ambiente durante 24 h. No dia seguinte, depois de seco, o DNA foi ressuspensionado em 200 µL de água MiliQ e armazenado no freezer (-20 °C).

Figura 9: Esquematização do processo de extração do DNA genômico.



3.3 Quantificação do DNA

Os padrões de visualização para quantificação (P25, P50, P75, P100 E P150) foram preparados utilizando os lambdas (λ_{10} e λ_{50}), água MiliQ e corante. Enquanto as amostras a serem quantificadas foram preparadas utilizando o DNA previamente extraído dos indivíduos acrescidos de corante e água MiliQ, conforme a tabela 2 a seguir.

Tabela 2 – Concentrações utilizadas no preparo das amostras para a corrida de quantificação do DNA.

<i>Padrões</i>	<i>H₂O</i>	<i>Corante</i>	<i>DNA</i>
P25	6,5 μ L	1 μ L	2,5 μ L de λ_{10}
P50	8,0 μ L	1 μ L	1,0 μ L de λ_{50}
P75	7,5 μ L	1 μ L	1,5 μ L de λ_{50}
P100	7,0 μ L	1 μ L	2,0 μ L de λ_{50}
P150	6,0 μ L	1 μ L	3,0 μ L de λ_{50}
Amostras	7,0 μ L	1 μ L	2,0 μ L do DNA

Após a preparação das amostras, todo o conteúdo foi pipetado em gel de agarose a 1% previamente preparado e corado com Brilliant Green a 10 μ L, e submetidos à corrida eletroforética, sob condições 200V e corrente elétrica 120, por aproximadamente 1 hora na cuba média.

A visualização das amostras foi feita através de equipamento fotodocumentador com emissão de luz ultravioleta do modelo Transilluminator L-PIX Molecular Imaging, a fim de estabelecer parâmetros quantitativos estimados de acordo com a concentração de DNA/ μ L, através da visualização das bandas geradas pela corrida eletroforética, considerando a intensidade e a espessura das bandas visualizadas no equipamento.

Além deste método de quantificação descrito, a qualificação do DNA das amostras foi verificada com o auxílio de equipamento espectrofotômetro do modelo Thermo Scientific Nanodrop 2000c, que realiza a medição dos valores totais de DNA presente nas amostras, desconsiderando a integridade dos fragmentos, além de apresentar também se há

contaminação ou presença de outras substâncias na amostra, que não o DNA. Este método foi aplicado em termos de quantificação para amostras que não apresentaram padrão visível de bandas após a corrida de eletroforese e submissão do gel ao equipamento transiluminador.

3.4 Seleção e preparo dos iniciadores

Para o RAPD foi realizada uma seleção dos iniciadores oligonucleotídeos (iniciadores) disponíveis no estoque do Laboratório de Marcadores Moleculares em Plantas do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ, que contava com 99 iniciadores (Quadro 1), compostos de 89 iniciadores pré existentes e 10 iniciadores recém sintetizados conforme a literatura disponível (PARACAMPO, 2017), que refere-se a análises moleculares em *Chrysobalanus icaco* L.

Quadro 1: Sequências dos iniciadores de RAPD avaliados para o estudo

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Referência	<u>Iniciadores</u>	<u>Sequência (5'-3')</u>	<u>Referência</u>
01	CCGGCCTTAC	SEMAGN, STEDJE e BJORNSTs, 2001	51	GAGAGCCAAC	K'OPONDO et al, 2009.
02	AAAACCGGGC		52	CAGAAGCGGA	
03	GTCCCAGAGC		53	GTCAGAGTCC	
04	GAGCTCGTGT		54	TTCAGGGCAC	
05	GCGGCTGGAG		55	ACGGGCCAGT	
06	AGTAGACGGG		56	CAGTGCCGGT	
07	TACGATGACG		57	GTCCGGAGTG	
08	GCTGCGTGAC		58	ACCTCGGCAC	
09	CGACCAGAGC		59	ACAGCCCCCA	
10	CTGAAGCGGA		60	TGAGCGGACA	
11	CTCGGGTGGG	VIEIRA, 1997; SUBRAMNIAN et al., 2000; DWIEDI et al., 2001;	61	AATCGGGCTG	CROCHEMORE et al, 2003.
12	AGTAGACGGG		62	GTCCACACGG	
13	GCTTGTGAAC		63	CCACAGCAGT	
14	TGACCGAGAC		64	ACCCCCGAAG	
15	TTCCGCGGGC		65	GGCACCTTAC	
16	GTAGACGAGC		66	ACCAGGTTGG	
17	GTCTTTCAGG		67	TGCCGTGAGA	
18	GCGGTTGAGG		68	ACGGAAGTGG	
19	CTTTCGTGCT		69	CAAAGGGCGG	
20	ATCTGGCAGC		70	CAATCGGGTC	
21	ACTCCACGTC	CLAIN et al., 2004.	71	GAACGAGGGT	
22	CACCGCAGTT		72	AACGGGCGTC	
23	AGCCAGGCTG		73	CTTGGCACGA	
24	GGCGTAAATC		74	TGAGGGCCGT	
25	GGGTGCAGTT		75	CTGGTCAGA	
26	CCGGGGTTAA	STEDJE; ZIRABA, 2003.	76	TGCCAAGAGG	CROCHEMORE et al, 2003.
27	TTAACCGGGG		77	CTGAAGCGCA	
28	GAGCACGGGA		78	GAGAGGCTCC	
29	GAGCCCGTAG		79	CTGGTGCTGA	
30	GCAAGTCACT		80	GACAGTCCCT	
31	TGCCGAGCTG	ROUT et al., 2006.	81	ND	SERVGEN - UERJ
32	GGGTAACGCC		82	ND	
33	TCTGTGCTGG		83	ND	
34	CCACAGCAGT		84	ND	
35	GATGACCGCC		85	ND	
36	TGGACCGGTG		86	ND	
37	GAGGGACCTC	OFFEI et al, 2004.	87	ND	
38	ACCCCCGAAG		88	GGGTAACGCC	
39	GATGACCGCC		89	GTAGACCCGT	
40	TTCCCCCAG		90	GTGATCGCAG	
41	ACCGCGAAGG		91	CAATCGCCGT	
42	CTTACCCGA	HU et al., 2008.	92	GGCTGTGTGG	PARACAMPO, 2017.
43	CCCGGCATAA		93	CCAGCCTCAG	
44	AGGGGTCTTG		94	GTGCGAGAAC	
45	ACGCCAGGT		95	TGCGTTCCAC	
46	CCACACTACC		96	GGGTGCATC	
47	GTGACCGACT		97	CCACAGCCGA	
48	ACACCGGAAC		98	AGGCGGGAAC	
49	CAGCCTACCA		99	CTGAGGTCTC	
50	GTAGCCGTCT	LAKHANPAUL et al, 2003.	-	-	-

Legenda: ND - Sequência não definida. SERVGEN: Serviço de Genética Humana.

Destes, foram selecionados 10 iniciadores (Tabela 3) considerando os resultados positivos obtidos através da utilização dos mesmos na literatura e em trabalhos equivalentes às análises moleculares e à espécie dita (ARAUJO, 2019; LEITE, 2020), como os padrões referentes ao número, espessura e densidade das bandas obtidas.

Tabela 3 – Iniciadores selecionados para as reações de amplificação RAPD em amostras de *C. icaco*

<i>Iniciador</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Equivalência Operon</i>	<i>Referência</i>
01	GTGATCGCAG	OPA-10	
02	CAATCGCCGT	OPA-11	
03	GGCTGTGTGG	OPAZ-03	
04	CCAGCCTCAG	OPAZ-04	
05	GTGCGAGAAC	OPBA-03	PARACAMPO, 2017.
06	TGCGTCCAC	OPBA-05	
07	GGGTCGCATC	OBPA-07	
08	CCACAGCCGA	OBPA-08	
09	AGGCGGGAAC	OPL-07	
10	CTGAGGTCTC	OPU-02	

Legenda: Equivalência Operon faz menção às sequências dos iniciadores comerciais da Operon Technologies (CA, EUA), com equivalência às sequências registradas no estoque do NBV-UERJ (Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ).

Para o SCoT, foram selecionados 15 iniciadores (Quadro 2) segundo a literatura de COLLARD; MACKILL (2009), cedidos gentilmente pela Dra Livia Cordeiro (LABPLAN – UERJ), representados abaixo.

Quadro 2 – Iniciadores cedidos para as reações de amplificação SCoT em amostras de *C. icaco*

<u>Iniciadores</u>	<u>Sequência (5'-3')</u>	<u>Referência</u>
1	CAACAATGGCTACCACCA	COLLARD; MACKILL, 2009.
2	CAACAATGGCTACCACCC	
3	CAACAATGGCTACCACCG	
4	CAACAATGGCTACCACCT	
5	CAACAATGGCTACCACGA	
6	CAACAATGGCTACCACGC	
7	CAACAATGGCTACCACGG	
12	ACGACATGGCGACCAACG	
13	ACGACATGGCGACCATCG	
16	ACCATGGCTACCACCGAC	
17	ACCATGGCTACCACCGAG	
27	ACCATGGCTACCACCGTG	
28	CCATGGCTACCACCGCCA	
32	CCATGGCTACCACCGCAC	
33	CCATGGCTACCACCGCAG	

Desses iniciadores, foram selecionados 10, descritos na Tabela 4, considerando os resultados positivos obtidos em trabalhos equivalentes às análises moleculares utilizando esse marcador em outra espécie (*Cleome spinosa* Jacq.), segundo VILARDO (2019).

Tabela 4 – Iniciadores selecionados para as reações de amplificação SCoT em amostras de *C. icaco*

<i>Iniciador</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Referência</i>
01	CAACAATGGCTACCACCA	
02	CAACAATGGCTACCACCC	
03	CAACAATGGCTACCACCG	
12	ACGACATGGCGACCAACG	
13	ACGACATGGCGACCATCG	COLLARD;MACKILL, 2019.
16	ACCATGGCTACCACCGAC	
17	ACCATGGCTACCACCGAG	
28	CCATGGCTACCACCGCCA	
32	CCATGGCTACCACCGCAC	
33	CCATGGCTACCACCGCAG	

3.5 Amplificação do DNA

3.5.1 Amplificação do DNA por RAPD

As amostras para amplificação foram calculadas e preparadas de acordo com as soluções estoque disponíveis e com base em trabalhos anteriores (LEITE, 2020). As amostras de DNA foram padronizadas a 5ng e individualmente dispostas em tubos do tipo eppendorf de 0,5mL, e submetidas a secagem em termociclador a 95°C durante 5 minutos, com a tampa aberta.

Após a secagem, foram acrescentados os demais componentes para a reação de PCR: tampão *buffer* a 10mm; dNTPs 200mm (Sigma), iniciadores à 100mm, MgCl₂ 25mm (Sigma) e Taq polimerase 5U (NeoBio). A amplificação do material foi realizada em termociclador do modelo Eppendorf Flexlid Mastercycler Nexus Gradient, com condições de ciclagem conforme protocolo estabelecido por Guimarães, 2007: temperatura inicial de 94°C por 2 minutos, seguido por 44 ciclos de 94°C por 1 minuto para a etapa de desnaturação da fita de

DNA, 35°C por 2 minutos para o anelamento do iniciador à região alvo e 72°C durante 2 minutos para a extensão da fita.

A análise dos produtos obtidos foi realizada por meio de corrida de eletroforese em gel de agarose preparados, desta vez, à concentração de 1,4%. O gel foi preparado utilizando-se agarose diluída em tampão TBE 1X, previamente pesada em balança de precisão, em volume de 300mL. Após solubilização do conteúdo, foi acrescentado o corante Brilliant Green (NeoBio) (10µl) no gel ainda líquido e reservado para posterior polimerização na cuba de eletroforese. Então, foi feita a pipetagem de 8µl de material amplificado para 2 de NeoTaq 6x Loading Buffer e 3 uL de *ladder* GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder e 2 uL de loading NeoTaq 6x Loading Buffer para referência. A corrida eletroforética foi feita em cuba horizontal Loccus Biotecnologia LCH 20X25 com fonte elétrica da Kasvi K33-300m. As condições de voltagem estabelecidas foram de 200V, com corrente elétrica à 120mA e 150 minutos de duração.

A visualização das bandas obtidas ao final do processo foi realizada conforme o processo descrito na etapa de quantificação do DNA, em equipamento transiluminador modelo L-PIX Molecular Imaging, com fotodocumentador acoplado.

3.5.2 Amplificação do DNA por SCoT

Diversos protocolos descritos na literatura foram avaliados e testados para amplificação de DNA por SCoT, com variadas etapas de ciclagem e concentração de DNA e reagentes. No entanto, na maioria dos testes não ocorreu amplificação. Para contornar as dificuldades e confirmar a possibilidade de amplificação do DNA da espécie estudada com os iniciadores selecionados, uma amostra de DNA de *Hovenia dulcis* foi utilizada como controle positivo da amplificação*.

Em seguida, os demais componentes da reação foram acrescentados, constituídos em: tampão *buffer* a 10X; dNTPs 10mM (Sigma), iniciadores à 8µM, MgCl₂ 25mM (Sigma) e Taq polimerase 5U (NeoBio). A amplificação do material foi realizada em termociclador do modelo Eppendorf Flexlid Mastercycler Nexus Gradient, com condições de ciclagem conforme protocolo estabelecido por RATHORE *et al* (2014): temperatura inicial de 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para a etapa de desnaturação da fita de

* CORDEIRO (comunicação pessoal, 06 de Outubro de 2021).

DNA, 50°C por 1 minutos para o anelamento do iniciador à região alvo, 72°C durante 2 minutos para a extensão da fita e 72°C por 8 minutos para extensão final.

A análise dos produtos obtidos pela reação foi realizada por meio de corrida de eletroforese em gel de agarose preparados à concentração de 1,2%. O gel foi preparado sob diluição de 3,6 g de agarose previamente pesada em balança de precisão em tampão TBE 1X a volume de 300 mL. Dada a solubilização do conteúdo, foi acrescentado o corante Brilliant Green (NeoBio) (10µl) no gel ainda em estado líquido e reservado para posterior polimerização na cuba de eletroforese. Então, foi feita a pipetagem de 9µl de material amplificado para 1 de Corante e 10 uL de *ladder* GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder para referência. A corrida eletroforética foi feita também em cuba horizontal Locus Biotecnologia LCH 20X25 com fonte elétrica da Kasvi K33-300m. As condições de voltagem estabelecidas foram de 130V, com corrente elétrica à 120mA e 150 minutos de duração.

A visualização das bandas obtidas ao final do processo foi realizada conforme o processo descrito na etapa de quantificação do DNA, em equipamento transiluminador modelo L-PIX Molecular Imaging, com fotodocumentador acoplado.

3.6 Análise dos dados

As imagens dos géis obtidas por fotodocumentação foram editadas em relação a cor e limpeza de ruídos provenientes de micropartículas do ambiente no software *Photoscape* versão 3.7. Os padrões de amplificação observados visualmente foram analisados com auxílio do aplicativo *Gel Analyzer* versão 19.1, para melhor detecção e avaliação dos perfis de bandas e tabulados na forma de matriz de dados binários considerando a presença ou ausência de bandas amplificadas e registrados em planilhas para a análise dos polimorfismos detectados.

No software, a metodologia de análise e interpretação se deu pela detecção das bandas geradas nos géis através do contraste entre o fundo escuro da imagem e os picos de luminosidade representando os fragmentos de banda. Uma vez estabelecidas as colunas e cada banda pertencente a cada uma delas, foram inseridas as referências do padrão de peso molecular (*Ladder*) a fim de estimar quantitativamente o tamanho e peso de cada banda gerada em cada iniciador.

4. RESULTADOS

4.1 Extração e quantificação do DNA

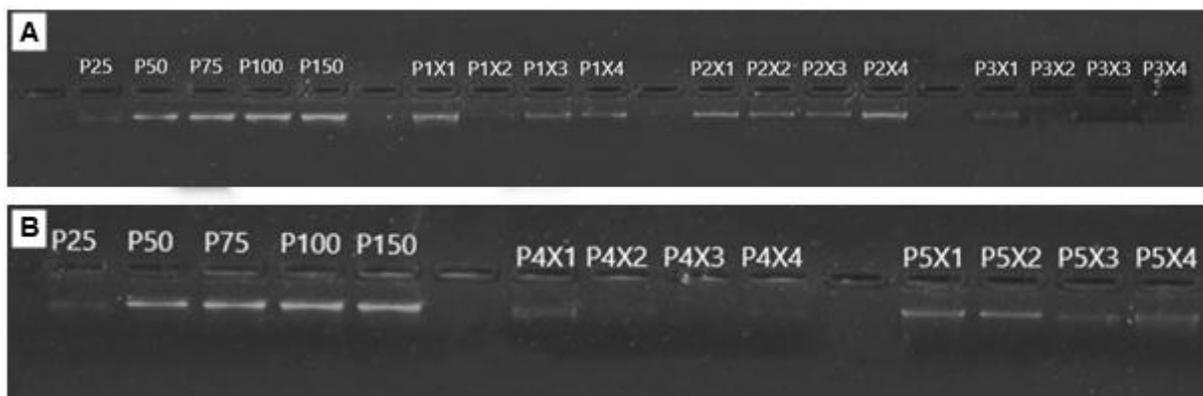
Em relação ao protocolo de extração utilizado, foi adequado e eficiente para a obtenção de DNA de *C. icaco*. A metodologia de secagem do *pellet* de DNA utilizada foi manter os tubos falcon na bancada em temperatura ambiente por 24h para evaporação dos compostos voláteis presentes nas substâncias utilizadas no processo de extração, assim como a presença dos compostos fenólicos e de substâncias derivadas do metabolismo secundário da planta, o que foi uma etapa significativa, visto os níveis de pureza das amostras obtidas na análise qualitativa (Tabela 5). Outras metodologias de secagem do *pellet*, como, por exemplo, a etapa de secagem dos tubos em temperatura ambiente por cerca de 15 minutos e secagem na estufa também por 15 minutos, foram testadas até que a primeira, onde os tubos são secos em temperatura ambiente, fosse tida como a mais eficiente. Foram obtidas concentrações de DNA entre 15 e 100 ng/μl após a quantificação por corrida eletroforética. Contudo, 2 dos indivíduos não apresentaram padrão visível de bandas, o que pode indicar insuficiência de DNA genômico íntegro nas amostras extraídas (Figura 10).

Tabela 5 – Quantificação do material por eletroforese em gel de agarose e por espectrofotometria

Amostras	[DNA] eletroforese em gel de agarose	[DNA] por espectrofotometria		
	Conc. (ng/ μ L)	Conc. (ng/ μ L)	OD 260/230	OD 260/280
P1X1	100	364.1	1.31	2.13
P1X2	10	147.4	0.55	1.98
P1X3	20	492	0.92	2.3
P1X4	20	203.6	1.16	2.3
P2X1	50	198.5	1.26	2.23
P2X2	50	213.5	1.18	2.26
P2X3	50	211.4	1.24	2.23
P2X4	100	487.9	1.84	2.28
P3X1	20	303.9	0.52	1.75
P3X2	10	496.3	1.14	2.04
P3X3	0	37.7	0.55	1.43
P3X4	10	467.7	1.88	2.22
P4X1	15	598.6	1.64	2.21
P4X2	10	79.8	0.59	1.69
P4X3	0	11.1	1.25	2.44
P4X4	5	28.6	1.14	2.21
P5X1	40	409.3	1.13	2.23
P5X2	40	128.3	1.25	2.14
P5X3	20	77.1	1.47	2.11
P5X4	25	506.2	1.27	2.17

Legenda: OD 260/30 e 260/280 referem-se a valores de absorvância em comprimentos de onda provenientes de outras substâncias moleculares que não DNA, como proteínas e compostos fenólicos.

Figura 10 – Gel de agarose contendo as amostras (P1X1 a P5X4) quantificadas por fluorescência.



Legenda: A – Quantificação das amostras P1X1 a P3X4; B Quantificação de P4X1 a P5X4 - As bandas em P25, P50, P75, P100 e P150 referem-se aos padrões de peso molecular utilizados na análise comparativa das amostras; As bandas de P1X1 a P5X4 referem-se ao DNA obtido da extração dos indivíduos analisados.

Fonte: O autor, 2019.

As análises realizadas por espectrofotometria através do NanoDrop® mostraram a presença de DNA, mesmo nos indivíduos que não apresentaram bandas mensuráveis, após a eletroforese. Este equipamento, utilizado para analisar qualitativamente o DNA amostral, gerou informações que indicam a pureza do material (OD 260/280; OD 260/230), e apresenta dados que apontam também a quantidade total de DNA presente em cada amostra.

As taxas de absorvância em OD 260/280, que medem a pureza do material analisado, permaneceram majoritariamente dentro dos padrões aceitáveis (>1,8-2,0), ou seja, os compostos e substâncias considerados contaminantes, não estavam presentes nas amostras qualificadas pelo NanoDrop®. Já as taxas de OD 260/230 indicaram a presença de algum contaminante nas amostras analisadas, problema a ser tratado futuramente, uma vez que as taxas foram obtidas abaixo dos padrões aceitáveis (2,0-2,2).

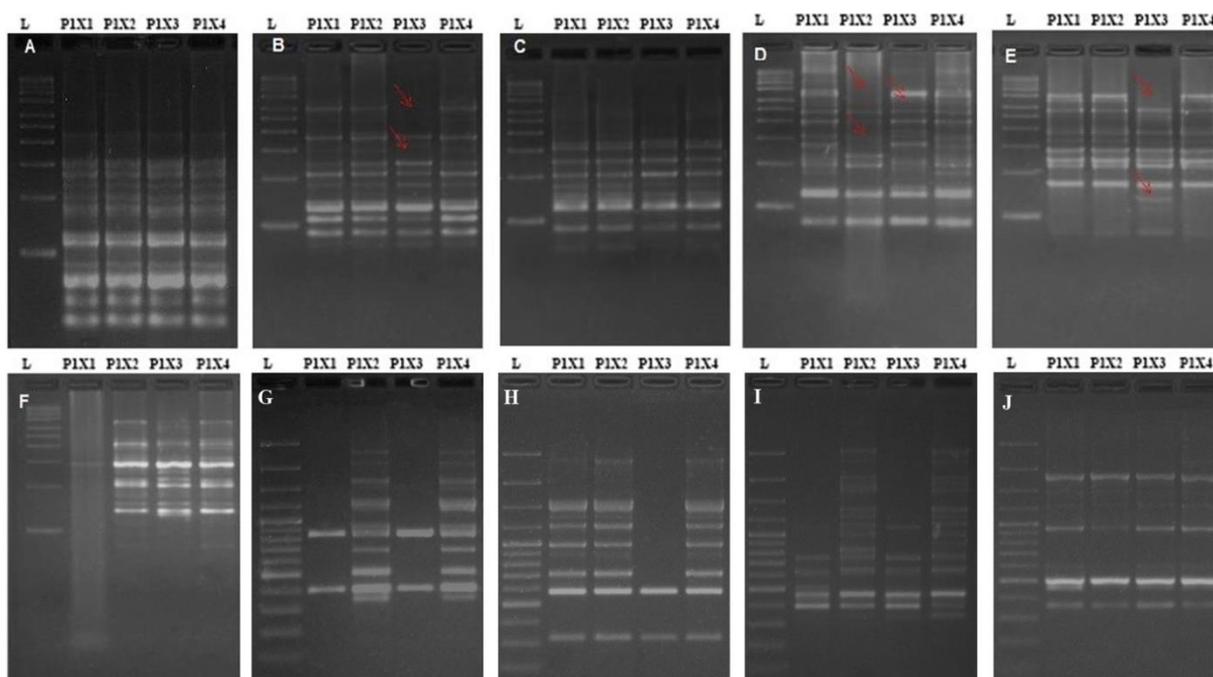
4.2 Amplificação do DNA

4.2.1 Amplificação do DNA por RAPD

A técnica, já aplicada com sucesso em trabalhos anteriores com a espécie (PARACAMPO, 2017; LEITE, 2020) mostrou bons resultados, conforme mostrado nas Figuras 11 a 16. O quantitativo de bandas monomórficas e polimórficas pode ser observado em detalhes no Quadro 3, para todos os indivíduos e iniciadores utilizados.

Em todos os indivíduos, o perfil de bandas variou em função do iniciador utilizado. Para a moita 1, com o iniciador 1, observou-se um perfil de bandas monomórficas (Figura 11A). No iniciador 2, foram identificados dois polimorfismos de ausência em P1X3, conforme apontado por setas em vermelho, porém o padrão de bandas nos outros três pontos foi monomórfico (Figura 11B). No iniciador 3, o padrão de bandas foi completamente monomórfico (Figura 11C). No iniciador 4, observou-se a presença de polimorfismos pontuais devido à ausência de 5 bandas, no entanto a presença de bandas monomórficas é predominante (Figura 11D). No iniciador 5, o padrão foi semelhante, com ausência de 2 bandas e presença de banda polimórfica em P1X3 e bandas monomórficas nas demais amostras, porém, de acordo com o gel de repetição, foi identificado um padrão monomórfico (Figura 11E). No iniciador 6, observou-se um padrão monomórfico (Figura 11F). Observou-se ausência de 3 bandas apenas em P1X1 representados pela Figura 16. O iniciador 7 apresentou monomorfismo entre P1X2 e P1X4 e entre P1X2 e P1X3 (Figura 11G). O iniciador 8 apresentou polimorfismos de ausência em P1X3 (Figura 11H). O iniciador 9 apresentou monomorfismo entre P1X2 e P1X4 e entre P1X2 e P1X3 (Figura 11I). O iniciador 10 apresentou padrões de monomorfismo, com bandas geradas nos mesmos locus (Figura 11J).

Figura 11: Géis de agarose representando a identidade genética de plantas componentes da moita 1, localizada na Praia das Dunas, Cabo Frio, RJ

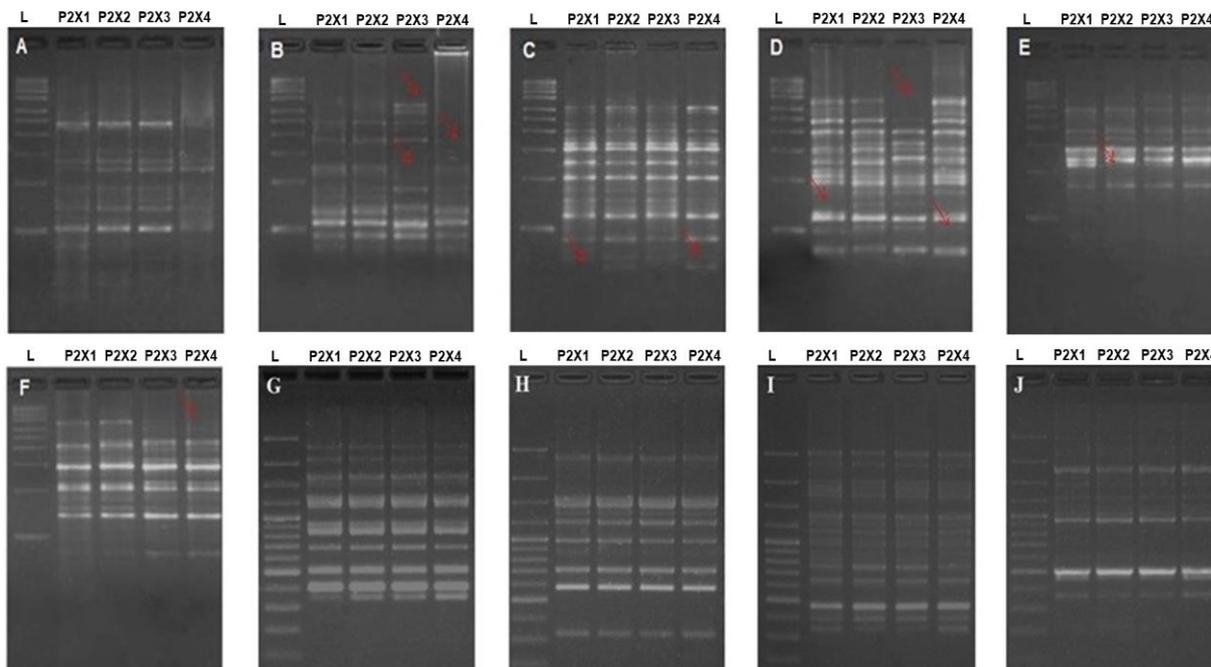


Legenda: RAPD das quatro regiões da moita 1: L – Marcador de peso molecular (Leader 1Kb); A - iniciador 1; B - iniciador 2; C - iniciador 3; D - iniciador 4; E - iniciador 5; F - iniciador 6; G – iniciador 7; H – iniciador 8; I – iniciador 9; J – iniciador 10.

Fonte: O autor, 2019.

Na moita 2, utilizando o iniciador 1, observou-se polimorfismos com a presença de 4 bandas em P2X4 de acordo com o gel de repetição representado na Figura 16. Entretanto, várias bandas monomórficas também foram observadas entre elas (Figura 12A). No iniciador 2, observa-se polimorfismos de presença e ausência, porém há, sobretudo, presença de bandas monomórficas dentro desta mesma moita (Figura 12B). No iniciador 3, foi observada a ausência de apenas 2 bandas, portanto a presença de bandas monomórficas foi predominante (Figura 12C). No iniciador 4, foi identificado alto índice de polimorfismo devido à ausência de 6 bandas, porém com várias bandas monomórficas presentes (Figura 12D). No iniciador 5, foi observada a ausência de uma banda em P2X2, sendo predominantes as bandas monomórficas (Figura 12E). No iniciador 6, o padrão monomórfico prevaleceu, com polimorfismo pontual de ausência em P2X4 (Figura 12F). Os iniciadores 7, 8, 9 e 10 apresentaram padrões de monomorfismo, com bandas geradas nos mesmos locus (Figuras 12G, 12H, 12I e 12J).

Figura 12: Géis de agarose representando a identidade genética de plantas componentes da moita 2, localizada na Praia das Dunas, Cabo Frio, RJ

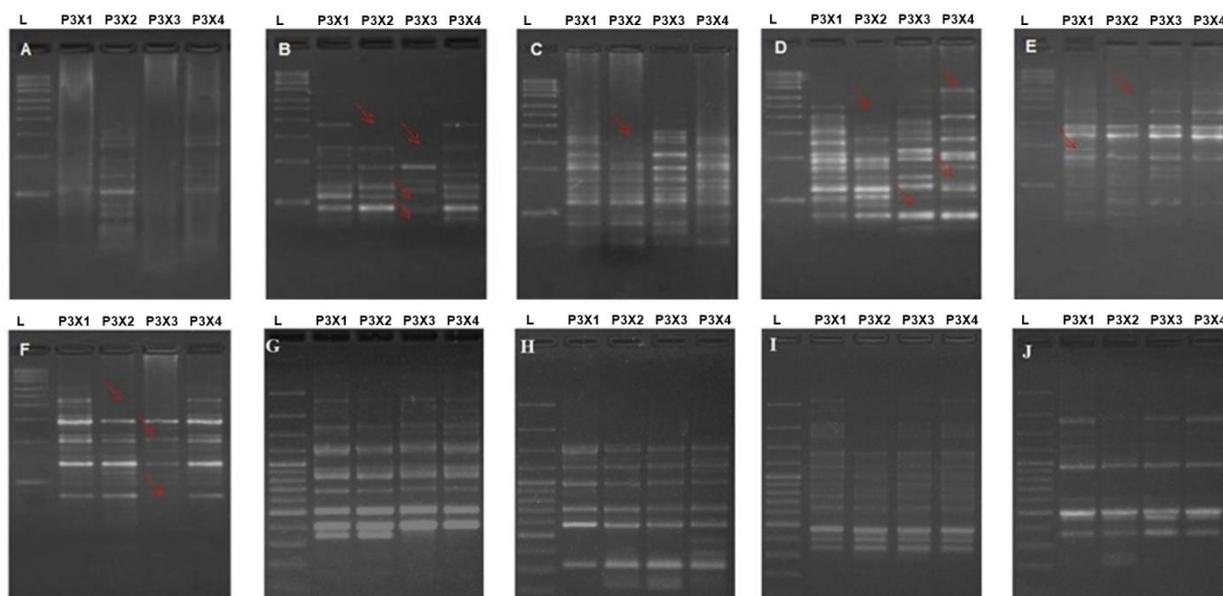


Legenda: RAPD das quatro regiões da moita 2: L – Marcador de peso molecular (Leader 1Kb); A - iniciador 1; B - iniciador 2; C - iniciador 3; D - iniciador 4; E - iniciador 5; F - iniciador 6; G – iniciador 7; H – iniciador 8; I – iniciador 9; J – iniciador 10.

Fonte, O autor, 2019.

Na moita 3, utilizando o iniciador 1, observou-se a presença de polimorfismos devido à ausência de bandas entre os pontos coletados de acordo com o gel de repetição da Figura 17 (Figura 13A). Com o iniciador 2, também foram identificadas bandas polimórficas com ausência de 4 bandas entre os quatro pontos analisados, com poucas bandas semelhantes entre elas (Figura 13B). No iniciador 3, foram observados alguns polimorfismos pontuais de ausência de algumas bandas (Figura 13C). No iniciador 4, 4 bandas de ausência foram identificadas. Porém, observou-se, também, similaridade entre algumas bandas e alguns polimorfismos de presença (Figura 13D). No iniciador 5, observou-se ausência de algumas bandas, presença de banda polimórfica e algumas bandas monomórficas similares (Figura 13E). No iniciador 6, verificou-se polimorfismo de ausência de 3 bandas pontuais, porém as demais bandas foram monomórficas (Figura 13F). Os iniciadores 7, 8, 9 e 10 também apresentaram padrões de monomorfismo para este indivíduo, com bandas geradas nos mesmos locus (Figuras 13G, 13H, 13I e 13J).

Figura 13: Géis de agarose representando a identidade genética de plantas componentes da moita 3, localizada na Praia das Dunas, Cabo Frio, RJ

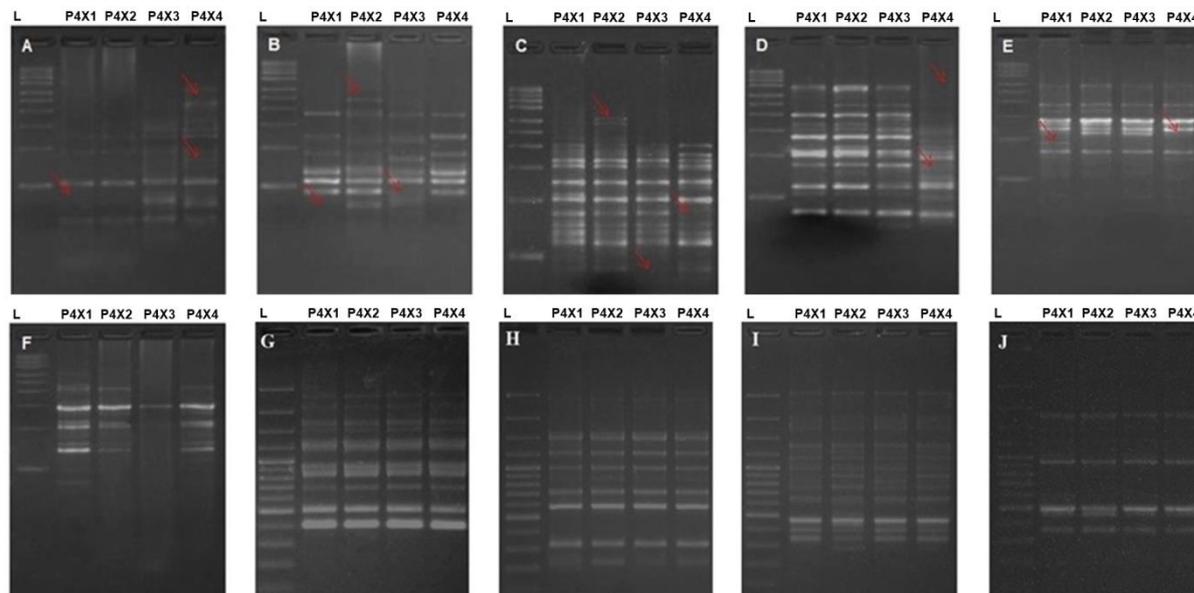


Legenda: RAPD das quatro regiões da moita 3: L – Marcador de peso molecular (Leader 1Kb); A - iniciador 1; B - iniciador 2; C - iniciador 3; D - iniciador 4; E - iniciador 5; F - iniciador 6; G – iniciador 7; H – iniciador 8; I – iniciador 9; J – iniciador 10.

Fonte: O autor, 2019.

Na moita 4, com o iniciador 1, o padrão se manteve regular com a observação de polimorfismos de ausência, alguns polimorfismos de presença em algumas bandas e semelhança entre elas (Figura 14A). Com o iniciador 2, da mesma forma, observaram-se polimorfismos devido à ausência de algumas bandas, porém também apresentaram semelhanças entre outras bandas (Figura 14B). Com o iniciador 3, foram observados apenas alguns polimorfismos por ausência e presença de algumas poucas bandas, porém a maioria das amostras apresentou bandas monomórficas (Figura 14C). Com o iniciador 4, foi notória a presença de bandas monomórficas. No entanto, apareceram polimorfismos pontuais em P4X4 com a ausência de 6 bandas (Figura 14D). Com o iniciador 5, também foram observadas bandas monomórficas e polimorfismos pontuais de ausência e presença de apenas 1 banda (Figura 14E). No iniciador 6 (Figura 14F), foi predominante a presença de bandas monomórficas, porém com a ausência de apenas 2 bandas de acordo com o gel de repetição da figura 16. Os iniciadores 7, 8, 9, e 10 apresentaram padrões de monomorfismo, com bandas geradas nos mesmos locus (Figuras 14G, 14H, 14I e 14J).

Figura 14: Géis de agarose representando a identidade genética de plantas componentes da moita 4, localizada na Praia das Dunas, Cabo Frio, RJ

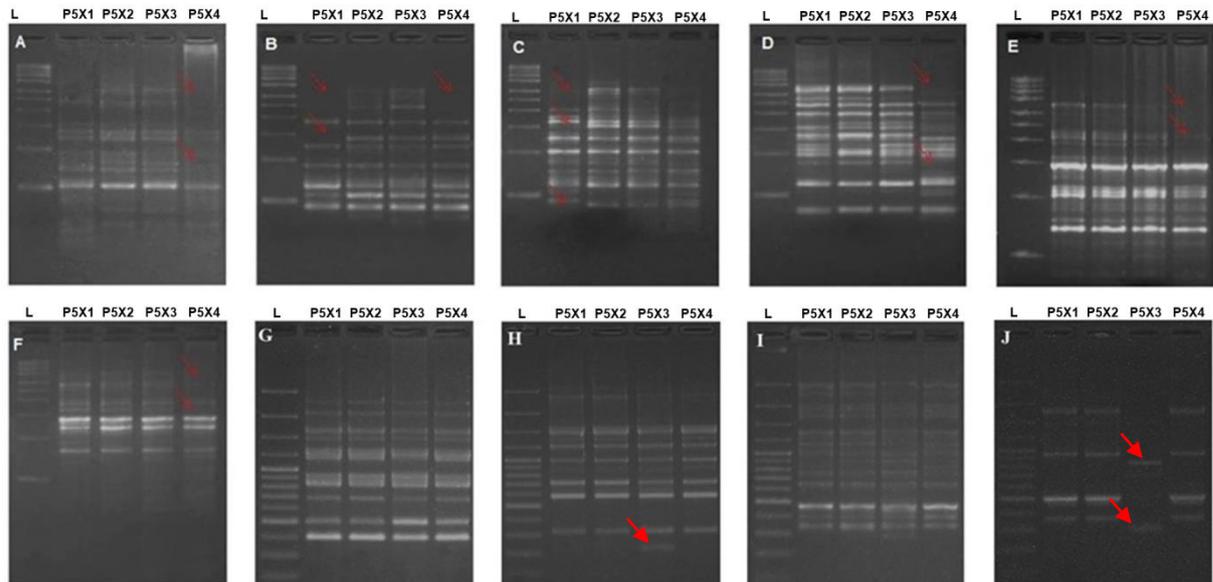


Legenda: RAPD das quatro regiões da moita 4: L – Marcador de peso molecular (Leader 1Kb); A - iniciador 1; B - iniciador 2; C - iniciador 3; D - iniciador 4; E - iniciador 5; F - iniciador 6; G – iniciador 7; H – iniciador 8; I – iniciador 9; J – iniciador 10.

Fonte: O autor, 2019.

Na moita 5, utilizando o iniciador 1, observou-se ausência de algumas bandas, sendo predominante a presença de bandas monomórficas (Figura 15A). No iniciador 2, notou-se polimorfismo de ausência entre P5X1 e P5X4, porém as bandas monomórficas foram majoritárias (Figura 15B). No iniciador 3, observou-se ausência de bandas entre P5X1 e P5X4, porém apresentou bandas monomórficas presentes entre as bandas nos quatro pontos de coleta dentro desta moita (Figura 15C). Com o iniciador 4, observou-se, principalmente, similaridade entre as bandas, porém foram identificados polimorfismos pontuais de ausência de algumas bandas em P5X4, principalmente (Figura 15D). No iniciador 5 o padrão foi semelhante ao anterior, com a identificação de bandas monomórficas em sua maioria. Porém, observou-se polimorfismo de ausência em P5X4 (Figura 15E). Já no iniciador 6, mais uma vez o padrão de bandas foi semelhante, mostrando, em sua maioria, bandas monomórficas, com polimorfismo pontual de ausência de poucas bandas em P5X4 (Figura 15F). Os iniciadores 7, e 9 também apresentaram padrões de monomorfismo para este indivíduo, com bandas geradas nos mesmos locus (Figuras 15G e 15I). No iniciador 8, é possível observar uma banda polimórfica em P5X3 (Figura 15H) e no iniciador 10, 2 bandas polimórficas também em P5X3 (Figura 15J).

Figura 15: Géis de agarose representando a identidade genética de plantas componentes da moita 5, localizada na Praia das Dunas, Cabo Frio, RJ

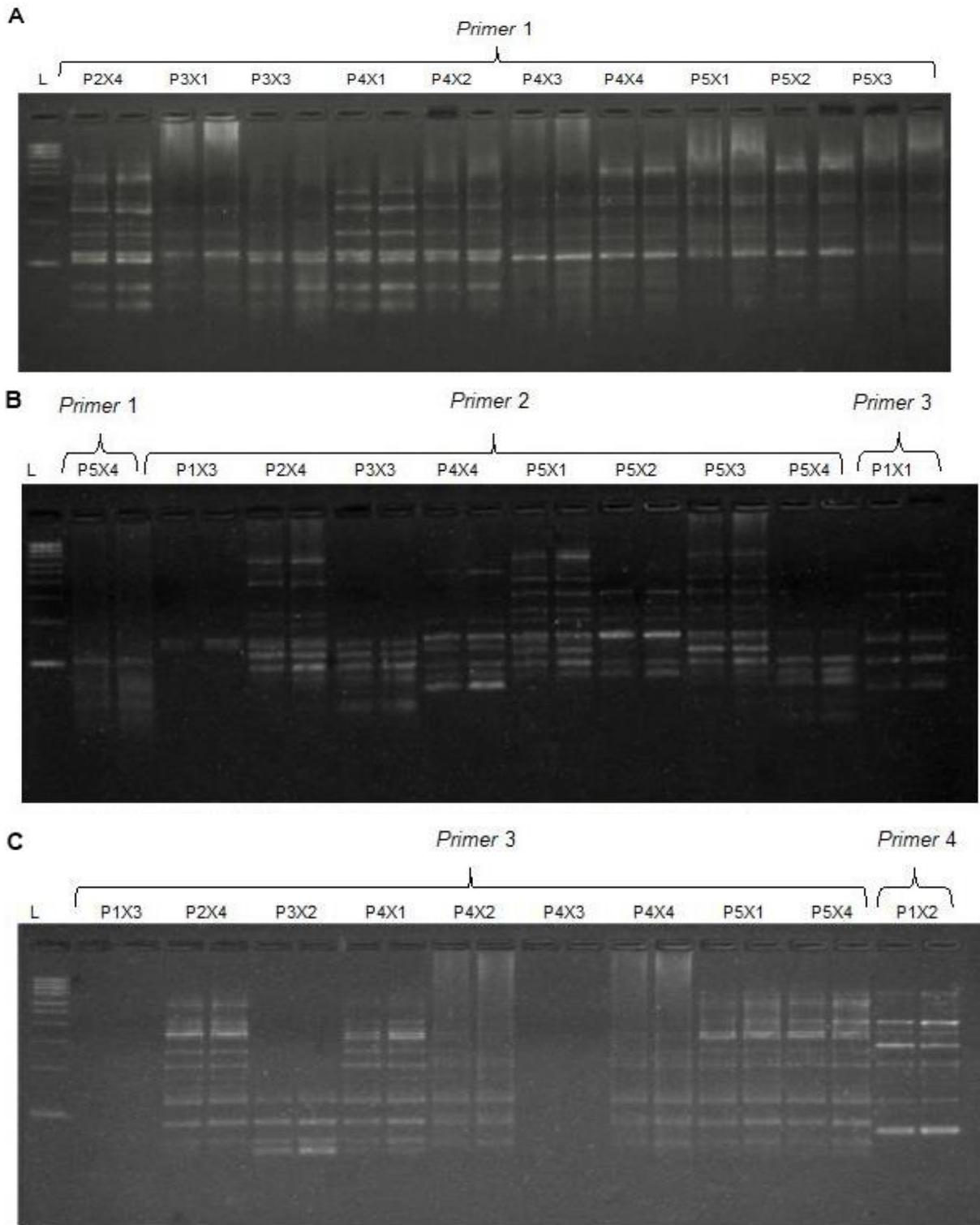


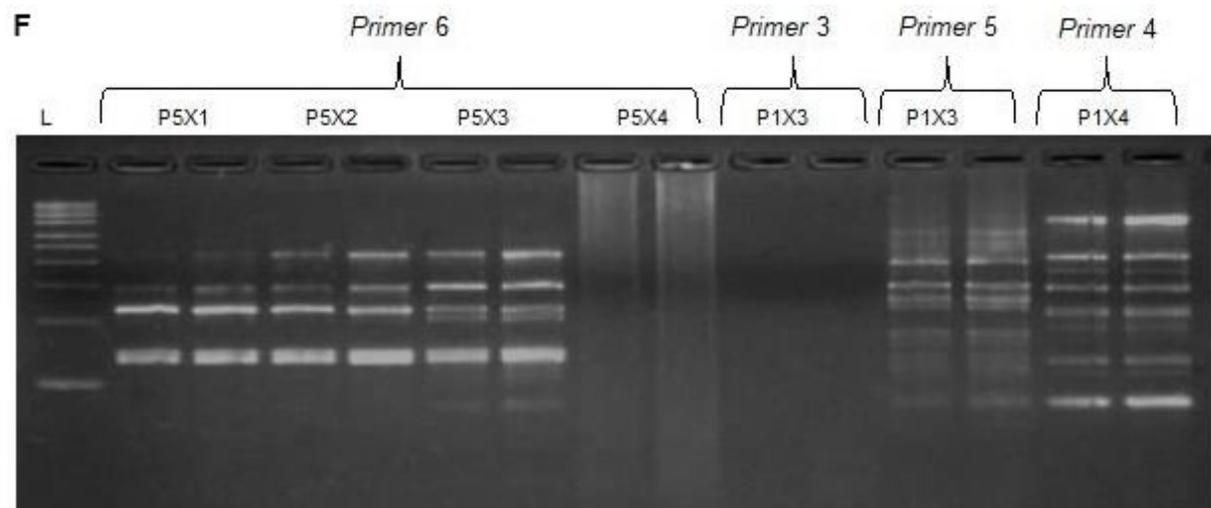
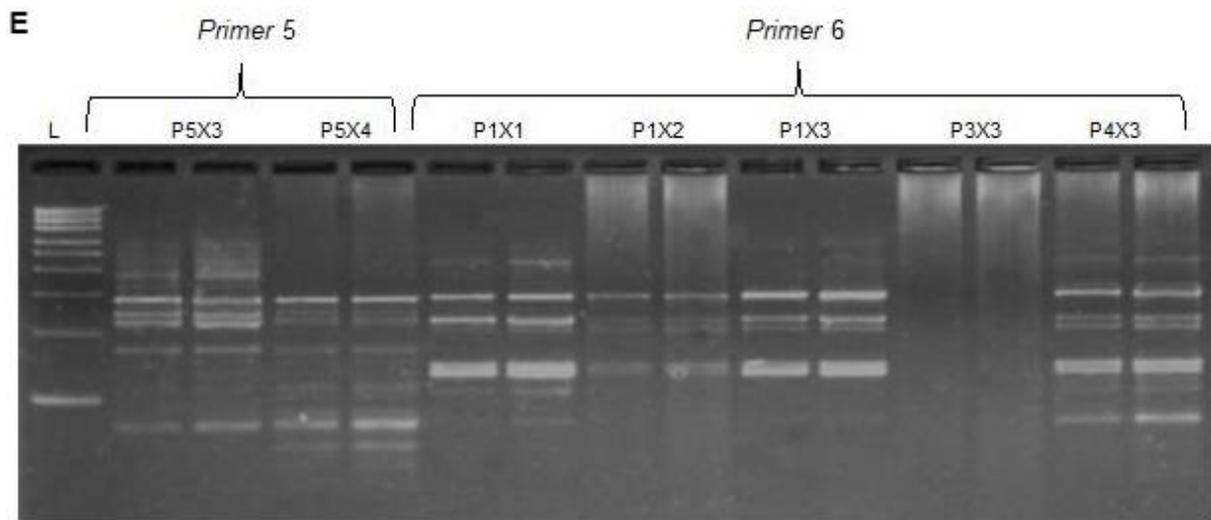
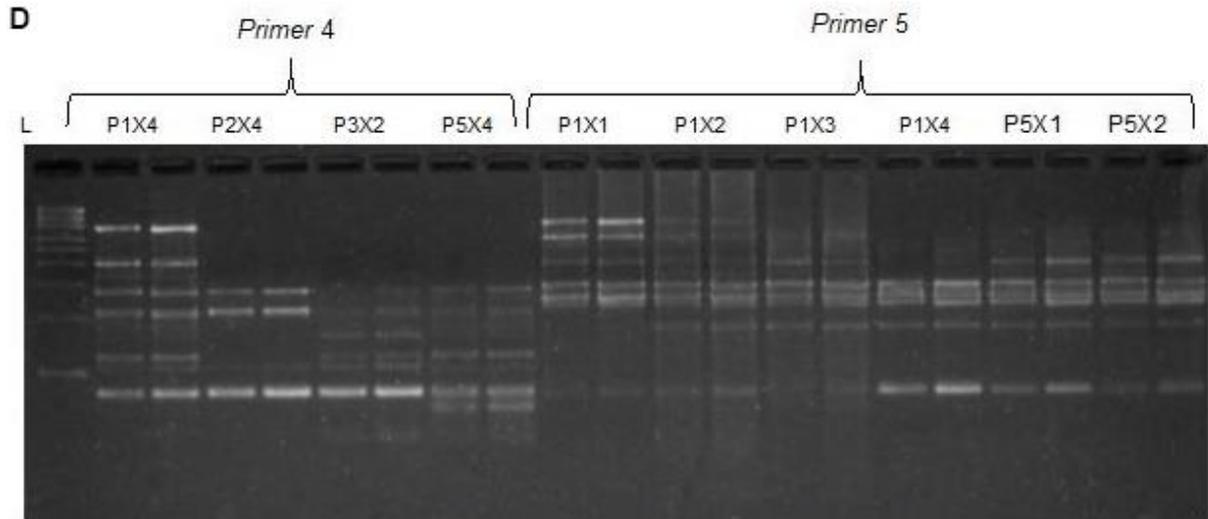
Legenda: RAPD das quatro regiões da moita 5: L – Marcador de peso molecular (Leader 1Kb); A - iniciador 1; B - iniciador 2; C - iniciador 3; D - iniciador 4; E - iniciador 5; F - iniciador 6; G – iniciador 7; H – iniciador 8; I – iniciador 9; J – iniciador 10.

Fonte: O autor, 2019.

Em decorrência de alguns erros de experimentação e análise das bandas geradas nos géis de amplificação, fez-se necessário repetir algumas corridas eletroforéticas com alguns dos indivíduos específicos, uma vez que, nos géis apresentados, não era possível se analisar as bandas geradas. A figura 16 representa os géis constituintes dos indivíduos que tiveram sua corrida repetida.

Figura 16: Produtos gerados em gel de repetição com diferentes concentrações de DNA (4 μ l e 8 μ l).





Fonte: O autor, 2019.

Os indivíduos analisados, representados no quadro 3, indica que o número de bandas monomórficas obtidas através dos iniciadores utilizados foi maior que o número de alelos polimórficos encontrados em todos os casos.

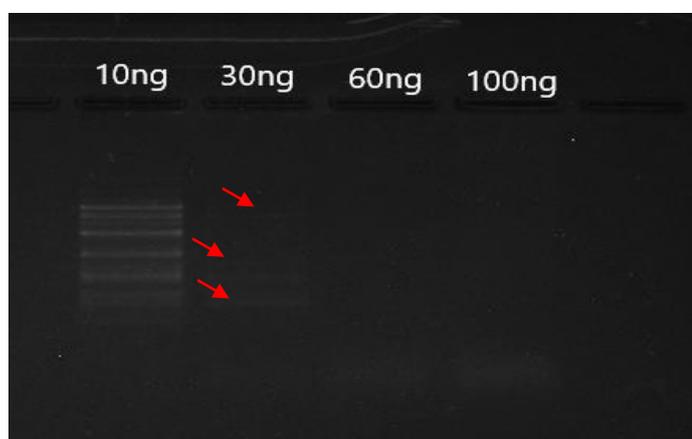
Quadro 3 – Relação de bandas monomórficas e polimórficas detectadas por iniciador de RAPD para cada moita testada.

Moita	Iniciador	Bandas Monomórficas	Bandas Polimórficas
1	1	12	0
	2	10	1
	3	9	0
	4	10	5
	5	9	2
	6	8	3
	7	9	0
	8	10	0
	9	12	0
	10	4	1
2	1	9	4
	2	8	5
	3	13	2
	4	11	6
	5	7	1
	6	8	1
	7	11	0
	8	8	0
	9	15	0
	10	6	0
3	1	8	4
	2	8	4
	3	11	5
	4	11	8
	5	7	7
	6	13	3
	7	11	0
	8	8	2
	9	11	0
	10	5	2
4	1	4	5
	2	6	4
	3	10	4
	4	11	6
	5	8	2
	6	6	2
	7	10	0
	8	8	0
	9	11	1
	10	4	1
5	1	9	5
	2	9	3
	3	11	4
	4	12	6
	5	6	2
	6	11	2
	7	10	0
	8	7	1
	9	11	0
	10	5	2

4.2.2 Amplificação do DNA por SCoT

Para a amplificação utilizando o marcador SCoT, após consultada a bibliografia disponível, as concentrações de DNA a serem utilizadas nas reações foram testadas em 10ng, 30ng, 60ng e 100ng para que pudesse ser observada e estabelecida a quantidade ideal de DNA amostral extraído para a técnica. Como resultado, a amostra padronizadas a 10ng de DNA foi a que apresentou o maior número de bandas visíveis, ao passo que as amostras com 30ng de DNA apresentou somente algumas, com pouca visibilidade, e as amostras com 60 e 100ng de DNA não apresentaram nenhum resultado ao experimento.

Figura 17 – Concentrações de DNA testadas nas amostras

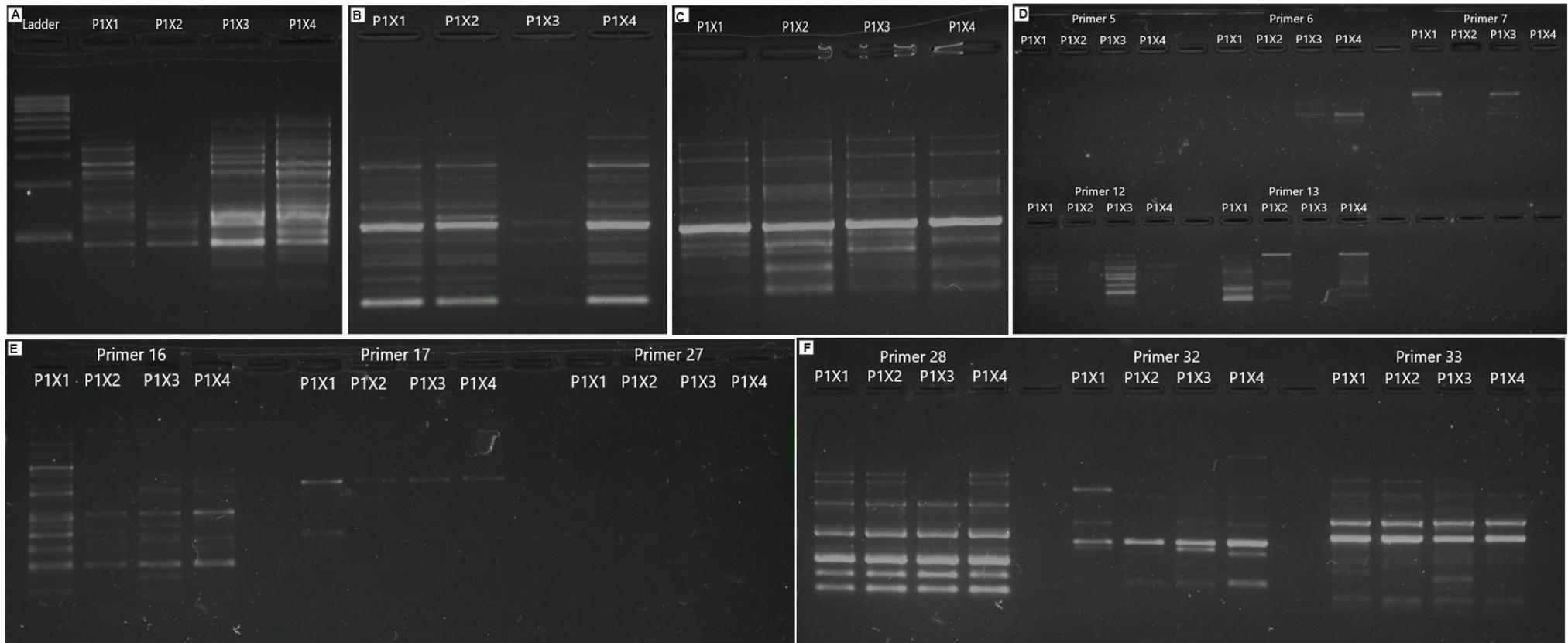


Legenda: Diferentes concentrações de DNA utilizadas no experimento. As setas vermelhas auxiliam na visualização das bandas geradas em 30ng de DNA.

Fonte: O autor, 2020.

A figura 18 mostra os géis dos produtos da amplificação para indivíduos de P1 (P1X1, P1X2, P1X3 e P1X4) que foram submetidos ao processo a fim de testar a compatibilidade do marcador SCoT. Como resultado desses experimentos, observou-se alto padrão de monomorfismo entre a maioria dos indivíduos, com alguns polimorfismos que poderiam ser caracterizados por ausência de bandas e alguns indivíduos que não responderam ao marcador.

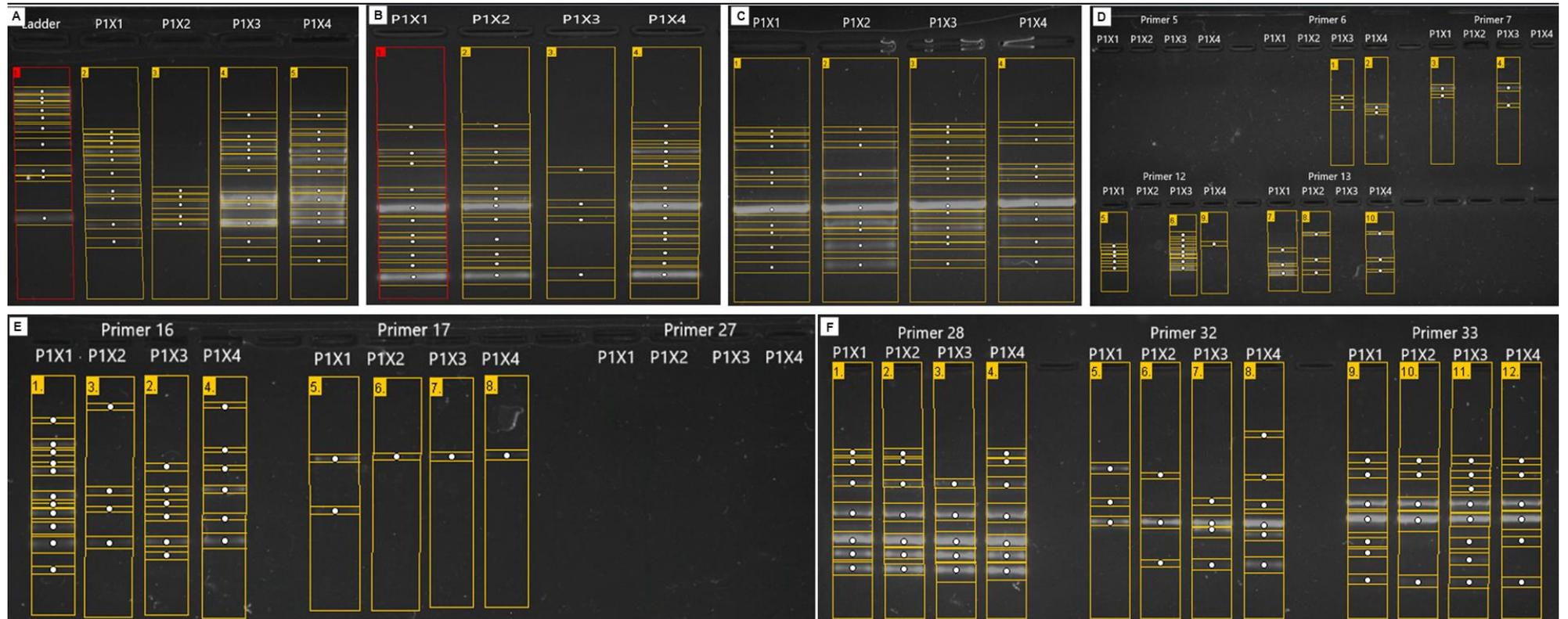
Figura 18 – Géis de agarose representando as bandas geradas pelos iniciadores utilizados para a reação de amplificação por SCoT em amostras de *C. icaco*.



Legenda: Ladder: marcador de peso molecular; A - Iniciador 1; B - Iniciador 2; C - Iniciador 3; D - Iniciador 5, 6, 7, 12 e 13; E - Iniciador 16, 17 e 27; F - Iniciador 28, 32 e 33.
Fonte: O autor, 2020.

Os padrões de banda observados visualmente, conforme representados na figura 18, foram analisados com auxílio do software *Gel Analyzer*, onde esse padrão de bandas detectado pelo aplicativo aparece nas colunas (representadas como caixas amarelas) e linhas pontuadas na horizontal para cada banda gerada, permitindo uma confirmação da presença ou ausência das bandas. O aplicativo foi utilizado, também, para fornecer aos experimentos uma maior confiabilidade na coleta e interpretação dos resultados, em função da dificuldade de repetição dos experimentos, devido aos contratempos impostos por diversas condições já mencionadas.

Figura 19: Géis de agarose representando as bandas geradas pelos iniciadores utilizados para a reação de amplificação por SCoT em amostras de *C. icaco*, com destaque das bandas detectadas pelo software Gel Analyzer



Legenda: Padrões de amplificação das reações observadas na figura 1; A - Iniciador 1; B - Iniciador 2; C Iniciador 3; D - Iniciador 5, 6, 7, 12 e 13; E – Iniciador 16, 17 e 27; F - Iniciador 28, 32 e 33.

Fonte: O autor, 2020.

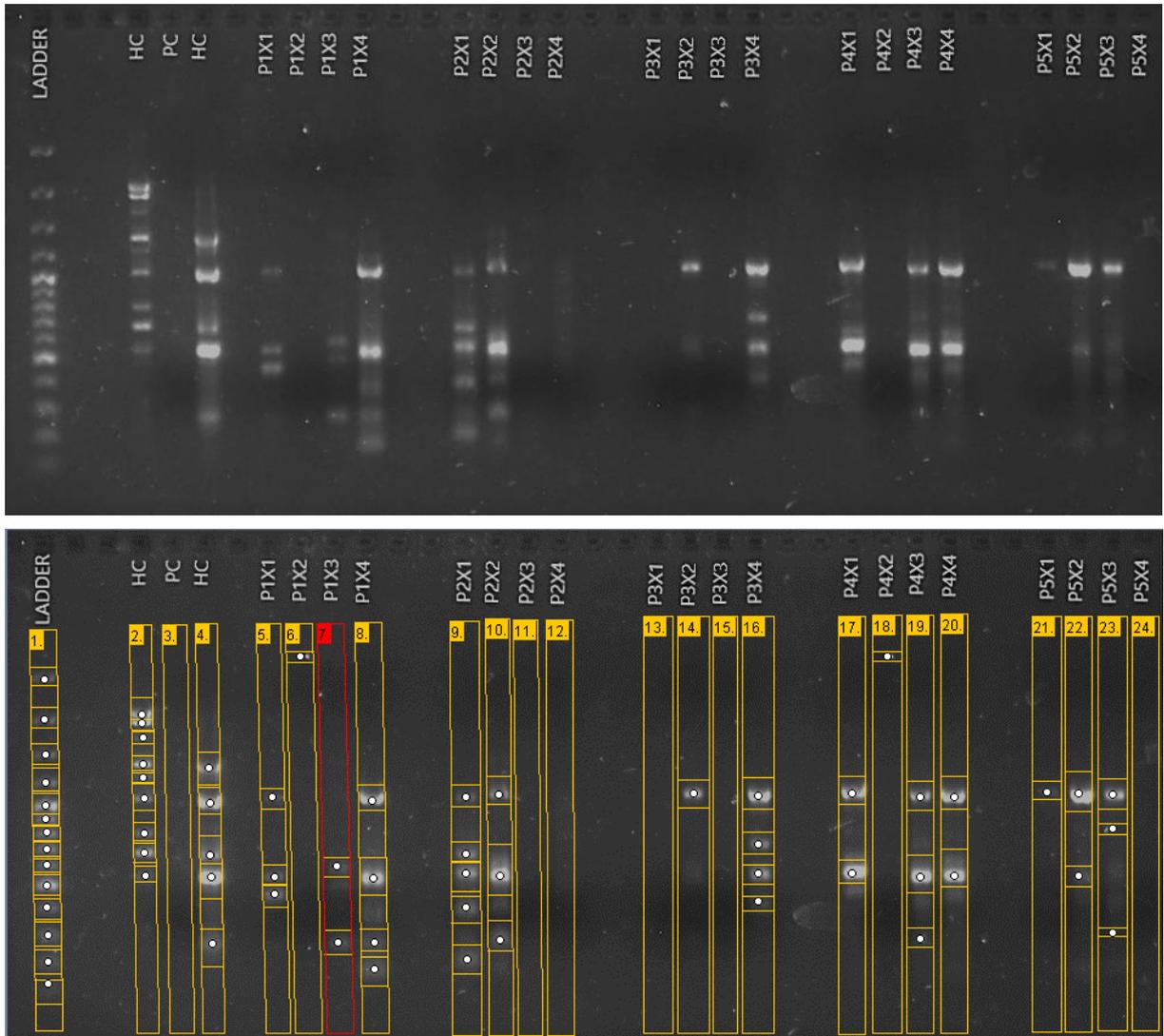
Após avaliação dos indivíduos que foram submetidos ao processo de amplificação foi observado que, dentre todos os iniciadores selecionados, apenas alguns desses apresentaram resultado significativo (Quadro 4).

Quadro 4 – Iniciadores selecionados para amplificação nas reações utilizando marcadores SCoT em amostras de *C. icaco*.

<u>Iniciadores</u>	<u>Sequência (5'-3')</u>	<u>Resultado da Amplificação</u>
1	CAACAATGGCTACCACCA	POSITIVO
2	CAACAATGGCTACCACCC	POSITIVO
3	CAACAATGGCTACCACCG	POSITIVO
4	CAACAATGGCTACCACCT	NEGATIVO
5	CAACAATGGCTACCACGA	NEGATIVO
6	CAACAATGGCTACCACGC	POSITIVO
7	CAACAATGGCTACCACGG	POSITIVO
12	ACGACATGGCGACCAACG	POSITIVO
13	ACGACATGGCGACCATCG	POSITIVO
16	ACCATGGCTACCACCGAC	POSITIVO
17	ACCATGGCTACCACCGAG	POSITIVO
27	ACCATGGCTACCACCGTG	NEGATIVO
28	CCATGGCTACCACCGCCA	POSITIVO
32	CCATGGCTACCACCGCAC	POSITIVO
33	CCATGGCTACCACCGCAG	POSITIVO

Em função das dificuldades de amplificação dos DNAs armazenados, foi realizada nova coleta pós-pandemia, seguindo-se as mesmas coordenadas de localização das moitas, a fim de, não só remediar a possível degradação do material estocado e repetir os experimentos com as amostras utilizadas para o RAPD, bem como restituir o estoque de DNA extraído. Em adicional às amostras testadas com o marcador, foi acrescido 1 controle positivo (HC) constituído por amostra de *Hovenia dulcis*, fruto do estoque do NBV-UERJ.

Figura 20 – Géis de agarose representando os iniciadores selecionados na reação de amplificação poe SCoT em amostras de *C. icaco* após nova coleta das amostras estudadas.



Legenda: LADDER – padrão de peso molecular; HC – controle positivo 1 (*Hovenia dulcis*) com tampão sem corante; PC – controle positivo (*Petiveria alliacea* L.) 2; HC – controle positivo 3 (*Cleome spinosa* Jacq.) com tampão corado.

Fonte: O autor, 2022.

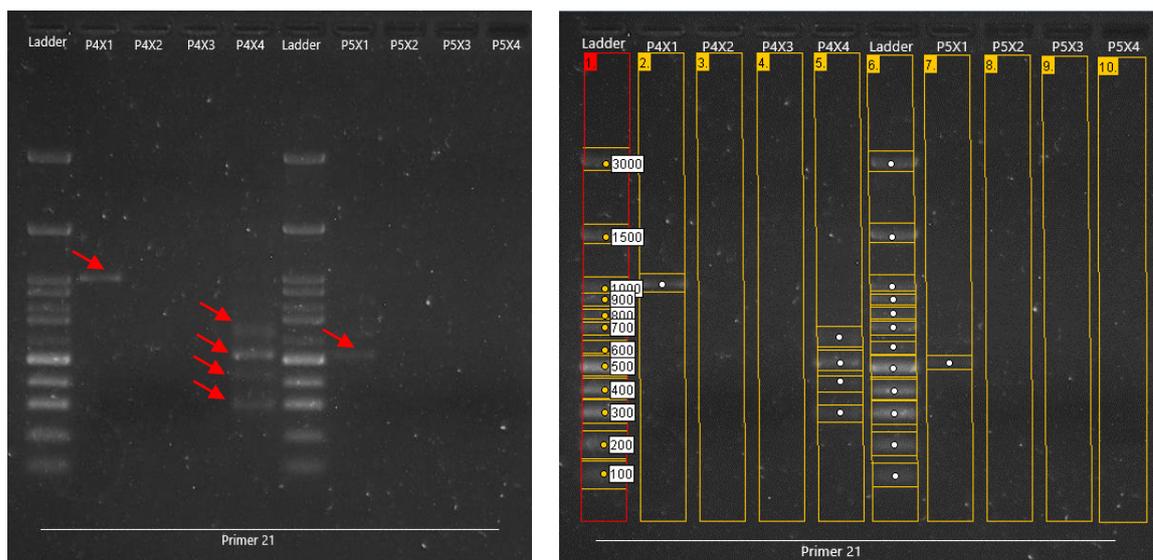
A fim de otimizar o resultado dos experimentos com os prazos estabelecidos, um novo cronograma de experimentação foi pré definido, dessa vez utilizando iniciadores selecionados com sucesso de amplificação baseado em pesquisas em andamento do NBV-UERJ (Quadro 5).

Quadro 5 – Iniciadores SCoT selecionados em amostras de *C. icaco*.

<u>Iniciadores</u>	<u>Sequência (5'-3')</u>
1	CAACAATGGCTACCACCA
2	CAACAATGGCTACCACCC
12	ACGACATGGCGACCAACG
13	ACGACATGGCGACCATCG
14	ACGACATGGCGACCACGC
21	ACGACATGGCGACCCACA
22	AACCATGGCTACCACCAC
28	CCATGGCTACCACCGCCA

Com o iniciador 21, observou-se a presença de uma banda na amostra P4X1 (1033pb) e algumas bandas presentes em P4X4. Além disso, observou-se a presença de 1 banda amplificada em P5X1 (499pb), ao passo que nos outros quadrantes, nenhuma região foi amplificada (Figura 21 A - B).

Figura 21 – Géis de agarose representando as bandas geradas pelo iniciador 21 na reação de SCoT em amostras de *C. icaco*.

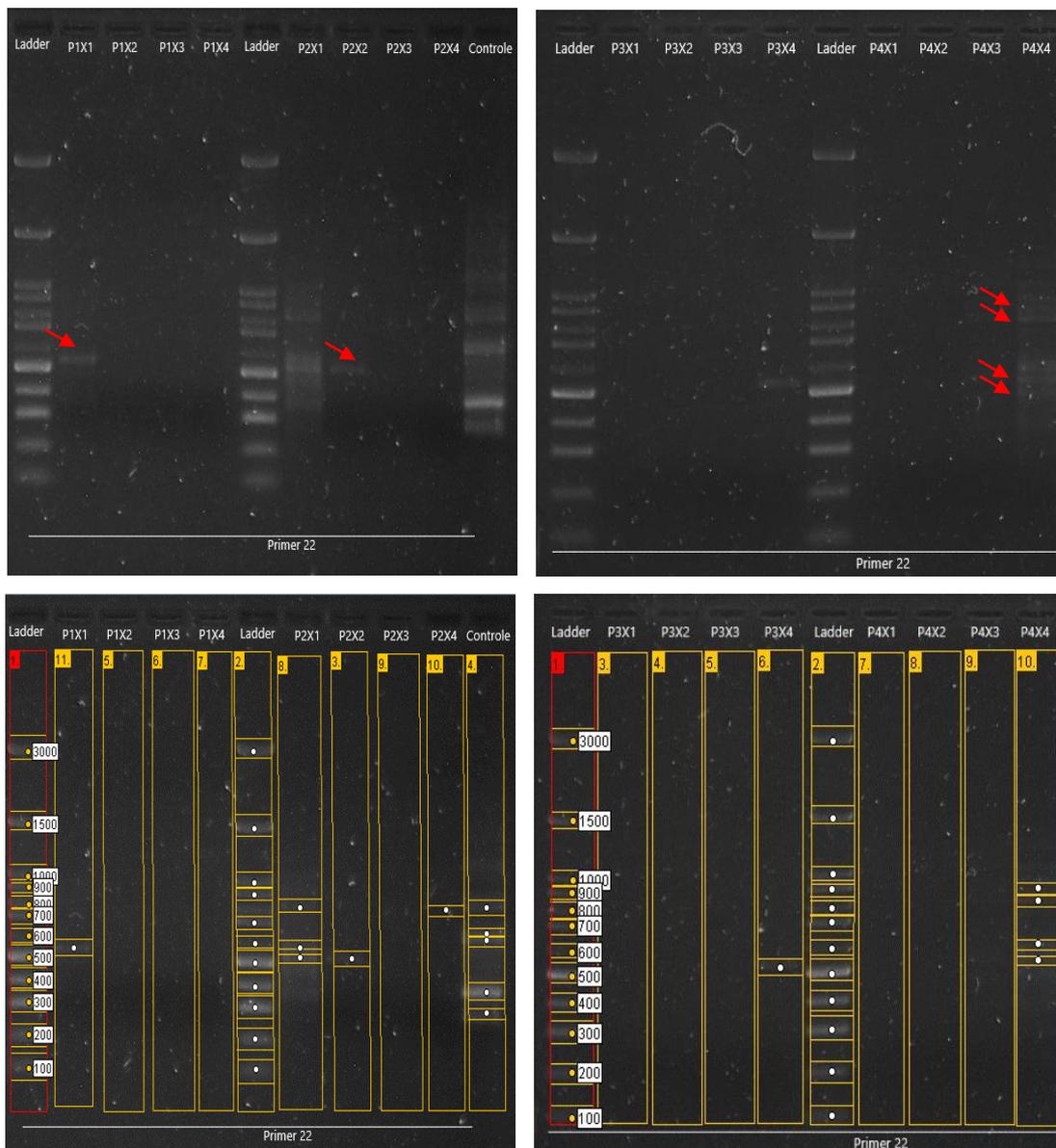


Legenda: A - Iniciador 21; B - Iniciador 21 através do *Gel Analyzer*. Ladder: padrão de peso molecular. As setas vermelhas indicam as bandas geradas por indivíduo com o iniciador utilizado.

Fonte: O autor, 2022.

Com o iniciador 22, da mesma forma, observou-se 1 banda na amostra P1X1 (495pb). Na amostra P2X1 foi observado um número maior de bandas (470 a 755pb) e apenas uma banda em P2X2 (462pb). Em P3X4 observou-se a presença de uma banda (488pb), ao passo que a amostra P4X4 apresentou um número maior de bandas, com 4 bandas amplificadas. O controle positivo do iniciador 22, como os demais, apresentou-se como uma referência positiva, com 5 bandas amplificadas.

Figura 22 – Géis de agarose representando as bandas geradas pelo iniciador 22 na reação de SCoT em amostras de *C. icaco*.

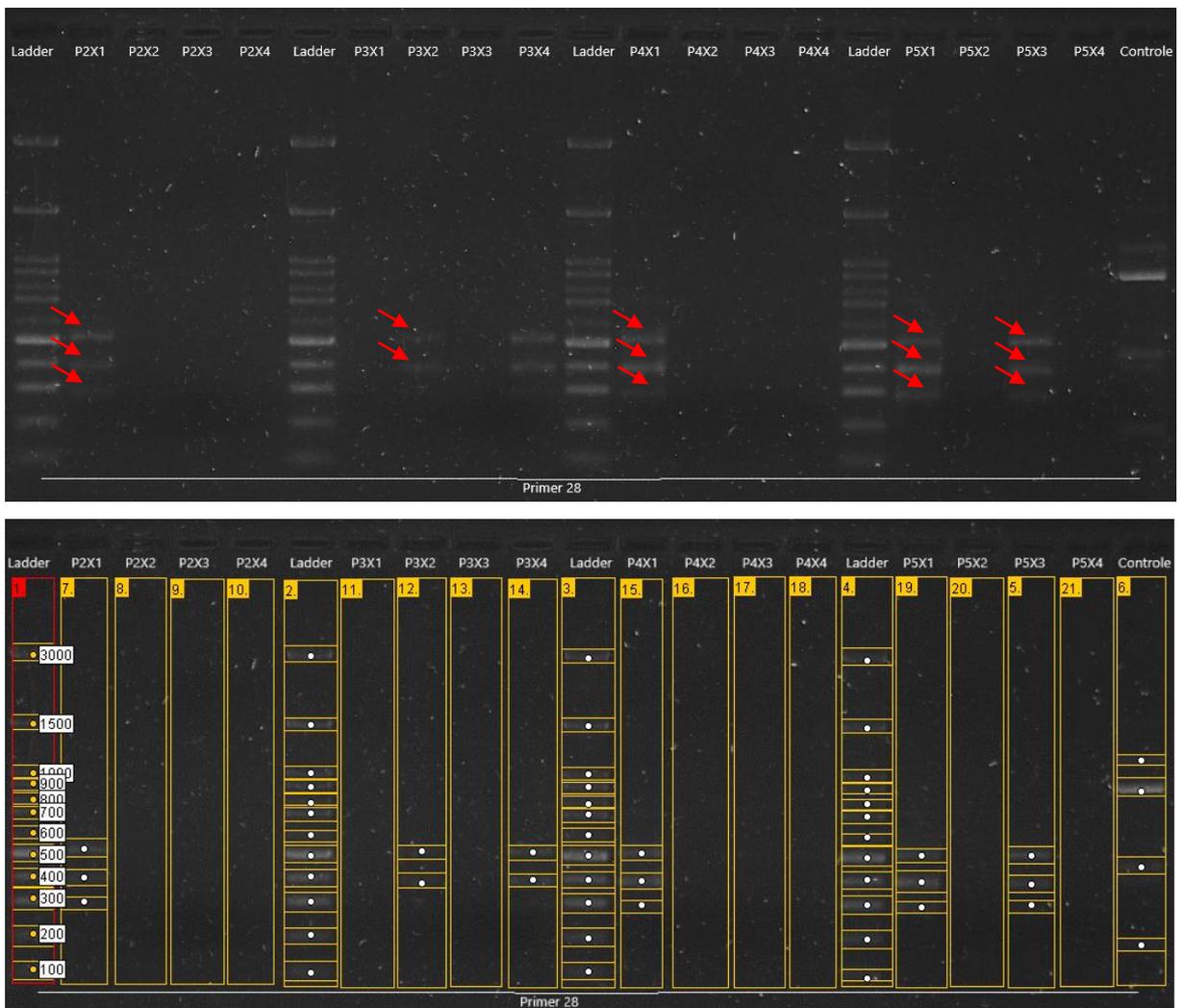


Legenda: A - Iniciador 22, Amostra Controle (*Hovenia dulcis*); B - Iniciador 22, Amostra Controle (*Hovenia dulcis*) através do Gel Analyzer. Obs. Ladder: padrão de peso molecular. As setas vermelhas indicam as bandas geradas por indivíduo com o iniciador utilizado.

Fonte: O autor, 2022.

O iniciador 28 forneceu o melhor resultado em relação ao número de bandas amplificadas por amostra, com um total de 16 bandas amplificadas distribuídas entre as amostras, sendo 3 bandas em P2X1 (296pb a 491pb), e 2 bandas em P3X2 (362pb e 491pb) e 2 em P3X4 (374pb e 488pb). Em P4X1 foram geradas 3 bandas (295pb a 483pb), enquanto que P5X1 e P5X3 também geraram 3 bandas cada (285pb a 466pb e 294pb a 471pb, respectivamente). O controle utilizado para este marcador se manteve positivo, apresentando 4 bandas amplificadas variando entre 194pb e 1128pb.

Figura 23 – Géis de agarose representando as bandas geradas pelo iniciador 28 na reação de SCoT em amostras de *C. icaco*.



Legenda: A - Iniciador 28, Amostra Controle (*Hovenia dulcis*); B - Iniciador 22, Amostra Controle (*Hovenia dulcis*) através do *Gel Analyzer*. Obs. Ladder: padrão de peso molecular. As setas vermelhas indicam as bandas geradas por indivíduo com o iniciador utilizado.

Fonte: O autor, 2022.

Problemas decorrentes não permitiram a confirmação da amplitude de uso destes iniciadores na espécie *C. icaco*. Porém, dentre os iniciadores capazes de promover a amplificação por SCoT na espécie *Cleome spinosa* Jacq. (Quadro 4), na avaliação das amostras de *C. icaco* disponíveis (P1X1 a P1X4) detectou-se grande número de bandas monomórficas, além de serem marcadores capazes de detectar polimorfismos (Quadro 6).

Quadro 6 – Relação total de bandas monomórficas e polimórficas detectadas por iniciador de SCoT nas amostras das moitas de *C. icaco*.

<u>Iniciador</u>	<u>Bandas Monomórficas</u>	<u>Bandas Polimórficas</u>
1	13	0
2	10	1
3	10	2
4	-	-
5	-	-
6	2	2
7	1	2
12	5	2
13	3	2
16	8	3
17	1	1
27	-	-
28	7	0
32	5	1
33	7	1

5 DISCUSSÃO

Ainda existem lacunas em relação à biologia desta espécie, acerca de sua propagação natural, tanto para questões de crescimento, quanto para as de enraizamento, o que indica a possibilidade de haver mais de um indivíduo por arbusto. Neste trabalho, a coleta em quadrantes se mostrou eficaz para garantir a individualidade das amostras coletadas, uma metodologia já implementada anteriormente e que apontou resultados positivos em relação a essa metodologia de coleta e avaliação de cada amostra, considerando-se essa hipótese, como observado por Araujo (2019).

Muitos transtornos devidos ao período de pandemia (2020-2021), impediram o desenvolvimento do trabalho, segundo os objetivos iniciais, que propunham uma comparação da eficiência de três marcadores para estudos genéticos na espécie (RAPD, SCoT e ISSR). Para viabilizar a conclusão dentro dos prazos cedidos, o trabalho se limitou a estabelecer e padronizar os protocolos de dois dos marcadores selecionados inicialmente, visando à detecção de polimorfismos e demonstrando a sua aplicação potencial em estudos posteriores.

Dentre os vários problemas metodológicos enfrentados, o fechamento do laboratório por mais de um ano, cumprindo as determinações da UERJ, em acordo com as autoridades sanitárias, causou uma quebra do controle ambiental fundamental à experimentação em laboratório, como por exemplo, a falta de energia em vários períodos, danificando equipamentos, prejudicando a conservação de amostras de DNA já processadas e deteriorando amostras de folhas armazenadas sob congelamento. Mesmo com a coleta refeita no início de 2022, seguindo as mesmas coordenadas de localização das moitas, não houve tempo suficiente para a repetição, essencial, de vários experimentos com o marcador SCoT, impossibilitando as análises quantitativas e comparativas entre os marcadores. Além disso, não foi possível estabelecer uma coleção genômica a partir das amostras coletadas.

A espécie estudada, tem sido reconhecida como altamente recalcitrante aos métodos de extração de DNA convencionais, por possuir altas concentrações de compostos fenólicos e polissacarídeos no tecido foliar (HEALEY et al., 2014, MANÇANO *et al.*, 2022). Estas substâncias são liberadas durante a etapa de maceração, o que dificulta o processo, principalmente através dos métodos convencionais de extração, como descreve o protocolo estabelecido por Doyle e Doyle (1987). A liberação dessas substâncias levam o material a

uma intensa oxidação, o que justificou a necessidade das adaptações feitas ao protocolo de extração utilizado neste trabalho, aumentando-se a concentração de compostos antioxidantes, o que possibilitou a extração, alternativa já evidenciada em outros trabalhos utilizando o abajeru (LEITE, 2020; MANÇANO *et al*, 2022).

Em função das dificuldades na obtenção de DNA de qualidade, considerou-se o aproveitamento máximo do DNA extraído de cada amostra, ainda que este não seja um fator limitante, posto que esses marcadores exigem quantidades consideravelmente baixas de DNA amostral para o sucesso da técnica (LACERDA *et al*, 2002).

Uma outra condição que contribuiu para a purificação/estabilização do material, já relatada também em outros trabalhos utilizando técnicas de extração de DNA de várias espécies (MOREDJO, 2015), incluindo-se também a espécie abordada (ARAUJO, 2019), foi a substituição do TE, um tampão utilizado para armazenagem do DNA a longo prazo, por água MiliQ para ressuspensão e armazenamento do pellet de DNA extraído.

A análise dos resultados do marcador molecular RAPD na espécie *Chrysobalanus icaco* L., ocorrentes no ambiente de restinga de Cabo Frio, Rio de Janeiro, aponta a constituição genética por mosaico nos arbustos estudados. Os quatro pontos analisados em cada arbusto não resultaram em indivíduos idênticos, quando o índice de similaridade chegaria a 100%. Porém, não se deve excluir a presença de indivíduos idênticos na composição das moitas, devido ao crescimento horizontal, com a possibilidade da produção de raízes e caules a partir de segmentos nodais (WILLIAMS, 2007; ARAÚJO e PEREIRA, 2009; FRANK e BROWN, 2018).

Em relação aos marcadores RAPD, os resultados demonstraram ser adequados aos estudos que se baseiam na identificação de caracteres polimórficos, atendendo efetivamente à proposta deste trabalho, mas que se utilizados em outros objetivos, denotam resultados igualmente eficazes, como apontado por Leite (2020), que utilizou as mesmas sequências de marcadores para estudar a diversidade intraespecífica de *C. icaco*, onde todos os iniciadores analisados (em um total de 12) indicaram a presença de polimorfismos ao longo do DNA da espécie. OPA-10, OPAZ-03, OPAZ-04, OPBA-03, OPBA-05, OPBA-07, OPBA-08, OPL-07 e RAn-1 (sendo este último um iniciador que não consta nesse estudo) foram os marcadores que amplificaram o maior número de amostras, sendo OPAZ-04 o marcador com o maior

número médio de bandas amplificadas (9,8), calculados através de dados estatísticos gerados individualmente e total das amostras.

Os iniciadores utilizados foram capazes de detectar e reproduzir essas alterações ao longo dos fragmentos de DNA analisado. O iniciador 1 (OPA-10) não foi o que identificou o maior número de bandas polimórficas, como observado nos estudos de Paracampo (2017), ao passo que o iniciador 5 (OPBA-03) foi o que gerou o maior número de bandas polimórficas na espécie. No entanto, de acordo com os resultados gerados, é possível observar uma possibilidade da espécie estudada apresentar algum grau de variabilidade intraespecífica. Os resultados do marcador confirmaram a efetividade de utilização deste marcador para estudos genéticos com *Chrysobalanus icaco* L.

Em relação aos marcadores SCoT, apesar do resultado negativo para algumas das amostras de *C. icaco*, é comprovada a efetividade da técnica e do marcador em estudos com outras espécies vegetais desde o advento da técnica (CABO *et al*, 2014; SATYA *et al*, 2015; SHEKHAWAT *et al*, 2018). Essa afirmativa pode ser observada também em estudos com a espécie *Cleome spinosa* (VILARDO, 2019), que também fazem parte das pesquisas elaboradas no Núcleo de Biologia Vegetal – UERJ e foi, juntamente com pesquisas dos precursores da técnica (COLLARD; MACKILL, 2008), os trabalhos que motivaram a triagem inicial dos iniciadores utilizados no presente estudo. Vilar do (2019) aponta em seu trabalho bons resultados em relação às bandas amplificadas utilizando os iniciadores da primeira triagem, com 10 dos 15 iniciadores gerando produto de amplificação (S1, S2, S3, S12, S13, S16, S17, S28, S32 e S33), ao passo que neste, utilizando somente amostras provenientes do arbusto P1, 12 dos iniciadores apresentaram produtos de amplificação (S1, S2, S3, S6, S7, S12, S13, S16, S17, S28, S32, S33) (Tabela 4). Dentre esses iniciadores que apresentaram resultados satisfatórios, os iniciadores S1, S2, S3 e S16 foram os que geraram o maior padrão de monomorfismo apresentado entre as amostras (13, 10, 10, 8, respectivamente), ao passo que S16 foi o iniciador com o maior número de polimorfismos revelado, com 8 bandas polimórficas geradas. O autor supracitado trata também em sua pesquisa, da possibilidade do marcador ser utilizado em estudos de diversidade genética, pois utiliza coeficientes de similaridade para analisar a semelhança entre os indivíduos da espécie estudada.

Ainda em relação aos marcadores SCoT, as análises realizadas a partir da segunda triagem de primers utilizando as sequências de iniciadores obtidas dos estudos ocorrentes com

amostras da espécie *Hovenia dulcis**, que foram utilizadas como controles positivos, observou-se que um maior número de bandas, utilizando todas as amostras, foram devidamente amplificadas, totalizando 32 bandas geradas, devidamente distribuídas em indivíduos variados (P1 a P5). A maioria dos iniciadores se mostrou pareável com pelo menos um dos indivíduos submetidos à técnica, ainda que em alguns dos indivíduos testados, o padrão de bandas geradas tenha sido baixo, em comparação com os resultados obtidos através da utilização do marcador RAPD. Os marcadores S22 e S28, por exemplo, foram capazes de parrear em pelo menos 4 dos 5 indivíduos testados, em diferentes amostras, ainda que com esse baixo padrão de bandas amplificadas entre as amostras (média de 2,75 em S22 e 4 em S28). As conclusivas parciais acerca desse marcador não o excluem como opção de utilização em pesquisas da espécie, dada sua efetividade comprovada.

Não foram encontrados na literatura demais trabalhos com a espécie envolvendo o uso de marcadores moleculares, além do marcador RAPD (PARACAMPO, 2017; ARAUJO, 2019; LEITE, 2020), no entanto, ambos os marcadores trazem resultados satisfatórios acerca das análises propostas. Para SCoT, este é o primeiro trabalho com o marcador envolvendo a espécie e, embora haja demanda de estudos mais aprofundados acerca deste tipo de marcador, os resultados preliminares indicam a compatibilidade e eficiência do SCoT para estudos genéticos em *Chrysobalanus icaco* L.

A espécie estudada, característica de um ecossistema que apresenta condições ambientais consideradas extremas, potencialmente degradado por atividades antrópicas, tornam iminentes a necessidade de conservar a espécie. Com isso, abrem-se precedentes à diferentes estratégias de conservação *in vitro*, que podem auxiliar no estudo e conservação da espécie. Porém, mesmo que estas sejam excelentes alternativas para a conservação da espécie como recurso genético, a conservação *in situ* segue sendo a melhor opção, uma vez que conservar o bioma em equilíbrio, permite a co-evolução da espécie, mantendo a variabilidade genética associada a sua competência medicinal.

CONCLUSÕES

Poucos trabalhos envolvendo o uso de marcadores moleculares para espécies de *Chrysobalanus* estão disponíveis na literatura. Apesar dos contratemplos, este trabalho permitiu avançar nos estudos moleculares com a espécie *Chrysobalanus icaco*, na medida em que:

- Um protocolo de extração e quantificação de DNA foi padronizado para a espécie estudada, variando entre 15 e 100 ng de DNA extraído de cada amostra;
- A técnica de RAPD foi aplicada, com sucesso, no estudo de identidade genética entre indivíduos da população de Cabo Frio – RJ, avaliando um total de 10 iniciadores pré selecionados, onde todos responderam à técnica com a espécie utilizada.
- A técnica de SCoT foi estabelecida para a espécie, com a determinação de iniciadores polimórficos.
- Os resultados demonstraram a eficiência de ambos os marcadores testados, em revelar a presença de polimorfismos no DNA, indicando sua aplicação na conservação de recursos genéticos da espécie estudada.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar outros marcadores moleculares, a fim de garantir uma maior e mais precisa identificação da estabilidade genética.
- Estabelecimento da cultura *in vitro* da espécie.
- Estudos de embriogênese somática, fidelidade genética e fitoquímica de compostos.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, T.; GUPTA, A. K.; PATEL, A. K.; SHEKHAWAT, N. S. **Micropropagation and validation of genetic homogeneity of *Alhagi maurorum* using SCoT, ISSR and RAPD markers.** Plant Cell Tissue and Organ Culture. v. 120, p. 313–323, 2015.
- 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 abajeru.** Pesquisa Agropecuária Tropical. Goiânia. v. 41, p. 102-109, 2011.
- ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. **Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja.** Fitopatologia Brasileira. Brasília. v. 30, n.,4, 2005.
- ARAÚJO, M. G. **Identidade genética em moitas de *Chrysobalanus icaco* L. ocorrentes em restinga aberta.** 2019. 57f. Monografia – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.
- ARAÚJO, D. S. D.; PEREIRA, M. C. A. Sandy Coastal Vegetation. **International Commission on Tropical Biology and Natural Resources.** Encyclopedia of Life Support Systems, 2009.
- ASSUMPCÃO, J. e NASCIMENTO, M.T. **Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil.** Acta Botanica Brasílica, v. 14, n.3: p. 301-315, 2000.
- ATIENZAR, F.; EVENDEN, A.; JHA, A.; SAVVA, D.; DEPLEDGE M. **Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature.** BioTechniques. v. 28, p. 52-54, 2000.
- 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.** Journal of Medicinal Food. v. 16, p. 538-543,2013.

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.

BHATTACHARYYA, P.; KUMARIA, S.; KUMAR, S.; TANDON, P. **Start codon targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl.: an endangered medicinal orchid species.** *Gene*. v. 529, p. 21–26, 2013.

BHATTACHARYYA, P.; KUMARIA, S.; JOB, N.; TANDON, P. **Phyto-molecular profiling and assessment of antioxidant activity within micropropagated plants of *Dendrobium thyrsiflorum*: a threatened, medicinal orchid.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 122, p. 535–550, 2015.

BHAWNA; ABDIN, M. Z.; ARYA, L.; VERMA, M. **Use of SCoT markers to assess the gene flow and population structure among two different populations of bottle gourd.** *Int J Gene*. v. 9, p. 80–86, 2017.

BBC – MARTINS, A. BBC News. 5 de maio de 2020. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/brasil-52539425>> acesso em 04/01/2021.

BORÉM, A; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 4. ed. Viçosa: UFV, p. 441, 447, 510, 514, 2005.

BROWN, S. H. U. S. **Chrysobalanus icaco**. Department of Agriculture, Cooperative Extension Service, University of Florida, IFAS, Florida A. & M. Revised, 2011.

BROWN, S. H.; COOPRIDER, K. **The Institute of Food and Agriculture Sciences (IFAS)**. Disponível em: <<http://lee.ifas.ufl.edu/hort/GardenHome.shtml>>. 2011.

BRUCES, A.; JOHSON, A.; LEWIS, J.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; RAFF, M. **Biologia Molecular da Célula**, 5ª edição. ArtMed, 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.

CABO, S.; FERREIRA, L.; CARVALHO, A.; MARTINS-LOPES, P.; MARTIN, A.; LIMA-BRITO, J. E. **Potential of Start Codon Targeted (SCoT) markers for DNA fingerprinting**

of newly synthesized tritordeums and their respective parents. Journal of Applied Genetics. v. 55: p. 307–312, 2014.

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.

Chrysobalanus icaco in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB16759>>. Acesso em: 14 abr. 2020.

CLAIN, C.; DA SILVA, D.; FOCK, I.; VANIET, S.; CARMEILLE, A.; GOUSSET, C.; SIHACHAKR, D.; LUISETTI, J.; KODJA, H.; BESSE, P. **RAPD genetic homogeneity and high levels of bacterial wilt tolerance in *Solanum torvum* Sw. (Solanaceae) accessions from Reunion Island.** Plant Science, v. 166, n. 6, p. 1533-1540, 2004.

COLLARD, B. C. Y.; MACKILL, D. J. **Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants.** Plant Molecular Biology Reporter. v. 27, p. 86–93, 2009.

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.

CROCHEMORE, M.L.; MOLINARI, H. B. C, AND 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.

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.

DAHLM, R. **Friedrich Miescher and the discovery of DNA.** Developmental Biology, v. 278 p. 274–288, 2005.

DEBENER, T.; MATTIESCH, L. **Effective pairwise combination of long primers for RAPD analysis.** Plant Breeding. v. 117, p. 147-151, 1998.

DEPRÁ, M. S. **Interações plantas-visitantes florais em áreas de restinga: estrutura e redes ecológicas.** 2018. 116 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ecologia de Recursos Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2018.

DIAS, F. T. C.; BERTINI C. H. C. M.; SILVA A. P. M.; CAVALCANTI J. J. V. .
Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. Revista Ciência Agronômica, v.46, p.563-572, 2015.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. . **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** Phytochem Bull v. 19, p. 11–15, 1987

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.** Journal of Medicinal Plants Research. v. 5(2), n. 10, p. 200-210, 2011.

FEITOSA, E. A.; XAVIER, H. S.; RANDAU, K. P. **Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Curitiba. v. 22 n. 5: Setembro/Outubro. 2012.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. **Plants with potential antifungal activity employed in Brazilian folk medicine.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42 p. 369-394. 2006.

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, v. 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.** Toxicology Letters, 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.** Journal of Medicinal Plant Research, v. 8, p. 52-57, 2014.

FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A. L. **Etnobotânica na reserva extrativista marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil.** Acta Botanica Brasilica. 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 States. Department of Agriculture (USDA), 2003. Acessado em 17 de Abril de 2020. Disponível em <http://www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/chrysobalanus%20icaco20L.pdf>.

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.

FUNGARO, M. H. P. **PCR na micologia**. Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento v. 3, p. 12-16, 2000.

FUTUYMA D. J. **Evolutionary biology today and the call for an extended synthesis**. Royal Society. v. 7, n.5: 20160145, 2017.

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.

GORJI, A. M., POCZAI, P., POLGAR, Z., TALLER, J. **Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato**. American Journal of Potato Research. v. 88, p. 226–237, 2011.

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 83 *Homalanthus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco***. Tetrahedron. v. 26, n. 47, p. 4547-4554, 1991.

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, p. 21, 2014.

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.

JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C. **Improved repetitive-element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures**. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v. 7, p. 258-264, 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.

KEARNS, C. A. et al. **Endangered mutualisms: the conservation of plant–pollinator interactions**. Annual Review of Ecology and Systematics, v. 29, p. 83–112, 1998.

K'OPONDO, F. B. O.; RHEENEN, H. A. AND 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.

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, 2003.

LEITE, V. S. M. **Diversidade genética intraespecífica de *Chrysobalanus icaco* L. (*Chrysobalanaceae*) de duas populações da Região dos Lagos, Rio de Janeiro**. 2020. 100f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

LÓPEZ, L. A. C. **El caco (*Chrysobalanus icaco*) como cultivo potencial en zonas de trópico seco**. 2004. Disponível em: <<http://www1.monografias.com/trabajos15/caco-cultivo/cacocultivo.shtml>> Acesso em: 08 de março de 2021.

LORENZ, T. C. **Polymerase Chain Reaction : Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies**. Journal of Visualized Experiments, v. 63, p. 1–15, 2012.

LUZ, A. C. **Diversidade genética de populações de *Bidens pilosa* e *Tithonia diversifolia* no Espírito Santo e respostas do metabolismo primário e secundário sob diferentes condições de fertilização e irrigação**. 2018. 154f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2018.

MACHLINE, I. S. A. **Etnobotânica e a medicina popular em mercados na cidade do Rio de Janeiro**. 2008. 197f. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânica do Rio de Janeiro, Escola de Botânica Tropical, Rio de Janeiro. 2008.

MANÇANO, A. P.; OLIVEIRA, C. A.; CAUZ-SANTOS, L. A.; *et al.* **A reliable DNA extraction protocol for the medicinal plant *Chrysobalanus icaco* (Chrysobalanaceae), a recalcitrant species**. *Brazilian Journal of Botany*, São Paulo, SP, p. 1-6, 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s40415-022-00797-1> > DOI: 10.1007/s40415-022-00797-1.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Millach, 1998. 141p.

MILACH, S. C. K. **Marcadores de DNA: aplicações no melhoramento de plantas**. *Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento*, v.5, p.14-17, 1998b.

MOREDJO, P. N. **Anatomia e otimização de protocolos para extração de DNA genômico de madeira de *Caryocar glabrum* (Aubl.) Pers.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Monografia. f.24, 2015.

OFFEI, S. K.; ASANTE, I. K.; DANQUAH, E.Y. **Genetic structure of seventy cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) accessions in Ghana based on RAPD**. *Hereditas*, v. 140, n.2), p. 123-128, 2004.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. **How many flowering plants are pollinated by animals?**. *Oikos*, v. 120, p. 321-326. 2011.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. **Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros**. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 23, p. 477-481, 2001.

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. **Anti-inflammatory and antinoceptive effects of the aqueous extract of the bark of *Chrysobalanus icaco* Linnaeus**. British Journal of Pharmaceutical Research, 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.

PEDRETE, T. A.; **A Comercialização da Planta Hipoglicemiante, o Abajerú, no Mercado de Madureira e Promoção do seu uso Racional**. 2018. 21f. Monografia (Especialização) - Informação Científica e Tecnológica em Saúde, Instituto de Comunicação e Informação Científica e tecnológica em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

PERES, A. R. M. N. **Caracterização farmacognóstica e avaliação antifúngica das folhas de *Chrysobalanus icaco* (lin) em espécies de candida**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

PIRES, M. V. V., FALEIRO, F. G., SILVA, J. C. S., MELO, J. T., PEIXOTO, J. R. **Características morfológicas e variabilidade genética de araticum utilizando marcadores RAPD e microssatélites**. Revista Brasileira de Fruticultura, v.37, n.1, p.149-158, 2015.

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 Research International, v. 53, p. 875-881, 2013.

PRANCE, G. **Monograph of Chrysobalanaceae**. Flora Neotropica. New York, United States of America, v. 10, p. 14-21, 1973.

PRANCE, G. **Padrões de distribuicao e especiacao em chrysobalanaceae e outras famillas de plantas amazônicas**. Acta Botanica Brasilica, v.1, n. 2, p. 1-25, 1988.

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**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, p. 331-335, 2007.

RAJESH, M. K.; SABANA, A. A.; RACHANA, K. E.; RAHMAN, S.; JERARD, B. A.; KARUN, A. **Genetic relationship and diversity among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions revealed through SCoT analysis.** 3 Biotech. v. 5, p. 999–1006, 2015.

RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. **Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines.** Trends in genetics, v. 9, n. 8, p. 275-280, 1993.

RAMÍREZ-VILLALOBOS, M.; URDANETA-FERNÁNDEZ, A; VARGAS-SIMÓN, G. **Tratamientos con ácido indolbutírico y lesionado sobre el enraizamiento de estacas de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.).** Agronomía Tropical, v. 54, p. 203-218. 2004.

RATHORE, N. S.; RAI, M. K.; PHULWARIA, M.; RATHORE, N.; SHEKHAWAT, N. S. **Genetic stability in micropropagated Cleome gynandra revealed by SCoT analysis.** Acta Physiol Plant, v. 36, p. 555–559, 2014.

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.** Experimental Parasitology. v. 143, p. 60-68, 2014.

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. 1, 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, v. 47(270), p. 181-187, 2000.

SATYA, P.; KARAN, M.; JANA, S.; MITRA, S.; SHARMA, A.; KARMAKAR, P. G.; RAY, D. P. **Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species.** Meta gene, v. 3, p. 62-70, 2015.

SEMAGN, 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.

SHEKHAWAT, J. K.; RAI, M. K.; SHEKHAWAT, N. S.; KATARIA, V. **Start codon targeted (SCoT) polymorphism for evaluation of genetic diversity of wild population of *Maytenus emarginata***. *Industrial Crops and Products*, v. 122, p. 202–208, 2018.

SILVA, C. N., FALEIRO, F. G., OLIVEIRA, J. D. S., JUNQUEIRA, N., & DA FONSECA, K. C. **Variabilidade genética de progênes de maracujá maçã (*Passiflora maliformis* L.) Usando marcadores RAPD e ISSR**. *Embrapa Cerrados-Artigo em periódico indexado (ALICE)*, 2019.

SILVA, I. M.; PEIXOTO, A. L. **O abajurú (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar.) comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil**. *Rev. bras. farmacogn.*, João Pessoa, v. 19, n. 1b, p. 325-332, Mar. 2009. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000200025&lng=en&nrm=iso>. access on 14 Apr. 2020.

SINGH, S. K.; CHHAJER, S.; PATHAK, R.; BHATT, R. K.; KALIA, R. K. **Genetic diversity of Indian jujube cultivars using SCoT, ISSR, and rDNA markers**. *Tree Genetics & Genomes*. v. 13, p. 12, 2017.

SOUSA, V. F. **Levantamento florístico e potencial ornamental de plantas da restinga do Rio Grande do Norte, Brasil: Subsídios para um paisagismo sustentável**. 2016. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

STEDJE, B.; BUKENYA-ZIRABA, R. **RAPD variation in *Solanum anguivi* Lam. and *S. aethiopicum* L. (*Solanaceae*) in Uganda**. *Euphytica*, v. 131, p. 293–297, 2003.

SUBRAMNIAN, 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.

TANAKA, J.; TANIGUCHI, F. **Emphasized-RAPD (e-RAPD): a simple and efficient technique to make RAPD bands clearer**. *Breeding Science*, v. 52, p. 225-229, 2002.

TURCHETTO-ZOLET A. C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 180p. 2017.

VARGAS-SIMÓN, 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.

VARGAS-SIMÓN, G.; ARELLANO-OSTOA, G.; SOTO-HERNÁNDEZ, R. **Enraizamiento de estacas de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.) sometidas a aplicaciones de auxinas.** Bioagro, v. 11, n. 3, p. 103-108, 1999.

VARGAS-SÍMON, G.; MARES, F. M.; MARTÍNEZ, R. F. M.; SÁNCHEZ, A. S. **Frutales Tropicales de Tabasco.** 2. ed. Villahermosa: Centro de Investigación de Ciencias Biológicas. 2000.

VASUDEVAN, V.; SUBRAMANYAM, K.; ELAYARAJA, D.; KARTHIK, S.; VASUDEVAN, A.; MANICKAVASAGAM, M. **Assessment of the efficacy of amino acids and polyamines on regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by SCoT and RAPD markers.** Plant Cell Tissue and Organ Culture, v. 130, p. 681–687, 2017.

VENANCIO, V. P.; ALMEIDA, M. R.; MARIA, L.; ANTUNES, G. **Cocoplum (*Chrysobalanus icaco* L.) decreases doxorubicin-induced DNA damage and downregulates Gadd45a, Il-1 β , and Tnf- α in vivo.** Food Research International, v. 105, p. 996–1002, 2018.

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.

VILARDO, A. F. R. M.; **Estudos de criopreservação, análise fitoquímica e avaliação da estabilidade genética de *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae).** 2019. Tese (Doutorado) – Curso de Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

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.

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.** Journal of Ethnopharmacology, v. 179, p. 92-100, 2016.

XIONG, F. Q.; ZHONG, R. C.; HAN, Z. Q.; JIANG, J.; HE, L. Q.; ZHUANG, W. J.; TANG, R. H. **Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes.** Molecular Biology Reports, v. 38, p. 3487–3494, 2011.

YAKANDAWALA, D.; MORTON, C. M.; PRANCE, G. T. **Phylogenetic Relationships of the Chrysobalanaceae Inferred from Chloroplast, Nuclear, and Morphological Data.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.97, n2, p. 259-281, 2010.