

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
CARLOS ALBERTO REYES MALDONADO – UNEMAT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS – PGMP**

ANA PAULA ROVEDA

**Citogenotoxicidade, diversidade genética e estrutura populacional
de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) no pantanal mato-
grossense**

**ALTA FLORESTA
MATO GROSSO - BRASIL
FEVEREIRO - 2023**

ANA PAULA ROVEDA

**Citogenotoxicidade, diversidade genética e estrutura populacional
de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) no pantanal mato-
grossense**

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO
ESTADO DE MATO GROSSO CARLOS
ALBERTO REYES MALDONADO, como parte
das exigências do Programa de Pós-Graduação
em Genética e Melhoramento de Plantas, para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini
Rossi

Coorientadora: Profa. Dra. Kelli Évelin Müller
Zortéa

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO - BRASIL
FEVEREIRO - 2023

ROVEDA, Ana Paula.
R873c Citogenotoxicidade, Diversidade Genética e Estrutura
Populacional de *Vochysia Divergens* Pohl (Vochysiaceae) no
Pantanal Mato-Grossense / Ana Paula Roveda – Alta
Floresta/Cáceres/Tangará da Serra, 2023.
76 f.; 30 cm. (ilustrações) Il. color. (sim)

Trabalho de Conclusão de Curso
(Dissertação/Mestrado) – Curso de Pós-graduação Stricto Sensu
(Mestrado Acadêmico) Genética e Melhoramento de Plantas,
Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Multicampi,
Universidade do Estado de Mato Grosso, 2023.
Orientador: Ana Aparecida Bandini Rossi
Coorientador: Kelli Évelin Müller Zortéa

1. Cambará. 2. Plantas Medicinais. 3. Microssatélites. I. Ana
Paula Roveda. II. Citogenotoxicidade, Diversidade Genética e
Estrutura Populacional de *Vochysia Divergens* Pohl
(Vochysiaceae) no Pantanal Mato-Grossense: .
CDU 633.88

Citogenotoxicidade, diversidade genética e estrutura populacional de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) no pantanal mato-grossense

ANA PAULA ROVEDA

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO “Carlos Alberto Reyes Maldonado”, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Comissão Examinadora:

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ANA APARECIDA BANDINI ROSSI
Data: 22/02/2023 22:49:29-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Presidente: Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi
(Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT)

Documento assinado digitalmente
 KELLI EVELIN MULLER ZORTEA
Data: 23/02/2023 15:48:03-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Titular 1: Profa. Dra. Kelli Évelin Müller Zortéa
(Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT)

Documento assinado digitalmente
 SERGIO ALESSANDRO MACHADO SOUZA
Data: 27/02/2023 12:25:21-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Titular 2: Prof. Dr. Sergio Alessandro Machado Souza
(Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT)

Documento assinado digitalmente
 MAGALI GONCALVES GARCIA
Data: 26/02/2023 10:29:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Titular 3: Profa. Dra. Magali Gonçalves Garcia
(Universidade Federal do Pará - UFPA)

A mim pelo esforço e empenho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), *campus* de Alta Floresta-MT, e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas (PGMP), pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, através da concessão de bolsa.

À minha orientadora Ana Aparecida Bandini Rossi e coorientadora Kelli Évelin Müller Zortéa pela orientação, ensinamentos e paciência. Duas pessoas maravilhosas, que não medem esforços para ajudar e passar o conhecimento adquirido. Peças fundamentais para o desenvolvimento dessa dissertação. Faltam palavras para descrever o quanto sou grata. Vocês são demais!

À Prof. Dra. Carolina Joana da Silva pela oportunidade de participar do Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração (PELD-DARP 2020) – Pantanal, do qual essa dissertação faz parte. Foi uma experiência incrível conhecer o Pantanal.

Ao meu namorado Alessandro pelo amor, apoio, compreensão e incentivo a mais essa jornada. Pessoa incrível que está sempre me motivando a buscar o melhor.

Aos familiares, em especial minha mãe Marlene que sempre está ali na torcida para que tudo dê certo.

Aos professores do programa pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

Aos colegas da turma PGMP/2021, que apesar do contato ter sido apenas *online*, foi gratificante conhecer vocês. Em especial, ao Giseudo Paiva e Renan Colavite, foram muitos corres para entregar todas as atividades, trabalhos em eventos, e claro, a dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular pela colaboração, foram momentos de muito aprendizado, conversas à toa e boas risadas.

Ao meu amigo Giseudo, parceria fechada desde a graduação, da qual continuou no mestrado.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

Ana Paula Roveda, filha de Marlene Terezinha Roveda e Hilário Roveda, nasceu em 27 de novembro de 1991, no município de Alta Floresta-MT. Em 2008 concluiu o ensino médio na Escola Estadual Jayme Veríssimo de Campos Júnior. Em 2010 concluiu o curso Técnico em Agropecuária pela Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação (SECITEC). Em 2015/2 iniciou no curso de Licenciatura Plena e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) *campus* de Alta Floresta, do qual era para ter concluído em 2020/1, porém devido a pandemia do COVID 19, colou grau em fevereiro de 2021, ingressando no mês seguinte no Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela UNEMAT.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Pantanal mato-grossense.....	3
2.2 <i>Vochysia divergens</i> Pohl	4
2.3 Citogenotoxicidade e teste <i>Allium cepa</i>	7
2.4 Diversidade genética e estrutura populacional	8
2.5 Marcadores moleculares SSR	9
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
4. CAPÍTULOS	17
4.1 CAPÍTULO I.....	17
CITOGENOTOXICIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DA CASCA DE <i>Vochysia</i> <i>divergens</i> POHL (VOCHYSIACEAE).....	17
RESUMO.....	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Local de Coleta.....	21
2.2 Extratos Aquosos	21
2.3 Teste <i>Allium cepa</i> L.	22
2.4 Avaliação do potencial tóxico, citotóxico e genotóxico	23
2.5 Preparo das lâminas e contagem das células	24
2.6 Análise dos dados	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1 Efeito tóxico dos extratos aquosos de <i>V. divergens</i>	26
3.2 Efeito citotóxico dos extratos aquosos de <i>V. divergens</i>	28
3.3 Efeito genotóxico dos extratos aquosos de <i>V. divergens</i>	30
4. CONCLUSÕES	33

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
4.2 CAPÍTULO II.....	38
DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE <i>Vochysia divergens</i> POHL (VOCHYSIACEAE) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES SSR	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT	39
1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Área de estudo	42
2.2 Coleta do material vegetal	42
2.3 Extração de DNA.....	43
2.3 Amplificação via PCR	44
2.4 Análise dos dados	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1 Diversidade genética de <i>Vochysia divergens</i>	48
3.2 Estrutura genética em populações naturais de <i>Vochysia divergens</i>	51
4. CONCLUSÕES	56
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	61

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Resumo da análise de variância (ANOVA) para o efeito dos extratos de <i>Vochysia divergens</i> e suas concentrações sobre o comprimento da raiz de <i>Allium cepa</i>	26
Tabela 2. Teste de médias para o comprimento da raiz de <i>Allium cepa</i> submetidas a diferentes concentrações e extratos aquosos de <i>Vochysia divergens</i>	27
Tabela 3. Resumo da análise de variância (ANOVA) para o efeito dos extratos de <i>Vochysia divergens</i> e suas concentrações sobre o índice mitótico de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	28
Tabela 4. Teste de médias para o índice mitótico (IM) das células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> submetidos a diferentes concentrações e extratos aquosos de <i>Vochysia divergens</i>	29
Tabela 5. Alterações cromossômicas observadas durante a divisão celular de células de <i>Allium cepa</i> submetidas aos extratos aquosos de casca de <i>Vochysia divergens</i>	30

Capítulo II

Tabela 1. Primers SSR usados para amplificar o DNA de <i>Vochysia divergens</i>	45
Tabela 2. Estimativa da diversidade genética por locus microssatélite em <i>Vochysia divergens</i>	48
Tabela 3. Estimativa da diversidade genética por população de <i>Vochysia divergens</i> , obtidas com sete locus microssatélites	49
Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) das seis populações de <i>Vochysia divergens</i> a partir de sete marcadores microssatélites	51
Tabela 5. Matriz de distância genética* de Nei (1978) e de distâncias geográficas** (Km) entre as seis populações naturais de <i>Vochysia divergens</i>	52

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1.** Distribuição geográfica de *Vochysia divergens* no Brasil. As áreas coloridas indicam as regiões de ocorrência. Verde: Norte; amarelo: Centro-oeste; alaranjado: Nordeste. Fonte: Flora e Funga do Brasil (2023). 5
- Figura 2.** *Vochysia divergens*. (A) hábito; (B) tronco; (C) detalhe da casca; (D) inflorescência; (E) botão floral; (F) flor – pétalas laterais (seta 1), pétala maior (seta 2), pétala inferior (seta 3) e cálcio (seta 4); (G) estame – estaminódios (seta); (H) estigma; (I) frutos. Fonte: a autora. 6

Capítulo I

- Figura 1.** Localização geográfica da coleta das cascas de *V. divergens* na Baía do Malheiros, no município de Cáceres, Mato Grosso, Brasil. Fonte: a autora. 21
- Figura 2.** Preparo dos extratos aquosos. (A) Cascas de *Vochysia divergens* pesadas na balança de precisão, (B) Preparo dos extratos aquosos do tipo decocto e infuso. 22
- Figura 3.** Preparo do Bioensaio pelo método descontínuo. (A) Retirada das escamas externas dos bulbos da cebola, (B) Enraizamento dos bulbos em água destilada, (C) Bulbos transferidos para os extratos aquosos e alocados em câmara de germinação. 23
- Figura 4.** (A) Lavagem das raízes em água destilada e ácido clorídrico, (B) Preparo das lâminas a partir da técnica de esmagamento. 25
- Figura 5.** Comprimento das raízes dos bulbos de *Allium cepa* após exposição à diferentes concentrações (mg/ml) de extratos aquosos da casca do caule de *Vochysia divergens*. Extrato aquoso do tipo infuso (EAI) e extrato aquoso do tipo decocto (EAD). CN: controle negativo, água destilada (0 mg ml^{-1}) e CP: controle positivo, $0,64 \text{ mg ml}^{-1}$ de sulfato de cobre pentahidratado. 26
- Figura 6.** Gráfico de interação entre os extratos e concentrações para a variável crescimento do sistema radicular. CP: controle positivo. 28
- Figura 7.** Gráfico de interação entre os extratos e concentrações para a variável índice mitótico. CP: controle positivo. 29

Figura 8. Alterações cromossômicas observadas durante a divisão celular das raízes de *Allium cepa*. (A) Prófase irregular, (B) Metáfase irregular, (C) Anáfase com cromossomo adiantado, (D) Anáfase com ponte cromossômica, (E) Telófase com cromossomo adiantado. Barra de 20 µm. 31

Capítulo II

Figura 1. Localização geográfica das seis populações naturais de *Vochysia divergens* no Pantanal de Mato Grosso, Brasil. Fonte: a autora.....42

Figura 2. Principais etapas da extração de DNA foliar de *Vochysia divergens* seguindo o protocolo CTAB. (A) Bancada preparada para o início da trituração das folhas com nitrogênio líquido, (B) Pó resultante da trituração foliar, (C) Transferência da folha triturada para microtubos, (D) Resultado da primeira centrifugação separando a fase aquosa da orgânica, (E) Separação das fases para retirada do sobrenadante, (F) Formação do pellet.....43

Figura 3. Quantificação do DNA. (A) Fotodocumentação do gel em transiluminador sob luz ultravioleta, (B) Eletroforese em gel de agarose a 1%, com amostras de DNA de seis indivíduos, com repetições, de *Vochysia divergens* pertencentes a população RSL, M: marcador 100 ng/µL, (C) Leitura das amostras de DNA no micro espectrofotômetro. 44

Figura 4. Fotodocumentação dos produtos amplificados para o primer A1-26 na população TPR em gel de agarose MetaPhor 3%. M: Marcador DNA Ladder 100pb Cellco®.....46

Figura 5. Distribuição da frequência alélica nos sete locus microssatélites analisados nas seis populações naturais de *Vochysia divergens*. 50

Figura 6. Dendrograma UPGMA, gerado a partir da matriz de distância genética de Nei (1983), com base nos dados de sete locus microssatélites para seis populações naturais de *Vochysia divergens*. CCC = 0,80; Distorção = 4,42%; Estresse = 21,07%. 53

Figura 7. Estimativa do número de grupos (K) a partir de 20 corridas independentes para K = 1-9, que melhor se encaixa no conjunto de dados de *Vochysia divergens*, conforme Evanno et al. (2005). 53

Figura 8. Análise de agrupamento e distribuição geográfica dos agrupamentos gerados pelo “Structure”. (A) Os gráficos pizza representam a proporção de

contribuição de cada população para os grupos formados no “Structure” (K = 3). (B) Distribuição dos três grupos genéticos gerados pelo “Structure”. As linhas verticais ao longo do eixo x representam os indivíduos e os segmentos coloridos ao longo do eixo y demonstram o coeficiente de associação de cada indivíduo atribuído a cada um dos inferidos K. BMO: Barrão de Melgaço; PFM: Porto de Fora à Mimoso; RSL: Rio São Lourenço; SAL: Santo Antônio do Leverger; TPR: Transpantaneira; CAS: Cáceres .
54

Figura 9. Análise de coordenadas principais de 152 indivíduos de *Vochysia divergens*. BMO: Barrão de Melgaço; PFM: Porto de Fora à Mimoso; RSL: Rio São Lourenço; SAL: Santo Antônio do Leverger; TPR: Transpantaneira; CAS: Cáceres. 55

RESUMO

ROVEDA, Ana Paula; M. Sc. Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado – UNEMAT, fevereiro de 2023. **Citogenotoxicidade, diversidade genética e estrutura populacional de *Vochysia divergens* Pohl (vochysiaceae) no Pantanal mato-grossense.** Orientadora: Profa. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi; Coorientadora: Dra. Kelli Évelin Müller Zortéa.

Conhecida popularmente no Brasil como cambará, *Vochysia divergens* Pohl. pertence à família Vochysiaceae, é uma espécie arbórea, naturalmente encontrada em terrenos inundáveis e matas ciliares do Pantanal. Sua madeira é utilizada para confecção de canoas, cochos e brinquedos, além disso a espécie também possui uso medicinal, ornamental e de reflorestamento. Apesar de ser amplamente utilizada, não há estudos no que diz respeito ao seu potencial citogenotóxico, nem a sua diversidade genética. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citogenotóxico de extratos aquosos (infuso e decocto) da casca do caule de *V. divergens*, por meio do teste *Allium cepa*, bem como caracterizar a diversidade e a estrutura genética em populações nativas no pantanal mato-grossense por meio de marcadores moleculares microssatélites. A avaliação do potencial citogenotóxico foi realizada a partir de dois tipos de extratos aquosos (infuso e decocto), com cinco concentrações distintas e dois controles, sendo a água destilada (controle negativo) e o sulfato de cobre penta-hidratado (controle positivo). Os dois extratos aquosos apresentam potencial citogenotóxico sobre as células do meristema apical de *Allium cepa*, com exceção da concentração de 200 mg ml⁻¹ do extrato tipo infuso, pois não diferiu estatisticamente do controle negativo. A diversidade e estrutura genética foram avaliadas em 152 indivíduos distribuídos em seis populações naturais no pantanal mato-grossense, por meio de sete marcadores moleculares microssatélites. Foram amplificados 33 alelos, com média de 4,71 alelos por locus. As seis populações apresentam *He* menor que *Ho*. O índice de fixação foi negativo, indicando maior heterozigosidade nas populações. O PIC variou de 0,110 a 0,729 e apenas um locus foi pouco informativo. Foram encontrados 4 alelos raros e 13 exclusivos nas populações. O maior componente de variação foi dentro das populações (52,78%) e a estimativa de fluxo gênico foi de 0,26, indicando um baixo fluxo gênico entre as populações. Os agrupamentos geraram três grupos, onde observa-se que a estrutura genética não está relacionada com a distância geográfica entre as populações. *Vochysia divergens* possui potencial citogenotóxico e suas populações nativas no Pantanal mato-grossense apresentam níveis de diversidade genética importante que podem auxiliar em práticas que assegurem o manejo e a conservação da espécie.

Palavras-Chave: Cambará; Plantas medicinais; Microssatélites.

ABSTRACT

ROVEDA, Ana Paula; M.Sc. Mato Grosso State University Carlos Alberto Reyes Maldonado – UNEMAT, February 2023. **Cytogenotoxicity, genetic diversity and population structure of *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) in the Pantanal of Mato Grosso state, Brazil.** Advisor: Prof. Dr. Ana Aparecida Bandini Rossi; Co-advisor: Dr. Kelli Évelin Müller Zortéa.

Popularly known in Brazil as cambará, *Vochysia divergens* Pohl. belongs to the Vochysiaceae family and is an arboreal species naturally found in floodplains and riparian forests of the Pantanal. Its wood is used to make canoes, feeding troughs and toys, and the species also has medicinal, ornamental and reforestation uses. Despite being widely used, there are no studies regarding its cytogenotoxic potential nor its genetic diversity. Thus, the present study aimed to evaluate the cytogenotoxic potential of aqueous extracts (infusion and decoction) of the stem bark of *V. divergens*, using the *Allium cepa* test, as well as to characterize the diversity and genetic structure of native populations in the Pantanal of Mato Grosso state, Brazil, using microsatellite molecular markers. The evaluation of its cytogenotoxic potential was carried out with two types of aqueous extracts (infusion and decoction), with five different concentrations and two controls, these being distilled water (negative control) and copper sulphate pentahydrate (positive control). The two aqueous extracts have cytogenotoxic potential on the cells of the apical meristem of *Allium cepa*. The exception was the concentration of 200 mg ml⁻¹ of the infused extract, since it did not differ statistically from the negative control. The genetic diversity and structure were evaluated in 152 individuals distributed in six natural populations in the Pantanal of Mato Grosso state using seven microsatellite molecular markers. A total of 33 alleles were amplified, with an average of 4.71 alleles per locus. The six populations present H_e lower than H_o . The fixation index was negative, which indicated greater heterozygosity in the populations. The PIC ranged from 0.110 to 0.729 and only one locus was uninformative. We found 4 rare and 13 exclusive alleles in the populations. The largest component of variation was within populations (52.78%) and the gene flow estimate was 0.26, which indicates low gene flow among populations. The clusters generated three groups. It is observed that the genetic structure is not related to the geographical distance among populations. *Vochysia divergens* has cytogenotoxic potential and its native populations in the Pantanal of Mato Grosso state present levels of important genetic diversity that can help in practices that ensure the management and conservation of the species.

Keywords: Cambará; Medicinal plants; Microsatellites.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Considerada a maior planície alagada do mundo, o Pantanal mato-grossense ocupa uma área aproximada de 140.000 km² no território brasileiro, situado entre os estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, está localizado na Bacia Hidrográfica do Alto Paraguai (SOUZA et al., 2006). É um dos biomas mais úmidos que possui diferentes unidades de paisagem, das quais interagem entre as épocas de cheia e seca (NASCIMENTO et al., 2020).

Assim, o Pantanal apresenta diversas fitofisionomias, como campos sazonalmente inundáveis, capões de cerrado, cordilheiras, florestas ripárias, além de formações monodominantes (POTT et al., 2011). Dentre as espécies que fazem parte dessas formações monodominantes no Pantanal, está a *Vochysia divergens* Pohl, espécie de porte arbóreo com características ecológicas e fisiológicas que proporcionam sua disseminação e dominância em campos sazonalmente inundados, formando extensas faixas de florestas, conhecidas como cambarazais (NUNES DA CUNHA et al., 2002; NUNES DA CUNHA & JUNK 2004).

A espécie é utilizada para fins medicinais pela população local (GUARIM NETO et al., 2006; JESUS et al., 2009), mas sem informações farmacológicas necessárias para seu uso correto. Pesquisas nessa área podem trazer dados relevantes, contribuindo para a inserção de drogas seguras e eficazes para comunidade, visando o combate de diversas patologias (BUFFON et al., 2001).

Vochysia divergens além do seu potencial medicinal, possui valor madeireiro, ornamental, ecológico e de reflorestamento (POTT & POTT, 1994; LORENZI, 1998; CARVALHO, 2014), o que torna importante a realização do manejo sustentável da espécie, de maneira a evitar a perda de variabilidade genética. O conhecimento da diversidade genética de uma espécie auxilia sua conservação e sustentabilidade. Estudos genéticos em populações naturais avaliam fatores como grau de diversidade genética entre os indivíduos, estrutura genética espacial, distribuição dos genótipos dentro e entre as populações, taxas de cruzamentos, fluxo gênico e o grau de isolamento das populações (MORAES et al., 2005; BRANDÃO et al., 2011).

A avaliação da diversidade genética pode ser realizada com o auxílio dos marcadores moleculares, que permitem detectar a variação genética nas espécies diretamente a nível de DNA (CRUZ et al., 2011). A criação da técnica de Reação em

Cadeia da Polimerase (PCR) possibilitou o desenvolvimento de muitos marcadores, entre eles o SSR (Simple Sequence Repeats) ou microssatélites (LITT & LUTY, 1989). Os marcadores moleculares SSR, são codominantes, detectam indivíduos heterozigotos, formando locus genéticos altamente polimórficos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Apesar de ser uma espécie amplamente utilizada no Pantanal, não há estudos sobre sua citogenotoxicidade e são escassos estudos sobre a diversidade genética e estrutura populacional (ZORTÉA, 2022), que possam fornecer dados sobre sua toxicidade e informações que contribuam para conservação e uso da espécie. Desse modo, esse trabalho tem por objetivo avaliar o potencial citogenotóxico de extratos aquosos (infuso e decocto) da casca de *V. divergens*, por meio do teste *Allium cepa*, bem como caracterizar a diversidade e a estrutura genética espacial em populações nativas no Pantanal mato-grossense por meio de marcadores moleculares microssatélites.

Este trabalho está dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo descreve sobre a citogenotoxicidade da espécie. O segundo capítulo, aborda a diversidade e a estrutura genética por meio de marcadores moleculares microssatélites em populações naturais de *V. divergens* localizadas no Pantanal mato-grossense.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pantanal mato-grossense

O Pantanal é uma extensa planície sazonalmente inundável, localizada na Bacia Hidrográfica do Alto Paraguai, possuindo aproximadamente 152.389 km² de extensão (PARANHOS FILHO et al., 2014), em que 70% estão em território brasileiro e as demais porções encontra-se na Bolívia e no Paraguai (SABINO, 2015). É uma região com influência fitogeográfica dos biomas vizinhos, como Cerrado, Floresta Amazônica, Floresta Atlântica e o Chaco (ALHO & SILVA, 2012).

O Pantanal mato-grossense foi dividido em 11 pantanais, onde Silva e Abdon (1998) levaram em consideração alguns critérios relacionados ao material de origem, como tipo de solo, drenagem, altimetria e vegetação associados às bacias hidrográficas, o que possibilitou a divisão de 11 sub-regiões sendo estas: Pantanal de Cáceres; Poconé; Barão de Melgaço; Paiaguás e Nhecolândia; Abobral; Miranda e Aquidauana; Nabileque; Paiaguás e o Pantanal de Porto Murtinho.

O regime de inundação do Pantanal é composto por quatro estações sazonais: enchente, cheia, vazante e seca, que são fatores determinantes para a ocorrência dos principais processos bióticos e abióticos do bioma, assim como a formação das diferentes unidades da paisagem (ADAMOLI, 1995). Essas unidades apresentam diferentes fitofisionomias, compreendendo áreas desde campos inundáveis até formações florestais, que formam um mosaico de ecossistema (ALHO & GONÇALVES, 2005). O ciclo hidrológico e a geomorfologia contribuem para a formação desses mosaicos, desempenhando importante papel no suporte a rica biodiversidade regional (ALHO, 2008).

A variação sazonal expõe as comunidades de plantas da região a restrições na obtenção de recursos, devido as mudanças ambientais frequentes, principalmente o estresse hídrico, seja pela falta ou excesso de água (JUNK & DA SILVA, 2000; SCREMIN-DIAS et al., 2011). No entanto, essa mistura de habitats permanente ou temporariamente inundados favorece para a riqueza da vegetação e produtividade do sistema, uma vez que ao ocorrer as inundações, ocorre também uma ciclagem de nutrientes, tornando o ambiente altamente fértil (ALHO, 2008; GONÇALVES et al., 2011).

Oscilações nos níveis de inundação alteram os padrões de sucessão das espécies vegetais, uma vez que a vegetação é constantemente substituída devido ao estresse hídrico (ABDON et al., 2001; JUNK & DA SILVA, 2000). Esse tipo de dinâmica beneficia as espécies pioneiras, que são adaptadas aos ambientes perturbados (RICKLEFS, 2011) que é o caso da *Vochysia divergens*.

Além das áreas de inundação, o Pantanal também apresenta formação de florestas ribeirinhas e ambientes não inundáveis (cordilheiras e capões de cerrado), que fornecem abrigo e alimento para fauna, além de contribuírem para a produção de serapilheira, ciclagem dos nutrientes e regulação da temperatura (JUNK et al., 1989).

Devido as ações antrópicas, mudanças vem ocorrendo na paisagem pantaneira, ameaçando processos ecológicos e a biodiversidade desse bioma (ALHO & SABINO, 2012). Essas mudanças são decorrentes da extração de madeira para uso local nas propriedades e abertura de novas áreas para introdução de pastagens (ALHO et al., 2011; DAMASCENO JUNIOR et al., 2009).

2.2 *Vochysia divergens* Pohl

A família Vochysiaceae compreende oito gêneros e cerca de 250 espécies, com distribuição predominantemente neotropical, sendo que no Brasil ocorrem seis gêneros e 166 espécies (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023). Dentro dessa família encontra-se o gênero *Vochysia* que inclui 89 espécies, seus representantes caracterizam-se por possuir flores com corola geralmente de 3 pétalas, cálice e corola amarelos, androceu formado por um estame inserido na base da pétala central e ovário súpero (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023).

Vochysia divergens Pohl, cujo epíteto específico “*divergens*” significa “divergente” ou “cores distintas dos lados da folha”, é uma espécie arbórea, podendo chegar a mais de 18m de altura, copa frondosa, tronco ereto e cilíndrico, com casca clara e partida, possui madeira moderadamente pesada, macia e de fácil manuseio, usada para confecção da canoa pantaneira, cocho, vara de porteira, rancho, tábuas, compensado, caixas, brinquedos, celulose e lenha (POTT & POTT, 1994; LORENZI, 1998).

A espécie ocorre na Bolívia, Brasil e Peru (GBIF, 2022). No Brasil, possui distribuição geográfica nas regiões: Norte (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins), Nordeste (Bahia, Maranhão) e Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato

Grosso), nos domínios fitogeográficos Amazônia, Cerrado e Pantanal, em vegetações do tipo Cerrado (lato sensu), Floresta Ciliar ou Galeria (Figura 1) (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023).



Figura 1. Distribuição geográfica de *Vochysia divergens* no Brasil. As áreas coloridas indicam as regiões de ocorrência. Verde: Norte; amarelo: Centro-oeste; alaranjado: Nordeste. Fonte: Flora e Funga do Brasil (2023).

Vochysia divergens possui caule com córtex esfoliante; ramos jovens cilíndricos, seríceo-adpressos. Estípulas 0,8–2,0 mm compr., triangulares, persistentes. Folha simples, 4-5-verticiladas; pecíolo 3,0–4,5 cm compr., canaliculado seríceo-adpresso, ausência de nectários extraflorais na base do pecíolo; lâminas 9,0–14,0 cm compr. × 3,4–4,5 cm larg., oblanceoladas, ápice retuso, base aguda, margem inteira a levemente sinuosa, revoluta, face adaxial glabra, face abaxial esparso-serícea, nectários extraflorais e glândulas ausentes. Inflorescência tirso, terminal, cincinos 1–3 flores, raque 30,0–46,5 cm compr. Flores vistosas, cálice gamossépalo, 2 sépalas laterais, 3 mm compr., 2 superiores, 5 mm compr., obovadas, puberulentas, margens ciliadas; cálcar 9–10,1 mm compr., esparsamente puberulento; corola zigomorfa, amarela, 1 pétala inferior, 14–15 mm compr., 2 laterais, 7–10 mm compr., obovadas, puberulentas, 1 pétala superior, 12–15 mm compr., obovada, puberulenta; 1 estame, 11,05 mm compr., antera 9,05 mm compr., deiscência rimosa; 2 estaminódios, 1,1 × 1,0 mm; estigma clavado, estilete 15–18,2 mm compr., glabro; ovário súpero, 1,9–2,2 mm compr. × 1,9–2,0 mm larg., densamente seríceo. Fruto cápsula, 2,0–2,3 cm compr. × 1,0–1,02 cm larg., 3-costelado, rugoso, esparso-seríceo (Figura 2).

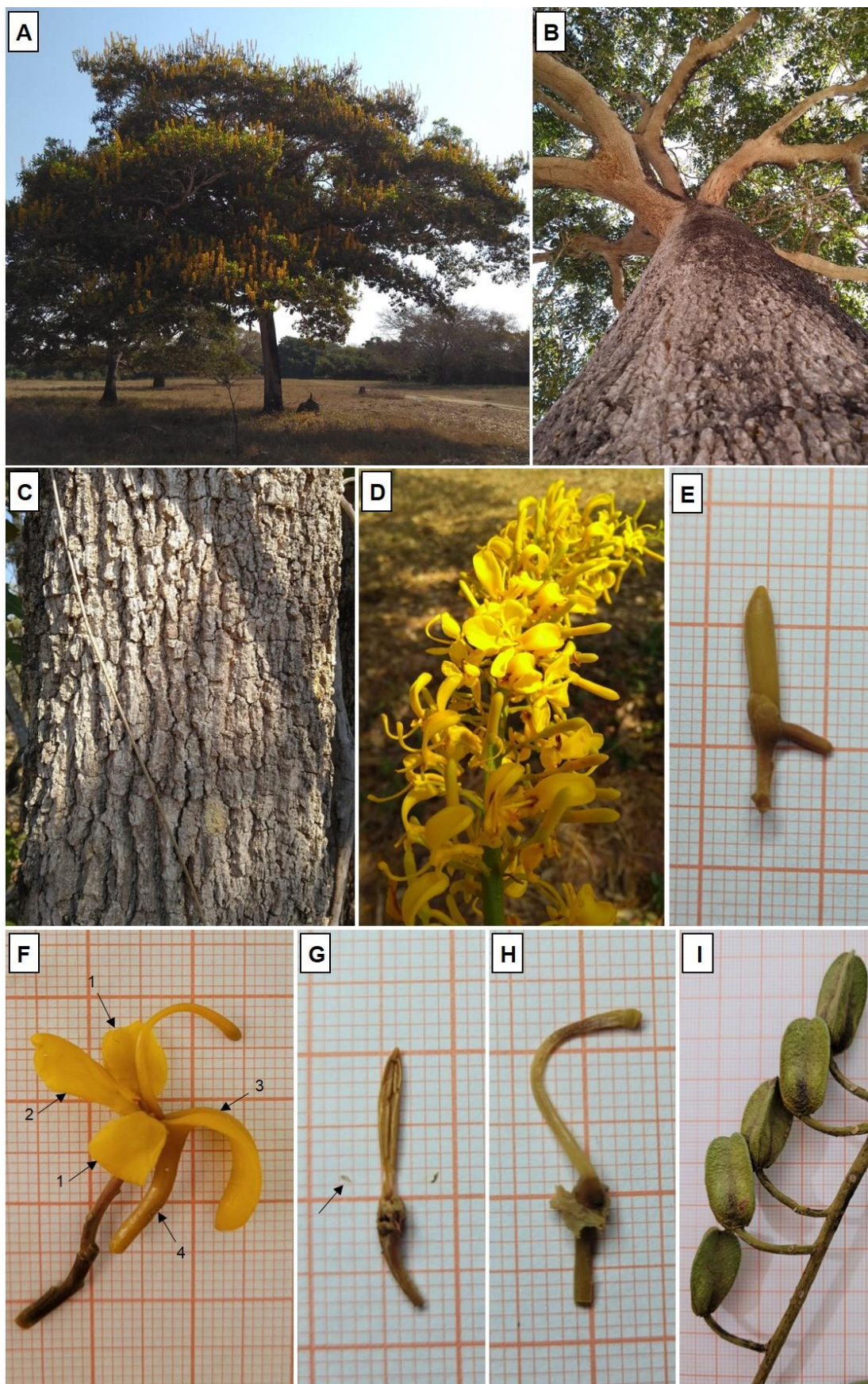


Figura 2. *Vochysia divergens*. (A) hábito; (B) tronco; (C) detalhe da casca; (D) inflorescência; (E) botão floral; (F) flor – pétalas laterais (seta 1), pétala maior (seta 2), pétala inferior (seta 3) e cálcio (seta 4); (G) estame – estaminódios (seta); (H) estigma; (I) frutos. Fonte: a autora.

Na medicina popular o chá das folhas de *Vochysia divergens* é preparado contra asma e gripe e o chá da casca é utilizado no tratamento de úlceras e como anti-inflamatório. Da casca também pode ser feito um xarope para o tratamento de apendicites (GUARIM NETO et al, 2006; JESUS et al., 2009).

A espécie floresce de julho a setembro e os frutos amadurecem de dezembro a janeiro. Devido a beleza de suas flores é ornamental, muito apícola e visitada por beija-flores e macacos em busca de néctar, sua flor serve de alimento para peixes, além disso seus galhos servem de abrigo para fauna (POTT e POTT, 1994; LORENZI, 1998).

Vochysia divergens produz grande quantidade de sementes viáveis, disseminadas pelo vento e pela água, e por apresentar rápido crescimento é indicada para reflorestamento (LORENZI, 1998). É uma espécie invasora de pastagens e como não cresce a própria sombra vai avançando sobre o campo, formando florestas monodominantes chamadas de cambarazais. Ocorre em matas ciliares, capões, campos de inundação por rio, corixo ou vazante, solos argilosos e arenosos (POTT e POTT, 1994).

2.3 Citogenotoxicidade e teste *Allium cepa*

As plantas medicinais são usadas no mundo todo para o tratamento de doenças e em sua maioria não foram estudadas o suficiente no que diz respeito ao potencial citotóxico/mutagênico, o qual pode ser monitorado pelo uso do sistema teste de *Allium cepa* L. (BAGATINI et al., 2007).

Dentre os efeitos tóxicos causados pelas substâncias produzidas pelas plantas, estão a citotoxicidade caracterizada pela ação antiproliferativa do ciclo celular (PASTORI et al, 2015) e a genotoxicidade que se refere as alterações na estrutura do DNA em células somáticas ou germinativas causadas pela exposição a determinados compostos (FONSECA & PEREIRA, 2004).

O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) aprova o método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa*, como um teste eficiente para análise e monitoramento da genotoxicidade de substâncias ambientais, onde as alterações podem variar desde mutagenicidade e antimutagenicidade até aumento e diminuição da proliferação celular nas pontas de raízes (CABRERA & RODRIGUEZ, 1999).

O teste *A. cepa* é eficiente e simples, uma vez que as cebolas são de baixo custo, fáceis de armazenar, manusear e o meristema radicular constitui um sistema conveniente para avaliação microscópica de danos cromossômicos. O fato de fornecer condições citológicas nas células da ponta de suas raízes, fez desta espécie um material clássico para estudo da mitose normal em plantas (BABICH et al., 1997).

Esse tipo de teste tem sido muito utilizado em estudos referentes aos efeitos de extratos vegetais, visando a detecção da citogenotoxicidade (DO CARMO et al., 2020; BISPO et al., 2021; NEVES et al., 2022). Além disso, também tem importância no monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos, uma vez que as células meristemáticas de raízes de plantas são indicadores apropriados para detectar efeitos clastogênicos causados por poluentes ambientais (MA et al., 1995).

O teste é capaz de indicar a presença de substâncias tóxicas, citotóxicas e até mutagênicas que podem colocar em risco a sobrevivência dos organismos (FERREIRA et al., 2012). Dessa forma, é um dos bioensaios mais utilizados para avaliação de danos em cromossomos, formação do fuso mitótico, detecção de micronúcleos e variações no percentual de células em divisão (OLIVEIRA et al., 2012; XAVIER et al., 2011; LEME & MARIN-MORALES, 2008).

2.4 Diversidade genética e estrutura populacional

O estudo da diversidade genética em populações naturais inclui a descrição dos níveis de variação genética mantida dentro das populações, assim como a forma em que a variação genética é dividida entre as populações (LOVELESS & HAMRICK, 1987). A variação genética é um fator primordial para que ocorra a adaptação, evolução e sobrevivência de espécies arbóreas.

A medida da diversidade genética intrapopulacional está relacionada com a capacidade das populações de se adaptarem às alterações ambientais, pois refere-se ao número total de alelos existentes na população, ou seja, riqueza alélica ali presente, principal parâmetro utilizado na determinação de áreas prioritárias para conservação (PETIT et al., 1998). O conhecimento da diversidade e estrutura genética espacial são importantes para o manejo dos recursos genéticos vegetais (SOUZA et al., 2007).

A estrutura genética evidencia a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações (HAMRICK, 1982). A estrutura populacional de uma espécie é formada por um conjunto de características genéticas e demográficas, resultado da ação e das interações de uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos (MARTINS, 1987). Entre esses mecanismos está a dispersão de sementes, competição inter e intraespecífica e a heterogeneidade do ambiente, que podem afetar os padrões de distribuição espacial dos indivíduos dentro de uma população (LOVELESS & HAMRICK, 1984). A análise da estrutura genética é utilizada para estimar as diferenças ou relações entre as populações e, inferir os fatores evolutivos como fluxo gênico, migração, mutação ou deriva genética (VINSON et al., 2018).

O fluxo gênico é a mudança evolutiva na frequência dos alelos causada pelo movimento de gametas entre populações de uma mesma espécie, sendo considerado um dos principais fatores evolutivos estimados para estudos que visem a conservação de espécies, por promover a evolução, espalhando novos genes e combinações gênicas entre populações de uma determinada espécie (SLATKIN, 1985; 1987). A interrupção das trocas genéticas entre as populações, seja por fatores naturais ou antrópicos, permite um acúmulo de diferenças genéticas ao longo do tempo nessas populações (SLATKIN, 1985). Nas plantas devido à mobilidade limitada, o fluxo gênico pode ocorrer através da dispersão de sementes ou através da dispersão de polens, onde o sucesso migratório dos agentes de dispersão de polens e sementes determinam o nível de fluxo gênico existentes entre as populações (ENNOS, 1994).

A estimativa de parâmetros de diversidade e da estrutura genética de populações pode ser realizada por meio de marcadores moleculares, ferramentas importantes que auxiliam no subsídio de projetos de conservação (GOIS et al., 2018).

2.5 Marcadores moleculares SSR

Em 1980 surgiram os marcadores moleculares que tiveram destaque por serem fenotipicamente neutros, aplicáveis a qualquer material vegetal em diferentes estágios de desenvolvimento, permitindo obter um número quase ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma (FALEIRO, 2007; GUIMARÃES et al., 2009). Um marcador molecular pode ser definido como sendo qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares possuem importantes aplicações no que diz respeito a conservação de espécies, pois possibilitam acessar a variabilidade genética, analisar os sistemas de cruzamento e estimar o fluxo gênico (KALIA et al., 2011). Dentre os vários tipos de marcadores moleculares existentes, destacam-se os Microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), que são sequências simples repetidas em tandem, com um a seis nucleotídeos, estando presentes no genoma de eucariotos e procariotos (LI et al., 2002).

Os SSRs são utilizados para estudos sobre a diversidade de populações naturais e de espécies cultivadas, além disso, também são aplicados para construção de mapas genéticos (GUPTA & VARSHNEY, 2000; ALMEIDA et al., 2009; BARROSO et al., 2010). Para a obtenção de marcadores SSR é preciso desenvolver primers específicos para espécie em estudo, por meio da construção de bibliotecas genômicas, seleção e sequenciamento dos clones positivos e desenho dos primers. Em espécies geneticamente relacionadas, esses primers podem ser usados para obter os marcados microssatélites (FALEIRO et al., 2003; FALEIRO, 2007).

Os microssatélites são muito utilizados para a detecção de polimorfismo entre as sequências de DNA, demonstrando assim a diversidade genética, onde se destacam em estudos com espécies de plantas de indivíduos heterozigotos e diploides, por possuírem caráter codominante, ou seja, em eletroforese quando disponível, permite a visualização de ambos os alelos (LITT & LUTY, 1989; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; GRATTAPAGLIA, 2007).

Além da capacidade de gerar altos níveis de polimorfismo, os microssatélites ainda possuem como vantagens, alta reprodutibilidade, simplicidade na análise técnica (PCR), pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo, grande poder de resolução e ainda são transferíveis entre as gerações (OLIVEIRA et al., 2006; GRATTAPAGLIA, 2007).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDON, M. M.; SILVA, J. S. V.; GALDINO, S.; VIEIRA, L. M. Alterações na cobertura vegetal causadas por inundação do Rio Taquari, Pantanal, Brasil. In: **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**. Foz do Iguaçu: INPE, 2001. p.1481-1489.
- ADAMOLI, J. Zoneamento ecológico do Pantanal baseado no regime de inundações. **Encontro sobre sensoriamento remoto aplicado a estudos no pantanal**, v. 1, n. 1995, p. 15-17.
- ALHO, C. J. R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 4, p. 957-966, 2008.
- ALHO, C. J. R.; CAMARGO, G. B.; FISCHER, E. C. Terrestrial and aquatic mammals of the Pantanal. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, p. 297-310, 2011.
- ALHO, C. J. R.; GONÇALVES, H. C. **Biodiversidade do Pantanal: Ecologia e Conservação**. 1ed. Campo Grande: Editora UNIDERP, 2005. 144p.
- ALHO, C. J. R.; SABINO, J. Seasonal Pantanal flood pluse: Implications for biodiversity conservation – A review. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 958-978, 2012.
- ALHO, C. J. R.; SILVA, J. S. V. Effects of severe floods and droughts on wildlife of the Pantanal wetland (Brazil) - A review. **Animals**, Basel, v. 2, n. 4, p. 591-610, 2012.
- ALMEIDA, V. C. D.; HOFFMANN, L. V.; YOKOMIZO, G. K. I.; COSTA, J. N. D.; GIBAND, M.; BARROSO, P. A. V. *In situ* and genetic characterization of *Gossypium barbadense* L. from the States of Para and Amapa, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.7, p. 719-25, 2009.
- BABICH, H.; SEGAL, M. A.; FOX, K. D. The *Allium* test - a simple, eukaryote genotoxicity assay. **American Biology Teacher**, vol.59, n.9, p.580–583, 1997. DOI: 10.2307/4450386.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.3, p. 444-447, 2007.
- BARROSO, P. A. V.; HOFFMANN, L. V.; DE FREITAS, R. B.; DE ARAÚJO BATISTA, C. E.; ALVES, M. F.; SILVA, U. C.; DE ANDRADE, F. P. *In situ* conservation and genetic diversity of three populations of *Gossypium mustelinum* Miers (ex Watt). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 57, n.3, p.343- 9, 2010.
- BISPO, R. B.; CARDOSO, E. D. S.; SANDER, N. L.; ARRUDA, J. C.; RODRIGUES, A. S. Citogenotoxicidade de extratos aquosos de *Erythrina fusca* Lour. sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 10, p. 99270-99285, 2021.

BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, p. 957-964, 2011.

BUFFON, M. C. M.; LIMA, M. L. C.; GALARDA, I.; COGO, L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoaria* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “*in vitro*”. **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n.1, p. 31-38, 2001.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1a ed. Visconde do Rio Branco-MG: Suprema, 2011. 620 p.

DAMASCENO JUNIOR, G. A.; POTT, A.; SILVA, J. S. V. Florestas Estacionais no Pantanal: considerações florísticas e subsídios para conservação. **Geografia**, Rio Claro, v. 34, n. especial, p. 697-707, 2009.

DO CARMO, L. R.; LEAL, L. S.; RIBEIRO, L. R. *Allium cepa* e teste do Micronúcleo como bioindicadores de citogenotoxicidade em extratos aquosos de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 82419-82430, 2020.

ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, London, v. 72, p. 250-259, 1994.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 21-22, 2007.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microsatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotropica**, Itabuna, v. 15, p. 41-46, 2003.

FERREIRA, C. F.; FRUEH, A. B.; DUSMAN, E.; HECK, M. C.; VICENTINI, E. P. Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinga (Mandaguari-PR), em *Allium cepa* L. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, p. 46-54, 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília-DF, EMBRAPA-CENARGEN, p. 55-62, 1998.

FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Revista Infarma**, v. 16, n. 7/8, p. 51-54, 2004.

GBIF - Global Biodiversity Information Facility. *Vochysia divergens* Pohl. 2022. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/4030794>. Acesso em: 06 dez. 2022.

GOIS, I. B.; FERREIRA, R. A.; SILVA-MANN, R. Variabilidade genética em populações naturais de *Cassia grandis* L. f. **Floresta e Ambiente**, v. 25, 2018.

GONÇALVES, H. C.; MERCANTE, M. A.; SANTOS, E. T. Hydrological cycle. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, p. 241-253, 2011.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. **Biotecnologia Florestal**, p. 177- 200, 2007.

GUARIM NETO, G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v.17, p. 71-89, 2006.

GUIMARÃES, C. T.; DE MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, p. 24-33, 2009.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v. 113, n. 3, p. 163-85, 2000.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.

JESUS, N. Z. T.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M. S.; ESPINOSA, M. M.; MARTINS, T. O. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 1A, p.130-139, 2009.

JUNK, W. J.; BAYLEY, P. B.; SPARKS, R. E. The flood pulse concept in riverfoodplain systems. In: DODGE, D. P. **Proceedings of the International Large River Symposium**. Ottawa: Canadian Journal of Fishers and Aquatic, 1989. p. 110-127.

JUNK, W. J.; DA SILVA, C. J. O conceito do pulso de inundação e suas implicações para o Pantanal de Mato Grosso. In: **II Simpósio sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal**. Embrapa, 2000. p. 17-28.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S. Singh R and Dhawan AK Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, p. 309-334, 2011.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

LITT, M.; LUTY, L. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 398-401, 1989.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas arbóreas do Brasil**. 2a edição. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Distribucion de la variacion en espécies de arboles tropicales. **Revista Biologia Tropicales**, v. 35, n. 1, p. 165-175, 1987.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual review of ecology and systematics**, v. 15, n. 1, p. 65-95, 1984.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação "*in situ*". ESALQ-USP, **Departamento de Genética**, Piracicaba –SP, n.35, p.71-78, 1987.

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBEN, A. M.; Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 281-289, 2005.

NASCIMENTO, M. M; SANTIAGO, L. S.; CUNHA, N. O. Biodiversidade e Fragilidades das Paisagens do Pantanal. **I Simpósio Brasileiro de Biogeografia**, 16 a 18 de outubro 2020. ISBN 978-65-86753-06-6

NEVES, L. P.; LEITE, D. M.; FARIAS, C. B. M.; KARSBURG, I. V. Evaluation of the cell cycle behavior of *Allium cepa* L. using the cytotoxic, genotoxic and antiproliferative potential of infusions of the dried leaves of four species of the genus *Inga* Mill (Fabaceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 2033-2048, 2022.

NUNES DA CUNHA, C.; JUNK, W. J. Year-to-year changes in water level drive the invasion of *Vochysia divergens* in Pantanal grasslands. **Applied Vegetation Science**, v. 7, n. 1, p. 103-110, 2004.

NUNES DA CUNHA, C; JUNK, W. J.; FALESSA, O.; COSTA, C. P.; ALMEIDA, L. Influences of Dry and Flooding Periods on Phenology and the Dynamic of Seedlings and Saplings of *Vochysia divergens* Pohl, in the Panatanal of Poconé. In: **Neotropical Ecosystems. Proceedings of the German-Brazilian Workshop, Hamburg 2000**. GKSS-Forschungszentrum, 2002. p. 881-874.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, J. P. W.; SANTOS, R. N.; CRISTIANE, C. P.; JANE, M. B. Genotoxicity and Physical Chemistry Analysis of waters from Sinos River (RS) using *Allium cepa*

and *Eichhornia crassipes* bioindicators. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2012.

PARANHOS FILHO, A. C.; MOREIRA, E. S.; OLIVEIRA, A. K. M.; PAGOTTO, T. C. S.; MIOTO, C. L. Análise da variação da cobertura do solo no Pantanal de 2003 a 2010 através de sensoriamento remoto. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 19, n. especial, p. 69-76, 2014.

PASTORI, T.; KUHN, A. W.; TEDESCO, M.; HOFFMANN, C. E.; NEVES, L. A. S.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Genotoxic and antiproliferative action of *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 186-194, 2015.

PETIT, R. J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, A. O. Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, Gainesville, v.12, n.4, p. 844-855, 1998.

POTT, A.; OLIVEIRA, A. K. M.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A.; SILVA, J. S. V. Plant diversity of the Pantanal wetland. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, p. 265-273, 2011.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 320 p.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 546p.

SABINO, J. Pantanal e seus encantos. In: HANNIBAL, W.; DUARTE, L. A.; SANTOS, C. C. (Orgs.). Mamíferos não voadores do Pantanal e entorno. Campo Grande: **Natureza em Foco**, 2015. p. 14-33.

SCREMIN-DIAS, E.; LORENZ-LEMKE, A. P.; OLIVEIRA, A. K. M. The floristic heterogeneity of the Pantanal and the occurrence of species with different adaptive strategies to water stress. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 275-282, 2011.

SILVA, J. D. S. V.; ABDON, M. M. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária**, v.33, Número Especial, p. 1703-1711, 1998.

SLATKIN, M. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. **Science**, Washington D. C., v. 236, 1987.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.

SOUZA, A. M.; CARVALHO, D.; ALMEIDA VIEIRA, F.; NASCIMENTO, L. H.; LIMA, D. C. Estrutura genética e espacial de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb. em mata de galeria. **Cerne**, v. 13, n. 3, p. 239-247, 2007.

SOUZA, C. A.; LANI, J. L.; SOUSA, J. B. Origem e evolução do Pantanal mato-grossense. **Simpósio Nacional de Geomorfologia**, p. 1-11, 2006.

VINSON, C. C.; MANGARAVITE, E.; SEBBENN, A. M.; LANDER, T. A. Using molecular markers to investigate genetic diversity, mating system and gene flow of Neotropical trees. **Brazilian Journal of Botany**, n. 41, p. 481–496, 2018.

Vochysiaceae in **Flora e Funga do Brasil** (espécie). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB33324>>. Acesso em: 31 jan. 2023.

Vochysiaceae in **Flora e Funga do Brasil** (família). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB250>>. Acesso em: 31 jan. 2023.

Vochysiaceae in **Flora e Funga do Brasil** (gênero). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB15296>>. Acesso em: 31 jan. 2023.

XAVIER, B. O.; PASSOS, L.; OLIVEIRA, R. C.; MIELLI, A. C. Avaliação do efeito genotóxico de diferentes tipos de solos para biomonitoramento com *Tradescantia pallida*. **Genética na Escola**, v. 6, n. 1, p. 42-45, 2011.

ZORTÉA, K. E. M. **Aspectos Reprodutivos, Caracterização Molecular e Relações Filogeográficas em Populações de Cambará (*Vochysia Divergens* Pohl.) Nativas dos Biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal, Brasil**. 2022. 140 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, 2022.

4. CAPÍTULOS

4.1 CAPÍTULO I

CITOGENOTOXICIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DA CASCA DE *Vochysia divergens* POHL (VOCHYSIACEAE)

RESUMO

O uso de plantas medicinais faz parte da medicina popular e dentre as diversas plantas medicinais utilizadas como fitoterápico, encontra-se a *Vochysia divergens* Pohl, conhecida popularmente como cambará, usada por populares para o tratamento de infecções, asma e distúrbios digestivos. Apesar de ser uma espécie muito utilizada pela população pantaneira, não há estudos sobre sua citogenotoxicidade que comprovem a segurança de seu uso. Nesse sentido, este trabalho objetivou avaliar o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico de extratos aquosos infuso e decocto da casca de *V. divergens*, por meio do teste *Allium cepa*. A avaliação foi realizada a partir de dois tipos de extratos aquosos, infuso e decocto, com cinco concentrações distintas ($12,5 \text{ mg ml}^{-1}$, 25 mg ml^{-1} , 50 mg ml^{-1} , 100 mg ml^{-1} e 200 mg ml^{-1}) e dois controles, sendo a água destilada o controle negativo e o sulfato de cobre penta-hidratado o controle positivo. Foram avaliados o crescimento do sistema radicular (CSR), o índice mitótico (IM) e a frequência de alterações cromossômicas e/ou anormalidades nas fases da divisão celular. Os dois extratos aquosos avaliados apresentam potencial tóxico, citotóxico e genotóxico sobre as células do meristema apical de *Allium cepa*, com exceção da concentração de 200 mg ml^{-1} do extrato tipo infuso, a qual não apresentou aumento ou inibição do índice mitótico. O extrato aquoso do tipo infuso foi o que causou menos alterações na divisão celular, sendo o mais recomendado para utilização como fitoterápico, pois apresenta um menor risco à saúde.

Palavras-Chave: Cambará; Plantas medicinais; Fitoterapia.

CYTOGENOTOXICITY OF AQUEOUS EXTRACTS FROM THE BARK OF *Vochysia divergens* POHL (VOCHYSIACEAE)

ABSTRACT

The use of medicinal plants is part of popular medicine and among the various medicinal plants used as herbal medicine, there is *Vochysia divergens* Pohl, popularly known as cambará, used by people to treat infections, asthma and digestive disorders. Despite being a species widely used by the Pantanal population, there are no studies on its cytogenotoxicity that prove the safety of its use. In this sense, this work aimed to evaluate the toxic, cytotoxic and genotoxic potential of infused and decocted aqueous extracts of *V. divergens* bark, using the *Allium cepa* test. The evaluation was carried out from two types of aqueous extracts, infused and decocted, with five different concentrations (12.5 mg ml^{-1} , 25 mg ml^{-1} , 50 mg ml^{-1} , 100 mg ml^{-1} and 200 mg ml^{-1}) and two controls, distilled water being the negative control and copper sulphate pentahydrate the positive control. Root system growth (CSR), mitotic index (MI), and frequency of chromosomal alterations and/or abnormalities in cell division phases were evaluated. The two aqueous extracts evaluated showed toxic, cytotoxic and genotoxic potential on the cells of the apical meristem of *Allium cepa*, with the exception of the concentration of 200 mg ml^{-1} of the infused extract, which did not show an increase or inhibition of the mitotic index. The aqueous extract of the infused type was the one that caused the least alterations in cell division, being the most recommended for use as a herbal medicine, as it presents a lower risk to health.

Keywords: Cambará; Medicinal plants; Phytotherapy.

1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia e o uso de plantas medicinais fazem parte da medicina popular compondo um conjunto de saberes advindo de seus usuários e praticantes (BRUNING et al. 2012). O uso de plantas para fins medicinais é uma prática muito antiga, em que para muitas comunidades simboliza o único meio terapêutico utilizado para tratar diversas enfermidades (VIANA & RAMOS, 2019).

O uso de espécies vegetais para a prevenção e tratamento de doenças vem sendo transmitido ao longo das gerações, onde o preparo tradicional é repassado com base apenas em seus efeitos benéficos, sem o conhecimento de propriedades, constituições e composição química presentes nessas plantas medicinais, que podem causar efeitos adversos (SOUZA et al., 2020; PEDROSO & PIRES, 2021). Fazendo-se necessário estudos que validem esses saberes tradicionais disseminados pela cultura popular, avaliando os riscos e benefícios para que seja realizada a utilização adequada (PEDROSO & PIRES, 2021).

Dentre as diversas plantas medicinais utilizadas como fitoterápico encontra-se a *Vochysia divergens* Pohl, conhecida popularmente como cambará, usada na medicina popular para o tratamento de infecções, asma e distúrbios digestivos. O chá de suas folhas é preparado contra asma e gripe, e o chá da casca é utilizado no tratamento de úlceras e como anti-inflamatório. Da casca também pode ser feito um xarope para o tratamento de apendicites (GUARIM NETO et al, 2006; JESUS et al., 2009).

O uso de chás é amplamente utilizado para fins medicinais, com isso, vem aumentando o número de pesquisas que assegurem essas formas de tratamento, visando avaliar os possíveis riscos e efeitos que essas plantas podem causar ao DNA (CABARAVDIC, 2010).

O teste *Allium cepa* L. é um dos vários protocolos de estudos que existem para tal finalidade, pois permite avaliar os efeitos tóxicos e citotóxicos de extratos aquosos vegetais, através da redução do crescimento das raízes e da diminuição do índice mitótico, respectivamente (ALMEIDA et al., 2019), como também os efeitos genotóxicos, por meio da análise da presença de micronúcleos ou de anormalidades da anáfase-telófase (FISKESJÖ & LEVAN, 1994).

Esse teste é considerado como um bioindicador de possíveis efeitos de produtos químicos, extratos de plantas e misturas complexas sobre a atividade celular (HISTER et al., 2017), recomendado para avaliar níveis de mutagenicidade e toxicidade em plantas medicinais (BAGATINI et al., 2007). As plantas medicinais mesmo quando usadas sob a forma de extratos aquosos podem conter substâncias (mutagênicas ou tóxicas) que oferecem riscos à saúde (BOCHNER et al., 2012).

Desse modo, a utilização do teste *A. cepa* para estudos com plantas medicinais é vantajoso, pois possui baixo custo, facilidade de cultivo, alta sensibilidade e confiabilidade, além de poder ser correlacionado com outros testes, inclusive os realizados em mamíferos (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; LEME & MARIN-MORALES, 2009).

Considerando que o cambará é muito utilizado pela população pantaneira para fins medicinais e que há necessidade de mais estudos que comprovem a sua segurança, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico de extratos aquosos (infuso e decocto) da casca de *V. divergens*, por meio do teste *Allium cepa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de Coleta

Foram coletadas cascas do caule de indivíduos adultos de *V. divergens* na Baía do Malheiros, localizada no município de Cáceres-MT (Figura 1). As mesmas foram secas em temperatura ambiente e levadas ao Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular (GenBioMol) da UNEMAT, Campus Universitário de Alta Floresta, para a realização do teste *A. cepa*.

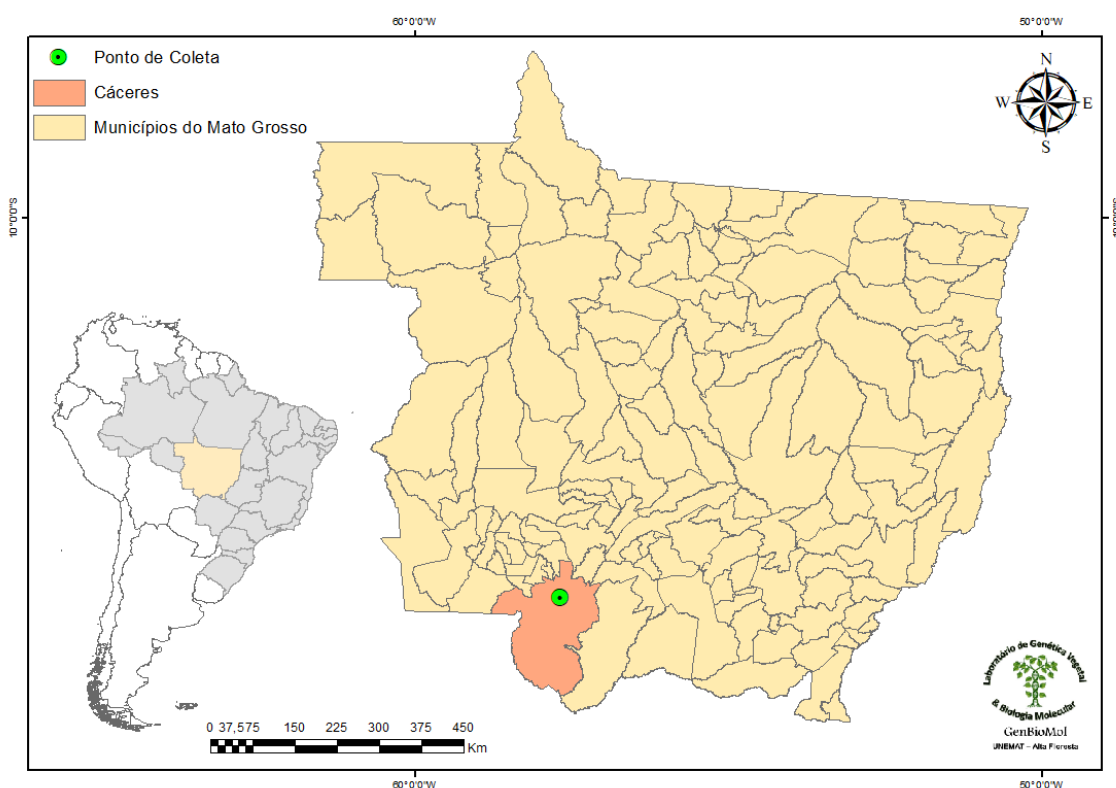


Figura 1. Localização geográfica da coleta das cascas de *V. divergens* na Baía do Malheiros, no município de Cáceres, Mato Grosso, Brasil. Fonte: a autora.

2.2 Extratos Aquosos

Foram preparados dois tipos de extratos aquosos (infuso e decocto) com as cascas de *V. divergens*, seguindo as orientações da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 26/2014 (BRASIL, 2014). As cascas foram pesadas em balança de precisão (Figura 2A) e utilizadas para preparo dos extratos aquosos do tipo infuso (EAI) e decocto (EAD) (Figura 2B). Para cada um dos extratos foram avaliadas cinco concentrações (12,5 mg ml⁻¹, 25 mg ml⁻¹, 50 mg ml⁻¹, 100 mg ml⁻¹ e 200 mg ml⁻¹),

sendo que para obtenção do extrato de maior concentração foram utilizados, 1.500 ml de água destilada e 300 g de casca do caule de *V. divergens*. As demais concentrações foram obtidas a partir da diluição do extrato mais concentrado.

O extrato do tipo infuso foi obtido por meio do aquecimento da água até o ponto de fervura (100 °C), sendo a mesma vertida sobre o material vegetal (casca do caule). O recipiente foi fechado e deixado em repouso por 10 minutos e, logo após, filtrado e diluído para obtenção das cinco concentrações.

Para o extrato do tipo decocto o material vegetal (casca do caule) foi colocado em um recipiente juntamente com a água e levado à fervura por cinco minutos, contados após o início da fervura. Ao atingir a temperatura ambiente, o extrato foi filtrado e diluído nas concentrações a serem avaliadas.

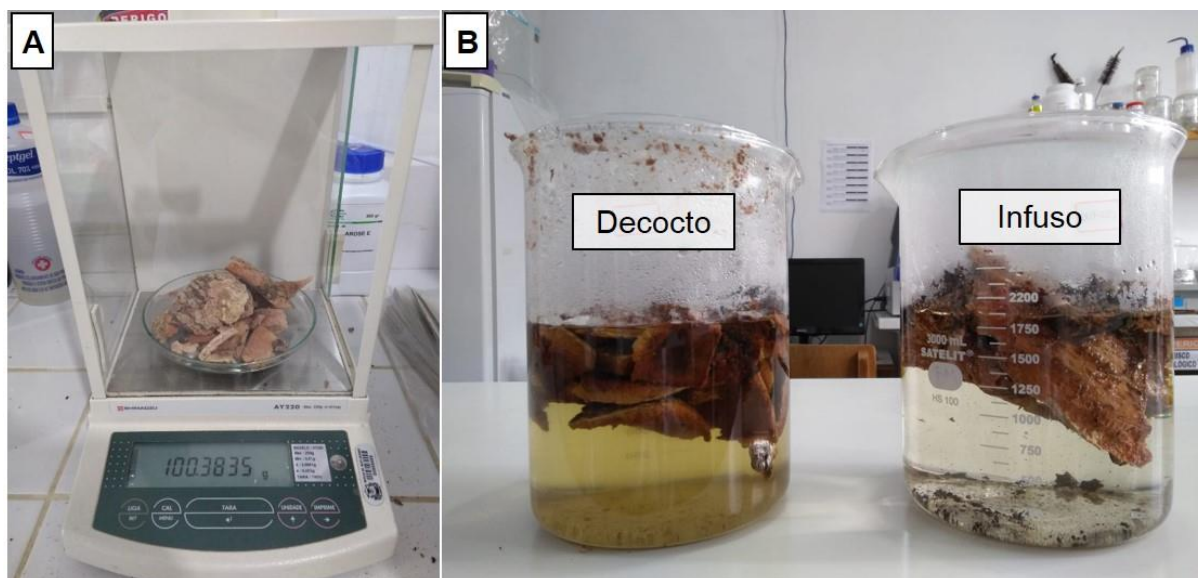


Figura 2. Preparo dos extratos aquosos. (A) Cascas de *Vochysia divergens* pesadas na balança de precisão, (B) Preparo dos extratos aquosos do tipo decocto e infuso.

2.3 Teste *Allium cepa* L.

O teste *A. cepa* foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Fiskesjö (1985) e Babich et al. (1997), onde os catáfilos e raízes secas foram retiradas cuidadosamente dos bulbos, sendo estes previamente colocados em água destilada para emissão de raízes e 48h depois, transferidos para os extratos aquosos a serem testados (Figura 3).

Os bulbos de *A. cepa*, foram submetidos a cinco concentrações de EAI e EAD obtidos da casca *V. divergens*, sendo que a água destilada, considerada como concentração 0 mg ml⁻¹ foi utilizada como controle negativo (CN) e o sulfato de cobre

penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) na concentração de $0,64 \text{ mg ml}^{-1}$, como controle positivo (CP). Para a obtenção do CP, foi preparada uma solução de 100 mg L^{-1} de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, conforme Palácio et al. (2013), sendo que a partir desta solução foi realizada a diluição para a concentração de $0,64 \text{ mg ml}^{-1}$ (FERREIRA et al., 2022; SANTOS et al., 2021). O sulfato de cobre pentahidratado, utilizado como CP é um composto químico tóxico que causa danos na estrutura celular, citado na literatura em bioensaios de citogenotoxicidade e mutagenicidade utilizando *Allium cepa* (CARDOSO et al., 2022; SOARES et al., 2022; MESSIAS et al., 2021).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e os bulbos organizados em um esquema $2 \times 5 + 2$, sendo dois tipos de extrato (EAI, EAD), cinco concentrações e dois tratamentos controle (CN e CP) com 10 repetições cada. Os bulbos foram mantidos em câmara de germinação do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand), onde permaneceram em temperatura controlada ($25^\circ\text{C} \pm 2$) e na ausência de luz por 48 horas, conforme metodologia proposta por Babich et al. (1997). Após esse período, os bulbos foram retirados da câmara de germinação para a realização das avaliações de citogenotoxicidade.



Figura 3. Preparo do Bioensaio pelo método descontínuo. (A) Retirada das escamas externas dos bulbos da cebola, (B) Enraizamento dos bulbos em água destilada, (C) Bulbos transferidos para os extratos aquosos e alocados em câmara de germinação.

2.4 Avaliação do potencial tóxico, citotóxico e genotóxico

Para avaliação do potencial tóxico foram mensurados o crescimento do sistema radicular (CSR) com auxílio do paquímetro digital (Mitutoyo). Para esta

avaliação foram selecionadas, ao acaso, 20 raízes de cada concentração dos EAI, EAD, CN e CP totalizando 100 raízes de cada extrato e 20 de cada controle.

O potencial citotóxico foi obtido por meio do Índice Mitótico (IM) e o potencial genotóxico foi avaliado a partir da verificação da presença e da frequência de alterações cromossômicas e/ou anormalidades nas fases da divisão celular.

Para análise do potencial citotóxico e genotóxico foram coletadas raízes dos bulbos de *A. cepa* de cada concentração de ambos os extratos. O material foi colocado em solução fixadora (3:1, etanol: ácido acético (v/v)) por 24 horas, em temperatura ambiente, sendo então transferidas para etanol 70% e mantidas sob refrigeração (± 4 °C) até o preparo das lâminas.

O IM foi obtido através da equação “A” proposta por Pires et al. (2001), já a frequência de alteração cromossômica $f(A)$ foi calculada através da equação “B”, enquanto o índice de alteração cromossômica (IA) foi obtido por meio da equação “C”:

$$A) \text{ IM} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em mitose}}{\text{n}^\circ \text{ de células observadas}} \times 100$$

$$B) f(A) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com alterações}}{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}} \times 100$$

$$C) \text{ IA} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com alterações}}{\text{total de células observadas}} \times 100$$

2.5 Preparo das lâminas e contagem das células

Para o preparo das lâminas foi utilizada a metodologia proposta por Souza et al. (2005), as radículas foram lavadas em água destilada por cinco minutos, hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N por 15 minutos e novamente lavadas em água destilada por cinco minutos (Figura 4A). Para o preparo das lâminas foi utilizado o meristema apical de uma a três raízes, sendo este corado com, aproximadamente, 100 μL deorceína acética 2%. Com auxílio de um bastão de vidro o meristema foi levemente pressionado e, posteriormente, coberto com lamínula (Figura 4B).

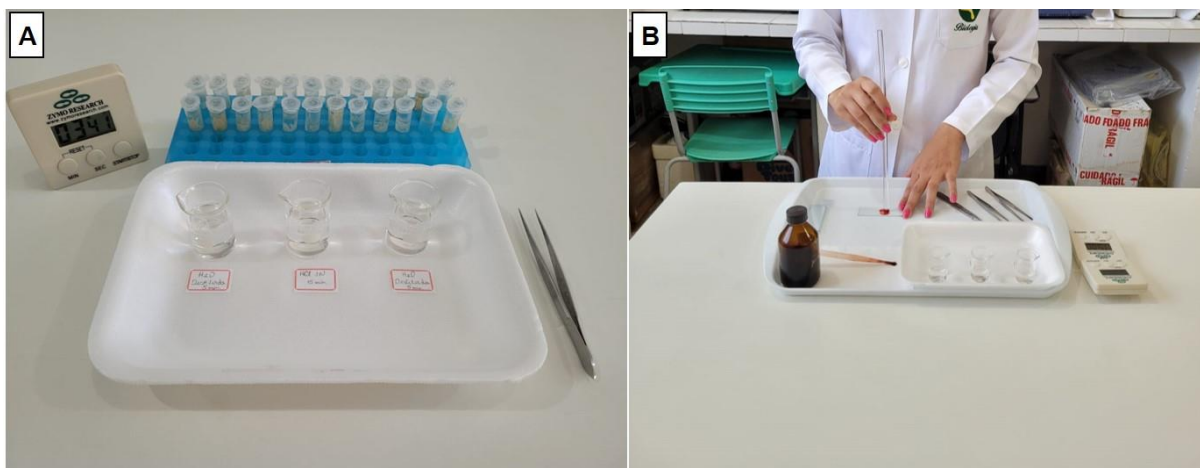


Figura 4. (A) Lavagem das raízes em água destilada e ácido clorídrico, (B) Preparo das lâminas a partir da técnica de esmagamento.

Foram preparadas oito lâminas por concentração de cada um dos extratos avaliados, assim como do CN e do CP. Foram analisadas 250 células por lâmina, totalizando 2.000 células para cada tratamento e 10.000 células por extrato. As lâminas foram observadas em microscópio óptico (BIOVAL), em magnitude de 400x, pelo método de varredura, sendo registrado para cada lâmina o número de células em cada fase do ciclo celular (intérfase, prófase, metáfase, anáfase, telófase), bem como, quando presentes as alterações em cada uma delas. O registro fotográfico foi realizado utilizando uma câmera digital CMOS (1.3 MP), colorida, acoplada ao microscópio e para captura e edição de imagem utilizou-se o software TSview.

2.6 Análise dos dados

Foram realizados o teste de Shapiro-Wilk e de Levene, afim de verificar a normalidade e homogeneidade dos dados, respectivamente. Os dados do comprimento da raiz foram transformados em $\sqrt{}$ (raiz quadrada). Em seguida, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias significativas foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para os dados com interação foram montados gráficos usando software Excel. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa R (RStudio, 2021).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito tóxico dos extratos aquosos de *V. divergens*

A análise de variância (ANOVA) revelou uma interação significativa entre as concentrações e os extratos aquosos da casca do caule de *V. divergens* sobre o crescimento do sistema radicular (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância (ANOVA) para o efeito dos extratos de *Vochysia divergens* e suas concentrações sobre o comprimento da raiz de *Allium cepa*

Fonte de Variação	GL	QMR
Extrato	5	20,72**
Concentração	1	6,03**
Extrato x Concentração	5	3,61**
Média	-	3,99

GL: Grau de liberdade, QMR: Quadrado Médio do Resíduo, ** significativo a 1% de probabilidade. Desvio padrão 0,86.

Foi possível observar variações nos comprimentos das raízes de acordo com as concentrações dos extratos (Figura 5).

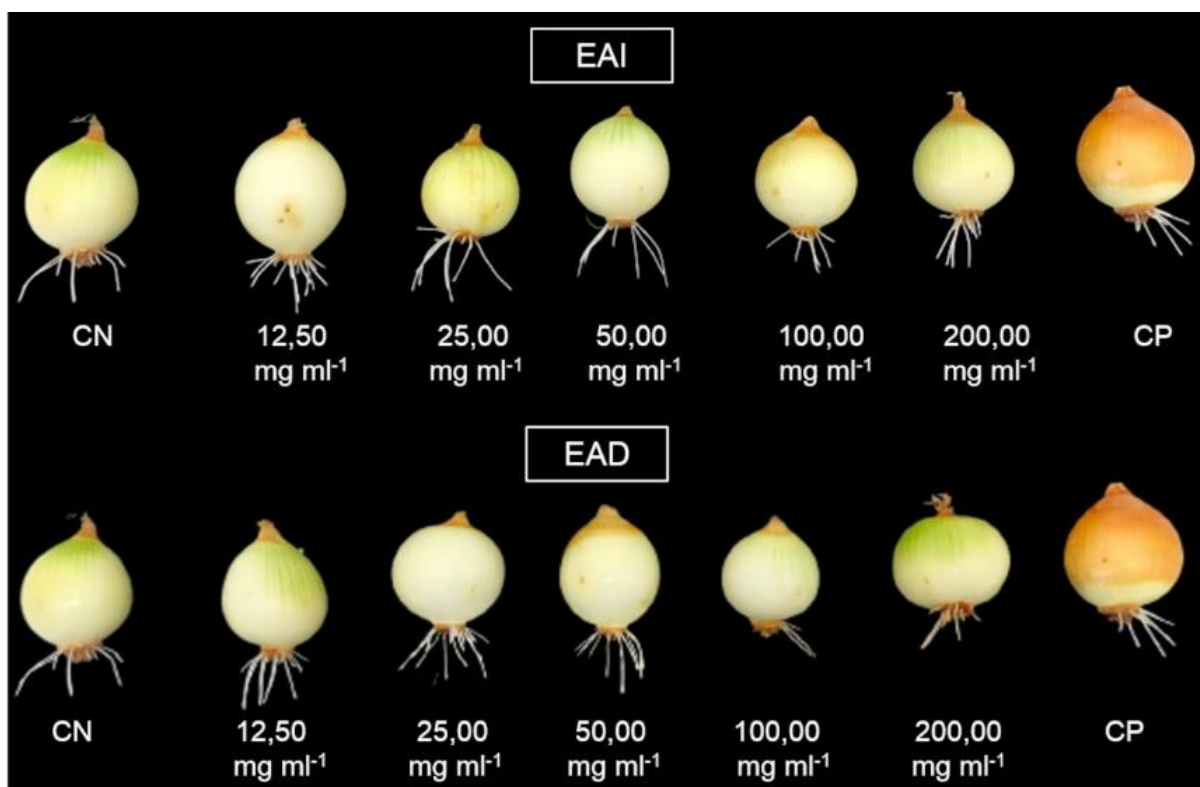


Figura 5. Comprimento das raízes dos bulbos de *Allium cepa* após exposição a diferentes concentrações (mg/ml) de extratos aquosos da casca do caule de *Vochysia divergens*. Extrato aquoso do tipo infuso (EAI) e extrato aquoso do tipo decocto (EAD). CN: controle negativo, água destilada (0 mg ml⁻¹) e CP: controle positivo, 0,64 mg ml⁻¹ de sulfato de cobre pentahidratado.

O comprimento médio da raiz em todas as concentrações do EAI se diferiu estatisticamente do CN, estimulando o CSR, já para o EAD as concentrações de 12,50; 25,00 e 50,00 mg ml⁻¹ estimularam o CSR, a concentração de 100,00 mg ml⁻¹ apresentou resposta similar ao CN e a concentração de 200,00 mg ml⁻¹ inibiu o CSR (Tabela 2). A maioria das concentrações testadas estimulou o CSR, para Bezerra et al. (2016) o crescimento do sistema radicular está ligado à intensa atividade mitótica que acontece no tecido meristemático.

Nesse estudo foi observado além do aumento e inibição do CSR, uma mudança de coloração nas pontas de algumas raízes, essas observações de acordo com Fiskesjö (1985) são parâmetros macroscópicos utilizados como indicativo de toxicidade em teste de *A. cepa*, constatando-se que as concentrações testadas apresentaram efeito tóxico em ambos os extratos testados com exceção da concentração de 100,00 mg ml⁻¹ do EAD.

Tabela 2. Teste de médias para o comprimento da raiz de *Allium cepa* submetidas a diferentes concentrações e extratos aquosos de *Vochysia divergens*

Concentração	Extrato	
	Infuso	Decocto
00,00 mg ml ⁻¹	11,69 bA	11,69 bcA
12,50 mg ml ⁻¹	21,24 aA	16,68 abB
25,00 mg ml ⁻¹	18,86 aA	18,22 aA
50,00 mg ml ⁻¹	21,21 aA	18,09 aA
100,00 mg ml ⁻¹	21,18 aA	12,20 bcB
200,00 mg ml ⁻¹	19,97 aA	8,94 cB

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. 0,00 mg ml⁻¹ = CN (controle negativo).

No gráfico de interação (Figura 6) é possível visualizar que as concentrações do EAI estimularam o CSR, enquanto as concentrações do EAD apresentaram respostas variadas. Na concentração de 200,00 mg ml⁻¹ houve um estímulo do CSR para EAI, enquanto que para o EAD houve uma inibição.

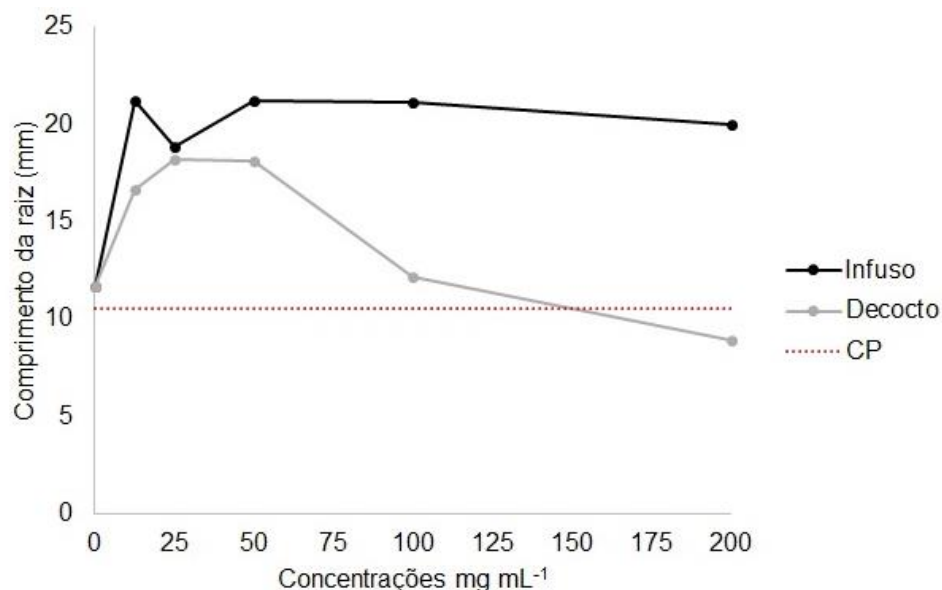


Figura 6. Gráfico de interação entre os extratos e concentrações para a variável crescimento do sistema radicular. CP: controle positivo.

3.2 Efeito citotóxico dos extratos aquosos de *V. divergens*

Para o IM, a Análise de Variância (ANOVA) revelou interação significativa entre as concentrações e os extratos aquosos da casca do caule de *V. divergens* (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância (ANOVA) para o efeito dos extratos de *Vochysia divergens* e suas concentrações sobre o índice mitótico de células meristemáticas de *Allium cepa*

Fonte de Variação	GL	QMR
Extrato	1	345,00**
Concentração	5	833,20**
Extrato x Concentração	5	77,6**
Média	-	28,72

GL: Grau de liberdade, QMR: Quadrado Médio do Resíduo, ** significativo a 1% de probabilidade. Desvio padrão 7,99.

Para o EAI todas as concentrações estimularam o IM, com exceção da de 200,00 mg ml⁻¹ que apresentou resposta similar ao CN, já para o EAD todas as concentrações estimularam o IM, com exceção da de 200,00 mg ml⁻¹ que inibiu o IM (Tabela 4). Segundo Smaka-Kinc (1996), a redução do IM é uma forma confiável de determinar a presença de substâncias citotóxicas. Por outro lado, o aumento do IM indica que houve uma indução da divisão celular, podendo ser considerada prejudicial às células, uma vez que pode levar ao aparecimento de tumores nos seres vivos (GRIPPA et al., 2010). O aumento ou diminuição do IM representa indícios de efeitos

citotóxicos, visto que, este é indicador de uma proliferação celular adequada (TEDESCO & LAUGHINGHOUSE, 2012; LEME & MARIN-MORALES, 2009).

Portanto, o aumento e a diminuição do IM observados no presente estudo, indicam potencial citotóxico dos extratos aquosos de *V. divergens* com exceção da concentração de 200,00 mg ml⁻¹ do EAI.

Tabela 4. Teste de médias para o índice mitótico (IM) das células meristemáticas de *Allium cepa* submetidos a diferentes concentrações e extratos aquosos de *Vochysia divergens*

Concentração	Extrato	
	Infuso	Decocto
00,00 mg ml ⁻¹	21,85 cA	21,85 cA
12,50 mg ml ⁻¹	36,85 aA	33,90 aA
25,00 mg ml ⁻¹	38,45 aA	28,10 bB
50,00 mg ml ⁻¹	35,85 abA	28,60 abB
100,00 mg ml ⁻¹	31,35 bA	32,75 abA
200,00 mg ml ⁻¹	19,35 cA	15,75 dA

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. 0,00 mg ml⁻¹ = CN (controle negativo).

No gráfico de interação (Figura 7) é possível visualizar um estímulo do IM em todas as concentrações de ambos extratos testados, com exceção da concentração de 200,00 mg ml⁻¹ que apresentou resposta similar ao CN para EAI e inibiu o IM no EAD.

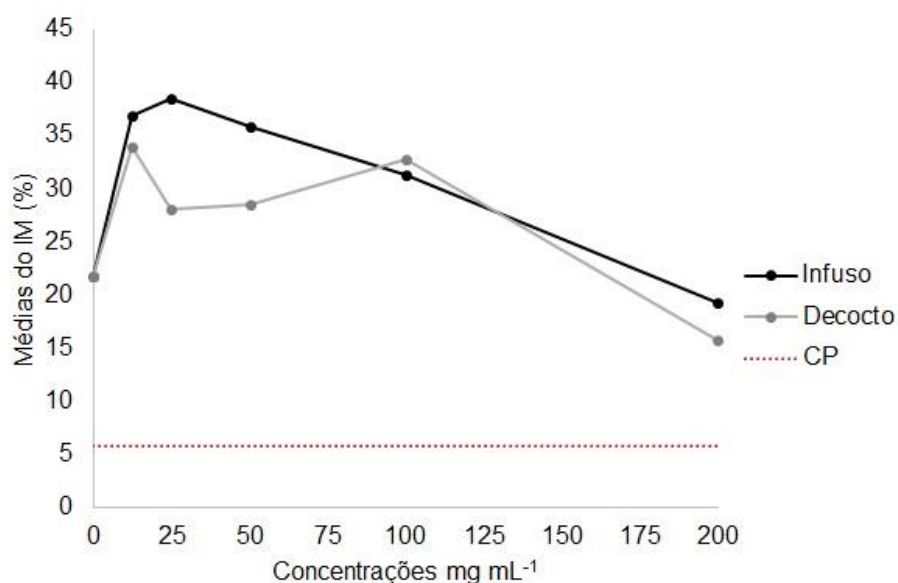


Figura 7. Gráfico de interação entre os extratos e concentrações para a variável índice mitótico. CP: controle positivo.

3.3 Efeito genotóxico dos extratos aquosos de *V. divergens*

As concentrações 12,50 mg ml⁻¹ do EAI e 100 mg ml⁻¹ do EAD apresentaram, respectivamente, 22,39% e 21,22% de alterações cromossômicas, ficando próximo ao percentual de alterações do CP (29,06%). Foram observadas alterações cromossômicas em todas as concentrações (Tabela 5) sendo que a metáfase irregular e anáfase com cromossomo isolado foram as alterações que apareceram com maior frequência nas concentrações testadas. As alterações podem ser visualizadas na figura 8.

Tabela 5. Alterações cromossômicas observadas durante a divisão celular de células de *Allium cepa* submetidas aos extratos aquosos de casca de *Vochysia divergens*

EAI								
Concentrações (mg ml⁻¹)	PI	MI	ACA	APC	TCA	TA	f(A)	IA
12,50	12	64	67	0	22	165	22,39%	8,25%
25,00	13	64	61	1	10	149	19,38%	7,45%
50,00	14	41	63	1	8	127	17,71%	6,35%
100,00	3	20	6	1	0	30	4,78%	1,50%
200,00	8	1	1	0	0	10	2,58%	0,50%
EAD								
12,50	0	28	43	0	4	75	11,06%	3,75%
25,00	0	46	44	1	22	113	20,11%	5,65%
50,00	1	55	51	0	9	116	20,28%	5,80%
100,00	5	65	56	0	13	139	21,22%	6,95%
200,00	0	6	12	0	0	18	5,71%	0,90%
CN	0	0	0	0	0	0	0,00%	0,00%
CP	1	15	8	1	9	34	29,06%	1,70%

EAI= Extrato Aquoso Infuso; EAD= Extrato Aquoso Decocto; CN= Controle Negativo; CP= Controle Positivo; PI= Prófase Irregular; MI= Metáfase irregular; ACA= Anáfase com Cromossomo Adiantado; APC= Anáfase com Ponte Cromossômica; TCA= Telófase com Cromossomo Adiantado; TA= Total de Células com Alteração; f(A)= Frequência de Alteração Cromossômica; IA= Índice de Alteração Cromossômica.

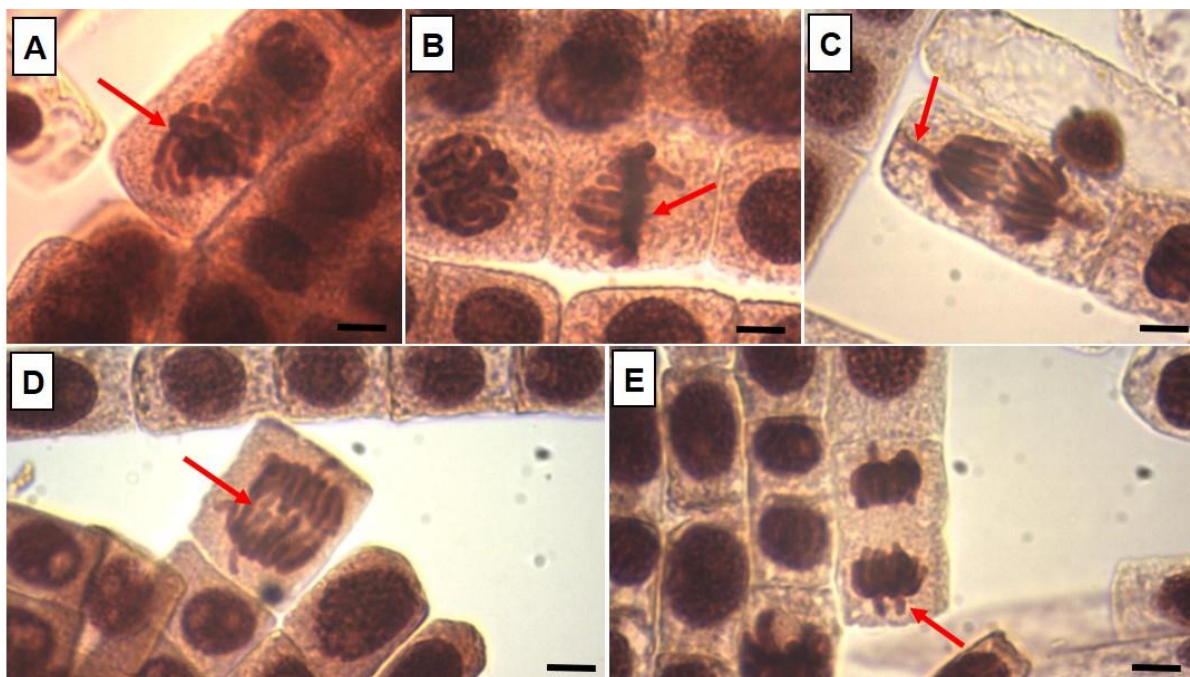


Figura 8. Alterações cromossômicas observadas durante a divisão celular das raízes de *Allium cepa*. (A) Prófase irregular, (B) Metáfase irregular, (C) Anáfase com cromossomo adiantado, (D) Anáfase com ponte cromossômica, (E) Telófase com cromossomo adiantado. Barra de 20 μ m.

Todas as concentrações testadas apresentaram potencial genotóxico com percentual de alterações cromossômicas que variaram de 2,28% a 22,39% (Tabela 5). Para Russel (2002) as alterações cromossômicas são caracterizadas por modificações na estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos, que podem ocorrer de forma espontânea ou por meio do resultado da exposição a agentes físicos ou químicos.

O EAD foi o que causou maior alteração celular, apesar de ser o método extrativo mais indicado para partes de drogas vegetais com consistência rígida, como a casca (BRASIL, 2014). Tal fato pode estar relacionado ao aumento gradativo da temperatura da água durante a decocção, favorecendo a extração de substâncias com diferentes polaridades (MANAHAN, 2012). Já o método extrativo infuso devido haver uma diminuição da temperatura inicial ao longo do tempo de infusão, acaba reduzindo a extração dos compostos presentes no material vegetal (RAMALHO et al., 2013).

Os resultados desse estudo revelaram um efeito citogenotóxico do extrato aquoso da casca de *V. divergens* sobre as raízes de *A. cepa*. Segundo Galindo et al. (2012), substâncias tóxicas podem não mostrar efeitos agudos nos organismos expostos, mas podem causar danos teciduais, danos genéticos em células somáticas e germinativas, acúmulo de contaminantes e neoplasias. Peron et al. (2009) indicam

que alterações na divisão celular e no material genético podem trazer consequências severas à saúde humana.

Portanto, extratos aquosos que apresentam potencial citogenotóxico a partir de bioensaios como o teste *A. cepa*, podem ser considerados indicativos de que o fator químico testado pode apresentar um risco à saúde (BELCAVELLO et al., 2012; CARVALHO et al., 2017).

Hess et al. (1995) ao estudarem a presença de compostos com atividades biológicas e farmacológicas com a casca do caule de *V. divergens*, descreveram três substâncias químicas, β -sitosterol, ácido betulínico e ácido serícico, sendo que este último foi o principal constituinte ativo isolado com ação antibacteriana. O β -sitosterol possui atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, angiogênico, antioxidante, imunomoduladora, antidiabética (AMBAVADE et al., 2014), antiúlcera (LING & JONES, 1995) e gastroprotetora (NAVARRETE et al., 2002). O ácido betulínico também apresenta atividades anticancerígena e anti-inflamatória (FULDA, 2009; POTZE et al., 2014), além de antiviral, antibacteriana, antimalárica e antitumoral (HSU et al., 2015). O fato dessas substâncias químicas apresentarem ação anti-inflamatória, pode explicar em partes, o uso popular dessa planta para o tratamento de doenças infecciosas.

O β -sitosterol apresenta baixa toxicidade (AMBAVADE et al., 2014) e o ácido betulínico possui citotoxicidade, sendo alta para células cancerígenas e baixa para células saudáveis (LUO et al., 2016; TIWARI et al., 2014; PISHA et al., 1995). Apesar do baixo potencial tóxico e citotóxico dessas substâncias químicas, estas podem ter contribuído de alguma maneira para os resultados obtidos no presente estudo. Se faz necessário novas pesquisas sobre a composição química da casca de *V. divergens*, a fim de verificar se há outras substâncias que possam apresentar um potencial tóxico, citotóxico ou genotóxico maior.

Apesar dos benefícios, as substâncias químicas presentes nesses metabólitos secundários, chamadas de princípios ativos, podem em determinadas quantidades apresentar efeitos tóxicos, ou seja, acabam causando danos ao organismo ao invés de benefícios (HISTER, 2021).

4. CONCLUSÕES

Os extratos aquosos do tipo infuso e decocto da casca do caule de *V. divergens* nas concentrações testadas, apresentaram efeito tóxico e citotóxico em células de *Allium cepa*, evidenciado pelo aumento/inibição do crescimento do sistema radicular e índice mitótico, respectivamente.

Todas as concentrações de ambos os extratos (infuso e decocto), apresentaram potencial genotóxico, comprovado pela presença de alterações cromossômicas. O EAI foi o que causou menos alterações na divisão celular, sendo o mais recomendado para utilização como fitoterápico, pois apresenta um menor risco a saúde.

Este resultado fornece dados básicos no que diz respeito a citogenotoxicidade de *V. divergens*, fazendo-se necessário um aprofundamento dos estudos com outros tipos de teste que verifiquem suas substâncias químicas com potencial tóxico e mutagênico, contribuindo dessa forma para tratamento seguro de enfermidades tratadas por meio da espécie através da medicina popular, bem como a produção de medicamentos pela indústria farmacêutica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. K. V.; NOVAIS, V. P. D.; SALVI, J. D. O.; MARSON, R. F. Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica/genotóxica de um extrato comercial de sangue do dragão (*Croton lecheri*). **Revista Fitos**, v. 13, n. 1, p. 29-37, 2019. DOI: 10.17648/2446-4775.2019.605.
- AMBAVADE, S. D.; MISAR, A. V.; AMBAVADE, P. D. Pharmacological, nutritional, and analytical aspects of β -sitosterol: a review. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 14, p. 193-211, 2014.
- BABICH, H.; SEGAL, M. A.; FOX, K.D. The *Allium* test - a simple, eukaryote genotoxicity assay. **American Biology Teacher**, vol. 59, n. 9, p. 580–583, 1997.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. D. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.
- BEZERRA, C. M.; DINELLY, C. M. N.; OLIVEIRA, M. A. S. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de Malva-Santa (*Plectranthus barbatus*-Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 13, n. 4, p. 220-228, 2016.
- BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; ASSIS, M. A.; AVELAR, K. E. S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.3, p.537-547, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada n. 26, 13 de maio de 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro de notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. Brasília-DF, maio 2014. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/>
- BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência Saúde Coletiva** [online]. vol.17, n.10, p.2675-2685, 2012.
- CABARAVDIC, M. Induction of Chromosome Aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of cells to Benzo(a) pyrene. **Medical Archives**, v. 64, n. 4, p. 215-218, 2010.
- CARDOSO, E. S.; ROSSI, A. A. B.; PETRI, E. C. M.; ZORTÉA, K. E. M.; FERREIRA, E. L.; MALTEZO, D. P. Potencial antimutagênico de extratos aquosos de gengibre. **Conjecturas**, v. 22, n. 9, p. 241-256, 2022.

CARVALHO, L. G.; BRITTO, F. F.; MARIN-MORALES, M. A.; MAFFEI, E. M. D. Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo. **Revista da Biologia**, v. 17, n. 1, p. 1–5, 2017.

FERREIRA, E. L.; CARDOSO, E. S.; ROVEDA, A. P.; PAIVA, G. A.; CORBULIN, T. S.; CORDEIRO, A. G. M.; SANTOS, L. L.; ROSSI, A. B. A. **Investigação dos efeitos citogenotóxicos de extratos aquosos de *Croton urucurana* Baill utilizando teste *Allium cepa***. Ciência em Foco: Volume VIII. Nova Xavantina, MT: Pantanal Editora, 2022. p. 30.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the First ten MEIC Chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, v. 21, p.139-149, 1994.

FULDA, S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. **Molecular nutrition & food research**, v. 53, n. 1, p. 140-146, 2009.

GALINDO, T.; SILVA, E.; ROSÁRIO, I. Indução de micronúcleos e toxicidade por efluente doméstico em duas populações de *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae) no Litoral de Salvador (BA), Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2012. <http://dx.doi.org/10.14210/bjast.v16n1.p1-7>

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

GRIPPA, G. A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTOET, S. T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, pág. 11-16, 2010.

GUARIM NETO, G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v.17, p. 71-89, 2006.

HESS, S. C.; BRUM, R. L.; HONDA, N. K.; CRUZ, A. B.; MORETTO, E.; CRUZ, R. B.; YUNES, R. A. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 47, n. 2, p. 97-100, 1995.

HISTER, C. A. L. **Produção da fitomassa, análise fitoquímica e potencial citogenotóxico de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2021.

HISTER, C. A. L.; PASQUALLI, M.; TRAPP, K. C.; STEFANELLO, R.; BOLIGON, A. A.; DE CAMPOS, M. M. A.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e determinação de compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (*Rubus* sp) pelo sistema teste *in vivo* de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 1, p. 43-48, 2017.

HSU, T. I.; CHEN, Y. J.; HUNG, C. Y.; WANG, Y. C.; LIN, S. J.; SU, W. C.; LAI, M. D.; KIM, S. Y.; WANG, Q.; QIAN, K. A novel derivative of betulinic acid, SYK023, suppresses lung cancer growth and malignancy. **Oncotarget**, v. 6, p. 13671 -13687, 2015.

JESUS, N. Z. T.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M. S.; ESPINOSA, M. M.; MARTINS, T. O. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 1A, p.130-139, 2009.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LING, W. H.; JONES, P. J. H. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. **Life Sciences**, v. 57, p. 195-206, 1995.

LUO, R.; FANG, D.; CHU, P.; WU, H.; ZHANG, Z.; TANG, Z. Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1321-1330, 2016.

MANAHAN, S. E. **Química Ambiental**. 9ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2012.

MESSIAS, J. B.; BRITO, R. L.; AQUINO BELTRÃO, G. T.; OLIVEIRA MESSIAS, I. M.; FLORÊNCIO, M. S.; ARAÚJO LUZ, B. R.; SILVA FILHO, J. F. Citogenotoxicidade e mutagenicidade do sulfato de cobre em diferentes variedades de *Allium cepa* linn. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 88231-88244, 2021.

NAVARRETE, A.; TREJO-MIRANDA, J. L.; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 383-388, 2002.

PEDROSO, R. S.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. Physis: **Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, n. 2, e310218, 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-73312021310218>

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.

PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I. S.; CHAGWEDERA, T. E; ARNSWORTH N. R.; CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H; KINGHORN, A. D.; BROWN, D. M.; Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nat Med**, v. 1, n. 10, p. 1046-1051, 1995.

POTZE, L.; MULLAUER, F. B.; COLAK, S.; KESSLER, J. H.; MEDEMA, J. P. Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response. **Cell death & disease**, v. 5, n. 4, p. e1169-e1169, 2014.

RAMALHO, S. A.; NIGAM, N.; OLIVEIRA, G. B.; OLIVEIRA, P. A.; SILVA, T. O. M.; SANTOS, A. G. P.; NARAIN, N. Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. **Food Research International**, v. 51, p. 155-161, 2013.

RUSSEL, P. J. **Chromosomal mutation**. In: CUMMINGS, B. (Ed.). Genetics. San Francisco: Pearson Education Inc, 2002, p. 595-621.

SANTOS, L. L.; ZORTÉA, K. E. M.; CARDOSO, E. S.; FERREIRA, E. L.; ROSSI, A. A. B. **Avaliação do potencial citogenotóxico de extratos aquosos de *Hibiscus sabdariffa* L. por meio do teste *Allium cepa* L.** Ciência em Foco: Volume VI. Nova Xavantina, MT: Pantanal Editora, 2021. p. 86.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 368, n. 3-4, p. 171-179, 1996.

SOARES, I. A.; NASCIMENTO, M.; TÁVORA, Z.; DAMIN, S.; RETUCI, V. S. Qualidade toxicológica e microbiológica da água de poços artesianos do município de Realeza - Paraná. **Acta Elit Salutis**, v. 6, n. 1, 2022.

SOUZA, E. C.; LAMEIRA, O. A.; FAIAL, K. C. F.; MÜLLER, R. C. S.; BRASIL, D. S. B. Estudo químico de chás de folhas de urucuzeiro (*Bixa orellana* L.). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 49132-49148, 2020.

SOUZA, S. A. M.; STEIN, V. C.; VESZ CATTELAN, L.; BOBROWSKI, V. L.; GOMES, B. H. R. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, p. 3-9, 2005.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. **Environmental Contamination**. Shanghai, p.137-156, 2012.

TIWARI, R.; PUTHLI, A.; BALAKRISHNAN, S.; SAPRA, B. K.; MISHRA, K. P. Betulinic acid-induced cytotoxicity in human breast tumor cell lines MCF-7 and T47D and its modification by tocopherol. **Cancer investigation**, v. 32, n. 8, p. 402-408, 2014.

VIANA, P. O.; RAMOS, A. C. C. A. Utilização de plantas medicinais como ferramenta de estímulo para o resgate de cultura e qualidade de vida. **Saber científico**, v. 8, n. 1, p. 89, 2019.

4.2 CAPÍTULO II

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Vochysia divergens* POHL (VOCHYSIACEAE) POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES SSR

RESUMO

Vochysia divergens Pohl. (Vochysiaceae), conhecida popularmente como cambará, é uma espécie arbórea, encontrada em terrenos inundáveis e matas ciliares do Pantanal. A espécie é utilizada para fins madeireiros, no reflorestamento, no paisagismo, na recuperação de áreas degradadas e para o uso medicinal. No entanto, há pouco estudo referente a sua diversidade genética, que possam fornecer dados que visem sua conservação. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a diversidade e a estrutura genética espacial em populações nativas de *V. divergens* no Pantanal mato-grossense por meio de marcadores moleculares microssatélites. Foram amostrados um total de 152 indivíduos de *V. divergens* em seis populações. A caracterização molecular foi realizada com sete *primers* SSR e os dados de diversidade e estrutura genética foram obtidos por meio dos programas Power Marker, Arlequin, PopGene, Genes e Structure. Foram encontrados 33 alelos com média de 4,714 alelos por locus. O PIC médio foi de 0,449. A H_e foi menor que H_o em todas as populações analisadas, indicando maior heterozigosidade nas populações. Foram encontrados quatro alelos raros e 13 alelos exclusivos nas populações, onde a população Transpantaneira apresentou o maior número destes. A análise de variância molecular demonstrou que o maior componente de variação encontra-se dentro das populações. O valor do F_{ST} (0,47223) revela que há diferença entre as populações analisadas e essa diferença pode estar relacionada com o baixo fluxo gênico entre as populações que foi de 0,26. Os agrupamentos geraram três grupos, onde observa-se que a estrutura genética não está relacionada com a distância geográfica entre as populações. Os resultados indicam que o baixo fluxo gênico e a diferenciação genética encontrada entre as populações, podem estar relacionados a processos de retração e expansão decorrentes da inundação, fogo e fatores edáficos que ocorrem no Pantanal mato-grossense e que as seis populações analisadas apresentam níveis de diversidade genética importante para auxiliar em práticas que assegurem o manejo e a conservação da espécie.

Palavras-Chave: Cambará; Pantanal; Microssatélites.

GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF *Vochysia divergens* POHL (VOCHYSIACEAE) BY MEANS OF SSR MOLECULAR MARKERS

ABSTRACT

Vochysia divergens Pohl. (Vochysiaceae), popularly known as cambará, is a tree species, found in floodplains and riparian forests in the Pantanal. The species is used for timber purposes, in reforestation, landscaping, recovery of degraded areas and medicinal use. However, there are almost no studies regarding its genetic diversity, which can provide data aimed at its conservation. Thus, the objective of this work was to characterize the diversity and spatial genetic structure in native populations of *V. divergens* in the Pantanal of Mato Grosso by means of microsatellite molecular markers. A total of 152 *V. divergens* individuals were sampled in six populations. Molecular characterization was performed with seven SSR primers and diversity and genetic structure data were obtained using Power Marker, Arlequin, PopGene, Genes and Structure programs. We found 33 alleles with an average of 4,714 alleles per locus. The average PIC was 0.449. The H_e was lower than H_o in all analyzed populations, indicating greater heterozygosity in the populations. Four rare alleles and 13 exclusive alleles were found in the populations, where the Transpantaneira population had the highest number of these. Molecular analysis of variance showed that the largest component of variation is found within populations. The F_{ST} value (0.47223) reveals that there is a difference between the populations analyzed and this difference may be related to the low gene flow between the populations, which was 0.26. The clusters generated three groups, where it is observed that the genetic structure is not related to the geographic distance between the populations. The results indicate that the low gene flow and genetic differentiation found among the populations may be related to processes of retraction and expansion resulting from flooding, fire and edaphic factors that occur in the Pantanal of Mato Grosso and that the six populations analyzed present important levels of genetic diversity to assist in practices that ensure the management and conservation of the species.

Keywords: Cambará; Pantanal; Microsatellites.

1. INTRODUÇÃO

Vochysia divergens Pohl., conhecida popularmente como cambará, pertence à família Vochysiaceae é uma espécie arbórea, naturalmente encontrada dispersa em terrenos inundáveis e matas ciliares do Pantanal, podendo formar populações homogêneas denominadas de cambarazais (LORENZI, 2008; POTT et al., 2011).

No Pantanal o cambará é considerado uma das principais espécies madeireiras, podendo ser aproveitada racionalmente através de manejo florestal (OLIVEIRA et al., 2018). Apresenta madeira macia e de fácil manuseio, muito utilizada na confecção de canoas, cochos, brinquedos, dentre outros (LORENZI, 2008). É uma espécie importante para recuperação de matas ciliares e áreas de preservação permanente (CARVALHO, 2014).

A casca, folhas e seiva são utilizadas na medicina popular, para o tratamento de infecções, asma e distúrbios digestivos (GUARIM NETO et al., 2006; JESUS et al., 2009). Devido a exuberância de sua floração que é apícola, pode ser usada no paisagismo (POTT & POTT, 1994; LORENZI, 2008). É uma espécie amplamente utilizada no Pantanal mato-grossense, no entanto, há poucos estudos relacionados a sua diversidade genética e estrutura populacional (ZORTÉA, 2022) que possam fornecer dados para o desenvolvimento de programas que visem a exploração sustentável das populações naturais e conservação dos recursos genéticos *in situ* e *ex situ*.

O desenvolvimento de estratégias para a conservação e manejo sustentável de uma espécie engloba o conhecimento de sua forma de reprodução, distribuição da diversidade genética dentro e entre populações, níveis de diversidade intrapopulacional, tamanho efetivo e distribuição espacial de genótipos (KAGEYAMA et al., 2003a).

A diversidade genética é fonte fundamental para biodiversidade (HUGHES et al., 2008). A avaliação da estrutura genética populacional e dos níveis de diversidade genética auxilia na compreensão dos efeitos ocasionados pela fragmentação ambiental e sua influência sobre a dinâmica populacional (SUJII et al., 2015). O estudo da diversidade genética em populações naturais pode ser realizado por meio de marcadores moleculares, que são ferramentas que fornecem informações relevantes para subsidiar a adoção de estratégias de manejo e conservação (SILVA et al., 2020).

Dentre os marcadores moleculares disponíveis destaca-se os SSR (Simple Sequence Repeat) que constituem em um par de primers complementares às sequências que flanqueiam os microssatélites (IDREES & IRSHAD, 2014). Apresentam a vantagem de serem codominantes e altamente específicos, além disso, cada microssatélite constitui um locus genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (CAIXETA et al., 2016).

Diante do exposto, esse trabalho tem por objetivo caracterizar a diversidade e a estrutura genética espacial em populações nativas de *Vochysia divergens* no Pantanal mato-grossense por meio de marcadores moleculares microssatélites.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no bioma Pantanal, localizado no estado de Mato Grosso, Brasil. As coletas foram realizadas em seis populações nativas, sendo estas: Barrão de Melgaço - Rio Cuiabá (BMO) sete indivíduos; Porto de Fora à Mimoso (PFM) 25 indivíduos; Rio São Lourenço – Porto Jofre (RSL) nove indivíduos; Santo Antônio do Leverger (SAL) 25 indivíduos; Transpantaneira – Poconé (TPR) 40 indivíduos e Cáceres (CAS) 46 indivíduos (Figura 1). Foram amostrados um total de 152 indivíduos de *V. divergens*.

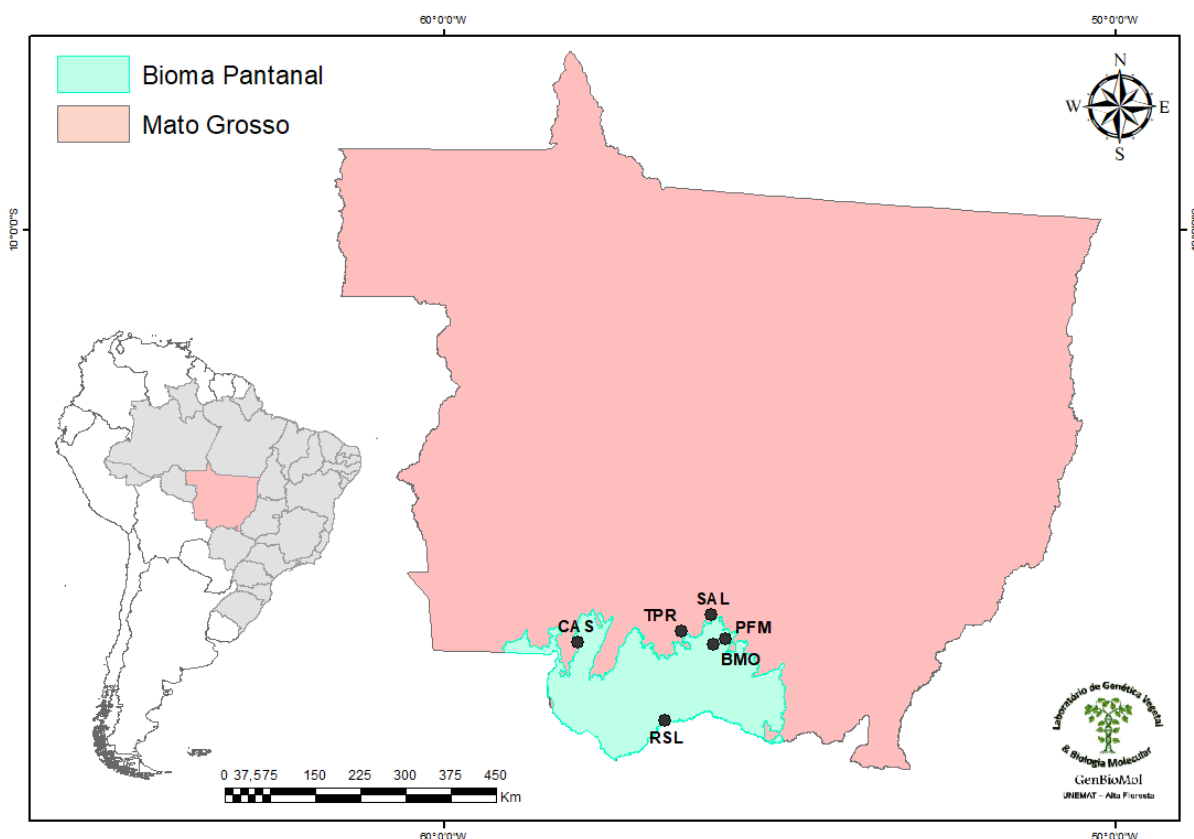


Figura 1. Localização geográfica das seis populações naturais de *Vochysia divergens* no Pantanal de Mato Grosso, Brasil. Fonte: a autora.

2.2 Coleta do material vegetal

Foi coletado material foliar de cada indivíduo, distribuídos aleatoriamente nas seis populações nativas, sendo essa amostragem realizada com uma distância mínima de 30 m de um indivíduo para o outro. Foram selecionadas folhas preferencialmente sadias em estágio intermediário de desenvolvimento. O material

foliar foi desidratado em sílica gel, levado ao Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular (GenBioMol) no Centro de Pesquisa e Tecnologia da Amazônia Meridional (CEPTAM) da Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado (UNEMAT), campus de Alta Floresta e conservado em temperatura de -4°C até seu posterior uso.

2.3 Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 300 mg de folhas, seguindo o método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987) com modificações propostas por Zortéa et al. (2021) (Figura 2).

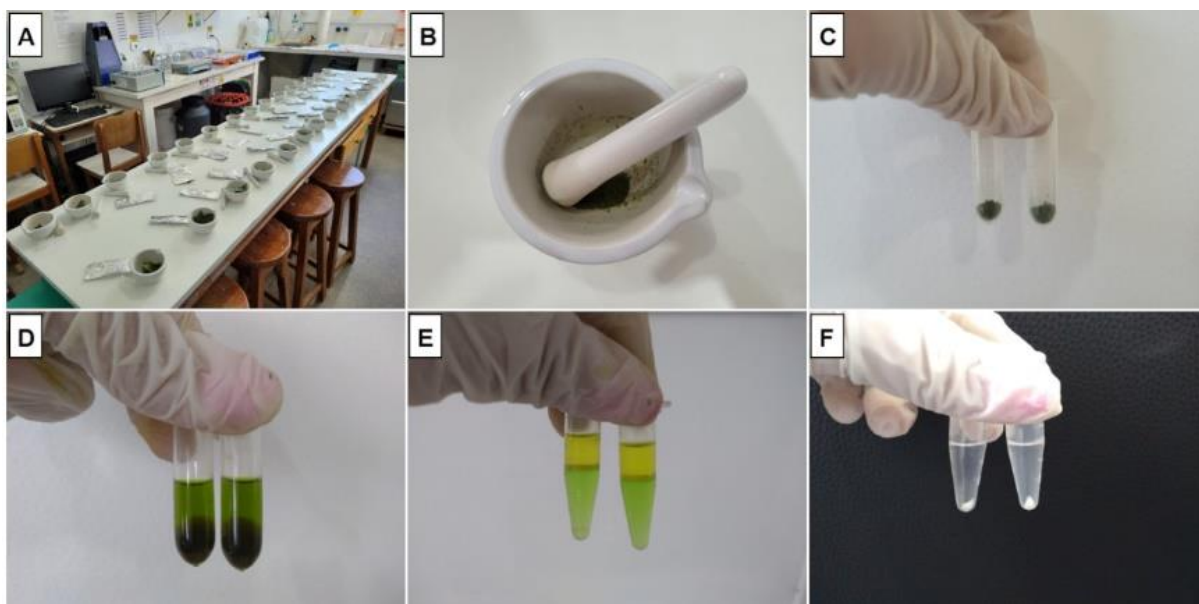


Figura 2. Principais etapas da extração de DNA foliar de *Vochysia divergens* seguindo o protocolo CTAB. (A) Bancada preparada para o início da trituração das folhas com nitrogênio líquido, (B) Pó resultante da trituração foliar, (C) Transferência da folha triturada para microtubos, (D) Resultado da primeira centrifugação separando a fase aquosa da orgânica, (E) Separação das fases para retirada do sobrenadante, (F) Formação do pellet.

A quantidade e qualidade do DNA extraído foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998) e fotodocumentados em transluminador LTB – 20x20 STi Loccus Biotecnologia® sob luz ultravioleta, utilizando o sistema LPix-STi Loccus Biotecnologia® (Figura 3A e B). A quantificação foi realizada por comparação com marcador de peso molecular conhecido DNA Lambda ($100\text{ng}/\mu\text{L}$) e através do Micro espectrofotômetro ND-3800-OD NANO DOT Hercuvan (Figura 3C). Após, a quantificação, as amostras do DNA extraídas foram diluídas em água destilada

autoclavada e padronizadas a uma concentração de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para realização das amplificações via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

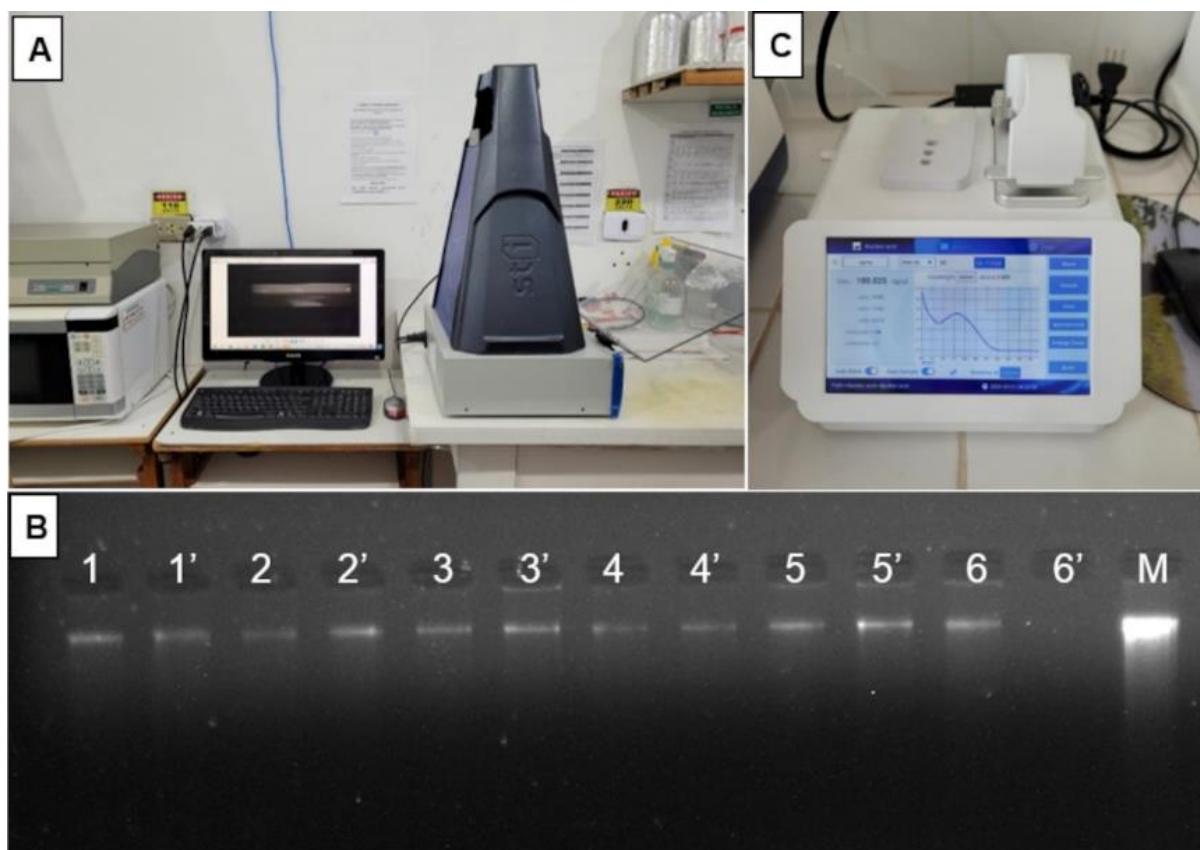


Figura 3. Quantificação do DNA. (A) Fotodocumentação do gel em transiluminador sob luz ultravioleta, (B) Eletroforese em gel de agarose a 1%, com amostras de DNA de seis indivíduos, com repetições, de *Vochysia divergens* pertencentes a população RSL, M: marcador 100 ng/ μL , (C) Leitura das amostras de DNA no micro espectrofotômetro.

2.3 Amplificação via PCR

As amplificações via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas utilizando sete pares de *primers* SSR desenvolvidos por Lowe et al. (2002) para *Vochysia ferrugínea* e com transferibilidade comprovada por Zortéa et al. (2021) para *V. divergens* (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers SSR usados para amplificar o DNA de Vochysia divergens*

Locus	Repetição microssatélite	Tamanho do fragmento ¹	Ta (°C)
AL-08	(GA) ₁₀	166 - 180	55
A1-10	(GA) ₁₃	180 - 190	55
A1-20	(GT) ₈ GAGT(GA) ₁₂	112 - 133	55
A1-26	(GA) ₁₀ AA(GA) ₉	150 - 188	55
A1-33	(GA) ₁₅	148 - 188	55
A1-35	(GA) ₁₇	160 - 194	55
A1-39	(GA) ₅ GG(GA) ₆ GG(GA) ₆	160 - 190	55

¹Tamanho do fragmento encontrado por Zortéa et al. (2021). Ta: temperatura de anelamento.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10µL contendo: 1,5µL de tampão 5x GoTaq Colorless Promega®, 0,2 mM de dNTPs, 2,25 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada primer (F e R), 0,12µL de Taq DNA polimerase (5U/µL), 10 ng de DNA e água ultrapura. As amplificações foram conduzidas em termociclador Eppendorf seguindo o programa descrito por Lowe et al. (2002), com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; um programa touchdown de 95 °C por 15s, 65°C por 25s e 72°C por 35s por 11 ciclos, em que a temperatura de anelamento diminuiu 1°C por ciclo; seguido de 25 ciclos com temperatura de anelamento de 55°C e uma extensão final de 15 minutos a 72°C.

A confirmação da amplificação dos produtos da PCR foi realizada a partir da aplicação de 3 µL da reação em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (10µg/mL⁻¹) e visualizado em transiluminador. Após confirmação, os produtos da amplificação foram separados em gel de Agarose MetaPhor® 3%, através da eletroforese em tampão de corrida TBE 1X (Tris, ácido bórico e EDTA) a 60 volts, por cerca de quatro horas. Os géis com os produtos das amplificações para cada primer (Figura 4) foram fotodocumentados com auxílio do transiluminador. As imagens foram utilizadas para avaliar o número e o tamanho dos fragmentos amplificados por meio do programa LabImage®, através da comparação com DNA Ladder 100 pb (Cellco®).

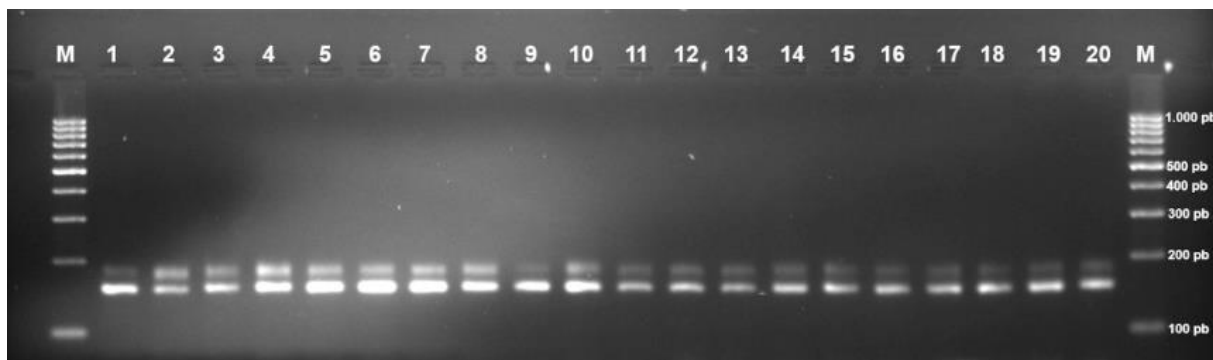


Figura 4. Fotodocumentação dos produtos amplificados para o primer A1-26 na população TPR em gel de agarose MetaPhor 3%. M: Marcador DNA Ladder 100pb Cellco®.

2.4 Análise dos dados

A montagem da matriz por primer foi realizada com base nas informações do tamanho dos fragmentos amplificados. A diversidade genética foi caracterizada quanto ao número de alelos, número médio de alelos por locus (N_a), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg, conteúdo de informação polimórfica (PIC) e coeficiente de endogamia (f) para cada população e para cada *loco*. Estas análises foram realizadas com auxílio do software Power Marker v. 3.25 (LIU & MOUSE, 2005). O coeficiente de endogamia (f) foi calculado para cada população e para cada locus de acordo com o método de Weir e Cockerham (1984), este coeficiente varia de -1 a +1, em que valores positivos indicam excesso de homozigotos e valores negativos, excesso de heterozigotos.

A frequência dos alelos na espécie e a frequência de alelos por locus dentro de cada população foi obtida no software Power Marker v. 3.25 e os gráficos foram montados no Excel. A partir destes dados, os alelos foram classificados de acordo com sua frequência, sendo considerados alelos raros os que apresentam frequência igual ou inferior a 0,05 (MARSHALL & BROWN, 1975; YANG & YEH, 1992). Considerou-se exclusivos os alelos que ocorreram em apenas uma população, independente da frequência.

A análise da variância molecular (AMOVA) utilizada para inferir sobre a estrutura genética das populações por meio da decomposição total nos componentes entre e dentro de populações foi obtida no software ARLEQUIN 3.01 (EXCOFFIER et al., 2006). O valor do fluxo gênico (N_m) foi obtido por meio do programa PopGene 1.32 (YEH et al., 1999). A correlação entre a similaridade genética e a distância geográfica das diferentes populações analisadas foi realizado por meio do teste de Mantel, com 1.000 permutações pelo programa Genes (CRUZ, 2016).

A matriz dos valores de distância genética de Nei (1983) entre as populações gerada no Power Marker V.3.25 foi importada para o software Genes (CRUZ, 2016) para a construção do dendrograma utilizando o método UPGMA (unweighted pairgroup method with arithmetic averages). Este método de agrupamento foi escolhido por ser o que melhor representou a variação genética em estudo, com base no valor do coeficiente de correlação cofenética (CCC) estresse e distorção.

Para inferir o número de grupos (k) foi utilizado o programa “Structure” (PRITCHARD et al., 2000), baseado em estatística bayesiana. Para cada valor de K (1 a 9) foram realizadas 20 corridas, 200.000 “burn-ins” e 500.000 simulações de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). O K mais provável em relação aos propostos foi definido por meio dos critérios sugeridos por Pritchard e Wen (2004) e também por Evano et al. (2005), os resultados foram enviados para o site Structure Harvester (EARL et al., 2012). E a análise das coordenadas principais (PCoA) foi realizada pelo programa GenAlEx 6.5® (PEAKALL & SMOUSE, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diversidade genética de *Vochysia divergens*

Os sete marcadores microssatélites amplificaram um total de 33 alelos em *V. divergens* com variação de 3 a 10. O número médio de alelos por locus (4,714) foi menor que o encontrado por Zortéa (2022) em *V. divergens* utilizando os mesmos primers. Contudo, Zortéa (2022) analisou indivíduos pertencentes aos biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal, enquanto o presente estudo analisou apenas indivíduos do Pantanal. A média da *He* foi maior que a *Ho*. O índice de fixação foi positivo para os locus A1-10, A1-20, A1-33 e A1-39 indicando maior homoziguidade, já os locus AL-08, A1-26 e A1-35 obtiveram o índice de fixação negativo indicando uma maior heteroziguidade (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativa da diversidade genética por locus microssatélite em *Vochysia divergens*

Locus	NI	NA	PIC	He	Ho	F
AL-08	151	4	0,398	0,466	0,536	-0,148
A1-10	152	4	0,409	0,486	0,000	1,000
A1-20	149	10	0,729	0,749	0,181	0,759
A1-26	152	3	0,465	0,525	0,730	-0,388
A1-33	152	3	0,110	0,113	0,059	0,479
A1-35	150	5	0,660	0,710	0,873	-0,226
A1-39	152	4	0,370	0,418	0,125	0,702
Média	151,143	4,714	0,449	0,495	0,358	0,280

NI = número de indivíduos analisados por locus; NA = Número de alelos; *He* = Heteroziguidade esperada; *Ho* = Heteroziguidade observada; PIC = Conteúdo de informação polimórfica; *f* = índice de fixação (endogamia).

Analisando os valores do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), observou-se um valor médio de 0,449, variando de 0,110 (A1-33) a 0,729 (A1-20) (Tabela 2). De acordo com Botstein et al. (1980), os marcadores moleculares são classificados como satisfatórios em conteúdo informativo quando apresentam PIC superior a 0,50, mediantemente informativos com valores que vão de 0,25 a 0,50 e pouco informativo com valores inferiores a 0,25. Diante desse resultado, pode-se verificar que o conjunto de *primers* testados para *V. divergens* foram eficazes em detectar polimorfismo nas populações em questão, demonstrando potencial para futuros estudos com a espécie, apesar do *primer* A1-33 ter sido classificado como pouco informativo.

A média de alelos encontrada por população foi de 12,666, sendo que a população PFM apresentou o maior número de alelos (16). A *He* foi menor que a *Ho* em todas as populações e a população TPR apresentou o maior valor de *Ho* (0,468). O índice de fixação foi menor que zero para todas as populações, indicando maior heterozigosidade nas populações, do que o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativa da diversidade genética por população de *Vochysia divergens*, obtidas com sete locus microssatélites

População	NI	NA	He	Ho	f
BMO	7	10	0,162	0,306	-0,875
PFM	25	16	0,260	0,322	-0,216
RSL	9	10	0,289	0,438	-0,472
SAL	25	13	0,287	0,300	-0,023
TPR	40	13	0,356	0,468	-0,303
CAS	46	14	0,257	0,304	-0,172
Espécie	152	12,666	0,495	0,358	0,280

NI = número de indivíduos utilizados na análise; NA = Número de alelos; He = Heterozigosidade esperada; Ho = Heterozigosidade observada; f = índice de fixação (endogamia). BMO: Barrão de Melgaço; PFM: Porto de Fora à Mimoso; RSL: Rio São Lourenço; SAL: Santo Antônio do Leverger; TPR: Transpantaneira; CAS: Cáceres.

A heterozigosidade observada e o índice de fixação sugerem que as populações analisadas de *V. divergens* apresentam diversidade genética e ausência de endogamia. Moura et al. (2009) relatam que esse fato está relacionado a seleção favorável do genótipo heterozigoto nos locus estudados.

Os locus AL-08, A1-26 e A1-35 apresentaram alelos com frequências similares mostrando distribuição uniforme, enquanto os demais locus apresentaram distribuição pouco uniforme com maior frequência de um ou dois alelos ou maior número de alelos em baixa frequência (Figura 5).

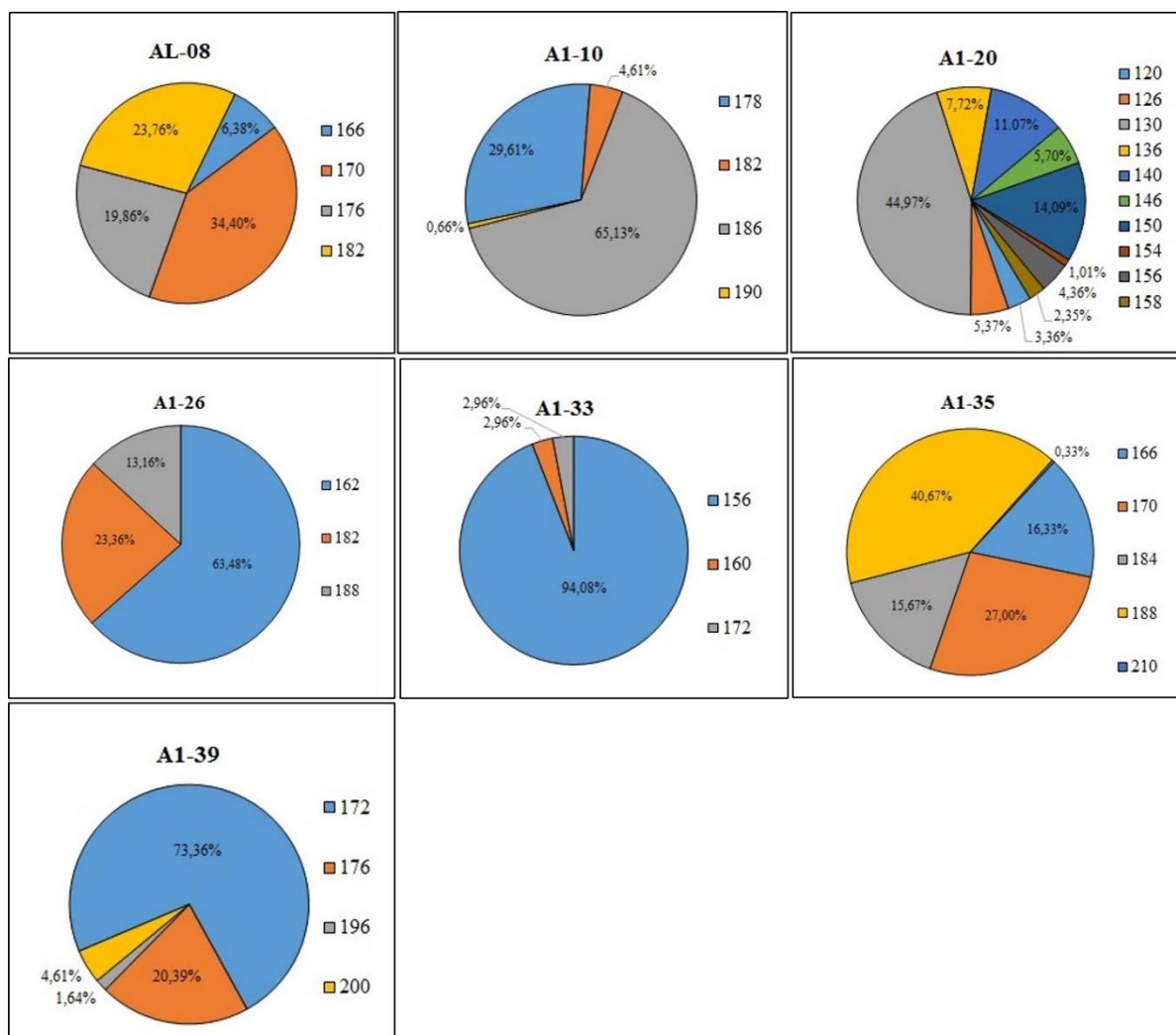


Figura 5. Distribuição da frequência alélica nos sete locus microssatélites analisados nas seis populações naturais de *Vochysia divergens*.

Através da análise da frequência alélica por população foram encontrados quatro alelos raros (frequência $<0,05$), distribuídos em três populações: PFM (1), SAL (1) e TPR (2) e 13 alelos exclusivos, distribuídos em cinco populações: PFM (2), RSL (3), SAL (1), TPR (6) e CAS (1). A população TPR apresentou o maior número de alelos exclusivos, sendo dois destes também classificados como raros.

De acordo com Montagna et al. (2012) os alelos raros são mais susceptíveis a serem perdidos em decorrência a efeitos da deriva genética, devido apresentarem baixa frequência, enquanto os alelos exclusivos podem ser usados como indicativo de que são populações e áreas prioritárias para conservação. Desse modo as populações nativas de cambará do Pantanal mato-grossense apresentam-se como áreas prioritárias para conservação *in situ* da diversidade genética da espécie.

Resultados semelhantes foram obtidos por Zortéa (2022) ao estudar a diversidade genética de *V. divergens* nos três biomas presentes no estado de Mato Grosso (Amazônia, Cerrado e Pantanal), onde encontrou além dos alelos raros e exclusivos na população analisada no Pantanal, um alelo comum e com distribuição local indicando que é uma população importante para conservação, pois esse alelo está relacionado com o processo de adaptação da espécie nesse bioma.

3.2 Estrutura genética em populações naturais de *Vochysia divergens*

A análise de variância molecular demonstrou que houve diferenciação genética significativa ($p < 0,000$) entre as populações e que o maior componente de variação encontra-se dentro das populações (52,78%) (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) das seis populações de *Vochysia divergens* a partir de sete marcadores microssatélites

Fonte de Variação	GL	SQ	CV	VT(%)	Valor de P
Entre populações	5	218,683	0,902	47,22	$p < 0,000$
Dentro de populações	298	300,294	1,007	52,78	
Total	303	518,977	1,909		

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; CV = Componente de Variância; VT = Variância Total e p são as probabilidades de ter um componente de variância maior que os valores observados ao acaso. As probabilidades foram calculadas por 1.023 permutações ao acaso. $F_{ST} = 0,23462$.

O F_{ST} (0,47223) demonstrou que há diferença entre as populações analisadas e essa diferença pode estar relacionada com o baixo fluxo gênico entre as populações que foi de 0,26. Segundo a classificação de Wright (1978), essa diferenciação genética é considerada elevada, por apresentar valor de F_{ST} superior a 0,25. *V. divergens* é uma espécie predominantemente alógama (ZORTÉA, 2022), segundo Konzen (2014), quando se trata de espécies alógamas, altos valores de diferenciação genética indicam baixo fluxo gênico entre as populações.

Embora, exista uma grande diferenciação entre as populações a maior parte da diversidade genética encontra-se distribuída dentro das populações. Kageyama et al. (2003) afirmam que esse tipo de padrão de distribuição está de acordo com o observado para espécies arbóreas alógamas ou de sistema misto, predominantemente alógamas, com mecanismo de dispersão do pólen e das sementes eficiente.

O sistema de dispersão de *V. divergens* é realizado pelo vento e pela água (NUNES DA CUNHA & JUNK, 2004; CARVALHO, 2014). No Pantanal a inundação

favorece a dispersão de espécies como *V. divergens* (JUNK & WANTZEN, 2004), causando seu espalhamento, onde períodos de grandes cheias e secas em intervalos prolongados, acarretam a retração e o aumento dessas populações, caracterizando essa vegetação como irregular no tempo e no espaço (JUNK & DA SILVA 2000; NUNES DA CUNHA & JUNK 2001; JUNK 2002).

O baixo fluxo gênico e a grande diferenciação entre as populações de *V. divergens* pode estar relacionado a processos de retração e expansão dessas populações. Tais processos são decorrentes da inundação (ARIEIRA & NUNES DA CUNHA, 2006), impacto do fogo durante a seca (NUNES DA CUNHA & JUNK, 2004) e fatores edáficos que ocorrem no Pantanal, causando diferenças na estrutura populacional, favorecendo a monodominância (cambarazais) (HART et al., 1989) e consequentemente as especificidades de cada população pela presença de alelos exclusivos, ocasionando desse modo, diferenciação entre as populações.

As populações mais próximas tanto geneticamente, quanto geograficamente, são BMO e PFM, indicando que a estrutura genética está relacionada com a estrutura geográfica, enquanto a população CAS apresentou a menor distância genética com BMO e PFM e também a maior distância geográfica em relação a essas duas populações, indicando que não há uma relação entre a estrutura genética e a geográfica (Tabela 5). Este resultado aliado ao teste de Mantel que não foi significativo e apresentou valor de $r = 0,1765$, indicam que a distância geográfica não está diretamente relacionada com a distância genética para todas as populações.

Tabela 5. Matriz de distância genética* de Nei (1978) e de distâncias geográficas** (Km) entre as seis populações naturais de *Vochysia divergens*

	BMO	PFM	RSL	SAL	TPR	CAS
BMO	---	0,119	0,615	0,372	0,419	0,263
PFM	22	---	0,518	0,344	0,384	0,190
RSL	146	165	---	0,301	0,677	0,600
SAL	46	44	189	---	0,510	0,350
TPR	54	70	148	55	---	0,360
CAS	214	234	188	217	165	---

*Distância genética acima da diagonal. **Distâncias geográficas, abaixo da diagonal. Distâncias geográficas aproximadas obtidas pelo Google Earth Pro versão 7.3.3. BMO: Barrão de Melgaço; PFM: Porto de Fora à Mimoso; RSL: Rio São Lourenço; SAL: Santo Antônio do Leverger; TPR: Transpantaneira; CAS: Cáceres.

O dendrograma UPGMA agrupou as populações em três grupos (Figura 6). As populações mais semelhantes foram BMO e PFM, enquanto as populações RSL e SAL formaram um grupo isolado das demais.

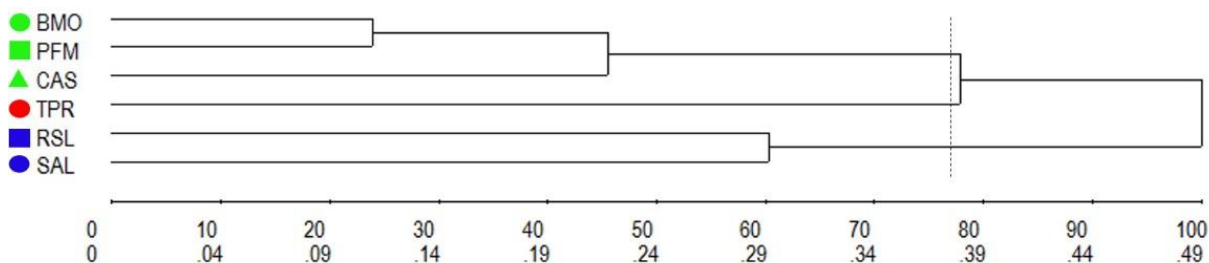


Figura 6. Dendrograma UPGMA, gerado a partir da matriz de distância genética de Nei (1983), com base nos dados de sete locus microssatélites para seis populações naturais de *Vochysia divergens*. CCC = 0,80; Distorção = 4,42%; Estresse = 21,07%.

A análise bayesiana, agrupou os 152 indivíduos de *V. divergens* em três grupos genéticos ($k = 3$), conforme a Figura 7.

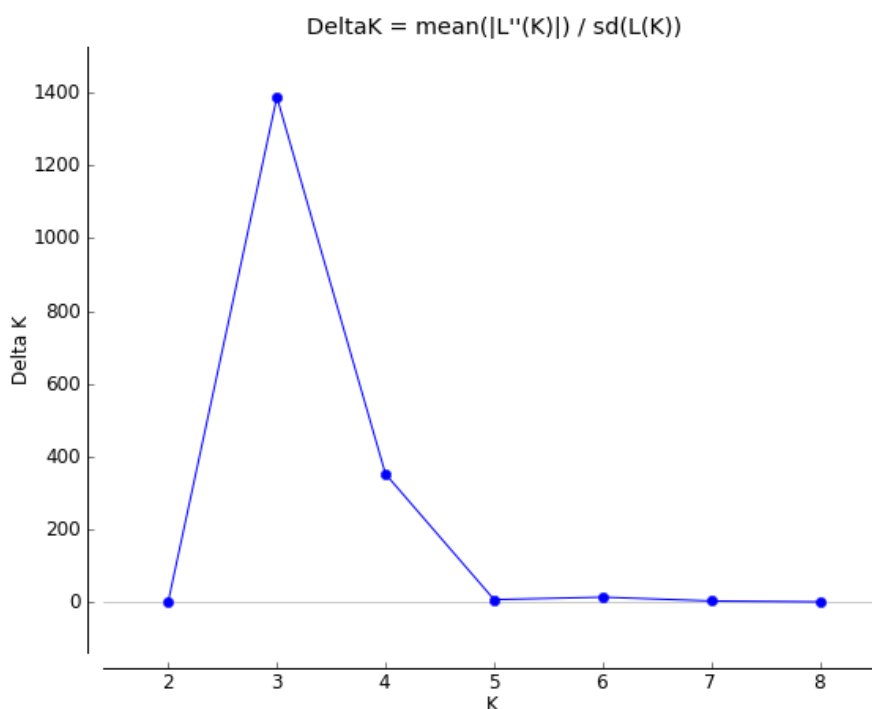


Figura 7. Estimativa do número de grupos (K) a partir de 20 corridas independentes para $K = 1-9$, que melhor se encaixa no conjunto de dados de *Vochysia divergens*, conforme Evanno et al. (2005).

A contribuição dos indivíduos de cada população para cada um dos três grupos genéticos gerados no Structure está representada na Figura 8.

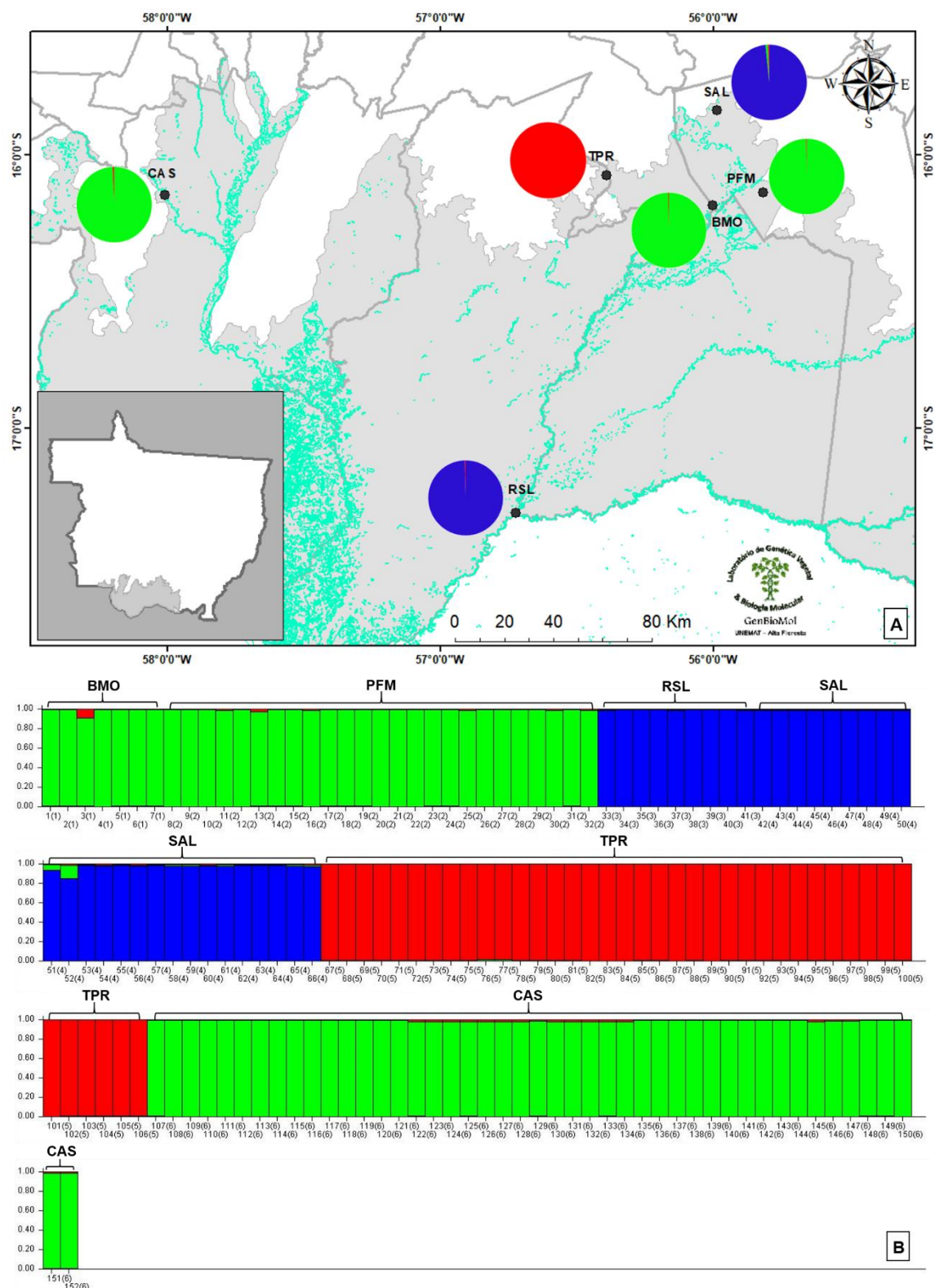


Figura 8. Análise de agrupamento e distribuição geográfica dos agrupamentos gerados pelo “Structure”. (A) Os gráficos pizza representam a proporção de contribuição de cada população para os grupos formados no “Structure” ($K = 3$). (B) Distribuição dos três grupos genéticos gerados pelo “Structure”. As linhas verticais ao longo do eixo x representam os indivíduos e os segmentos coloridos ao longo do eixo y demonstram o coeficiente de associação de cada indivíduo atribuído a cada um dos inferidos K . BMO: Barrão de Melgaço; PFM: Porto de Fora à Mimoso; RSL: Rio São Lourenço; SAL: Santo António do Leverger; TPR: Transpantaneira; CAS: Cáceres.

Esse agrupamento apresentou resposta similar ao dendrograma UPGMA, onde é possível observar três grupos distintos, em que a população TPR ficou separada das demais. Este fato pode ser explicado devido a população TPR ter apresentado o maior número de alelos raros e exclusivos, indicando que houve ausência de fluxo alélico, apresentando assim diferenciação entre as populações (KAGEYAMA et al., 1998; KAGEYAMA et al., 2003; SEOANE et al., 2000).

A intensa dinâmica populacional relacionada ao processo de expansão/retração que ocorrem no Pantanal como citado anteriormente, ocasiona um isolamento das populações e por essa razão não há troca de material genético entre elas. Em especial, a população TPR é a única que não está tão próxima de um rio, como mostra a figura 8A, um dos principais dispersores de suas sementes.

O diagrama de dispersão da PCoA mostra a relação entre indivíduos e populações, corroborando ao encontrado na análise bayesiana do Structure e no dendrograma UPGMA, onde é possível observar uma sobreposição genética entre as populações BMO, PFM e CAS, e entre as populações RSL e SAL, enquanto a população TPR ficou separada das demais (Figura 9). As três primeiras coordenadas principais explicam 63,45% da variação genética entre os indivíduos.

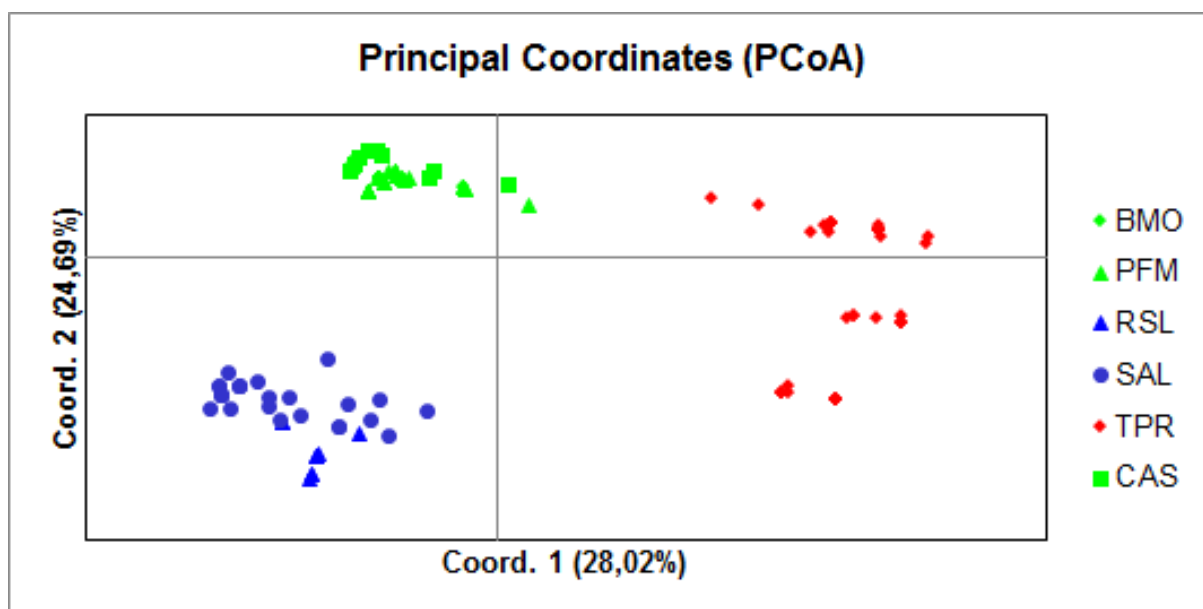


Figura 9. Análise de coordenadas principais de 152 indivíduos de *Vochysia divergens*. BMO: Barrão de Melgaço; PFM: Porto de Fora à Mimoso; RSL: Rio São Lourenço; SAL: Santo Antônio do Leverger; TPR: Transpantaneira; CAS: Cáceres.

4. CONCLUSÕES

As populações naturais de *V. divergens* avaliadas no Pantanal mato-grossense apresentam diversidade genética.

A população TPR apresentou maior número de alelos raros e exclusivos e é considerada uma população com prioridade para a conservação. No entanto, a população RSL é interessante para se investigar melhor, uma vez que ela teve uma amostragem pequena (9 indivíduos) e mesmo assim apresentou 10 alelos, sendo que três são exclusivos.

O maior componente de variação foi encontrado dentro das populações, sendo recomendado a conservação *in situ* de indivíduos de cada uma das populações estudadas, com intuito de possibilitar a manutenção da diversidade genética e conservação da espécie.

O baixo fluxo gênico e a diferenciação genética encontrada entre as populações, podem estar relacionados a processos de retração e expansão decorrentes da inundação, fogo e fatores edáficos que ocorrem no Pantanal mato-grossense.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIEIRA, J.; NUNES DA CUNHA, C. Fitossociologia de uma floresta inundável monodominante de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) no Pantanal Norte, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 568-580, 2006 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062006000300007>
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. (eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2016. p. 9-93.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras** – Brasília, DF: Embrapa, 2014. v.5, 637 p.
- CRUZ, C. D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016. DOI: 10.4025/actasciagron.v38i4.32629
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochem Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.
- EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Biology**, v.14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN version 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. **Bern: University of Bern, Zoological Institute**, 2006.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília-DF, EMBRAPA-CENARGEN, p. 55-62, 1998.
- GUARIM NETO, G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v.17, p. 71-89, 2006.
- HART, T. B.; HART, J. A.; MURPHY, P. G. Monodominant and species-rich forests of the humid tropics: causes for their co-occurrence. **The American Naturalist**, v. 133, p. 613-633, 1989. <http://dx.doi.org/10.1086/284941>

HUGHES, A. R.; INOUE, B. D.; JOHNSON, M. T. J.; UNDERWOOD, N.; VELLEND, M. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters**, v. 11, p. 609-623, 2008. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x

IDREES, M.; IRSHAD, M. Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. **European Academic Research**, v.2, n.1, p.1513-1540, 2014.

JESUS, N. Z. T.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M. S.; ESPINOSA, M. M.; MARTINS, T. O. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 1A, p.130-139, 2009.

JUNK, W. J. Long-term environmental trends and future of tropical wetlands. **Environmental Conservation, Foundation for Environmental Conservation**, v. 29, n. 4, p. 414-435, 2002.

JUNK, W. J.; DA SILVA, C. J. O conceito do pulso de inundação e suas implicações para o Pantanal de Mato Grosso. In: **II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal**. Embrapa, 2000. p. 17-28.

JUNK, W. J.; WANTZEN, K. M. The flood pulse concept: new aspects, approaches and applications-an update. In: **Second international symposium on the management of large rivers for fisheries**. Food and Agriculture Organization and Mekong River Commission, FAO Regional Office for Asia and the Pacific, 2004. p. 117-149.

KAGEYAMA, P. O.; CUNHA, G. C.; BARRETO, K. D.; GANDARA, F. B.; CAMARGO, F. R. A.; SEBBENN, A. M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorífera* (Lauraceae). **Scientia Forestalis**, v. 64, p. 108-119, 2003a.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Indicadores de sustentabilidade de florestas naturais. **Série Técnica IPEF**, v. 12, n. 31, p. 79-84, 1998.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64, p. 93-107, 2003.

KONZEN, E. R. Towards conservation strategies for forest tree endangered species: the meaning of population genetic statistics. **Advances in Forestry Science**, v. 1, n. 1, p. 45-51, 2014. DOI: <https://doi.org/10.34062/afs.v1i1.1405>

LIU, K.; MOUSE, S. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, v. 21, p.2128–2129, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v. 1, 384 p.

LOWE, A. J.; GOODALL-COPESTAKE, W. P.; CARON, H.; KREMER, A.; DECROOCQ, S. A set of polymorphic microsatellites for *Vochysia ferruginea*, a promising tree for land reclamation in the Neotropics. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 3, p. 209-210, 2002.

MARSHALL, D. R.; BROWN, A. H. D. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: FRANKEL, O. H.; HAWKES, J. G. (Eds.). **Crop genetic resources for today and tomorrow**. Cambridge: Cambridge University Press, 1975.

MONTAGNA, T.; FERREIRA, D. K.; STEINER, F.; FERNANDES, C. D.; BITTENCOURT, R.; SILVA, J. Z.; REIS, M. S. A Importância das unidades de conservação na manutenção da diversidade genética de xaxim (*Dicksonia sellowiana*) no Estado de Santa Catarina. **Biodiversidade Brasileira-BioBrasil**, n. 2, p. 26-32, 2012.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA G. C. X.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locus microsatélites. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 82, p. 143-150, 2009.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973. DOI: 10.1073/pnas.70.12.3321.

NUNES DA CUNHA, C.; JUNK, W. J. Distribution of wood plant communities along the flood gradient in the Pantanal of Poconé, Mato Grosso, Brazil. **International Journal of Ecology and Environmental**, v. 27, p. 63-70, 2001.

NUNES DA CUNHA, C.; JUNK, W. J. Year-to-year changes in water level drive the invasion of *Vochysia divergens* in Pantanal grasslands. **Applied Vegetation Science**, v. 7, n. 1, p. 103-110, 2004.

OLIVEIRA, A. K. M.; ALVES, F. F.; FERNANDES, V. Germinação de sementes de *Vochysia divergens* após armazenamento em três ambientes. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 2, p. 525-531, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509832035>

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28: p.2537-2539, 2012.

POTT, A.; OLIVEIRA, A. K.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A.; SILVA, J. S. V. Plant diversity of the Pantanal wetland. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 1, p. 265-273, 2011.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p. 945-959, 2000.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Documentation for structure software: Version 2.1**. 2004. Disponível em <<http://pritch.bsd.uchicago.edu>>. Acesso em 16 jul. 2022.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBEN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, v. 57, p. 123-139, 2000.

SILVA, L. F.; MELO JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, D. A.; MENEZES, E. V.; ROYO, V. A.; BRANDÃO, M. M. Cerrado rupestre do espinhaço: diversidade genética de espécie endêmica. **Cerrados**, v. 18, n. 1, p. 300-330, 2020.

SUJII, P. S.; MARTINS, K.; WADT, L. H. O.; AZEVEDO, V. C. R.; SOLFERINI, V. N. Genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations from the Amazon at different spatial scales. **Conservation Genetics**, v. 6, p. 955-964, 2015.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984. DOI: <https://doi.org/10.2307/2408641>

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of Populations**. Chicago: University of Chicago, 1978.

YANG, R. C.; YEH, F. C. Genetic consequences of in situ and ex situ conservation of forest trees. **The Forestry Chronicle**, v. 68, n. 6, p. 720-729, 1992. DOI: <https://doi.org/10.5558/tfc68720-6>

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. POPGENE. **Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis**. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta. 1999.

ZORTÉA, K. E. M. **Aspectos Reprodutivos, Caracterização Molecular e Relações Filogeográficas em Populações de Cambará (*Vochysia Divergens* Pohl.) Nativas dos Biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal, Brasil**. 2022. 140 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, 2022.

ZORTÉA, K. É. M.; ROSSI, A. A. B.; SANDER, N. L.; SILVA, C. J. Transferibilidade de marcadores microssatélites de *Vochysia ferrugínea* Mart. para *Vochysia divergens* Pohl. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.3, p. 24014-24026, 2021.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os extratos aquosos do tipo infuso e decocto da casca do caule de *V. divergens* nas concentrações testadas, apresentaram efeito tóxico, citotóxico e genotóxico em células de *Allium cepa*. O extrato aquoso infuso é o mais recomendado para utilização como fitoterápico, pois causou menos alterações na divisão celular, apresentando um menor risco a saúde.

As populações naturais de *V. divergens* avaliadas no Pantanal mato-grossense apresentam diversidade genética, sendo a população Transpantaneira (TPR) a que apresentou o maior número de alelos raros e exclusivos e é considerada uma população com prioridade para a conservação.

O maior componente de variação foi encontrado dentro das populações, sendo recomendado a conservação *in situ* de indivíduos de cada uma das populações estudadas, com intuito de possibilitar a manutenção da diversidade genética e conservação da espécie.

O baixo fluxo gênico e a diferenciação genética encontrada entre as populações, podem estar relacionados a processos de retração e expansão decorrentes da inundação, fogo e fatores edáficos que ocorrem no Pantanal mato-grossense.