



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Estimativas Genéticas em *Croton linearifolius* MULL. ARG.
(Euphorbiaceae) por Meio de Marcadores Moleculares

Thalana Souza Santos Silva

Itapetinga - Bahia
Fevereiro - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Estimativas Genéticas em *Croton linearifolius* MULL. ARG.
(Euphorbiaceae) por Meio de Marcadores Moleculares

Autora: Thalana Souza Santos Silva
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaína Silva Freitas
Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento”

Itapetinga - Bahia
Fevereiro - 2016

583.69
S584e

Silva, Thalana Souza Santos.

Estimativas genéticas em *Croton linearifolius* MULL. ARG. (Euphorbiaceae) por meio de marcadores moleculares. / Thalana Souza Santos Silva. – Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2016.
81 fl.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga, BA. Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento. Sob a orientação da Prof^ª. D. Sc. Janaína Silva Freitas; co-orientador Prof. D. Sc. Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva.

1. *Croton linearifolius* – Diversidade genético-molecular. 2. *Croton linearifolius* – Manejo e conservação. 3. *Croton linearifolius* – Produção de mudas – Caatinga I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. II. Freitas, Janaína Silva. III. Cerqueira-Silva, Carlos Bernard Moreno. IV. Título.

CDD(21): 583.69

Catálogo na fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB/5-1014
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. *Croton linearifolius* : Diversidade genético-molecular
2. *Croton linearifolius* : Manejo e conservação
3. *Croton linearifolius* : Produção de mudas
4. Euphorbiaceae: Marcadores moleculares

AGRADECIMENTOS

É com o coração repleto de alegria que findo mais uma etapa. Sinto um gosto especial de vitória, de dever cumprido e, ao mesmo tempo, o revelar de novas possibilidades. Durante esta caminhada fui agraciada por pessoas que tornaram essa conquista possível.

Ao amado Deus, minha constante e eterna gratidão, por ter tornado meus ombros mais fortes, quando as rotinas de trabalho e de estudo pareciam um fardo pesado demais.

Aos meus pais Dermeval e Neurides, e irmãs Crisley e Thalane, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

Ao meu amor Kaique, meu grande incentivador, pela força nos momentos de desânimo, pela compreensão e paciência, e por sempre apoiar os meus sonhos.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Janaína S. Freitas, pela oportunidade e confiança, e pela contribuição ao trabalho, bem como, pelo incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Carlos Bernard M. Cerqueira-Silva, pela disponibilidade e participação em todas as etapas do trabalho e por todo o conhecimento compartilhado.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular Aplicada, em especial ao colega Tarcísio, pelos momentos de convivência agradáveis e contribuições para realização dos experimentos.

Ao professor Msc. Murilo Marques Scaldaferrri, pelo auxílio nas atividades no laboratório.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, pelos momentos de aprendizagem e amizade.

As professoras Dr^a. Elisa S. Lisboa dos Santos, Dr^a. Gabriele Marisco e Dr^a. Melina Cristina Mancini, pelo aceite em participar das bancas avaliadoras e pelas contribuições e correções preciosas ao trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao programa de pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

Dentre as espécies vegetais com ocorrência no bioma Caatinga, várias apresentam importância enquanto recurso natural, sendo utilizadas pela população para diversos fins. Nesse contexto destaca-se o gênero *Croton* L. que, com cerca de 1.200 espécies, constitui o segundo maior da família Euphorbiaceae. Muitos representantes do gênero são conhecidos pelo potencial medicinal e/ou inseticida, a exemplo de *Croton linearifolius*, espécie endêmica do Brasil, a qual apresenta atividade inseticida comprovada contra o *Aedes aegypti*. No entanto, apesar de diversas espécies do gênero *Croton* apresentarem importância ecológica e potencial econômico, são incipientes estudos do gênero sob diversos aspectos, sobretudo às publicações embasadas em dados genéticos. Neste contexto, o conhecimento da diversidade e estrutura genética de espécies que apresentam potencial enquanto recurso natural é uma prerrogativa para elaboração de estratégias de conservação e de manejo sustentável. Tendo em vista o exposto, objetivou-se com esse trabalho, apresentar um panorama do conhecimento disponível sobre os estudos genético-moleculares para as espécies de *Croton*, bem como estimar a diversidade e estrutura genética em 61 indivíduos de *C. linearifolius* coletados em 3 regiões na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA) no município de Contendas do Sincorá - Bahia, adotando-se para tanto a análise do perfil de amplificação de marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). A partir das buscas realizadas nas bases de dados de publicações científicas (NCBI, Scopus, SciELO), foi possível identificar uma lacuna em diversos âmbitos do conhecimento acerca do gênero *Croton*, sobretudo às publicações com dados genéticos e moleculares. As estimativas de diversidade e estrutura genética de *C. linearifolius*, realizadas a partir da análise do perfil de amplificação de nove combinações de pares de *primers* RGA e oito *primers* ISSR geraram um total de 134 marcas (81,3% polimórficas), com médias de 7,6 e 8,1 marcas obtidas com os marcadores RGA e ISSR, respectivamente. A análise Bayesiana indicou como mais provável uma estruturação em dois pools gênicos (escore de Delta K=1400) e possível sub-estruturação de três pools gênicos (escores de Delta K~400). Com base na análise molecular de variância (AMOVA) foi possível verificar uma quantidade significativa (36%) ($p_{rand} < 0,01$) de variação entre as regiões, o que indica estruturação genética entre elas, resultado que foi corroborado com a Análise de coordenadas principais (PCoA), indicando associação com a distribuição geográfica das regiões de coleta. Os prováveis mecanismos de polinização por insetos e dispersão primária autocórica com dispersão secundária por formigas, justificariam a estruturação genética observada para *C. linearifolius* entre as regiões de coleta. Os resultados obtidos nesse estudo contribuem com o conhecimento genético-molecular da espécie *C. linearifolius*, o que pode auxiliar nas estratégias aplicadas ao seu manejo e conservação.

Palavras-chave: Caatinga; RGA; ISSR; *Croton*; Velame pimenta.

ABSTRACT

Among the plant species occurring in the Caatinga, several present importance as a natural resource and they are used by the population for various purposes. In this context we highlight the genus *Croton* that, with about 1,200 species, is the second largest in the Euphorbiaceae family. Many representatives of the genus are known for medicinal potential and / or insecticide, like *Croton linearifolius*, endemic species from Brazil, which has proven insecticidal activity. However, despite several species of the genus *Croton* present ecological importance and economic potential, are incipient the genus studies in several aspects, particularly the informed publications on genetic data. In this context, knowledge of the genetic diversity and structure of species with potential as a natural resource is a prerogative for the development of conservation and sustainable management strategies. The aim of this work is to present an overview of current knowledge on the molecular-genetic studies for the species of *Croton*, and to estimate the genetic diversity and structure in 61 individuals of *C. linearifolius* collected in three regions Contention of the National Forest Sincorá (FLONA) in municipality Contendas of Sincorá - Bahia, adopting for both the amplification profile analysis of RGA markers (Resistance Gene Analogs) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). From the searches conducted in the scientific literature databases (NCBI, Scopus, SciELO), it was possible to identify a gap in various fields of knowledge of the *Croton* genus, especially to publications with genetic and molecular data. Estimates of genetic diversity and structure of the 61 individuals of *C. linearifolius* were taken from the profile analysis amplification of nine combinations of pairs of primers RGA and eight ISSR primers selected previously. They generated a total of 134 marks (81.3% polymorphic), with averages of 7.6 and 8.1 marks obtained with RGA and ISSR markers, respectively. The Bayesian analysis indicated as most likely structure in two gene pools (Delta score $K=1400$) and possible sub-structuring of three gene pools (scores of Delta $K\sim 400$). Based on analysis molecular of variance (AMOVA) observed a significant amount (36%) (p rand <0.01) variation between regions indicating genetic structure between them, a result that is corroborated by the Principal Coordinate Analysis (PCoA), suggesting an association with the geographical location of collection regions. The likely mechanisms of pollination by insect and primary dispersion autochoric with secondary dispersal by ants, justify the genetic structure observed for *C. linearifolius* between regions collection. The results of this study contribute to the molecular genetic knowledge of the species *C. linearifolius*, which can assist in the strategies applied to their management and conservation.

Keywords: Caatinga; RGA; ISSR; *Croton*; *Velame pimenta*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
CARACTERIZAÇÃO DO BIOMA CAATINGA	3
O GÊNERO <i>Croton</i> L. (EUPHORBIACEAE).....	5
<i>Croton linearifolius</i> MULL. ARG.	5
DIVERSIDADE GENÉTICA.....	7
MARCADORES GENÉTICO – MOLECULARES	9
MARCADORES RGA (<i>Resistance Genes Analogs</i>).....	10
MARCADORES ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>)	12
CAPÍTULO I.....	14
Genética e Biologia Molecular Aplicadas em Estudos do Gênero <i>Croton</i> (Euphorbiaceae): Contribuições e Perspectivas para a Caracterização da Biodiversidade	14
CAPITULO II.....	35
Diversidade e estrutura genética em populações naturais de <i>Croton linearifolius</i> (Euphorbiaceae) estimadas com o uso de marcadores moleculares	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	

INTRODUÇÃO GERAL

O bioma Caatinga ocupa grande extensão do território brasileiro e apesar de representar a única região natural exclusiva do Brasil, constitui um bioma relativamente pouco estudado e protegido. Não há estimativas exatas sobre o número de espécies vegetais e animais que compõe o bioma, uma vez que 50% da região ainda não foi investigada em levantamentos de biodiversidade (SANTOS, *et al.*, 2011). Aliado a esse fator, as estratégias de proteção são incipientes, com aproximadamente 8% do território protegido por unidades de conservação (MMA, 2015).

O cenário apresentado é preocupante, tendo em vista que a Caatinga abriga uma população humana, em sua maioria, dependente dos recursos naturais disponíveis, com ênfase em plantas para diversos fins, incluindo alimentos, fitoterápicos e fontes energéticas (DRUMOND *et al.*, 2000). O uso em maior escala baseia-se, essencialmente, no extrativismo de espécies nativas e, devido à falta de informações que orientem o manejo dessas espécies, pode acarretar na redução da biodiversidade (VALLE *et al.*, 2013).

Nesse contexto destaca-se o gênero *Croton* L. que, com cerca de 1.200 espécies, constitui o segundo maior e mais diverso da família Euphorbiaceae, destas estima-se que aproximadamente 82 ocorram na vegetação da Caatinga (CORDEIRO *et al.*, 2015). Muitos representantes do gênero são empregados pela população por possuírem propriedades farmacológicas e/ou inseticidas, a exemplo de *Croton linearifolius*, espécie endêmica do Brasil, a qual apresenta potencial inseticida comprovado (SILVA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014).

Em detrimento da importância ecológica e do potencial econômico, os estudos sobre *C. linearifolius* são incipientes em diversos âmbitos, principalmente as publicações embasadas em dados genético-moleculares. O conhecimento da diversidade e estrutura genética de espécies que apresentam potencial enquanto recurso natural é uma prerrogativa para elaboração de estratégias de manejo sustentável e de conservação dos recursos genéticos. Para tanto, ferramentas da biologia molecular, sobretudo os marcadores moleculares, têm sido empregados para identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos, a exemplo dos marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Esses marcadores são amplamente utilizados, pois não requerem informações prévias sobre o genoma das espécies a serem avaliadas e possuem, devido ao tamanho dos iniciadores, maior reprodutibilidade que outros marcadores dominantes, a exemplo dos marcadores RAPD, além

de serem baseados em plataforma PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), o que torna a técnica automatizada e de fácil execução (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Diante desse contexto, objetivou-se com a realização dessa pesquisa apresentar um panorama do conhecimento disponível sobre os estudos genético-moleculares para as espécies do gênero *Croton*, bem como estimar a diversidade e estrutura genética em 61 indivíduos de *C. linearifolius* coletados na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA) no município de Contendas do Sincorá - Bahia, adotando-se para tanto a análise do perfil de amplificação dos marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

Na busca dos objetivos traçados, a dissertação está organizada em dois capítulos correspondentes as etapas de cunho prático, estando estes formatados segundo as normas específicas das revistas científicas para as quais os mesmos serão submetidos. Todos os quesitos da dissertação refletem as normas estabelecidas pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/Campus de Itapetinga. Portanto, itens como Resumo, Abstract e Introdução Geral precedem aos capítulos.

No capítulo 1, com pretensão de submissão ao periódico *African journal of Biotechnology*, é apresentado um panorama atual do conhecimento genético-molecular disponível na literatura acerca do gênero *Croton*, no qual são apontadas as principais lacunas e perspectivas em relação às ferramentas genético-moleculares disponíveis e sua aplicação na compreensão do gênero com vistas a conservação e manejo dessas espécies.

Por sua vez, no capítulo 2, com pretensão de submissão ao periódico *Genetics and Molecular Research*, são apresentados os resultados obtidos a partir da análise do perfil de amplificação de combinações de pares de *primers* RGA (*Resistance Gene Analogs*) e *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), para caracterização da diversidade e estrutura genética de populações naturais de *C. linearifolius* presentes na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA) no município de Contendas do Sincorá-Bahia, Brasil. Ao final são expostas as considerações finais sobre o trabalho realizado.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CARACTERIZAÇÃO DO BIOMA CAATINGA

Não existe consenso sobre sua área de abrangência, mas admite-se que o bioma Caatinga cubra aproximadamente 844.453 km² do território brasileiro (IBGE, 2004). Sua área corresponde a 11% do território brasileiro, englobando parte dos territórios pertencentes aos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Sergipe, Bahia e de Minas Gerais (ALVES *et al.*, 2009).

O clima, na maior parte da extensão do bioma Caatinga é quente e semi-árido, fortemente sazonal, com temperaturas variando entre 25°C e 30°C; elevada evapotranspiração potencial (1500-2000 mm/ano), com baixas precipitações anuais (300-1000 mm/ano) (VELLOSO *et al.*, 2002; SAMPAIO, 2010). Na Caatinga é possível identificar dois períodos anuais, caracterizados por um com longo déficit hídrico seguido de chuvas intermitentes e outro com seca curta seguida de chuvas torrenciais, provocando periodicamente a ocorrência de secas prolongadas (SOARES e ALMEIDA, 2011).

Embora a área seja cortada por uma razoável rede hidrográfica, grande parte desses rios são intermitentes ou sazonais, ocorrendo apenas em época de chuva. As regiões hidrográficas inclusas no Bioma Caatinga são: São Francisco, Parnaíba, Atlântico Nordeste Oriental e Atlântico Leste (FRANCA-ROCHA *et al.*, 2007).

O solo da região semi-árida tem uma distribuição espacial complexa, com a formação de um mosaico muito retalhado e com tipos muito diferentes em relação a composição e fertilidade (VELLOSO *et al.*, 2002). De forma geral, o solo é raso, rico em minerais, mas pobre em matéria orgânica, já que a decomposição da mesma é prejudicada pelo calor e a luminosidade que são intensos durante quase todo o ano na Caatinga (ALVES *et al.*, 2009).

Apesar da Caatinga ocupar grande extensão do território brasileiro e de representar a única região natural exclusiva do país, o bioma é proporcionalmente o menos estudado e protegido entre as regiões naturais brasileiras (LEAL *et al.*, 2003). O número real de espécies que compõem a Caatinga não está totalmente elucidado, uma vez que 50% da região têm sido negligenciada em levantamentos de biodiversidade (SANTOS *et al.*, 2011). Embora subestimada, o bioma possui uma rica biodiversidade e altos índices de endemismo (LEAL *et al.*, 2003).

Em relação à fauna, já foram registradas 148 espécies de mamíferos (10 endêmicas), 348 espécies de aves (23 endêmicas), 154 de répteis e anfíbios (15% endêmicas) e 185 tipos de peixes (57,3% endêmicas) (GARIGLIO *et al.*, 2010).

Os contrastes físicos e climáticos condicionam o aparecimento de diferentes tipos de formações vegetais (GIULIETTI *et al.*, 2004). É possível encontrar desde áreas de vegetação arbustiva baixa e rala até florestas impenetráveis, atingindo 8 metros de altura. Em termos de número de espécies vegetais, foram registradas aproximadamente 5.218 espécies de plantas terrestres sendo 748 espécies consideradas endêmicas para o bioma (FORZZA *et al.*, 2012).

Uma explicação para esse alto índice de endemismo deve-se ao fato de que a grande maioria das espécies dessa região apresenta estratégias de adaptação frente às intensas pressões ecológicas que esse ambiente sofre (PRADO, 2003). A presença de espécies microfilas e decíduas além de adaptações como espinhos, acúleos, folhas e caules suculentos e o predomínio de ervas anuais, são características marcantes da vegetação adaptadas ao clima característico desse bioma (ZAPPI, 2008).

A Caatinga abriga uma população humana que em sua maioria apresenta grande dependência de recursos naturais, com a utilização de plantas para diversos fins, incluindo alimentos, fitoterápicos e fontes energéticas. Regiões de maior dependência de recursos naturais e atividade extrativista são acompanhados de perda visível da biodiversidade, devido à extração insustentável (ALVES *et al.*, 2009).

Estimativas indicam que até 2010, 36,8% da cobertura vegetal nativa da Caatinga havia sido suprimida como consequência das atividades antrópicas (BEUCHLE *et al.*, 2015). O cenário apresentado é preocupante, tendo em vista que o desmatamento está avançando sobre as áreas remanescentes de Caatinga. Essa dinâmica demonstra a necessidade de implementar ações efetivas para coibir o desmatamento e para fomentar a conservação e o uso sustentável do bioma, melhorando a qualidade de vida de seus habitantes (RAPINI *et al.*, 2006; MMA, 2011).

Em relação às estratégias de proteção, a Caatinga constitui um dos biomas menos protegido no Brasil, com apenas 157 unidades de conservação, aproximadamente 7,7% do território, e 33 áreas (menos de 2% da região) de proteção integral (MMA, 2015). Aliado a isso o bioma continua passando por um extenso processo de alteração e deterioração ambiental, provocada pelo uso insustentável dos seus recursos naturais, o que tem levado à rápida perda de espécies endêmicas, à eliminação de processos ecológicos chaves e à formação de extensos núcleos de desertificação em vários setores da região (LEAL *et al.*, 2003).

O GÊNERO *Croton* L. (EUPHORBIACEAE)

Croton linearifolius MULL. ARG.

O gênero *Croton* L. com aproximadamente 1.200 espécies é o segundo maior e mais diverso da família Euphorbiaceae, com a maioria dos seus representantes distribuídos nas regiões tropicais, predominantemente no continente Americano (BERRY *et al.*, 2005). Com cerca de 350 espécies, o Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero, que está representado nos mais variados ambientes e tipos vegetacionais (Figura 1), havendo uma maior concentração de espécies nas regiões Sudeste (156) e Nordeste (120) do país. A Bahia é o estado da região nordeste que congrega o maior número de espécies (99). No bioma Caatinga estima-se a ocorrência de aproximadamente 82 espécies (BERRY *et al.* 2005; CARNEIRO-TORRES, 2009; CORDEIRO *et al.*, 2015).

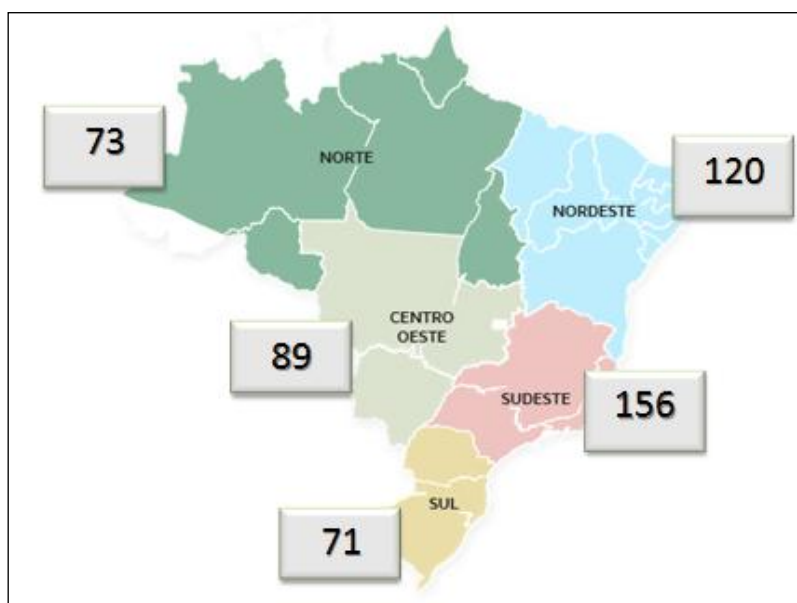


Figura 1. Quantitativo de espécies do gênero *Croton* L. nas regiões do Brasil. Informações obtidas na Lista de Espécies Flora do Brasil: <http://reflora.jbrj.gov.br/>

As espécies de *Croton* apresentam uma composição química diversa, tais como, terpenos, esteróides, alcalóides, e compostos fenólicos (SALATINO *et al.*, 2007), característica que tem despertado um crescente interesse acadêmico e econômico sobre as propriedades químicas e/ou farmacológicas do gênero. Na região Nordeste do Brasil espécies do gênero *Croton* são empregadas pela população por seus diferentes usos potenciais. Dentre as espécies com aplicação medicinal, algumas apresentam atividades biológicas comprovadas, tais como, *C. regelianus* (antitumoral) (BEZERRA *et al.*, 2009); *C. zehntneri* (antimalárica)

(MOTA *et al.*, 2012); *C. campestris* (antiulcerogênico gástrico) (JÚNIOR *et al.*, 2014); *C. pulegioides* (antimicrobiana) (ARRAIS *et al.*, 2014); *C. cordifolius* (antinociceptivo) (NOGUEIRA *et al.*, 2015).

Dentre as espécies com ocorrência no bioma Caatinga, destaca-se *Croton linearifolius*, conhecida popularmente como velame pimenta, a espécie é considerada rica em diversos compostos químicos que tem despertado o interesse dos pesquisadores pelas suas propriedades biológicas (SILVA *et al.*, 2010; FELIU, 2011, SILVA *et al.*, 2014). *C. linearifolius* foi citada por seu efeito inseticida em um levantamento etnobotânico, realizado no município de Contendas do Sincorá, na Bahia. Em prospecção fitoquímica realizada a partir do extrato etanólico de *C. linearifolius* foi observada a presença de alcalóides, esteróides, flavonóides, taninos, açúcares redutores e bases quaternárias (SILVA *et al.*, 2010). Nesse estudo foi demonstrado que a espécie possui atividade inseticida sobre indivíduos adultos de *Cochliomyia macellaria*. O extrato obtido do caule de *C. linearifolius* também revelou o potencial larvicida contra *Aedes aegypti* (SILVA *et al.*, 2014).

A espécie *C. linearifolius* é endêmica do Brasil, abrange o norte de Minas Gerais, Piauí, sul do Tocantins, com maior representatividade no estado da Bahia. Há registros de ocorrência em Caatingas arbustivas e Cerrados, sobre solo arenoso, entre 200 e 750 metros de altura s.n.m. (CARNEIRO-TORRES, 2009; CORDEIRO *et al.*, 2015).

A espécie *C. linearifolius* (Figura 2) possui hábito arbustivo e pode medir até 2 metros de altura, são monóicas, com folhas lanceoladas e discoloradas, inflorescências racemos bissexuados, com flores estaminadas alvas a esverdeadas (2,0-3,5 mm comprimento) e flores pistiladas creme-esverdeadas (2,0-4,0 mm comprimento). Os frutos são deiscentes e apresentam-se como capsulas tricocas, com 4,5 mm de comprimento e 4,0 mm de largura. As sementes medem cerca de 4,0 mm de comprimento e 2,5 mm de largura, com coloração castanha e levemente rugosa (LIMA e PIRANI 2008).

Algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas acerca da espécie *C. linearifolius*, a exemplo de estudos relacionados com a anatomia (BRITO *et al.*, 2011), taxonomia (CARNEIRO-TORRES, 2009; LIMA e PIRANI, 2008), prospecção química (FELIU, 2011; BRITO, 2014) e genético-moleculares (SCALDAFERRI, 2013; SCALDAFERRI *et al.*, 2013, 2014; ROCHA, 2015; ROCHA *et al.*, 2016). No entanto, em detrimento da importância ecológica e do potencial enquanto recurso natural, os estudos em diversos âmbitos são escassos para *C. linearifolius*, sobretudo os estudos genético-moleculares, o que pode prejudicar o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação que possam auxiliar em seu uso sustentável.



Figura 2. Detalhe da inflorescência de *Croton linearifolius*. Fonte: Acervo pessoal.

DIVERSIDADE GENÉTICA

A diversidade biológica pode ser definida como a variação presente em todas as espécies de plantas e animais, em seu material genético e nos ecossistemas em que eles incidem; podendo ocorrer em três níveis: diversidade genética (variação de genes e genótipos), de espécies (riqueza de espécies) e ecossistemas (comunidades de espécies e seu ambiente) (RAO e HODGKIN, 2002).

Dentre os diferentes níveis hierárquicos de biodiversidade, a diversidade genética destaca-se em nível de importância, uma vez que constitui a base do processo evolutivo das espécies. A diversidade genética pode ser definida como toda variação biológica hereditária acumulada durante o processo evolutivo e que pode ser gerada, principalmente, nos processos de mutação na sequência nucleotídica durante a replicação do DNA. Quando esta variação

ocorre entre indivíduos da mesma espécie, chama-se de diversidade intraespecífica, e quando ela ocorre entre espécies, denomina-se diversidade interespecífica (SANTOS *et al.*, 2009).

Diversos fatores podem afetar diretamente o grau e a distribuição (estrutura) da diversidade genética entre e dentro de populações de plantas. Os principais eventos que podem atuar na ampliação da diversidade genética são a mutação e o fluxo gênico, entre populações. Outros aspectos como, deriva genética, endogamia e seleção natural podem afetar as populações diminuindo a sua diversidade genética (NEI, 1987).

Os mecanismos de dispersão que podem ocorrer, tanto via pólen quanto via sementes são muito importantes, pois podem modelar a composição e a estrutura genética das populações de plantas (DOW e ASHLEY, 1998). O fluxo gênico, que consiste na troca de genes entre populações, pode atuar na homogeneização da variação genética espacial, por promover a conectividade genética entre as populações (HAMRICK e NASON, 1996). Os polinizadores e agentes dispersores de sementes que apresentem efetiva dispersão a longas distâncias diminuem a probabilidade de ocorrer diferenciação geográfica entre populações, enquanto a dispersão em distâncias restritas tem efeito contrário, promovendo a estruturação genética populacional (LOVELESS e HAMRICK, 1984).

Os fatores acima relacionados são ainda mais atuantes em populações subdivididas e com ocorrência em ambientes fragmentados. O fluxo gênico nessas áreas é restrito, o que pode levar a endogamia e deriva genética, reduzindo a diversidade genética e comprometendo o potencial adaptativo das espécies (YOUNG *et al.*, 1996; KELLER e WALLER, 2002).

Características intrínsecas à espécie tais como o sistema reprodutivo (autogamia ou alogamia) e a morfologia floral (monóicas, dióicas ou hermafroditas) também são determinantes para a compreensão da estrutura genética nas populações naturais. Espécies preferencialmente alógamas, tendem a apresentar alta diversidade dentro de populações e pouca variação interpopulacional, por outro lado, as espécies autógamias possuem níveis reduzidos de variação dentro das populações e maior entre populações (CAVALLARI, 2004).

No âmbito das ações de manejo e conservação da biodiversidade, o conhecimento da composição genética de uma espécie, e de como ela está organizada (estruturada) em suas populações, torna-se fundamental. Isto porque é através da variação genética disponível que os organismos podem responder às possíveis mudanças ambientais, mantendo sua capacidade de adaptação e garantindo sua sobrevivência e reprodução ao longo do tempo (FLEISHMAN *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2001).

Neste sentido, muitos programas de conservação de plantas visam manter os níveis existentes de variabilidade genética, evidenciando a importância de estudos genético-

moleculares para a conservação e melhoramento de espécies (JAMES e ASHBURNER, 1997). Os dados gerados nesses estudos podem ser utilizados para definir unidades de conservação e prioridades para o manejo de recursos genéticos, indicar áreas e populações de maior ou menor importância para a preservação das espécies de interesse e dessa forma permitir o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação (CAVALLARI, 2004).

A composição de coleções *ex situ* para fins conservacionistas pode ser um exemplo de aplicação das informações disponíveis sobre a distribuição genética em uma população. Tendo em vista as limitações de ordem prática e financeira, as amostras a serem preservadas devem representar ao máximo o padrão de distribuição da diversidade genética de uma população. Em populações uniformes e conectadas por fluxo gênico, não é necessário amostragem de todas as populações, no entanto, um maior número de populações deve ser representado quando as mesmas estão estruturadas em subpopulações (CAVALLARI, 2004).

A avaliação da diversidade genética dentro e entre populações pode ser realizada por meio da utilização de diferentes técnicas. Os avanços das técnicas de biologia molecular abriram novas perspectivas para pesquisas em conservação de espécies, permitindo avaliação da diversidade genética diretamente ao nível de DNA, livre de influências do ambiente ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado (LACERDA *et al.*, 2001).

MARCADORES GENÉTICO – MOLECULARES

Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM, 1997). Dentre os marcadores genéticos, destacam-se os moleculares, que trata-se de todo e qualquer fenótipo molecular de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Os marcadores moleculares são caracterizados por meio das diferenças genéticas em nível de DNA, que são determinadas por mutações pontuais, gerando desse modo, os polimorfismos de DNA que podem ser acessados por várias técnicas. Ferreira e Grattapaglia (1998) relatam que o polimorfismo gerado pode ser quantificado e qualificado, a depender da técnica utilizada, sendo o seu comportamento verificado através das leis clássicas mendelianas.

Dentre as principais vantagens que os marcadores moleculares apresentam destacam-se a obtenção praticamente ilimitada de polimorfismos genéticos que podem ser detectados

em qualquer estágio de desenvolvimento de uma planta ou até mesmo em cultura de células ou tecidos; além da identificação do genótipo sem influência do ambiente (FALEIRO, 2007).

Quando aplicados na investigação de plantas, os marcadores moleculares têm sido úteis para orientar a coleta de material genético com a finalidade de conservação *ex situ*, definir o tamanho mínimo de área para conservação *in situ*, descrever a organização da variação genética em populações naturais e conhecer a magnitude da diversidade genética da espécie e das populações (SCHNEIDER *et al.*, 2003), entre outros aspectos.

As diferentes tecnologias genético-moleculares apresentam vantagens e limitações, que compreendem desde a infraestrutura disponível, requisitos técnicos e de custos, o nível de conhecimento genético da espécie de interesse, bem como os tipos de dados que as diferentes técnicas podem gerar e nos níveis taxonômicos em que eles podem ser mais adequadamente aplicados (KARP *et al.*, 1996; FALEIRO, 2007).

Existe uma ampla gama de marcadores moleculares empregados no estudo de diferentes organismos e com diversos objetivos de pesquisa. É possível citar tanto marcadores dominantes (*Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD, Inter Simple Sequence Repeat - ISSR, Resistance Genes Analogs - RGA, Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP*), quanto marcadores co-dominantes (*Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP, Simple Sequence Repeats - SSR, single nucleotide polymorphism - SNP*).

MARCADORES RGA (*Resistance Genes Analogs*)

As plantas são constantemente desafiadas em seus ambientes naturais por um amplo espectro de agentes abióticos e bióticos, incluindo vírus, bactérias, fungos, nematóides, protozoários e parasitas. No curso da evolução, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa, incluindo estruturas pré-existentes, como cutículas e pêlos (barreiras físicas contra o patógeno), a produção de enzimas, como quitinases e glucanases (substâncias inibidoras) e o reconhecimento específico do patógeno pela planta hospedeira (AGRIOS, 1997).

A reação de hipersensibilidade (HR; *Hipersensitive Response*) consiste no principal mecanismo utilizado pelas plantas para se defenderem contra o ataque de patógenos (BONAS e LAHAYE, 2002). Essa reação é desencadeada pela “ativação” de um gene de resistência (*R*) e caracterizada por morte celular rápida e localizada impedindo que o patógeno se espalhe colonizando o organismo (MEYERS *et al.*, 2005). Posteriormente esses eventos podem desencadear uma resposta generalizada com longa duração, prolongando-a de forma sistêmica

e atuando mesmo longe da infecção (SAR – Resistência Sistêmica Adquirida) (SANTOS, 2011).

Os genes de resistência, caracterizados em muitas plantas, possuem regiões filogeneticamente conservadas, denominadas motivos, os quais podem incluir regiões ricas em leucina (LRR – *Leucine Rich Repeats*), sítios de ligação a nucleotídeos (NBS – *Nucleotide Binding Sites*), estruturas complexas de NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site Leucine Rich Repeat*) e proteínas quinases (STASKAWICZ *et al.*, 1995; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1997).

O domínio NBS-LRR em plantas possui sua função associada com a resistência a doenças, frequentemente manifestada como uma resposta de hipersensibilidade. Neste sentido, NBS-LRR, age nos caminhos de transdução de sinal que opera em resposta ao ataque dos patógenos, gerando como resposta a morte celular programada. O domínio LRR é o responsável primário pelo reconhecimento, ou seja, atua como guarda da maquinaria celular que é susceptível ao ataque de patógenos (JONES e DANGL, 2006).

Segundo Bent (1996) a presença de segmentos que dispõem de sequências similares dentro de um conjunto de genes bastante polimórficos sugere que essas regiões conservadas representam sítios de relevante importância biológica envolvidos na função geral dos genes de resistência e/ou na regulação da expressão fenotípica desses genes. Assim, as regiões conservadas dentro desses domínios permitem a geração de marcadores moleculares, pois favorecem o desenvolvimento de *primers* que acessem regiões análogas a genes de resistência (RGA).

Os marcadores RGA podem ser amplificados por meio da técnica de PCR e/ou usando informações genômicas e, então, mapeados geneticamente. Quando um RGA se relaciona a um *locus* de resistência previamente definido, sua funcionalidade pode ser testada. Essa etapa geralmente é realizada para determinar se um gene candidato pode conferir resistência quando expresso como um transgene em uma linhagem que é, normalmente, suscetível à doença (HULBERT *et al.*, 2001).

Os primeiros trabalhos que relataram o uso de sequências conservadas entre genes de resistência, para identificar sequências similares em outras espécies foram realizados por Kanazin *et al.* (1996), Yu *et al.* (1996) e Leister *et al.* (1996). Os autores supracitados desenvolveram independentemente a estratégia baseada na amplificação com *primers* desenhados a partir das regiões conservadas nos domínios, o que possibilitou isolar numerosos análogos de genes de resistência.

Após esses trabalhos iniciais descrevendo a técnica RGA, esta tem sido aplicada na investigação de diversas espécies vegetais e para diferentes fins (Figura 3), tais como caracterização e diversidade genética (JUANSHENG *et al.*, 2013; PAULA *et al.*, 2010), filogenia (PAN *et al.*, 2000), mapeamento genético (MILLER *et al.*, 2008; SCHEJBEL *et al.*, 2008) e genética de populações (DIAZ e FERRER, 2003). Apesar dos estudos com RGA em várias espécies vegetais, relatos sobre a identificação e utilização desta classe de marcadores para o gênero *Croton* ainda são inexistentes.

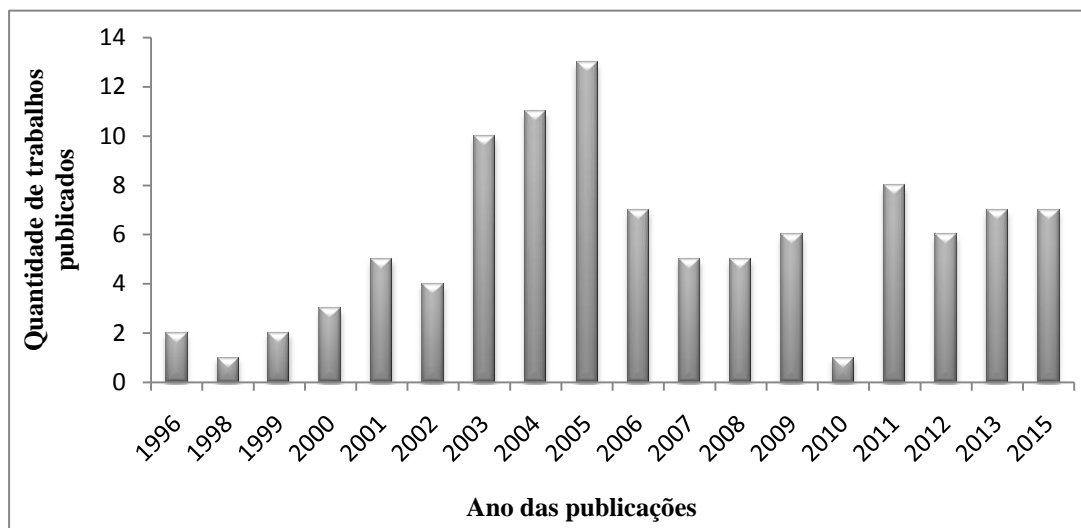


Figura 3. Quantitativo de artigos científicos publicados por ano com a aplicação dos marcadores RGA (*Resistance Genes Analogs*) em diferentes espécies vegetais. Dados obtidos a partir da busca em bases de dados de publicações científicas (NCBI e SciELO) com as palavras chave: RGA (*Resistance Genes Analogs*); RGAs “plants”; RGAs “plantas”.

MARCADORES ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

Os marcadores moleculares ISSR caracterizam-se como uma técnica simples, rápida e eficiente. Dentre as vantagens da técnica destaca-se a pequena demanda de quantidade de DNA por reação, além de requerer pouca infraestrutura de equipamentos para execução dos experimentos. Esses marcadores foram desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites, abundantes no genoma eucarioto, sem a utilização de sequenciamento prévio do DNA da espécie de interesse (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994).

Os marcadores ISSR são obtidos por amplificação via PCR (*Reaction Chain Polymerase*) com a utilização de *primer* único, constituídos de sequências repetidas de di ou trinucleotídeos (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). O iniciador utilizado pode ou não estar

ancorado, sendo a condição ancorado mais frequente, com um a quatro bases ancoradas na posição 5' e 3' do iniciador, dentro das sequências flanqueadas (REDDY *et al.*, 2002).

Os produtos amplificados correspondem a uma sequência de DNA, presente entre duas regiões idênticas de microssatélites, orientadas em direções opostas (REDDY *et al.*, 2002). O tamanho dos produtos amplificados são geralmente de 200-2000 pb (pares bases) de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade, possivelmente devido ao uso de iniciadores longos (formados por mais de 10 pb) e de altas temperaturas de anelamento. A limitação dessa classe de marcadores está relacionada ao fato de serem dominantes, o que impossibilita a distinção entre os genótipos heterozigotos e homozigotos (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994).

Os marcadores ISSR já foram empregados em estudos prévios de diversidade genética em espécies do gênero *Croton* a exemplo de *C. linearifolius* (SCALDAFERRI, 2013), *C. heliotropiifolius*, *C. blanchetianus* e *C. pedicellatus* (LIRA- NETO, 2011), *C. cajucara* (ANGELO *et al.*, 2006) e *C. heliotropiifolius* (ROCHA *et al.*, 2016). Essa técnica também tem sido aplicada para a investigação de inúmeras espécies de plantas e com diferentes finalidades (Figura 4), tais como caracterização da diversidade genética com vistas a conservação (QIAN *et al.*, 2014; GONZÁLEZ-LÓPEZ *et al.*, 2014) e melhoramento genético (LIMA *et al.*, 2015) e Filogenia (JOSHI *et al.*, 2000).

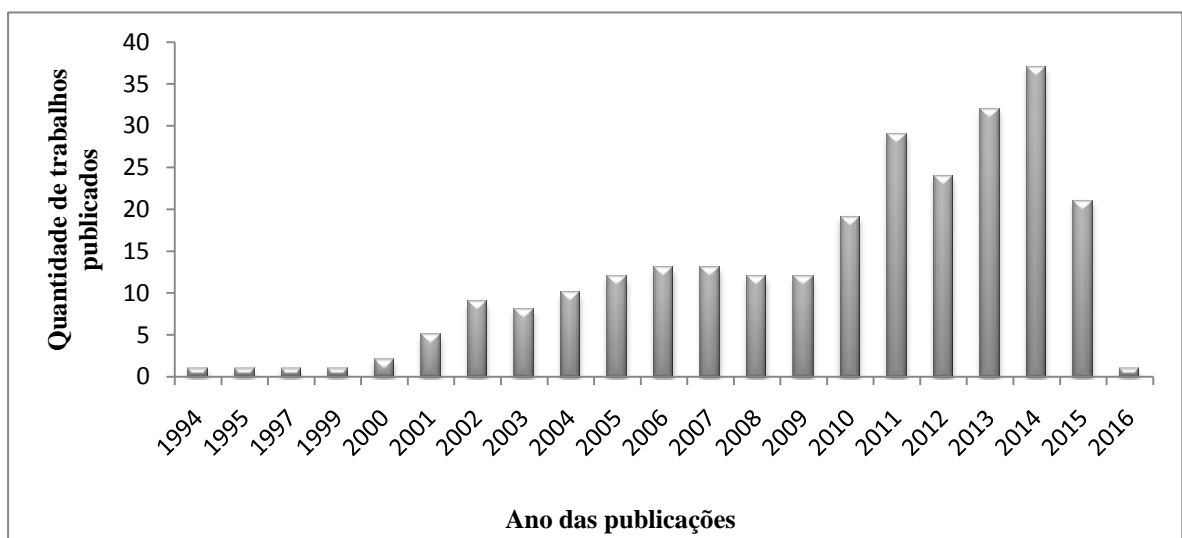


Figura 4. Quantitativo de artigos científicos publicados por ano com a aplicação dos marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) em diferentes espécies vegetais. Dados obtidos a partir da busca em bases de dados de publicações científicas (NCBI e SciELO) com as palavras chave: ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*); ISSR “plants”.

CAPÍTULO I

Periódico pretendido para submissão: *African Journal of Biotechnology*

**Genética e Biologia Molecular Aplicadas em Estudos do Gênero *Croton*
(Euphorbiaceae): Contribuições e Perspectivas para a Caracterização da Biodiversidade**

Thalana Souza Santos Silva¹, Janaína Silva Freitas² [...] Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva^{2*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000; ²Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000

Author para correspondência: *C.B.M Cerqueira-Silva
E-mail: csilva@uesb.edu.br

Resumo. Diversas espécies do gênero *Croton* apresentam importância ecológica e econômica, no entanto, são incipientes os estudos de investigação do gênero sob diversos aspectos, sobretudo às publicações com dados genéticos e moleculares. Conhecer geneticamente espécies que apresentam relevância enquanto recurso natural é de fundamental importância para elaboração de estratégias de conservação e uso sustentável da biodiversidade. Assim, a presente revisão teve como objetivo apresentar um panorama do conhecimento disponível na literatura sobre a diversidade genética, filogenia e informações citogenéticas das espécies do gênero *Croton*, indicando tanto as principais lacunas como as perspectivas em relação às ferramentas moleculares disponíveis e sua aplicação na compreensão do gênero, tendo como fim a conservação e uso dessas espécies. Para tanto, foram realizadas buscas em bases de dados de publicações científicas (NCBI, Scopus, SciELO). Os dados apresentados nesta revisão apontam para uma lacuna em diversos âmbitos do conhecimento acerca do gênero *Croton* e um conseqüente conjunto de oportunidades para realização de novas pesquisas.

Palavras chave: *Croton*, diversidade genética, marcadores moleculares, citogenética, filogenia.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae)

A família Euphorbiaceae *sensu lato* distribui-se nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta com a maioria das espécies na região Indo-Malaia e na América tropical (Rahman e Akter, 2013). No Brasil ocorrem 63 gêneros e cerca de 940 espécies, presentes na maioria dos biomas, sendo 638 espécies consideradas endêmicas para o país (Cordeiro et al., 2015). Estima-se que há aproximadamente 7.500-9.000 espécies distribuídas em cerca de 300 gêneros, constituindo uma das mais diversificadas e complexas famílias dentro das Angiospermas (Cronquist, 1981).

Com base no progresso dos estudos taxonômicos e filogenéticos com a utilização de dados moleculares, Euphorbiaceae *sensu lato* foi recentemente dividida em quatro famílias: Euphorbiaceae *sensu stricto*, Phyllanthaceae, Putranjivaceae e Picrodendraceae, com proposição de estabelecer Peraceae como parte de um táxon autônomo (APG II, 2003).

Croton L. é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, com aproximadamente 1.200 espécies (Govaerts et al., 2000). Os representantes deste gênero apresentam elevada diversidade morfológica (Figura 1), com hábitos que variam de herbáceas a arbóreas (Silva et al., 2010); são monóicas e raramente dióicas (Carneiro-Torres, 2009). Podem apresentar inflorescência onde as pétalas quando não ausentes, são reduzidas (Guimarães, 2006). As folhas são predominantemente alternas e podem exibir um revestimento piloso. As flores masculinas e femininas são diminutas e em sua maioria brancas. Apresentam também tricomas de formas variadas (simples, estrelados, lepidotos e variações de tais tipos). As sementes são carunculadas e o fruto apresenta-se como cápsula tricoca, medindo de 2 a 6 mm de diâmetro (Silva et al., 2010).

De acordo com a classificação proposta por Webster (1994), *Croton* pertence à subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae. A configuração da exina dos grãos de pólen, denominada de padrão-Croton, juntamente com os grãos de pólen inaperturados, constituem as principais características morfológicas da subfamília (Nowicke, 1994). A presença de estames encurvados no botão floral em *Croton* parece constituir a única sinapomorfia morfológica do gênero (Berry et al., 2005).

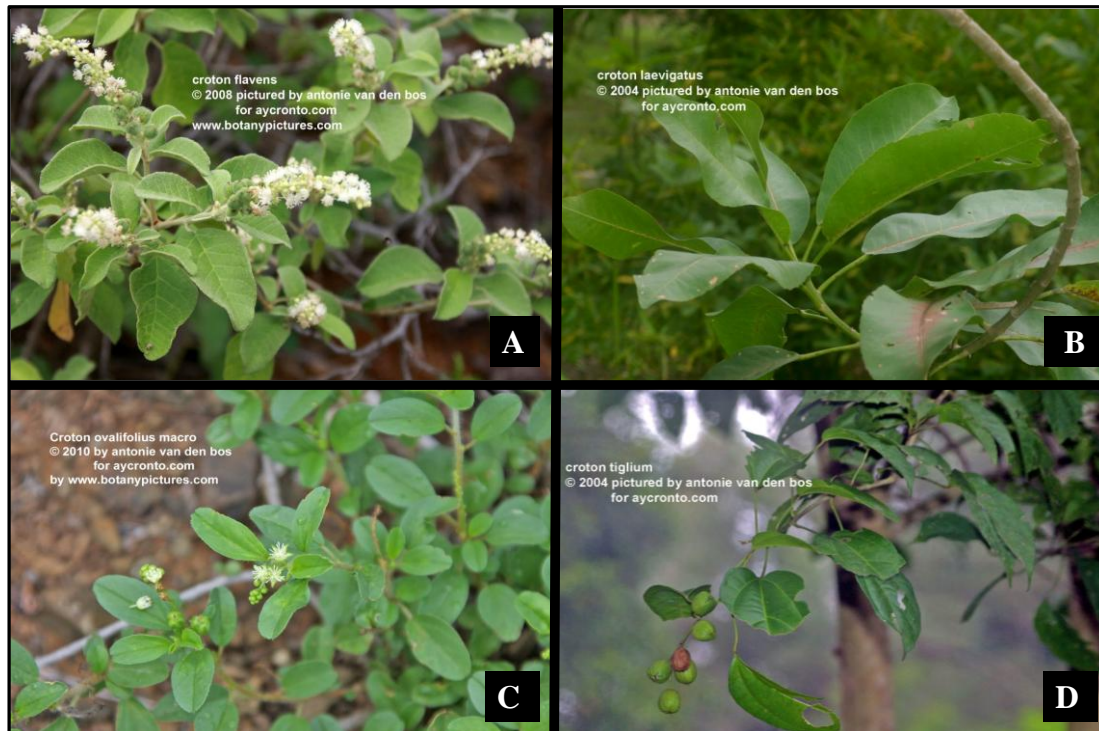


Figura 1. Painel ilustrativo de diferentes espécies do gênero *Croton*: (A) *C. flavens*; (B) *C. laevigatus*; (C) *C. ovalifolius* e (D) *C. tiglium*. Créditos: <http://www.botanypictures.com/>

Tendo em vista a diversidade morfológica e complexidade taxonômica, diversas são as propostas visando o arranjo das espécies do gênero *Croton*. Neste contexto, destaca-se a classificação infragenérica proposta por Webster (1993) que reconheceu 40 seções e cinco subseções para *Croton*. Uma nova circunscrição foi proposta por meio de estudos filogenéticos tendo como base a análise de dados moleculares das regiões ITS, do DNA nuclear ribossômico, e do fragmento trnL-F, do DNA plastidial (Berry et al., 2005). Esses autores sugeriram que para o gênero *Croton* ser considerado monofilético, é necessário a segregação da seção *Croton Astraea* (Klotzsch) Baill como um gênero independente.

Após esse trabalho inicial, outras análises filogenéticas moleculares têm contribuído para a construção de uma classificação infragenérica de *Croton* (Riina et al., 2009; Riina et al., 2010; Caruzo et al., 2011; Van Ee et al., 2011; Van Ee e Berry, 2011). Como resultado do aumento no número de estudos taxonômicos e filogenéticos para o gênero, especialmente para as espécies com ocorrência na região Neotropical, o conhecimento acerca de *Croton* vem crescendo substancialmente. Não obstante, as relações básicas dentro de muitas seções ainda não foram exploradas (Caruzo et al., 2011), tendo em vista o elevado número de espécies, ampla distribuição geográfica e considerável diversidade morfológica, o que torna o grupo de alta complexidade taxonômica (Riina et al., 2009).

Diante deste cenário, estratégias de estudos moleculares associadas a identificação, sequenciamento e comparação de regiões conservadas do genoma (a exemplo da técnica de DNA Barcode) podem contribuir na identificação e diferenciação de espécies, auxiliando no desenvolvimento de estudos taxonômicos e filogenéticos. Neste contexto, estudo recente realizado com 12 espécies do gênero *Croton* apresenta avanços no uso acoplado do DNA Barcode com a técnica *High Resolution Melting* (Bar-HRM) como eficiente estratégia para discriminação de espécies do gênero *Croton*, já que possibilita a detecção de mutações pontuais, indels e metilação do DNA (Osathanunkul et al., 2015).

1.2 Distribuição e Ecologia de *Croton* L.

A ampla distribuição geográfica das espécies de *Croton* em diferentes paisagens é resultado de uma soma de fatores que envolvem interações ecológicas estabelecidas pelas espécies do gênero, ressaltando-se os eventos de polinização e dispersão, relacionados com o sucesso reprodutivo, bem como as estratégias de defesa em resposta à ação dos predadores (fungos, bactérias, nematóides e vírus) e aos fatores limitantes do ambiente físico em que essas espécies ocorrem.

As espécies de *Croton* apresentam ampla distribuição mundial com a maioria dos seus representantes distribuídos nas regiões tropicais, predominantemente no continente Americano, sendo o Brasil (300 espécies), Madagascar (150 espécies), Caribe (150 espécies) e México (100 espécies) considerados os mais importantes centros de diversidade do gênero (Berry et al., 2005). No Brasil, as espécies de *Croton* estão amplamente distribuídas nos mais diversos ambientes, havendo registros de espécies nos biomas do Cerrado (143 espécies), Mata Atlântica (120 espécies), Caatinga (82 espécies), Amazônia (64 espécies), Pampa (15 espécies) e Pantanal (14 espécies) (Cordeiro et al., 2015).

A abundante produção de flores e frutos durante a maior parte do ano sugere que as espécies do gênero constituem importante recurso alimentar para os animais polinizadores e dispersores, sobretudo em ambientes degradados com reduzida oferta desses recursos, já que muitas espécies de *Croton* são pioneiras, configurando-se como importante componente em estágios iniciais de sucessão ecológica (Lima e Pirani, 2008).

Os sistemas de polinização para a maioria das espécies de *Croton* são pouco conhecidos, apesar disso é esperado que sejam diversificados, tendo em vista que, entomofilia (Freitas et al., 2001; Pires et al., 2004), anemofilia (Dominguez e Bullock, 1989) e ambifilia (Passos, 1995; Quirino e Machado, 2014) já foram documentados para o gênero.

A dispersão balística (autocoria) é uma estratégia comum entre os diversos gêneros de Euphorbiaceae, incluindo *Croton*. Essa síndrome é caracterizada pela deiscência explosiva de frutos secos que lançam as sementes para longe da planta-mãe (Webster, 1994; Leal, 2003). Além disso, possuem uma estrutura rica em compostos lipídicos, o elaiossomo, o qual atrai as formigas que atuam como dispersores secundários das sementes, diminuindo assim a predação e a competição entre as plântulas (Passos e Ferreira, 1996; Leal, 2003; Leal et al., 2007; Lobo et al., 2011).

Uma variedade de estruturas secretoras (nectários extraflorais, laticíferos, idioblastos e tricomas secretores) são comumente encontradas nas espécies de *Croton* (Vitarelli et al., 2015) e, juntamente com os metabólitos secundários desempenham um importante papel nas estratégias anti-herbivoria e na adaptabilidade às constantes mudanças ambientais (Alves et al., 2012).

1.3 O gênero *Croton* enquanto recurso natural: Uso e status de conservação

A família Euphorbiaceae destaca-se por sua notável importância econômica em vários segmentos da sociedade, compreendendo plantas utilizadas na alimentação (*Manihot esculenta*), produção apícola (*Alchornea triplinervia*, *Sapium glandulosum* e *Sebastiania commersoniana*), como ornamentais (*Euphorbia milii* e *E. pulcherrima*), produção da borracha (*Hevea brasiliensis*), como fonte de óleo (*Ricinus communis*) e na produção de biocombustível (*Jatropha curcas*) (Caruzo, 2010).

O gênero *Croton* destaca-se pelo seu uso na produção apícola (*C. ceanothifolius*, *C. celtidifolius*, *C. floribundus*, *C. splendidus* e *C. urucurana*) (Coradin et al., 2011), fonte de madeira para a produção de lenha e carvão (*C. sonderianus*), carpintaria e construção civil (*C. urucurana* e *C. nitens*) (Ramos e Lagos, 1988; Govaerts et al., 2000) e como inseticidas naturais contra o *Aedes aegypti* (*C. linearifolius*, *C. tetradenius* e *C. argyrophyllus*) (Silva et al., 2014; Carvalho et al., 2015; Cruz et al., 2015).

Apesar da importância ecológica e da utilização de *Croton* spp. como recurso natural, são as propriedades químicas e farmacológicas que têm levado a um crescente interesse científico e econômico sobre as espécies do gênero. Várias de suas espécies são largamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de câncer, constipação intestinal, diarreia e outros problemas digestivos, diabetes, feridas externas, febre, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, dor, úlceras e obesidade (Salatino et al., 2007).

As espécies do gênero *Croton* são ricas em compostos químicos, propriedade que qualifica o grupo como promissor para estudos de prospecção de substâncias com potencial farmacológico (Randau et al., 2004). As propriedades medicinais das espécies do gênero têm sido atribuídas a uma ampla variedade de compostos químicos, tais como terpenos, esteróides, alcalóides, e compostos fenólicos, entre os quais predominam os lignanos, flavonóides e pró-antocianidinas (Salatino et al., 2007).

A despeito do seu potencial e do uso recorrente pela população, são incipientes os estudos de espécies que possuem propriedades terapêuticas já comprovadas, não obstante os ensaios farmacológicos vêm corroborando os usos tradicionais de *Croton*, tais como, efeito hipoglicêmico (*C. cuneatus*) (Torrice et al., 2007), antiulcerogênico (*C. urucurana*) (Cordeiro et al., 2012), anticâncer (*C. celtidifolius*) (Biscaro et al., 2013), hipotensor (*C. zehntneri*) (Siqueira et al., 2013), antimicrobiano (*C. pulegioides*) (Arrais et al., 2014) e leishmanicida (*C. cajucara*) (Lima et al., 2015).

Tendo em vista o potencial fitoquímico e econômico de muitas espécies de *Croton*, é essencial o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a propagação e avaliação do potencial produtivo dessas espécies sob condições de cultivo. Para o gênero *Croton* são escassos os estudos dessa natureza, havendo alguns registros para *C. urucurana* (Lima et al., 2008), *C. zehntneri* (Paulino et al., 2012; Cunha et al., 2012) e *C. sonderianus* (Lopes et al., 2014).

O elevado número de espécies de *Croton* endêmicas do Brasil, cerca de 250 (Cordeiro et al., 2015), aliado a extração insustentável desse recurso natural pela população, implica em um cenário preocupante para a preservação das espécies do gênero no país, tendo em vista que 38,64% dessas espécies encontram-se sob ameaça, o que demonstra a urgência na aplicação de medidas de conservação, tais como, a proteção dos ambientes de ocorrência dessas espécies por meio da criação e ampliação de áreas protegidas (*in situ*) (Pollito et al., 2004), bem como, estratégias de conservação *ex situ*, a exemplo dos bancos de germoplasma.

Informações sobre o número de espécies de *Croton* presentes em unidades de conservação no Brasil são insuficientes, o que dificulta a determinação do *status* de conservação do gênero no país. De acordo com os dados reportados por Pollito et al. (2004), apenas 20 espécies têm mais de 50% de probabilidade de estarem protegidas em unidades de conservação. Em relação ao estabelecimento de *Croton* spp. em bancos de germoplasma, também existem poucos registros, com acessos de *Croton cajucara* e *Croton sacaquinha* mantidos em banco de germoplasma pela Embrapa Amazônia Ocidental.

2 CONTRIBUIÇÕES DA GENÉTICA E DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA CARACTERIZAÇÃO, CONSERVAÇÃO E USO DO GÊNERO *Croton*

A Biodiversidade pode ser definida como a totalidade dos genes, espécies e ecossistemas de uma região específica ou no planeta como um todo (Rao e Hodgkin, 2002). Os componentes da biodiversidade são importantes tanto sob o ponto de vista ecológico quanto pelo seu uso atual ou potencial pelos seres humanos enquanto recurso biológico, que pode, por sua vez, ser classificado como um recurso genético (Nass, 2011).

De modo geral, os recursos genéticos são considerados fontes de variabilidade (matéria-prima natural), sendo fundamental tanto para o estabelecimento de formas de exploração econômica racional, bem como no desenvolvimento de estratégias de conservação. Nas últimas décadas, tem-se observado grandes avanços no desenvolvimento de técnicas da genética e biologia molecular para identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais, gerando informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa (Faleiro, 2007).

A maioria dos estudos com ênfase no gênero *Croton* aborda os aspectos anatômicos e fitoquímicos, sendo raras as publicações com dados genéticos em níveis cromossômicos e moleculares para a maioria das espécies do gênero. Características como a diversidade morfológica, a ocorrência em diferentes ambientes, incluindo aquelas com condições agroclimáticas extremas, e a grande quantidade e tipos de compostos químicos presentes em algumas espécies, sugerem que *Croton* possui diversidade genética interespecífica considerável, incluindo muitos genes importantes ainda não investigados pela ciência.

2.1 Estudos Citogenéticos

Dados citogenéticos são relevantes em estudos que envolvem caracterização taxonômica, sistemática e filogenia, abrangendo desde a observação do número e morfologia dos cromossomos, até dados da citogenética molecular, tais como a hibridização fluorescente in situ ou FISH e a hibridização genômica in situ ou GISH (Stace, 2000).

Informações associadas ao estado da arte das pesquisas citogenéticas acerca do gênero *Croton* foram sumarizadas em uma tabela revisada por Lira-Neto (2011), onde é possível observar um total de 32 publicações entre os anos de 1943 e 2007. Os estudos citogenéticos sobre *Croton* são escassos e restritos a menos de 5% das cerca de 1.200 espécies estimadas para o gênero. Após esses trabalhos há registros de apenas dois estudos na literatura, nos

quais foram investigadas seis (*C. adenocalix*, *C. lundianus*, *C. sellowii*, *C. blanchetianus*, *C. heliotropiifolius* e *C. lobatus*) (Lira-Neto, 2011) e uma (*C. floribundus*) (Silvestrini et al., 2013) espécies, respectivamente, sendo que para quatro espécies foram os primeiros registros de contagem de cromossomos (*C. adenocalix*, *C. lundianus*, *C. sellowii* e *C. floribundus*).

O gênero *Croton* apresenta extensa variação numérica de cromossomos, uma característica comum observada entre os gêneros da família Euphorbiaceae. Apesar de apresentar os números $2n=16$ (Perry, 1943) e $2n=64$ (Fedorov, 1969) como menor e maior números diplóides encontrados, respectivamente, o gênero exibe $2n=20$ como o mais frequente (74% dos registros citogenéticos para *Croton*).

A maioria dos estudos de investigação cromossômica em *Croton* é baseada em técnicas convencionais limitando-se ao registro numérico de cromossomos. Poucos estudos com maior nível de detalhamento cromossômico para as espécies do gênero estão disponíveis na literatura com a aplicação de técnicas de bandeamento e citogenética molecular (Gusmão, 2000; Lira-Neto, 2011). Os resultados obtidos por Lira-Neto (2011) indicaram relativa conservação cariomorfológica em cinco das 6 espécies investigadas, com exceção de *C. lobatus*, o que pode sugerir a elevação da seção *Astrea*, a qual essa espécie pertence, a condição de gênero, como proposto por Berry et al. (2005). No entanto, essa área do conhecimento permanece aberta à investigação, tendo em vista que muitas espécies ainda não foram investigadas.

As informações citogenéticas sobre a maioria das publicações restringe-se as espécies que compõem as vegetações de outros países (Perry, 1943; Urbatsch et al., 1975; Soontornchainaksaeng e Chaiyasut, 1999; Berry, 2006; Soontornchainaksaeng et al., 2003), com poucos estudos contemplando as espécies com ocorrência exclusiva no Brasil, importante centro de diversidade do gênero (Pôrto, 2007; Lira-Neto, 2011). De um total de 250 espécies endêmicas, apenas nove foram investigadas em estudos citogenéticos (*C. adenocalyx*, *C. blanchetianus*, *C. floribundus*, *C. jacobinensis*, *C. pulegioides*, *C. persicaria*, *C. sellowii*, *C. semivestitus* e *C. sonderianus*).

2.2 Aplicação de Marcadores Moleculares

Os avanços dos estudos moleculares trouxeram um aumento significativo dos conhecimentos em diversas áreas, o que possibilitou a avaliação da diversidade genética diretamente ao nível de DNA, livre de influências ambientais ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado (Lacerda et al., 2002).

Diante da ampla gama de marcadores moleculares, diversos fatores podem influenciar na escolha da técnica mais adequada aos objetivos do estudo. Cada tecnologia apresenta vantagens e limitações, que compreendem desde a infraestrutura disponível, requisitos técnicos e de custos, ao nível de conhecimento genético da espécie de interesse (Faleiro, 2007), bem como os tipos de dados que podem fornecer e os níveis taxonômicos em que eles podem ser mais adequadamente aplicados (Karp et al., 1996).

Similar à escassez de informações citogenéticas disponíveis para o gênero *Croton*, os estudos genéticos com aplicação de marcadores moleculares são considerados incipientes no Brasil e em todo o mundo. A Figura 2 ilustra uma linha cronológica da evolução de alguns dos principais marcadores moleculares e a sua utilização em estudos de *Croton* spp. Dados informados na Figura 2 indicam que o uso de marcadores moleculares no gênero *Croton* iniciou-se há cerca de 10 anos com a aplicação do marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para estimativa da diversidade genética de *C. sublyratus* (Klinbantom, 2004).

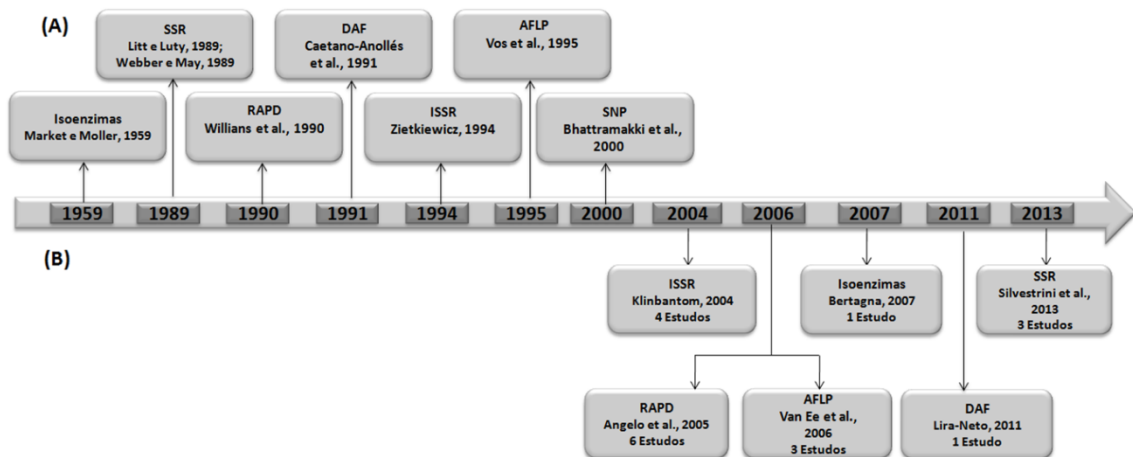


Figura 2. Esquema ilustrativo dos principais marcadores moleculares e suas referências iniciais (A), bem como os estudos publicados utilizando marcadores moleculares no gênero *Croton*, a sua referência inicial, e o quantitativo de estudos (B).

Estudos disponíveis em bases de dados de publicações científicas (NCBI, Scopus, SciELO) incluem caracterização da diversidade genética com base em marcadores moleculares de 10 espécies de *Croton*, o que corresponde a menos de 1% das espécies do gênero (Tabela 1). A maioria dos estudos genético moleculares para o gênero (aproximadamente 80%) é baseada no uso de marcadores moleculares dominantes (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*; AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorfism*; ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat*; e DAF - *DNA Amplification Fingerprinting*). Apesar

das limitações inerentes ao uso dos marcadores dominantes, tais como a baixa reprodutibilidade e a impossibilidade de diferenciar os locos em heterozigose, a aplicação desses marcadores tem contribuído para ampliação do conhecimento da base genética de *Croton* spp.

Tabela 1. Apresentação descritiva e quantitativa de estudos publicados utilizando diferentes marcadores moleculares para o gênero *Croton*. (a) Artigos científicos

Marcadores moleculares	Objetivos dos estudos	Espécies avaliadas	Referências
Isoenzimas	Estimar a variabilidade genética	<i>C. floribundus</i>	Bertagna, 2007
RAPD	Estimar a variabilidade genética; comparar métodos para estimativas de diversidade genética	<i>C. cajucara</i> , <i>C. floribundus</i> , <i>C. heliotropiifolius</i> e <i>C. linearifolius</i>	Angelo et al., 2005 ^a ; Angelo et al., 2006 ^a ; Zioldo, 2007; Souza et al., 2012 ^a ; Scaldaferrri et al., 2014 ^a , e Rocha et al., 2016 ^a
AFLP	Estimar a variabilidade genética e Filogenia	<i>C. alabamensis</i> , <i>C. pallidulus</i> e <i>C. antisiphiliticus</i>	Van Ee et al., 2006 ^a e Suzaki, 2011, Oliveira et al., 2016 ^a
SSR	Estimar a variabilidade e estrutura genética; desenvolver <i>primers</i>	<i>C. floribundus</i>	Silvestrini et al., 2013 ^a , Silvestrini, 2014 e Silvestrini et al., 2015 ^a
ISSR	Estimar a variabilidade genética; comparar métodos para estimativas de diversidade genética; Filogenia	<i>C. sublyratus</i> , <i>C. heliotropiifolius</i> , <i>C. blanchetianus</i> , <i>C. pedicellatus</i> e <i>C. linearifolius</i>	Klinbantom, 2004; Lira- Neto, 2011; Scaldaferrri et al., 2014 ^a ; Rocha et al., 2016 ^a
DAF	Estimar a variabilidade genética, Filogenia	<i>C. heliotropiifolius</i> , <i>C. blanchetianus</i> e <i>C. pedicellatus</i>	Lira-Neto, 2011

*As teses e dissertações foram mantidas como referências nos casos em que não foi observada a publicação total ou parcial dos dados em artigos científicos.

As técnicas de RAPD e ISSR foram as mais utilizadas em *Croton* totalizando seis e quatro estudos respectivamente (Tabela 1). Dentre as vantagens que podem justificar a escolha por essas técnicas, destacam-se a simplicidade, rapidez na obtenção de dados, baixo custo, demanda de quantidades mínimas de DNA para realização das análises e a possibilidade de estudar espécies sem informações prévias de sequências de DNA para

construção dos *primers*. Os ISSR, contudo, geram resultados mais robustos, pois apresentam alta reprodutibilidade devido ao uso de sequências longas (formados por mais de 10 pb) e por possuírem maiores temperaturas de anelamento, quando comparadas ao RAPD (Reddy et al., 2002; Lacerda et al., 2001; Mondini et al., 2009; Ibrahim et al., 2010).

Na maioria dos estudos foi estimada a diversidade genética de *Croton* spp. (Tabela 1), e em geral foram encontrados altos níveis de diversidade genética dentro das populações das espécies estudadas, sendo detectado algum nível de estruturação genética em algumas populações (Zirolto, 2007; Oliveira et al., 2016; Rocha et al., 2016). O conhecimento sobre a estruturação genética de populações de plantas podem fornecer informações importantes para o desenvolvimento de estratégias de conservação *ex situ* e *in situ*, e para o manejo dos recursos vegetais.

O marcador ISSR foi utilizado para determinar o nível de diversidade genética entre 37 amostras de *C. sublyratus* em diferentes regiões da Tailândia, no qual foi encontrado que a variação na quantidade de plaunotol (ação antiúlcera) produzida pelas plantas é regulada pela variação genética entre as mesmas (Klinbantom, 2004).

Em estudos com *C. cajucara*, espécie que apresenta potencial econômico na indústria de cosméticos, o marcador RAPD foi aplicado para demonstrar a divergência genética entre acessos de dois morfotipos (Angelo et al., 2005; Angelo et al., 2006). Em *C. floribundus*, espécie utilizada em programas de reflorestamento, a técnica foi utilizada para avaliar a estrutura e a diversidade genética entre três fragmentos, os quais apresentaram baixa diferenciação genética entre si (Zirolto, 2007). Marcadores do tipo RAPD também foram utilizados para analisar a estrutura genética de diferentes pontos de coleta a fim de estabelecer estratégias para a coleta de sementes da espécie *C. floribundus* comumente usadas em reflorestamentos da Floresta Atlântica (Souza et al., 2012).

Essa técnica também foi utilizada em conjunto com o marcador ISSR para estimar a variabilidade genética e comparar métodos para estimativas de diversidade genética em *C. linearifolius* e *C. heliotropiifolius*, espécies que tem despertado o interesse dos pesquisadores por apresentarem potencial inseticida e medicinal, respectivamente (Scaldeferri et al., 2014; Rocha et al., 2016). Ainda no contexto dos marcadores dominantes, Lira-Neto (2011) investigou a eficiência dos marcadores ISSR e DAF no acesso à variabilidade genética das espécies *C. heliotropiifolius*, *C. blanchetianus*, *C. pedicellatus*.

A técnica AFLP foi empregada para avaliar a variabilidade genética em populações naturais de *C. antisiphiliticus*, espécie medicinal utilizada no tratamento de infecções do aparelho urogenital. O marcador molecular AFLP foi eficiente para caracterizar a

variabilidade genética nas populações investigadas (Oliveira et al., 2016). Além das características inerentes aos marcadores dominantes, os marcadores AFLP apresentam como desvantagens a exigência de uma maior quantidade de DNA, várias etapas e reagentes que aumentam o custo da técnica (Semagn et al., 2006).

Estudos utilizando marcadores co-dominantes em espécies de *Croton*, iniciaram-se em 2007, com a aplicação de marcadores bioquímicos do tipo isoenzimas em *C. floribundus* (Bertagna, 2007). Após essa referência inicial, constam recentemente na literatura 3 estudos (Silvestrini et al., 2013 ;Silvestrini, 2014 e Silvestrini et al., 2015) que empregaram os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*), também para investigação da espécie *C. floribundus*. Os marcadores co-dominantes são mais informativos que os de natureza dominante, sendo os mais indicados para estudos genético-populacionais.

Bertagna (2007) utilizou isoenzimas para avaliar a diversidade genética da espécie *C. floribundus* em diferentes fragmentos florestais, localizados em uma Área de Proteção Ambiental. Segundo o autor, os altos níveis de diversidade genética e a baixa diferenciação entre as populações estudadas, podem ser explicados pelo número limitado de gerações transcorridas, tendo em vista que o processo de fragmentação é recente na área, além da ocorrência de fluxo gênico entre fragmentos mais próximos e as características próprias da espécie. Apesar da natureza codominante das Isoenzimas, esses marcadores apresentam algumas desvantagens tais como o número limitado de sistemas enzimáticos polimórficos, não permitindo a cobertura completa do genoma, além de serem altamente influenciadas pelo estágio de desenvolvimento da planta (Mondini et al., 2009).

Silvestrini et al. (2013) investigaram as implicações do uso dos microssatélites no estudo de *C. floribundus*, uma espécie poliplóide. Os dados gerados com a aplicação dos SSR combinados com análises citogenéticas demonstrou novas evidências sobre a origem e evolução da espécie, bem como confirmou a eficiência desse marcador para estudos genético de populações de espécies pioneiras poliplóides. Os microssatélites são os mais viáveis para a avaliação da diversidade e estrutura genética, pois são co-dominantes, apresentam alto polimorfismo e são abundantes nos genomas das plantas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os marcadores SSR também foram utilizados por Silvestrini et al. (2015) para investigar como os processos ecológicos e os fatores genéticos associados aos distúrbios naturais ou antrópicos afetam a diversidade e estrutura genética de populações de *C. floribundus* em diferentes estágios sucessionais. As análises de marcadores moleculares nucleares e cloroplastídias sugeriram que o fluxo gênico por pólen é responsável por manter a diversidade genética dentro das populações de *C. floribundus*, tanto na floresta primária

quanto na floresta secundária, em estágio inicial de sucessão. Os autores concluíram que os distúrbios antrópicos parecem aumentar a influência do efeito fundador em populações de uma espécie com a dispersão limitada de sementes.

Marcadores moleculares também têm sido empregados em conjunto com dados de sequências de DNA em estudos de reconstrução das relações filogenéticas em *Croton alabamensis* (Van Ee et al., 2006) e em *C. pallidulus* (Suzaki, 2011). Apesar de controverso, o uso de marcadores AFLP tem sido utilizado com sucesso em estudos que visam elucidar as relações filogenéticas entre espécies estreitamente relacionadas e táxons infraespecíficos, tendo em vista que a utilização dessa técnica não é indicada para comparações entre organismos filogeneticamente distantes (Karp et al., 1996).

Na maioria dos estudos com aplicação de marcadores moleculares em *Croton* spp. foram investigadas espécies de fragmentos de populações naturais, destas espécies, três estão presentes em unidades de conservação (*C. floribundus*, *C. pedicelatus* e *C. linearifolius*), e apenas uma espécie dentre as 10 investigadas com marcadores moleculares (*C. cajucara*) está mantida em banco de germoplasma. Além disso, do total de espécies do gênero investigadas apenas quatro são endêmicas do Brasil (*C. blanchetianus*, *C. floribundus*, *C. linearifolius* e *C. pallidulus*). O panorama apresentado implica em uma importante lacuna no conhecimento do *status* de conservação das espécies do gênero, já que os dados gerados por meio da utilização das técnicas moleculares podem elucidar o nível de diversidade genética, possibilitando a implementação de estratégias bem sucedidas de conservação e uso sustentável dessas espécies.

3 CONCLUSÕES, PERSPECTIVAS E DESAFIOS NO AVANÇO DAS PESQUISAS GENÉTICO-MOLECULARES NO GÊNERO *Croton*

Os dados apresentados nesta revisão apontam para uma lacuna em diversos âmbitos do conhecimento acerca do gênero *Croton*, sobretudo às publicações com dados genéticos e moleculares. Diversas espécies do gênero apresentam potencial econômico em muitos setores da sociedade, sendo as propriedades químicas e farmacológicas que tem impulsionado um crescente interesse dos pesquisadores no estudo dessas espécies.

A escassez de estudos sobre *Croton*, somados ao uso insustentável desse recurso natural pela população e aliado ao elevado número de espécies endêmicas no Brasil, país no qual foram encontrados a maior parte dos estudos, demonstram a urgência na aplicação de medidas de proteção das áreas de ocorrência dessas espécies no país, bem como o estabelecimento de estratégias de conservação *ex situ*. Em uma compilação realizada por

Pollito et al. (2004) foi relatado a escassez dos registros de espécies de *Croton* em unidades integrantes do Sistema Nacional de Unidades de Conservação do Brasil.

No âmbito das ações de manejo e conservação da biodiversidade, o conhecimento da composição genética de uma espécie, e de como ela está organizada (estruturada) em suas populações torna-se fundamental. O nível de variabilidade genética implica no potencial evolutivo de uma espécie, e determina em grande parte, suas chances de sobrevivência frente às flutuações ambientais provocadas pelos fatores bióticos e abióticos (Fleishman et al., 2001; Jones et al., 2001).

Em relação aos estudos citogenéticos e filogenéticos, há um maior número de estudos disponíveis para as espécies de *Croton*, no entanto, são necessários também a aplicação de técnicas mais robustas, já que a maioria dos estudos citogenéticos foram restritos a contagem de cromossomos.

Informações morfo-agronômicas a respeito do cultivo e propagação de espécies do gênero também são incipientes. Esse conhecimento constitui uma ferramenta importante no desenvolvimento de estratégias para o reflorestamento, no estabelecimento de bancos de germoplasma e para o manejo sustentável, tendo em vista que muitas espécies são utilizadas pela população como medicinais, entre outros usos.

Os estudos genéticos com a aplicação de marcadores moleculares restringiram-se a menos de 1% das espécies de *Croton*, e em sua maioria os marcadores moleculares empregados foram dominantes, fato que pode limitar a possibilidade dos autores em ampliar suas discussões e conclusões. Apesar das limitações inerentes a essa classe de marcadores, os marcadores dominantes possibilitam uma caracterização rápida e de baixo custo, especialmente útil para espécies ainda pouco estudadas e com interesse comercial pouco explorado.

Embora relevante para as atividades de conservação e melhoramento genético há uma escassez de estudos genético-populacionais com o uso de técnicas moleculares mais robustas, a exemplo dos marcadores co-dominantes, tendo em vista que os estudos com esta classe de marcadores limitaram-se a investigação de uma única espécie, *C. floribundus*. Dessa forma, faz-se necessário a aplicação de marcadores tais como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) que possibilitam o refinamento dos resultados.

Apesar das lacunas existentes sobre o conhecimento genético do gênero *Croton*, o panorama atual desses estudos em diferentes aspectos, parece apontar para uma continuidade do cenário apresentado, uma vez que não foram observados projetos dessa natureza em buscas realizadas na plataforma Lattes, mantida pelo CNPQ, Brasil.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao programa de pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) pela concessão da bolsa de estudo e ao Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA).

4 REFERÊNCIAS

- Alves M, Araújo MFL, Gusmão GLS, Lira-Neto AC, Carvalho R, Benko-Iseppon AM (2012). The genus *Croton* (Euphorbiaceae) in Northeastern Brazil: Diversity, Uses and Priorities for Conservation. In: Rai, M.; Rastrelli, L.; Marinoff, M.; Martinez, J.L.; Cordell, G. (Org.). *Medicinal Plants: Biodiversity and Drugs*. 1ed. New Hampshire: CRC Press, 2012, 1: 106-141.
- Angelo PCS, Chaves FCM, Bizzo HR, Xavier JJBN, Cruz JC, Lira MPS (2006). Genetic diversity in sacaca (*Croton cajucara* Benth.) accessed by RAPD markers. *Rev. Bras. Pl. Med*, 8:18-22.
- Angelo PCS, Chaves FCM, Xavier JJBN, da Cruz JC, Lira MPS (2005). Avaliação inicial do RAPD como forma de acessar a variabilidade genética na espécie rica em linalol *Croton cajucara* Benth. (sacaca). Comunicado técnico 28. Embrapa.
- APG II. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141:399-436.
- Arrais LG, Lyra HFS, Batista DCA, Coutinho FN, Saraiva AM, Pereira RCA, Pisciotano MNC, Xavier HS, Melo SJ (2014). Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). *Rev. bras. plantas med.* 16(2):316-322.
- Berry P (2006). *Croton* Research Network. Madison, University of Wisconsin Board of Regents. Disponível em: <http://www.botany.wisc.edu/croton>. Acesso em: 19.06.2015.
- Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, Ee BV, Riina R (2005). Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotoneae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. *Am. J. Bot.* 92:1520-1534.
- Bertagna M (2007). Variabilidade genética de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) em seis fragmentos de Mata Atlântica do município de Campinas. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas.
- Bhatramakki S, Ching A, Morgante M, Dolan M, Register J, Smith H, Tinngay S, Rafalski JA (2000). Conserved single nucleotide polymorphism (SNP) haplotype in maize. In: *Plant and Animal Genome Conference*, 8, San Diego. Abstracts. San Diego: Scherago International. 188p.
- Biscaro F, Parisotto EB, Zanette VC, Günther TM, Ferreira EA, Gris EF, Correia JF, Pich CT, Mattivi F, Filho DW, Pedrosa RC (2013). Anticancer activity of flavonol and flavan-3-ol rich extracts from *Croton celtidifolius* latex. *Pharm Biol.* 51(6):737-43.

- Caetano-Anolles G, Bassam BJ e Gresshoff P (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9:553-557.
- Carneiro-Torres DS (2009). Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- Caruzo MBR, Van Ee B, Cordeiro I, Berry PE, Riina R (2011). Molecular phylogenetics and character evolution of the "sacaca" clade: novel relationships of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 60:193-206.
- Caruzo MBR (2010). Sistemática de *Croton* sect. *Cleodora* (Euphorbiaceae s.s.). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade de São Paulo.
- Carvalho KS, Cruz RCD, Silva SLCE and Gualberto AS (2015). Atividade larvicida dos extratos aquosos e do hidrolato das folhas de *Croton tetradenius* sobre o *Aedes aegypti*. *Enciclopédia Biosfera* 11:2815-2823.
- Coradin L, Siminski A, Reis A (2011). Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro – Região Sul. Brasília: MMA, 934 p.
- Cordeiro I, Secco R, Carneiro-Torres DS, Lima LR DE, Caruzo MBR, Berry P, Riina R, Silva OLM, Silva MJDA, Sodr e RC (2015). *Croton*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 30.04.2015.
- Cordeiro KW, Pinto AL, Formagio ASN, Andrade SF, Kassuya CAL, Freitas K (2012). Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. *J Ethnopharmacol.* 143(1):331-7.
- Cronquist A (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Cruz RCD, Carvalho KS, Silva SLCE, Gualberto AS (2015). Avalia o da atividade larvicida dos extratos aquosos e do hidrolato obtido das folhas de *Croton argyrophyllus* sobre o *Aedes aegypti*. *Enciclopédia Biosfera* 11:2835-2841.
- Cunha CSM, Maia SSS, Coelho MFB (2012). Estaquia de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. com diferentes concentra es de ácido indol butírico. *Ciênc. rural.* 42(4):621-626.
- Dominguez CA, Bullock SH (1989). La reproducción de *Croton suberosus* (Euphorbiaceae) en luz y sombra. *Rev. biol. trop.* 37:1-10.
- Faleiro FG (2007). Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conserva o e uso de recursos genéticos. Embrapa.
- Fedorov AA (1969). Kromosomnye chisla tsvetkovykh rastenii [Chromosome numbers of flowering plants]. Leningrad: Komarov Botanical Institute, 926 p.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998). Introdu o ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220 p.
- Fleishman E, Launer AE, Switky KR (2001). Rules and exceptions in conservation genetics: Genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. *Biol. Conserv.* 98:45-53.

- Freitas L, Bernardello G, Galetto L, Paoli AAS (2001). Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). Bot. J. Linn. Soc. 136:267-277.
- Govaerts R, Frodin DG, Radcliffe-Smith A (2000). A world checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae) Kew, Royal Botanic Gardens.
- Guimarães LAC (2006). O gênero *Croton* L. seção *Cyclostigma* Griseb. e seção *Luntia* (Raf.) G.L. Webster (Euphorbiaceae) ocorrentes na Amazônia Brasileira. Dissertação, Universidade Federal Rural da Amazônia.
- Gusmão CLS (2000). Citogenética da família Euphorbiaceae do nordeste brasileiro. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 58p.
- Ibrahim AA, Mohammad A, Bakir Haseeb AK, Farhan AH, Homaidan AA, Ali HB, Sadoon M e Mohammad S (2010). A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. Int. J. Mol. Sci. 11:2079-2096.
- Jones B, Gliddon C, Good JEG (2001). The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britain. Biol. Conserv. 101:147-156.
- Karp A, Seberg O, Buiatti M (1996). Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. Ann. Bot. 78:143-149.
- Klinbantom R (2004). ISSR analysis of *Croton sublyratus* Kurz in Thailand. Digital Research Information Center.
- Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos Filho JP e Lovato MB (2002). A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. Lundiana 3(2):87-92.
- Leal IR (2003). Dispersão de sementes por formigas na caatinga. In: Leal IR, Tabarelli M, Silva JMC. (Eds). Ecologia e conservação da caatinga. Recife: Universitária da UFPE, p.593-624.
- Leal IR, Wirth R e Tabarelli M (2007). Seed dispersal by ants in the semi-arid Caatinga of northeast Brazil. Ann. Bot. 99:885-894.
- Lima EC, Paiva R, Nogueira RC, Soares FP, Emrich E, Silva AN (2008). Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. Ciênc. agrotec. 32(1): 17-22.
- Lima GS, Castro-Pinto DB, Machado GC, Maciel MA, Echevarria A (2015). Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). Phytomedicine 22(12):1133-7.
- Lima LR e Pirani JR (2008). Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). Biota Neotrop. 82:177-231.
- Lira-Neto AC (2011). Caracterização genética de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste Brasileiro. Tese. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) p.135. Universidade Federal de Pernambuco.

- Litt M e Luty JA (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:388-396.
- Lobo D, Tabarelli M, Leal IR (2011). Relocation of *Croton sonderianus* (Euphorbiaceae) seeds by *Pheidole fallax* Mayr (Formicidae): a case of post-dispersal seed protection by ants?. *Neotrop. entomol.* 40(4):440-444.
- Lopes MCS, Melo YL, Bezerra LL, Ribeiro MCC, Bertino, AMP, Ferreira, NM (2014). Propagação vegetativa por estaquia em marmeleiro (*Croton Sonderianus*) submetido a diferentes indutores de enraizamento. *Agropecuária Científica no Semi-Árido*, 10:111-116.
- Market C e Moller F (1959). Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 45:753-763.
- Mondini L, Noorani A, Pagnotta MA (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1(1):19–35.
- Nass LL (2011) Pré-melhoramento vegetal. In Pré-melhoramento de Plantas. Estado da Arte e Experiências de Sucesso. In: Lopes MA, Fávero AP, Ferreira MAJF, Faleiro FG, Folle SM, Guimarães EP, Eds. Embrapa Informações Tecnológicas: Brasília, Brasil, p. 23–38.
- Nowicke JW (1994). A palynological study of Crotonoideae (Euphorbiaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81:245–269.
- Oliveira TG, Pereira MAS, Coppede JS, França SdeC, Ming LC, Bertoni BW (2015). Genetic diversity analysis of *Croton antisyphiliticus* Mart. using AFLP molecular markers. *Genet. Mol. Res.* 15:1-8.
- Osathanukul M, Suwannapoom C, Ounjai S, Rora JA, Madesis P, Boer Hde (2015). Refining DNA Barcoding Coupled High Resolution Melting for Discrimination of 12 Closely Related *Croton* Species. *PLoS ONE* 10(9):1-14.
- Passos L (1995). Fenologia, polinização e reprodução de duas espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) em mata semidecídua. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
- Passos L, Ferreira SO (1996). Ant dispersal of *Croton priscus* (Euphorbiaceae) seeds in a tropical semideciduous forest in Southeastern Brazil. *Biotropica*, 28:697-700.
- Paulino RC, Santos LW, Coelho MFB (2012). Propagação por estaquia de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. (Euphorbiaceae) em diferentes concentrações de indutores de enraizamento. *Revista Verde*, 7(3):29-33.
- Perry BA (1943). Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. *Am. J. Bot.* 30:527-543.
- Pires MMY, Souza LA e Terada Y (2004). Biologia floral de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) ocorrente em vegetação ripária da ilha Porto Rico, Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 26(2):209-215.
- Pollito PAZ, Tomazello M, Takashiba HE (2004). Contribuição ao conhecimento do status de conservação das espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Brasil. *Nat Con.* 2:42-55.

- Pôrto NA (2007). Citotaxonomia de espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae: Crotonoideae) ocorrentes no Nordeste do Brasil. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agronomia) p.51. Universidade Federal da Paraíba.
- Quirino ZGM e Machado IC (2014). Pollination syndromes in a Caatinga plant community in northeastern Brazil: seasonal availability of floral resources in different plant growth habits. *Braz. J. Biol.* 74(1):62-71.
- Ramos RFB e Lagos JLM (1988). Catalogo de cien espécies forestales de Honduras: distribución, propiedades y usos. Siguatepeque, Escuela Nacional de Ciencias Forestales.
- Randau KP, Florêncio DC, Ferreira CP, Xavier HS (2004). Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 14(2):89-96.
- Rao VR e Hodgkin T (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 68:1–19.
- Rahman, AHMM e Akter M (2013). Taxonomy and Medicinal Uses of Euphorbiaceae (Spurge) Family of Rajshahi, Bangladesh. *Research in Plant Sciences*, 1(3):74-80.
- Reddy PM, Sarla N, Siddiq EA (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1):9–17.
- Riina R, Berry PE, Van Ee B (2009). Molecular phylogenetics of the Dragon's blood *Croton* section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae): a polyphyletic assemblage unraveled. *Systematic Botany*, 34:360–374.
- Riina R, Van Ee BW, Wiedenhoef AC, Cardozo A, Berry PE (2010). Sectional rearrangement of arborescent clades of *Croton* (Euphorbiaceae) in South America: evolution of arillate seeds and a new species, *Croton domatifer*. *Taxon*, 59:1147–1160.
- Rocha TO, Freitas JS, Santos ESL, Scaldaferrri MM, Gonçalves C, Cerqueira-Silva CBM (2016). Estimate of diversity and structure genetic in cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) based on molecular markers. *Afr. J. Biotechnol.* 15:518-523.
- Salatino A, Salatino MLF, Negri G (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 18(1):11-33.
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop MN (2006). An overview of molecular markers methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5(25):2540-2568.
- Scaldaferrri MM, Freitas JS, Vieira JGP, Gonçalves, ZS, Souza AM e Cerqueira-Silva CBM (2014). Comparison of methods for estimates of molecular genetic diversity in genus *Croton*: influence of coefficients, clustering strategies and data projection. *Genet. Mol. Res.*, 13 (3): 5566-5573.
- Silva JS, Sales MF, Gomes APS, Carneiro-Torres DS (2010). Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, 24(2):441-453.

Silva SLC, Gualberto AS, Carvalho KS, Fries DD (2014). Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Biotemas*, 27:79-85.

Silvestrini M (2014). Ecologia e evolução de *Croton floribundus* spreng.: como a diversidade e estrutura genética de uma espécie arbórea pioneira são afetadas por distúrbios naturais e antrópicos?. Tese, Universidade Estadual de Campinas.

Silvestrini M, McCauley DE, Zucchi MI, Santos FAM (2015). How do gap dynamics and colonization of a human disturbed area affect genetic diversity and structure of a pioneer tropical tree species?. *Forest Ecology and Management*, 344:38–52.

Silvestrini M, Pinto-Maglio CAF, Zucchi MI, Santos FAM (2013). Cytogenetics and characterization of microsatellite loci for a South American pioneer tree species, *Croton floribundus*. *Genome*, 56:743–751.

Siqueira RJ, Duarte GP, Magalhães PJ, Lahlou S (2013). Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in DOCA-salt hypertensive, conscious rats. *Nat Prod Commun*. 8(8):1167-70.

Soontornchainaksaeng P e Chaiyasut K (1999). Cytogenetic investigation of some Euphorbiaceae in Thailand. *Cytologia*, 64:229-234.

Soontornchainaksaeng P, Chantaranonthai P, Senakun C (2003). Genetic diversity of *Croton* L. (Euphorbiaceae) in Thailand. *Cytologia*, 68(4):379-382.

Souza RF, Zirolto BD, Rossetto EF, Cavalheiro AL, Torezan JMD, Vanzela ALL (2012). The use of genetic structure as a guide for seed gathering for forest restoration. *R. bras. Bioci.*, 10(3):309-313.

Stace CA (2000). Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20 th and 21 st centuries. *Taxon*, Utrecht, 49: 451-477.

Suzaki VJ (2011). Filogenia e biogeografia do complexo *Croton pallidulus* (Euphorbiaceae), inferidas por sequências de DNA e marcadores AFLP. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) p. 89. Universidade de São Paulo.

Torrice F, Cepeda M, Guerrero G, Melendez F, Blanco Z, Canelón DJ, Diaz B, Compagnone RS, Suárez AI (2007). Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Rev Bras Farmacogn*, 17:166-169.

Urbatsch LE, Bacon JD, Hartman RL, Johnston MC, Watson-JR TJ e Webster GL (1975). Chromosome numbers for North American Euphorbiaceae. *Am. J. Bot.* 62(5):494-500.

Van Ee BW, Jelinski N, Berry PE, Hipp AL (2006). Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. *Mol. Ecol.*, 15: 2735-2751.

Van Ee BW, Riina R, Berry PE (2011). A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon*, 42:793-823.

Van Ee BW e Berry PE (2011) *Croton* section *Pedicellati* (Euphorbiaceae), a novel new world group, and a new subsectional classification of *Croton* section *Lamprocroton*. *Systematic Botany*, 36: 88–98.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23(21):4407-4414.

Vitarelli NC, Riina R, Caruzo MBR, Cordeiro I, Fuertes-Aguilar J, MEIRA RMSA (2015). Foliar secretory structures in Crotonaeae (Euphorbiaceae): Diversity, anatomy, and evolutionary significance. *Am. J. Bot.* 102:833-847.

Webster GL (1993). A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon*, 42:793-823.

Webster GL (1994). Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81:33-144.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531–6535.

Zietkiewicz E, Rafalski A e Labuda D (1994). Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-183.

Zirolto BD (2007). Estrutura genética em populações de *Croton floribundus* spreng. de diferentes fragmentos de mata. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina.

CAPITULO II

Periódico pretendido para submissão: *Genetics and Molecular Research*

Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Croton linearifolius* (Euphorbiaceae) estimadas com o uso de marcadores moleculares

T.S.S Silva¹; J. S. Freitas^{1,2}; [...] e C. B. M. Cerqueira- Silva ^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000

²Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000

Autor para correspondência: C.B.M Cerqueira-Silva

E-mail: csilva@uesb.edu.br

RESUMO. Foi estimada a diversidade e estrutura genética em 61 indivíduos de *C. linearifolius* coletados na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA) no município de Contendas do Sincorá - Bahia, a partir da análise do perfil de amplificação de nove combinações de pares de *primers* RGA (*Resistance Gene Analogs*) e oito *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) selecionados previamente. Foram geradas um total de 134 marcas (81,3% polimórficas), com médias de 7,6 e 8,1 marcas obtidas com os *primers* RGA e ISSR, respectivamente. A análise Bayesiana indicou como mais provável a estruturação em dois pools gênicos (escore de Delta K=1400) e possível sub-estruturação de três ou quatro pools gênicos (escores de Delta K~400 e K~200, respectivamente). Com base na análise molecular de variância (AMOVA) foi possível verificar que 64% ($p \text{ rand} < 0,01$) da variação ocorre dentro das regiões, e uma quantidade significativa (36%) ($p \text{ rand} < 0,01$) foi atribuída a diferenças entre as regiões, o que indica estruturação genética entre elas. Esses resultados foram corroborados com a Análise de coordenadas principais (PCoA), indicando associação com a distribuição geográfica das regiões de coleta. Os prováveis mecanismos de polinização por insetos e dispersão primária autocórica com dispersão secundária por formigas, justificariam, ao menos em parte, a estruturação genética observada para *C. linearifolius*.

Palavras chave: Caatinga; *Croton* spp.; Diversidade genética; Marcadores moleculares; Velame pimenta

INTRODUÇÃO

O gênero *Croton* L. (Euprobiaceae), com cerca de 1.200 espécies, destaca-se como o segundo maior da família Euphorbiaceae, com a maioria das suas espécies dispersas nas regiões tropicais do mundo (Govaerts et al., 2000). O Brasil é considerado um dos principais centros de diversidade do gênero *Croton*, com pelo menos 350 espécies distribuídas nas diferentes regiões do país (Berry et al., 2005). A maior concentração se dá nas regiões Sudeste e Nordeste, com aproximadamente 160 e 120 espécies, respectivamente (Carneiro-Torres 2009; Cordeiro et al., 2015).

Espécies do gênero *Croton* constituem um importante recurso natural na região Nordeste do Brasil, sendo utilizadas para diversos fins. Dentre as espécies indicadas popularmente por possuírem atividade biológica, algumas possuem ensaios que comprovam seu potencial medicinal [*C. regelianus* (Antitumoral) (Bezerra et al., 2009); *C. zehntneri* (Antimalárica) (Mota et al., 2012); *C. campestris* (Antiulcerogênico gástrico) (Júnior et al., 2014); *C. pulegioides* (Antimicrobiana) (Arrais et al., 2014); *C. cordiifolius* (Antinociceptivo) (Nogueira et al., 2015)], e/ou inseticida [*C. argyrophyloides*, *C. nepetaefolius*, *C. sonderianus* e *C. zehntneri* (Lima et al., 2006); *C. tetradenius* (Carvalho et al., 2015); *C. argyrophyllus* (Cruz et al., 2015)].

Neste contexto, destaca-se *Croton linearifolius*, conhecida popularmente como “velame pimenta”, a espécie apresenta potencial inseticida comprovado contra o *Aedes aegypti* (Silva et al., 2014) e *Cochliomyia macellaria* (Silva et al., 2010), o que corrobora o uso tradicional indicado na região semiárida do Brasil (Silva et al., 2010, 2014). Apresenta ainda composição química diversa, sendo rica em alcaloides, esteroides e flavonoides, dentre outros compostos potencialmente promissores (Silva et al., 2010). *C. linearifolius* é endêmica do Brasil, com registros de ocorrência nos estados de Minas gerais, Piauí, Tocantins e maior representatividade na Bahia (Cordeiro et al., 2015).

A espécie *C. linearifolius* (Figura 1) possui hábito arbustivo e pode medir até 2 metros de altura. São monóicas, com folhas lanceoladas e discolores, inflorescências racemos bissexuados, os frutos são deiscentes e apresentam-se como capsulas tricocas, as sementes medem cerca de 4,0 mm de comprimento e 2,5 mm de largura, com coloração castanha (Lima e Pirani, 2008).

A exploração de espécies nativas pela população é baseada geralmente no extrativismo exploratório, o que pode acarretar na redução da biodiversidade (Valle et al.,

2013). Entre os diferentes componentes da biodiversidade, a diversidade genética é a base para o potencial evolutivo de uma espécie e determina suas chances de sobrevivência, reprodução e adaptação às possíveis mudanças ambientais (Fleishman et al., 2001). Portanto, o conhecimento da diversidade e da estrutura genética de espécies que apresentam potencial enquanto recurso natural é uma prerrogativa para elaboração de estratégias de manejo sustentável e de conservação dos recursos genéticos. Neste contexto, os marcadores genético-moleculares consistem em uma importante ferramenta para realização de estudos populacionais e têm sido empregados no estudo de uma ampla gama de organismos.

Os marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) são exemplos de marcadores que não requerem informações prévias sobre o genoma das espécies a serem avaliadas e possibilitam uma caracterização rápida e de baixo custo, especialmente útil para espécies ainda pouco estudadas e com interesse comercial ainda pouco explorado.

Em detrimento da importância ecológica e do potencial econômico para as espécies de *Croton*, estudos genéticos populacionais se encontram escassos e limitados a poucas espécies (aproximadamente 1%), o que prejudica o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação, que possam auxiliar na conservação e no uso sustentável dessa biodiversidade. Para *C. linearifolius* os estudos genético-moleculares limitam-se aos trabalhos de Scaldaferrri (2013), Scaldaferrri et al. (2013, 2014) e Rocha (2015), com a utilização de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

O objetivo geral dessa pesquisa foi caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *C. linearifolius*, presentes na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), no município de Contendas do Sincorá-Bahia, Brasil, por meio da aplicação dos marcadores moleculares RGA e ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da área e material biológico

O estudo foi conduzido a partir de amostras de DNA previamente extraídas de 61 indivíduos de *Croton linearifolius*, coletados em três regiões, aqui entendidas como unidades populacionais presentes na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), no município de Contendas do Sincorá, Bahia, Brasil (Tabela 1) (Rocha, 2015). Essas amostras foram depositadas no banco de DNA genômico do Laboratório de Genética Molecular Aplicada

(LGMA), na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* Itapetinga – Bahia.

A integridade das amostras de DNA foi reavaliada em gel de agarose 1% (m/v), mediante eletroforese (2 horas em corrente elétrica 90 V) e visualizadas a partir dos corantes loading (azul de bromofenol e xileno cianol) e GelRed (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) (conforme especificações do fabricante), em sistema de fotodocumentação Kodak, com incidência de iluminação ultravioleta (UV). Para estimar a concentração de DNA (ng/uL) foi adotado como padrão o marcador de peso molecular Lambda (DNA Lambda não digerido) (Invitrogen) (conforme especificações do fabricante).

Genotipagem Molecular

Pré-seleção de *primers* foi realizada a partir de testes de amplificação em oito indivíduos de *C. linearifolius* com o uso de 24 combinações de pares de *primers* RGA (a partir de 23 *primers* previamente publicados) (Tabela 2) e em cinco indivíduos com 23 *primers* ISSR (Tabela 3). Com o objetivo de potencializar a segurança da genotipagem foram selecionados 10 *primers* ISSR e 10 combinações de pares RGA, que além de gerarem produtos de fácil visualização também foram polimórficos.

Todas as reações de PCR foram realizadas com um volume final de 16 µL, contendo 12 ng de DNA, 1,7 µL de tampão de PCR 10X (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1,0 µL de MgCl₂ 50mM (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), 1 µL de dNTP mix 2,5mM (LGC biotecnologia), 1 unidade de Taq DNA polimerase (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), água Milli-Q e 1 µL de *primer*.

Nas reações de amplificação foram adotados os seguintes programas de amplificação: para os iniciadores RGAs; 5 minutos a 95°C; seguido de 34 ciclos (30 segundos a 95°C, 1 minuto a 37°C, 1 minuto e 20 segundos a 72°C); e 10 minutos a 72°C. Para os iniciadores ISSR: 95 °C por 5 minutos; seguido de 34 ciclos (94 °C por 50 segundos, 48°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto); e 5 minutos a 72°C. Todas as amplificações foram realizadas no LGMA da UESB.

Alíquotas (5 µL) dos produtos de amplificação foram visualizados a partir de corrida eletroforética, em gel de agarose a 2% (m/v) e solução de corrida TBE 1x, por aproximadamente 2 horas a 110V. A visualização do resultado da corrida eletroforética foi realizada com fotodocumentador Kodak, sob incidência de luz ultravioleta.

Análises dos dados moleculares e estimativa da diversidade genética

Após análise das imagens dos géis, por dois avaliadores, os padrões de bandas obtidos foram considerados para construção de uma tabela de dados binários, onde zero (0) foi atribuído para a ausência de bandas e um (1) para presença. Com base nessa tabela, foi calculado o percentual de polimorfismo. Antes das estimativas de diversidade e estrutura, foi realizada uma triagem dos dados, com intuito de manter apenas os marcadores que apresentassem um percentual menor ou igual a 20% de dados faltantes (i.e., dados cuja identificação de presença ou ausência de bandas não pode ser determinada com certeza).

A análise Bayesiana foi realizada com uso do programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) e a estimativa do número de pools gênicos que melhor representam a distribuição da diversidade foi realizada com uso da ferramenta *on line* STRUCTURE Harvester (Earl e vonHoldt, 2012). Entre os principais parâmetros adotados nas análises Bayesianas, destacam-se: uso do modelo admixture (que admite fluxo genético entre as amostras), realização de 20 corridas para cada um dos possíveis pool gênicos 'K' testados (k1 a k10), e adoção de 100,000 e 1.000,000 de corridas, para os períodos de pré-análise (burnining) e desenvolvimento da MCMC (cadeia de Markov), respectivamente. O programa CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson e Rosenberg, 2007) foi utilizado para alinhar os valores de q (representativos do percentual de adesão de um indivíduo a um determinado pool gênico) obtidos nas análises do STRUCTURE. Os dados obtidos com o programa CLUMPP foram utilizados para construção de histogramas com auxílio do programa DISTRUCT v.1.1 (Rosenberg, 2004). Os valores de q também foram utilizados como critério para classificação dos indivíduos nos pools gênicos, sendo considerado como mistura (i.e., indivíduo de pool gênico indefinido) os indivíduos com valores de $q \leq 0,60$ para um dos pool gênicos estimados.

Estimativa de similaridade genética foi realizada com base no coeficiente de Jaccard, com auxílio do programa GENES (Cruz, 2006). O agrupamento dos genótipos foi realizado pelo método Neighbor Joining, por meio do programa DARwin (Perrier, 2009). Análise de coordenadas principais (PCoA) e de Variância Molecular (AMOVA), com 999 permutações ao acaso foram realizadas com uso do programa GenALEX v.6.5 (Peakall e Smouse, 2012) a fim de se observar a variação genética entre e dentro das regiões de coleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 134 marcas foram geradas após as reações de amplificação em 61 indivíduos de *Croton linearifolius*. Após triagem dos dados, foram mantidos nas análises nove e oito *primers* RGA e ISSR, respectivamente. As combinações de *primers* RGAs selecionadas produziram um total de 69 marcas (82,6% polimórficas) com um número médio de 7,6 marcas por par de *primers*. As combinações 18 (RGA6R + RGA 6F) e 19 (RGA1R + RGA 4F) geraram o menor (três) e o maior (13) número de marcas, respectivamente (Tabela 4). As reações de amplificação com os *primers* ISSR produziram um total de 65 marcas (80% polimórficas), com um número médio de 8,1 marcas por *primer*. Os *primers* DiCA3`RG e TriAAC3`RC produziram o menor (seis) e maior (10) número de marcas, respectivamente (Tabela 5).

Embora inexistam estudos com marcadores RGA para o gênero *Croton*, resultados semelhantes ao polimorfismo observado com tais marcadores para *C. linearifolius* foram observados em diferentes espécies vegetais, a exemplo de maracujazeiros (94%) (Paula et al., 2010); cana de açúcar (86,5%) (Jayashree et al., 2010) e arroz (96%) (Juansheng et al., 2013). Esses resultados atestam o potencial dos marcadores RGA em acessar polimorfismo genético. Por sua vez, os resultados de polimorfismo obtidos com a utilização de *primers* ISSR em *C. linearifolius* foram similares aos resultados apresentados para outras espécies do gênero *Croton*, a exemplo de *C. sublyratus*, *C. blanchetianus*, *C. pedicellatus* (97%) (Lira-Neto, 2011) e *C. heliotropiifolius* (94%) (Rocha et al., 2016).

Considerando a análise Bayesiana (baseado nos valores de Delta K) observou-se a estruturação principal em dois pools gênicos (escore de Delta K=1400) e possível sub-estruturação de três ou quatro pools gênicos (escores de Delta K~400 e K~200, respectivamente), como as composições mais prováveis para os 61 indivíduos de *C. linearifolius* (Figura 2). O histograma que ilustra o nível de estruturação em dois pools gênicos (Figura 3A) revela uma predominância do pool gênico representado pela cor azul, nas regiões 1 ($q = 0,78$) e 2 (pontos 2,3,4 e 5) (média de $q = 0,73$), enquanto que na região 3 (pontos 6, 7, 8, 9 e 10) há uma predominância do pool gênico representado pela cor verde (média de $q = 0,89$). Considerando uma sub-estruturação em três pools gênicos (Figura 3B), embora não se observe alterações significativas na composição das regiões 1 ($q = 0,82$) e 3 (média de $q = 0,89$), é nítida a alteração na composição da região 2 que passa a apresentar a presença predominante de um pool gênico distinto representado pela cor vermelha (média de $q = 0,62$).

A estrutura observada com a análise Bayesiana foi corroborada pelos resultados obtidos a partir da análise molecular de variância (AMOVA), onde foi possível verificar que

64% ($p_{\text{rand}} < 0,01$) da variação ocorre dentro das regiões, e uma quantidade significativa (36%) ($p_{\text{rand}} < 0,01$) foi atribuída a diferenças entre as regiões, o que indica estruturação genética entre elas. A decomposição da AMOVA apresentada na matriz de avaliação par a par entre as regiões (Tabela 6), indica maior distância genética entre as regiões 1 e 3 (45,8%) e menor entre as regiões 2 e 3 (29,7%). Resultado similar foi encontrado para a espécie *C. antisiphiliticus* que de acordo com Oliveira (2016) apresentou aproximadamente 40% de variação entre as localidades estudadas.

A estrutura genética entre as populações de plantas é influenciada, entre outros fatores, pelos efeitos ocasionados pela dispersão de pólen e sementes, que estão diretamente relacionados com a conectividade entre as populações, determinando as taxas de fluxo gênico (Zanella et al., 2012). Os polinizadores e agentes dispersores de sementes que apresentem efetiva dispersão a longas distâncias diminuem a probabilidade de ocorrer diferenciação entre as populações, enquanto a dispersão em distâncias restritas tem efeito contrário, promovendo a estruturação genética populacional (Loveless e Hamrick, 1984).

Embora inexista registros na literatura de estudos acerca da biologia reprodutiva de *C. linearifolius*, trabalhos realizados com espécies do mesmo gênero mostram que há predominância de polinização pelo vento e/ou por diferentes insetos [*C. suberosus* (Domínguez e Bullock, 1989), *C. floribundus* e *C. priscus* (Passos, 1995), *C. sarcopetalus* (Freitas et al., 2001), *C. urucurana* (Pires et al., 2004)]. Considerando que as espécies polinizadas por insetos tendem a ter menores taxas de fluxo gênico e por consequência maior diferenciação genética, já que as distâncias percorridas são relativamente pequenas (Loveless e Hamrick, 1984) é esperado que para o gênero *Croton* ocorra estruturação entre populações.

A dispersão primária autocórica pela deiscência dos frutos e dispersão secundária zoocórica devido a associações com várias espécies de formigas, é uma estratégia comum entre as espécies do gênero *Croton*. A presença do elaiossomo é um atrativo para as formigas que atuam como dispersores secundários, diminuindo assim a predação e a competição entre as plântulas (Webster, 1994; Passos e Ferreira, 1996; Leal et al., 2007; Lobo et al., 2011). As espécies autocóricas tendem a apresentar uma dispersão de sementes limitada espacialmente, em distâncias máximas que podem variar de 3,4 (Passos e Ferreira, 1996) até 8,0 metros (Narbona et al., 2005). Além disso, as formigas podem percorrer até 2,5 metros de distância (Passos e Ferreira, 1996), o que também pode resultar em uma maior diferenciação genética entre populações.

Portanto, as estratégias de polinização e dispersão observadas para o gênero e prováveis para *C. linearifolius*, podem estar relacionadas ao baixo fluxo gênico inferido entre

as regiões 1 e 3, tendo por base os resultados do STRUCUTRE e da AMOVA, bem como a menor estrutura entre essas e a região 2, que se localiza em região intermediária. Estruturação semelhante, com existência de três pool gênicos e presença de maior diferenciação entre pontos extremos de coleta, foi observada por Rocha et al. (2016) para *C. helitropiifolius* a partir de estimativas realizadas com marcadores ISSR e RAPD.

Além dos fatores acima mencionados *C. linearifolius* é uma espécie monóica, caracterizada por apresentar inflorescências com flores estaminadas (masculinas) na parte terminal e pistiladas (femininas) na parte inferior (Lima e Pirani, 2008). Esta disposição das flores masculinas e femininas em uma inflorescência pode facilitar a ocorrência de autofecundação, fato que já foi demonstrado nas espécies *C. floribundus* e *C. priscus* (Passos, 1995); *C. suberosus* (Domínguez e Bullock, 1989) e *C. sarcopetalus* (Freitas et al., 2001) que apresentam flores de morfologia similar a *C. linearifolius* o que contribui para o aumento da endogamia.

Os resultados obtidos por meio da análise PCoA (Figura 4) corroboram a hipótese de sub-estruturação em três pools gênicos obtidos pela análise Bayesiana (Figura 3B), havendo uma correspondência com a distribuição geográfica das três regiões de coleta. Na figura 4B é apresentado os agrupamentos dos indivíduos delimitados por retângulos de cores correspondentes aquelas utilizadas para representar os pools gênicos no histograma. Diversos indivíduos coletados na região 2 apresentaram valores elevados para o pool gênico característico dessa região, representado pela cor vermelha no histograma ($q \leq 0,60$) (Figura 3B e material suplementar 2). Esses resultados estão de acordo com as regiões de coleta e corroboram com a dispersão dos indivíduos dessa região no gráfico do PCoA (Figura 4B).

Com base no gráfico de coordenadas principais (Figura 4B) é possível observar a ocorrência de indivíduos característicos da região 2 para o pool gênico característico dos indivíduos da região 3 (material suplementar 2), fato que foi corroborado pela análise molecular de variância apresentada na matriz de avaliação par a par entre as regiões (Tabela 6), no qual foi indicado estruturação genética entre os indivíduos das regiões 2 e 3 (aproximadamente 30%). O resultado observado pode ser reflexo da conectividade entre as regiões tendo como intermédio a região 2, devido a sua localização geográfica entre os pontos 1 e 3.

A despeito da complementariedade observada entre os resultados das análises Bayesianas, de coordenadas principais e da AMOVA, não houve correspondência com a projeção dos dados de distância (tanto pelo método de agrupamento Neighbor Joining quanto pelo UPGMA) estimadas pelo coeficiente de Jaccard (dados não apresentados). Considerando

que a escolha dos coeficientes e dos métodos de agrupamento podem influenciar diretamente nos resultados das projeções (tanto em gráficos de dispersão, quanto em dendogramas) (Scaldeferri et al., 2014; Cerqueira-Silva et al., 2009) é provável que essa ausência de associação esteja associada a influência do método estatístico intrínseco aos procedimentos de estimativa de distância e/ou ao método de agrupamento.

CONCLUSÃO

Os marcadores RGA e ISSR foram eficientes em acessar marcas polimórficas nos indivíduos de *Croton linearifolius*. As populações de *C. linearifolius* estão estruturadas em pelo menos dois pools gênicos e sub-estruturadas em três e quatro pools gênicos, havendo correspondência entre a estruturação genética e a distribuição geográfica dos indivíduos. Os prováveis mecanismos de polinização por insetos e dispersão primária autocórica com dispersão secundária por formigas, justificariam a estruturação genética observada para *C. linearifolius*, uma vez que essas estratégias não seriam suficientes para promover o fluxo genético entre as regiões de coleta. Os resultados obtidos contribuem com o conhecimento genético-molecular de *C. linearifolius*, o que pode auxiliar nas estratégias aplicadas ao manejo e conservação da espécie.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao programa de pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) pela concessão da bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

- Arrais LG, Lyra HFS, Batista DCA, Coutinho FN, et al. (2014). Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). *Rev. bras. plantas med.* 16: 316-322. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_033
- Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, Ee BV, Riina R (2005). Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. *Am. J. Bot.* 92: 1520-1534. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.92.9.1520>
- Bezerra DP, Marinho Filho JD, Alves AP, Pessoa C, et al. (2009). Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. *Chem Biodivers.* 6: 1224-31. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.200800253>

- Carneiro-Torres DS (2009). Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 296p.
- Carvalho KS, Cruz RCD, Silva SLCE and Gualberto AS (2015). Atividade larvívica dos extratos aquosos e do hidrolato das folhas de *Croton tetradenius* sobre o *Aedes aegypti*. *Enciclopédia Biosfera* 11: 2815-2823.
- Cerqueira-Silva CBM, Cardoso-Silva CB, Conceicao LD, Nonato JV, et al. (2009). Comparison of coefficients and distance measurements in passion fruit plants based on molecular markers and physicochemical descriptors. *Genet. Mol. Res.* 8: 870-879. <http://dx.doi.org/10.4238/vol8-3gmr614>
- Cordeiro I, Secco R, Carneiro-Torres DS, Lima LR DE, et al. (2015). *Croton*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 30.04. 2015.
- Cruz CD and Carneiro PCS (2006). Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético. 2ª ed. Viçosa: UFV, p.585.
- Cruz RCD, Carvalho KS, Silva SLCE and Gualberto AS (2015). Avaliação da atividade larvívica dos extratos aquosos e do hidrolato obtido das folhas de *Croton argyrophyllus* sobre o *Aedes aegypti*. *Enciclopédia Biosfera* 11: 2835-2841.
- Dominguez CA and Bullock SH (1989). La reproducción de *Croton suberosus* (Euphorbiaceae) en luz y sombra. *Rev. Biol Trop.* 37: 1-10.
- Earl DA and vonHoldt BM (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour.* 4: 359–361. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Fleishman E, Launer AE and Switky KR (2001). Rules and exceptions in conservation genetics: Genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. *Biol Conserv* 98: 45-53. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3207\(00\)00140-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00140-3)
- Freitas L, Bernardello G, Galetto L and Paoli AAS (2001), Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 136: 267–277. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2001.tb00572.x>
- Govaerts R, Frodin DG and Radcliffe-Smith A (2000). A world checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae). Kew, Royal Botanic Gardens. 2: 417-536.
- Jakobsson M and Rosenberg NA (2007). CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics.* 23: 1801-1806. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
- Jayashree J, Selvi A and Nair NV (2010). Characterization of resistance gene analog polymorphism in sugarcane cultivars with varying levels of red rot resistance. *Elect J Plant Breeding*, 1: 1191-1199

- Juansheng R, Yuchao Y, Fangyuan G, Lihua Z, et al. (2013). Application of resistance gene analog markers to analyses of genetic structure and diversity in rice. *Genome* 56: 377-387. <http://dx.doi.org/10.1139/gen-2012-0142>
- Júnior FE, de Oliveira DR, Boligon AA, Athayde ML, et al. (2014). Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. *J Ethnopharmacol.* 153: 469-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.005>
- Leal IR, Wirth R and Tabarelli M (2007). Seed dispersal by ants in the semi-arid Caatinga of northeast Brazil. *Ann. Bot.*, 99: 885–894. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm017>
- Lobo D, Tabarelli M and Leal IR (2011). Relocation of *Croton sonderianus* (Euphorbiaceae) seeds by *Pheidole fallax* Mayr (Formicidae): a case of post-dispersal seed protection by ants?. *Neotrop. entomol.* 40: 440-444. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2011000400005>
- Loveless MD and Hamrick JL (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 15: 65-95. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.es.15.110184.000433>
- Lima LR and Pirani JR (2008). Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). *Biota Neotrop.* 82: 177-231. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032008000200018>
- Lima MGAde, Maia ICC, Sousa BDde, Morais SMde, et al. (2006). Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 48: 211-214. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652006000400007>.
- Lira-Neto AC (2011). Caracterização genética de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste Brasileiro. Tese. (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) p.135. Universidade Federal de Pernambuco.
- Mota ML, Lobo LT, Costa JM, Costa LS, et al. (2012). In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. *Planta Med.* 78: 658-64. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1298333>
- Narbona E, Arista M and Ortiz PL (2005). Explosive seed dispersal in two perennial Mediterranean Euphorbia species (Euphorbiaceae). *Am. J. Bot.* 92: 510–516. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.92.3.510>
- Nogueira Lde M, da Silva MR, Dos Santos SM, de Albuquerque JF, et al. (2015). Antinociceptive Effect of the Essential Oil Obtained from the Leaves of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae) in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/620865>

Oliveira TG, Pereira MAS, Coppede JS, França SdeC, et al. (2016). Genetic diversity analysis of *Croton antisiphiliticus* Mart. using AFLP molecular markers. *Genet. Mol. Res.* 15: 1-8 <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017461>

Paula MS, Fonseca MEN, Boiteux LS and Peixoto JR (2010). Caracterização genética de espécies de Passiflora por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. *Rev. Bras. Frutic.* 32: 222-229. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452010005000021>

Passos LC (1995). Fenologia, polinização e reprodução de duas espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) em mata semidecídua. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Passos L and Ferreira SO (1996). Ant dispersal of *Croton priscus* (Euphorbiaceae) seeds in a tropical semideciduous forest in Southeastern Brazil. *Biotropica* 28: 697-700. <http://dx.doi.org/10.2307/2389055>

Peakall R and Smouse PE (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teach-ing and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>

Perrier X and Jacquemoud-Collet JP (2006). DARwin Software. Disponível em: <http://darwin.cirad.fr/>.

Pires MMY, Souza LA and Terada Y (2004). Biologia floral de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) ocorrente em vegetação ripária da ilha Porto Rico, Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. *Acta sci., Biol. sci.* 26: 209-215. <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v26i2.1638>

Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.

Rocha TDEO (2015). Diversidade genética em *Croton* spp. (euphorbiaceae) com potencial fitoterápico e inseticida. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) p.74. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Rocha TO, Freitas JS, Santos ESL, Scaldaferrri MM, et al. (2016). Estimate of diversity and structure genetic in cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) based on molecular markers. *Afr. J. Biotechnol.* 15: 518-523. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2015.15009>

Rosenberg NA (2004). DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes.* 4: 137–138. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>

Scaldaferrri MM, Freitas JS, Vieira JGP, Gonçalves ZS, et al. (2014). Comparison of methods for estimates of molecular genetic diversity in genus *Croton*: influence of coefficients, clustering strategies and data projection. *Genet. Mol. Res.* 13: 5566-5573. <http://dx.doi.org/10.4238/2014.July.25.11>

Scaldaferri MM, Freitas JS, Santos ESL, Vieira JGP, et al. (2013). Comparison of protocols for genomic DNA extraction from 'velame pimenta' (*Croton linearifolius*), a native species to the Caatinga, Brazil. *Afr. J. Biotechnol.* 12: 4761-4766.

<http://dx.doi.org/10.5897/AJB2013.12182>

Scaldaferri M.M (2013). Diversidade genética em Velame Pimenta (*Croton linearifolius*) e Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) em ambientes silvestres no Sudoeste da Bahia. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) p.89. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Silva SLC, Carvalho MG, Gualberto AS, Carneiro-Torres DS, et al. (2010). Bioatividade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Acta Vet. Brasilica* 4: 252-258.

Silva SLC, Gualberto AS, Carvalho KS and Fries DD (2014). Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Biotemas* 27: 79-85.

<http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2014v27n2p79>

Valle JS, Fonseca BKD, Nakamura SS, Linde GA, et al. (2013). Diversidade genética de populações naturais de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] por RAPD. *Rev. bras. plantas med.* 15: 47-53. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000100006>

Zanella CM, Janke A, Palma-Silva C, Kaltchuk-Santos E, et al. (2012). Genetics evolution and conservation of Bromeliaceae. *Genet. Mol. Biol.* 35: 1020-1026.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572012000600017>

Webster GL (1994). Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 81: 33-144. <http://dx.doi.org/10.2307/2399909>

Tabela 1. Coordenadas geográficas e número de indivíduos de *C. linearifolius* amostrados por regiões e pontos de coleta na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, Bahia.

Regiões de coleta	Pontos de coleta	Latitude (S)	Longitude (W)	Número de indivíduos
Região 1	1	-13.922	-41.117	13
Região 2	1	-13.943	-41.113	5
	2	-13.942	-41.112	5
	3	-13.942	-41.112	5
	4	-13.941	-41.112	4
Região 3	1	-13.970	-41.119	3
	2	-13.970	-41.119	5
	3	-13.970	-41.119	5
	4	-13.969	-41.119	5
	5	-13.970	-41.119	11
Total				61

Tabela 2. Descrição das 24 combinações de pares de *primers* RGA obtidas a partir de 23 *primers* e utilizados em testes de amplificação em *C. linearifolius*.

Combinação	Código	Seqüência	Referência	
1	S1	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	Leister et al.,1996	
	AS1	CAA CGC TAG TGG CAA TCC		
2	S1	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG		
	AS2	IAA IGC IAG IGG IAA ICC		
3	S1	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG		
	AS3	IAG IGC IAG IGG IAG ICC		
4	AS1	CAA CGC TAG TGG CAA TCC		
	AS2	IAA IGC IAG IGG IAA ICC		
5	AS1	CAA CGC TAG TGG CAA TCC		
	AS3	IAG IGC IAG IGG IAG ICC		
6	NBSF1	GGA ATG GGI GGI GIF GGI AAR AC		Yu et al., 1996
	AS1	CAA CGC TAG TGG CAA TCC		Leister et al.,1996
7	NBSF1	GGA ATG GGI GGI GIF GGI AAR AC	Yu et al., 1996	
	AS2	IAA IGC IAG IGG IAA ICC	Leister et al.,1996	
8	NBSF1	GGA ATG GGI GGI GIF GGI AAR AC	Yu et al., 1996	
	AS3	IAG IGC IAG IGG IAG ICC	Leister et al.,1996	
9	S1	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	Leister et al.,1996	
	NBSR1	YCT ACT TGT RAY DAT DAY YYT RC	Yu et al., 1996	
10	RGA1F	AGT TTA TAA TTY EAT TGC T	Kanazin et al., 1996	
	RGA8R	AGC CAC TTT TGA CAA CTG C	Kanazin et al., 1996	
11	NBSF1	GGA ATG GGI GGI GIF GGI AAR AC	Yu et al., 1996	
	NBSR1	YCT ACT TGT RAY DAT DAY YYT RC	Yu et al., 1996	
12	RGA8F	AGC GAC GAG AGT TGT ATT TAA G	Kanazin et al., 1996	
	RGA8R	AGC CAC TTT TGA CAA CTG C		
13	RGA1R	ACT ACG ATT CAA GAC GTC CT		
	RGA1F	AGT TTA TAA TTY EAT TGC T		
14	RGA2R	CAC ACG GTT TAA AAT TCT CA		
	RGA1F	AGT TTA TAA TTY EAT TGC T		
15	RGA7R	CCG AAG CAT AAG TTG GTG		
	RGA1F	AGT TTA TAA TTY EAT TGC T		
16	RGA4R	TAC ATC ATG TGT TAC CTC T		
	RGA4F	TGT TAC TGC TTT GTT TGG TA		
17	RGA5R	TCA ATC ATT TCT TTG CAC AA		
	RGA5F	TGC TAG AAA AGT CTA TGA AG		
18	RGA6R	AAC TAC ATT TCT TGC AAG T		
	RGA 6F	AGC CAA AGC CAT CTA CAG T		
19	RGA1R	ACT ACG ATT CAA GAC GTC CT		
	RGA 4F	TGT TAC TGC TTT GTT TGG TA		
20	RGA4R	TAC ATC ATG TGT TAC CTC T		
	RGA 1F	AGT TTA TAA TTY EAT TGC T		
21	RGA2R	CAC ACG GTT TAA AAT TCT CA		
	RGA 4F	TGT TAC TGC TTT GTT TGG TA		
22	RGA2R	CAC ACG GTT TAA AAT TCT CA		
	RGA 5F	TGC TAG AAA AGT CTA TGA AG		
23	RGA2R	CAC ACG GTT TAA AAT TCT CA		
	RGA 6F	AGC CAA AGC CAT CTA CAG T		
24	RGA6R	AAC TAC ATT TCT TGC AAG T		
	RGA 5F	TGC TAG AAA AGT CTA TGA AG		

I= A/T/G/C; D= A/G/T; E=C/G; R= A/G; Y= C/T

Tabela 3. Descrição dos 23 primers ISSR testados em *C. linearifolius*.

Código	Sequência
DiCA3`G	5`- CAC ACA CAC ACA CAC AG- 3`
DiCA3`RG	5`- CAC ACA CAC ACA CAC ARG- 3`
DiCA3`YG	5`- CAC ACA CAC ACA CAC AYG-3`
DiGA3`C	5`- GAG AGA GAG AGA GAG AC- 3`
DiGA3`RC	5`- GAG AGA GAG AGA GAG ARC- 3`
DiGA3`T	5`- GAG AGA GAG AGA GAG AT- 3`
TriCAC3`RC	5`- CAC CAC CAC CAC CAC RC-3`
TriCAC3`YC	5`- CAC CAC CAC CAC CAC YC-3`
TriCAC5`CY	5`- CAC CAC CAC CAC CAC CY-3`
TriCAG3`RC	5`- CAC CAC CAC CAC CAC RC-3`
TriGTG3`YC	5`- GTG GTG GTG GTG GTG YC-3`
TriTGT3`YC	5`- TGT TGT TGT TGT TGT YC-3`
TriAAC3`RC	5`- AAC AAC AAC AAC AAC RC-3`
TriAAG3`RC	5`-AAG AAG AAG AAG AAG RC3`
TriACG3`RC	5`- ACG ACG ACG ACG ACG RC-3`
TriAGA3`RC	5`-AGA AGA AGA AGA AGA RC-3`
TriTGG3`RC	5`- TGG TGG TGG TGG TGG RC-3`
TriCGA3`RC	5`- CGA CGA CGA CGA CGA RC-3`
TriCGC3`RC	5`- CGC CGC CGC CGC CGC RC-3`
TriGAC3`RC	5`- GAC GAC GAC GAC GAC RC-3`
TriGCA3`RC	5`- GCA GCA GCA GCA GCA RC-3`
TriGCC3`RC	5`- GCC GCC GCC GCC GCC RC-3`
TriGGA3`RC	5`- GGA GGA GGA GGA GGA RC-3`

I= A/T/G/C; D= A/G/T; E=C/G; R= A/G; Y= C/T

Tabela 4. Polimorfismo obtido a partir de 9 combinações de pares de *primers* RGA na caracterização dos 61 indivíduos de *C. linearifolius*.

Combinação	Código	Nº de bandas		Polimorfismo (%)
		Total	Polimórficas	
2	S1+AS1	9	5	55.5
3	S1+AS3	5	2	40
6	NBSF1+AS1	6	1	16.6
14	RGA2R+ RGA1F	9	9	100
15	RGA7R+ RGA1F	4	4	100
17	RGA5R+ RGA5F	12	12	100
18	RGA6R+ RGA6F	3	3	100
19	RGA1R+ RGA4F	13	13	100
24	RGA6R+ RGA5F	8	8	100
Total		69	57	83%

Tabela 5. Polimorfismo obtido a partir de 8 *primers* ISSR na caracterização dos 61 indivíduos de *C. linearifolius*.

Código do iniciador	Nº de bandas		Polimorfismo (%)
	Total	Polimórficas	
DiCA3`RG	6	4	66.6
DiGA3`RC	9	7	77.7
TriCAC3`RC	9	9	100
TriCAC3`YC	7	4	57.1
TriGTG3`YC	8	5	25
TriTGT3`YC	9	9	100
TriAAC3`RC	10	8	80
TriACG3`RC	7	6	85.7
Total	65	52	80%

Tabela 6. Matriz representativa dos valores de Φ (diagonal inferior) e probabilidade de ocorrência (diagonal superior) estimado a partir da Análise Molecular de Variância entre as diferentes regiões de coleta de *C. linearifolius*.

	Região 1	Região 2	Região 3
Região 1		0.001	0.001
Região 2	0.335		0.001
Região 3	0.458	0.297	

Material suplementar 1: Valores de q (representativos da adesão de um indivíduo a um determinado pool gênico) referente a classificação dos indivíduos de *C. linearifolius* considerando a existência de 2 pools gênicos.

Indivíduos	Região de coleta	Ponto de coleta	% q	
			Pool 1	Pool 2
6	1	1	0.0055	0.9945
11	1	1	0.0106	0.9894
12	1	1	0.0258	0.9743
7	1	1	0.0734	0.9266
8	1	1	0.1612	0.8389
1	1	1	0.1623	0.8377
9	1	1	0.2168	0.7833
13	1	1	0.261	0.739
3	1	1	0.3004	0.6996
2	1	1	0.3081	0.6919
4	1	1	0.3417	0.6584
5	1	1	0.4119	0.5881
10	1	1	0.4699	0.5301
14	2	1	0.003	0.997
30	2	4	0.003	0.997
23	2	2	0.004	0.996
31	2	4	0.004	0.996
25	2	3	0.0053	0.9947
29	2	4	0.0066	0.9934
17	2	1	0.0068	0.9932
32	2	4	0.014	0.986
18	2	1	0.0482	0.9518
24	2	3	0.1222	0.8778
21	2	2	0.1758	0.8242
28	2	3	0.2404	0.7596
26	2	3	0.3373	0.6627
22	2	2	0.4977	0.5024
20	2	2	0.5569	0.4431
27	2	3	0.659	0.3409
19	2	2	0.7195	0.2805
15	2	1	0.8541	0.1459
16	2	1	0.9925	0.0075
33	3	1	0.9963	0.0037
38	3	2	0.0813	0.9187
44	3	3	0.579	0.4209
53	3	5	0.6041	0.3959
42	3	3	0.6715	0.3284
43	3	3	0.7452	0.2547

41	3	3	0.8273	0.1727
39	3	2	0.9127	0.0873
49	3	4	0.9535	0.0465
50	3	4	0.9556	0.0445
61	3	5	0.9574	0.0426
45	3	3	0.958	0.042
34	3	1	0.9595	0.0405
58	3	5	0.9607	0.0394
37	3	2	0.9703	0.0297
40	3	2	0.9841	0.016
52	3	5	0.987	0.013
51	3	5	0.9874	0.0126
57	3	5	0.991	0.009
47	3	4	0.993	0.007
54	3	5	0.993	0.007
36	3	2	0.995	0.005
46	3	4	0.995	0.005
35	3	1	0.9955	0.0045
48	3	4	0.996	0.004
55	3	5	0.996	0.004
59	3	5	0.996	0.004
60	3	5	0.9967	0.0033
56	3	5	0.997	0.003

* Pool 1= equivale a cor azul do histograma apresentado

Pool 2= equivale a cor verde do histograma apresentado

Material suplementar 2: Valores de q (representativos da adesão de um indivíduo a um determinado pool gênico) referente a classificação dos indivíduos de *C. linearifolius* considerando a existência de 3 pools gênicos.

Indivíduos	Região de coleta	Ponto de coleta	% q		
			Pool 1	Pool 2	Pool 3
8	1	1	0.9962	0.0018	0.002
7	1	1	0.996	0.002	0.002
4	1	1	0.9957	0.0013	0.003
9	1	1	0.995	0.002	0.003
3	1	1	0.993	0.002	0.005
2	1	1	0.992	0.0023	0.0057
5	1	1	0.9904	0.0015	0.008
1	1	1	0.9733	0.0207	0.006
10	1	1	0.7599	0.003	0.2371
6	1	1	0.5601	0.4376	0.0023
11	1	1	0.5468	0.4492	0.004
12	1	1	0.5101	0.4829	0.007
13	1	1	0.4605	0.3558	0.1837
14	2	1	0.002	0.9963	0.0017
23	2	2	0.002	0.996	0.002
31	2	4	0.002	0.996	0.002
17	2	1	0.003	0.994	0.003
30	2	4	0.0069	0.9911	0.002
32	2	4	0.003	0.99	0.007
29	2	4	0.1079	0.8813	0.0108
18	2	1	0.1304	0.7652	0.1045
25	2	3	0.2773	0.7197	0.003
21	2	2	0.0072	0.6729	0.3198
24	2	3	0.209	0.5634	0.2276
28	2	3	0.2265	0.4697	0.3038
22	2	2	0.0064	0.4312	0.5624
26	2	3	0.2561	0.3637	0.3802
19	2	2	0.005	0.2203	0.7747
27	2	3	0.0966	0.1766	0.7268
20	2	2	0.2406	0.1659	0.5935
15	2	1	0.066	0.0408	0.8932
16	2	1	0.0296	0.003	0.9674
33	3	1	0.0031	0.0014	0.9955
56	3	5	0.003	0.001	0.996
35	3	1	0.002	0.0024	0.9956
55	3	5	0.0029	0.002	0.9951
48	3	4	0.003	0.002	0.995
59	3	5	0.003	0.002	0.995
60	3	5	0.004	0.001	0.995

36	3	2	0.0039	0.002	0.9941
46	3	4	0.004	0.002	0.994
54	3	5	0.006	0.003	0.991
51	3	5	0.0049	0.0059	0.9891
47	3	4	0.008	0.003	0.989
52	3	5	0.0072	0.008	0.9848
37	3	2	0.003	0.0124	0.9846
40	3	2	0.011	0.006	0.983
34	3	1	0.002	0.0292	0.9688
61	3	5	0.0217	0.0144	0.9639
49	3	4	0.0208	0.0156	0.9636
50	3	4	0.0423	0.008	0.9497
45	3	3	0.0568	0.0112	0.932
58	3	5	0.0847	0.0044	0.911
39	3	2	0.0843	0.0073	0.9084
43	3	3	0.0378	0.1281	0.8341
57	3	5	0.1648	0.002	0.8332
42	3	3	0.0106	0.2387	0.7507
41	3	3	0.3198	0.0107	0.6695
53	3	5	0.1058	0.2274	0.6668
44	3	3	0.0046	0.3475	0.6479
38	3	2	0.165	0.692	0.1429

* Pool 1= equivale a cor azul do histograma apresentado

Pool 2= equivale a cor vermelha do histograma apresentado

Pool 3= equivale a cor verde do histograma apresentado



Figura 1. Aspecto geral da espécie *Croton linearifolius* (A) flor masculina e fruto (B) semente (C). Fonte: Acervo pessoal.

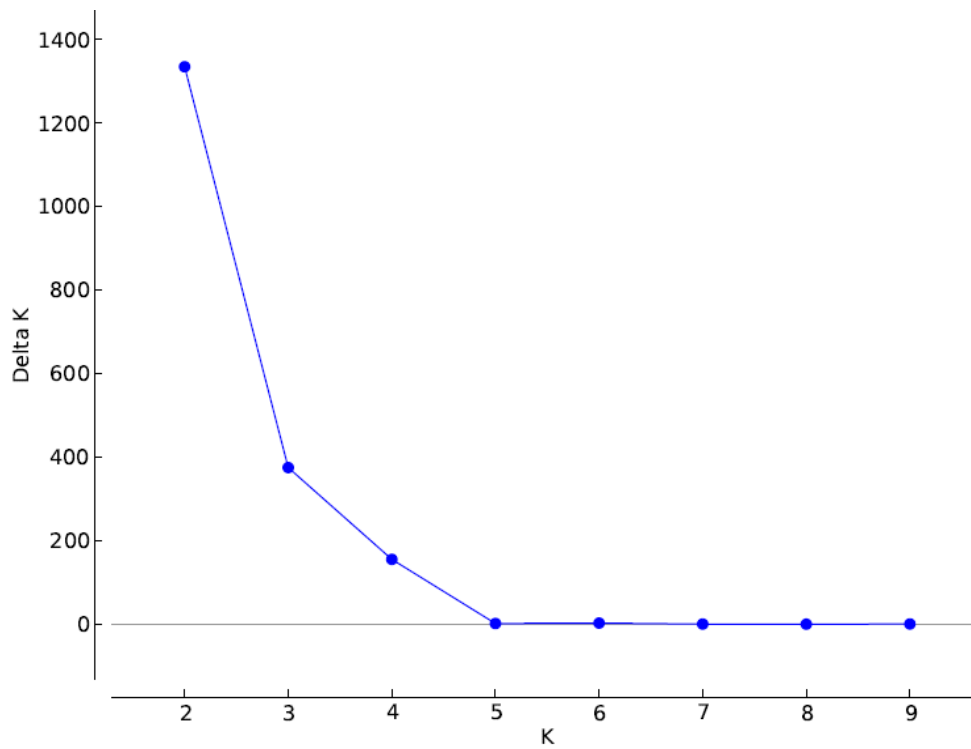


Figura 2. Número mais provável de pools gênicos (K) estimado a partir de 61 indivíduos de *Croton linearifolius* e obtido de acordo com o método descrito por Evanno et al. (2006).

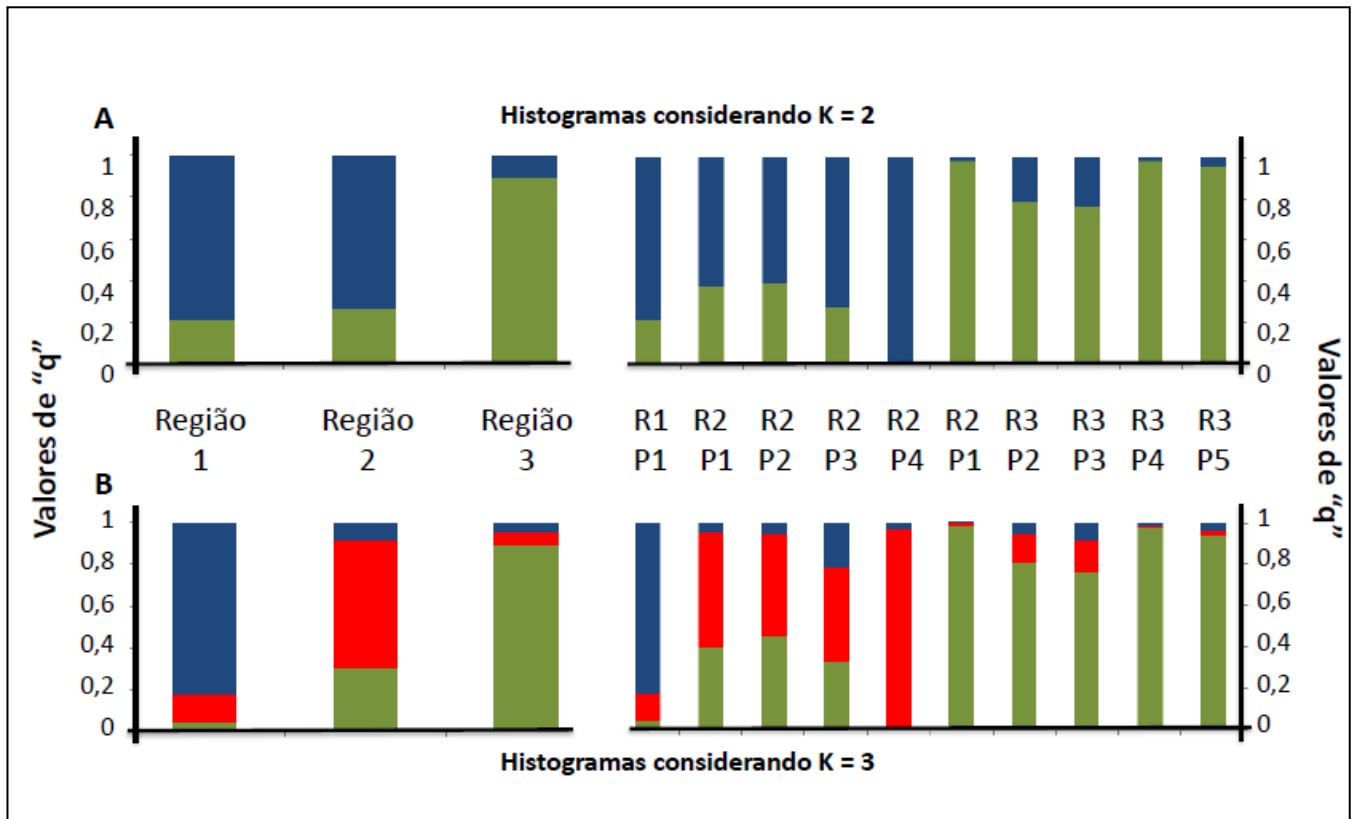


Figura 3. Histogramas (baseado nos valores de Delta K) representando a distribuição dos prováveis pools gênicos nas três regiões (R) (canto superior e inferior esquerdo) e pontos de coleta (P) (canto superior e inferior direito), com a estruturação principal em dois pools gênicos (escore de Delta K=1400) (A) e sub-estruturação em três pools gênicos (escores de Delta K~400) (B). As cores utilizadas nos histogramas representam a ascendência mais provável do grupo a partir dos quais os indivíduos foram derivados.

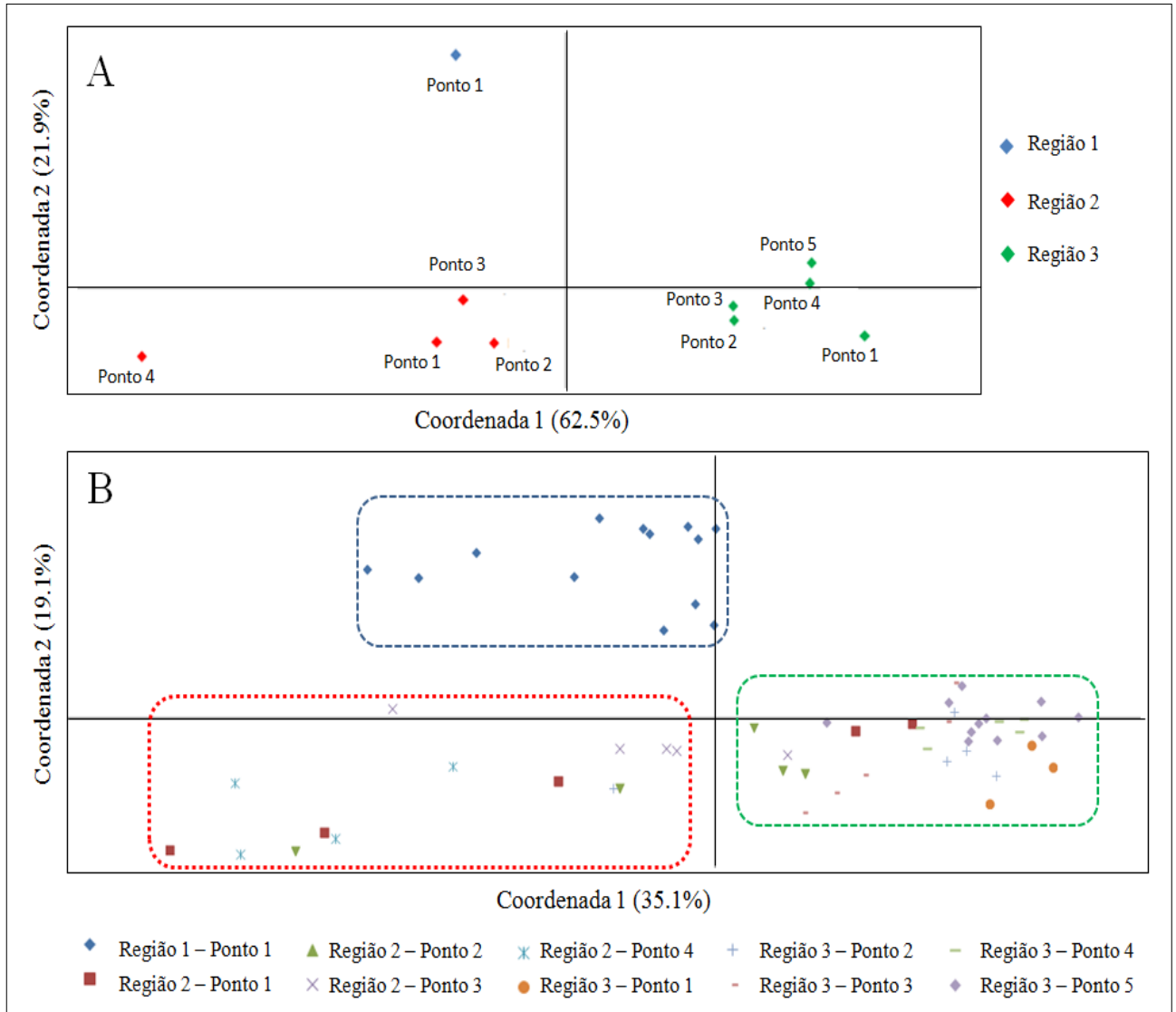
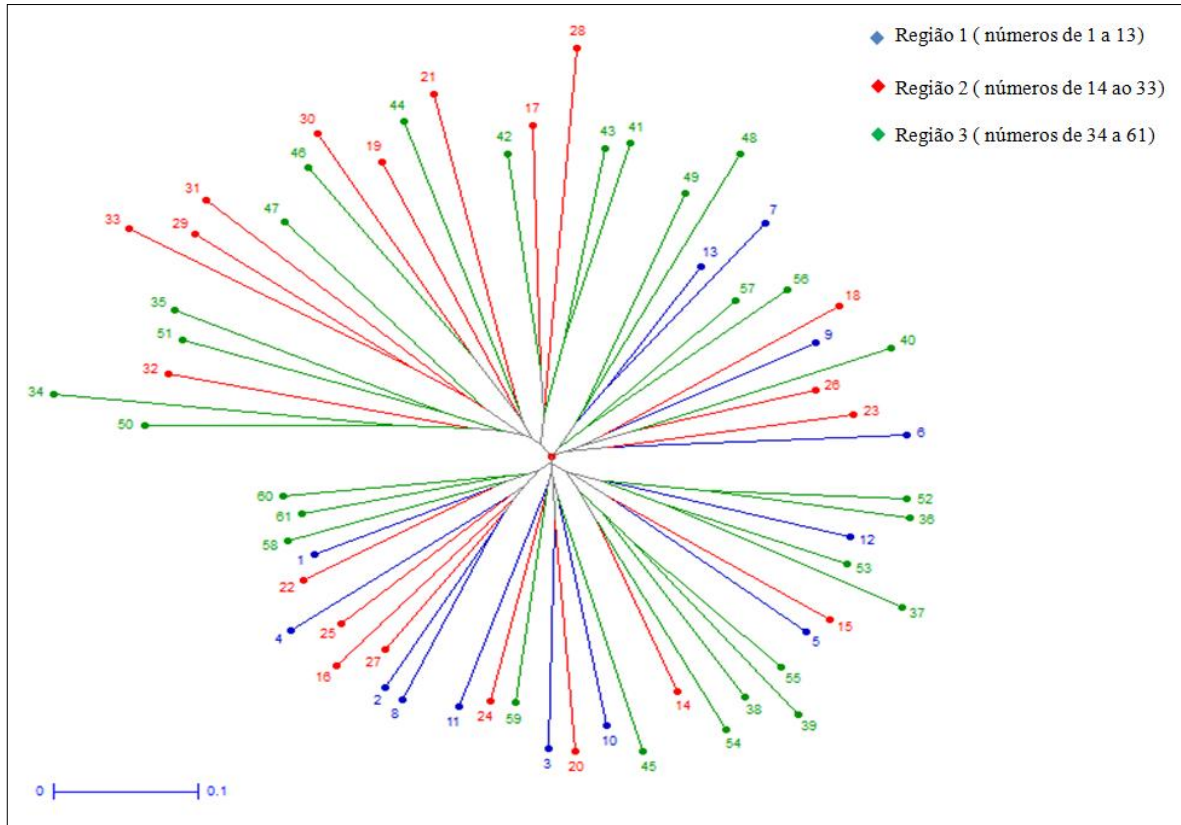


Figura 4. Gráfico de dispersão baseado na análise de coordenadas principais (PCoA), representado por regiões de coleta (A) e por 61 indivíduos de *Croton linearifolius* (B). As cores das linhas tracejadas correspondem àquelas utilizadas para representar os pools gênicos predominantes nos histogramas obtidos no STRUCTURE (Figura 3).



Material suplementar 3. Agrupamento Neighbor Joining realizado com a utilização do coeficiente de Jaccard. As cores indicam a região de coleta dos indivíduos de *C. linearifolius* (Região 1 – azul; Região 2- vermelho e Região 3- verde).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos por meio das buscas realizadas nas bases de dados de publicações científicas apontaram para escassez de estudos em diversos âmbitos do conhecimento acerca do gênero *Croton*, sobretudo as publicações com dados genéticos e moleculares, o que pode prejudicar no desenvolvimento de estratégias que visem a conservação e o manejo sustentável das espécies do gênero. As informações geradas contribuem para proposição e condução de novos estudos genético-moleculares associados ao gênero *Croton*.

Os marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) utilizados nesse estudo foram eficientes para estimar a diversidade e estrutura genética de *Croton linearifolius*. As populações de *C. linearifolius* estão estruturadas em pelo menos dois pools gênicos e sub-estruturadas em três e quatro pools gênicos. Os prováveis mecanismos de polinização por insetos e dispersão primária autocórica com dispersão secundária por formigas, justificariam a estruturação genética observada, já que essas estratégias não seriam suficientes para promover o fluxo genético entre as regiões de coleta.

Os resultados obtidos contribuem com o conhecimento genético-molecular de *C. linearifolius*, o que pode auxiliar nas estratégias aplicadas ao manejo e conservação da espécie. As análises da distribuição da variabilidade genética fornecem informações práticas para o estabelecimento de estratégias de conservação, indicando que a amostragem de plantas para a realização de estudos e para coleta de sementes de *C. linearifolius* deve ocorrer em mais de uma unidade populacional na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, no município de Contendas do Sincorá-Ba. Como perspectivas, propõe-se para estudos posteriores o uso de marcadores co-dominantes, aliado a investigação da biologia reprodutiva da espécie, o que possibilitará o refinamento dos resultados.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. Fourth Edition, **Academic Press**, USA, 635 p., 1997.
- ALMEIDA, C.M.A.DE. **Diversidade Genética em Populações de *Aechmea fulgens* Brongn. (Bromeliaceae) em Fragmentos de Mata Atlântica em Pernambuco.** 60 p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento de Plantas), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, 2006.
- ALVES, J.J.A.; ARAÚJO, M.A.; NASCIMENTO, S.S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.22, n.3, p.126-135, 2009.
- ARRAIS, L.G.; LYRA, H.F.S.; BATISTA, D.C.A.; COUTINHO, F.N.; SARAIVA, A.M.; PEREIRA, R.C.A.; PISCIOTTANO, M.N.C.; XAVIER, H.S.; MELO, S.J. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides* Baill. (Zabelê). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n. 2, p.316-322, 2014.
- ANGELO, P.C.S.; CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H.R.; XAVIER, J.J.B.N.; CRUZ, J.C.; LIRA, M.P.S. Genetic diversity in sacaca (*Croton cajucara* Benth.) accessed by RAPD markers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.18-22, 2006.
- BENT, A.F. Plant disease resistance genes: function meets structure. **Plant Cell**, v.8, p. 1757-1771, 1996.
- BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; VAN, E.E.B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giants genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu strictu) using *ITS* and *trnL-trn-F* DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v.92, p.1520-1534, 2005.
- BEUCHLE, R.; GRECCHI, R.C.; SHIMABUKURO, Y.E.; SELLINGER, R.; EVA, H.D.; SANO, E.; ACHARD, F. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. **Applied Geophysics**, v.58, p.116-127, 2015.
- BEZERRA, D.P.; MARINHO FILHO, J.D.; ALVES, A.P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; PESSOA, O.D.; TORRES, M.C.; SILVEIRA, E.R.; VIANA, F.A.; COSTA-LOTUFO, L.V. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v.6, n.8, p.1224-31, 2009.
- BONAS, U.; LAHAYE, T. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.44–50, 2002.
- BORÉM, A. Melhoramento de plantas. **UFV**, Viçosa, 547 p., 1997.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. Marcadores moleculares. 2ª Ed. **UFV**, Viçosa, 532 p., 2009.
- BRITO, M.S.; FRIES, D.D.; CUNHA e SILVA, S.L.; GUALBERTO, S.A. Anatomia foliar de *Croton linearifolius* Mull. Arg. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.13, 2011.

BRITO, M.S. **Prospecção química e avaliação da atividade antioxidante de extratos dos caules de *Croton Linearifolius* (Euphorbiaceae)**. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, 2014.

CARNEIRO-TORRES, D. S. **Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga**. 296 p. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA, 2009.

CAVALLARI, M.M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação**. 92 p. Dissertação (Mestrado em) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; CARNEIRO-TORRES, D.S.; LIMA, L.R. DE; CARUZO, M.B.R.; BERRY, P.; RIINA, R.; O.L.M. SILVA; SILVA, M.J.DA; SODRÉ, R.C. *Croton*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>. Acesso em 30 abr. 2015.

DIAZ, V.; FERRER, E. Genetic variation of populations of *Pinus oocarpa* revealed by resistance gene analog polymorphism (RGAP). **Genome**, v.3, p.404-410, 2003.

DOW, B.D.; ASHLEY, M.V. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Journal of Heredity**, v.89, p.62–70, 1998.

DRUMOND, M.A.; KILL, L.H.P.; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S.; CAVALCANTE, J. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da Caatinga. **Embrapa. CPATSA**, 2000. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/33873/1/uso-sustentavel.pdf>. Acesso em 29 mai. 2015.

FALEIRO, F.G. Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de uso e conservação dos recursos genéticos. Platina- DF, **Embrapa**, 2007.

FELIU, D.A. **Análise de terpenóides de espécies de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Mull.Arg.) Pax (Euphorbiaceae)**. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Botânica), Universidade de São Paulo, 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores Moleculares em análise genética. 3ª Ed. Brasília: **EMBRAPA-CENARGEN**, 220 p., 1998.

FLEISHMAN, E.; LAUNER, A.E.; SWITKY, K.R. Rules and exceptions in conservation genetics: Genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. **Biological Conservation**, v.98, p.45-53, 2001.

FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J.F. A.; BICUDO, C.E.M.; CANHOS, D.A.L.; CARVALHO, A.; COELHO, M.A.N.; COSTA, A.F.; COSTA, D.P.; HOPKINS, M.G.; LEITMAN, P.M.; LOHMANN, L.G.; LUGHADHA, E.N.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, S.; SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; FRANCA-ROCHA, W.; SILVA, A.DEB.; NOLASCO, M.C.; LOBÃO, J.; BRITTO, D.; CHAVES, J. M.; ROCHA, C.C.DA. **Levantamento da cobertura vegetal e do uso do solo do Bioma**

Caatinga. Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Florianópolis, Brasil, 21-26 abril, p.2629-2636, 2007.

GARIGLIO, M.A.; SAMPAIO, E.V.B.; CESTARO, L.A.; KAGEYAMA, P.Y. (Org.). Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 368p., 2010.

GIULIETTI, A.M.; BOCAGE, A.L.; DU CASTRO, A.A.J.F.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; VIRGÍNIO, J.; PAGANUCCI, L.; FIGUEIREDO, M.A.; RODAL, M.J.N.; BARBOSA, M.R.V.; HARLEY, R. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília: MMA, Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, O.; POLANCO, C.; GYÖRGY, Z.; PEDRYC, A.; CASQUERO, P.A. Genetic Variation of the Endangered *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* (Gentianaceae) in Populations from the Northwest Iberian Peninsula. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.6, p.10052-10066, 2014.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.575-607, 1997.

HAMRICK, J.L.; NASON, J.D. Consequenses of dispersal in plants. In: RHODES, O.F.; CHESSER, R.K.; SMITH, M.H. Populations dynamics in ecological space and time. Chicago: University of Chicago Press, Chicago, p. 203-236, 1996.

HULBERT, S.H.; WEBB, C.A.; SMITH, S.M.; SUN, Q. Resistance gene complexes: Evolution and utilization. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p.285-312, 2001.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação, 2004, Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em 26 jul. 2015.

JAMES, E.A.; ASHBURNER, G.R. Intraspecific variation in *Astelia australiana* (liliaceae) and implications for the conservation of this australian species. **Biological Conservation**, v. 82, p.253-261, 1997.

JOSHI, S.P.; GUPTA, V.S.; AGGARWAL, R.K.; RANJEKAR, P.K.; BRAR, D.S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, n.8, p.1311-1320, 2000.

JONES, B.; GLIDDON, C.; GOOD, J.E.G. The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britain. **Biological Conservation**, v.101, p.147-156, 2001.

JONES, J.; DANGL, J. The plant immune system. **Nature**, v.444, p.323-329, 2006.

JUANSHENG, R.; YUCHAO, Y.; FANGYUAN, G.; LIHUA, Z.; XIANJUN, L.; XIANTING, W.; WENGUI, Y.; GUANGJUN, R. Application of resistance gene analog

markers to analyses of genetic structure and diversity in rice. **Genome**, v.56, n.7, p.377-387, 2013.

JÚNIOR, F.E.; DE OLIVEIRA, D.R.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; KAMDEM, J.P.; MACEDO, G.E.; DA SILVA, G.F.; DE MENEZES, I.R.; COSTA, J.G.; COUTINHO, H.D.; KERNTOPF, M.R.; POSSER, T. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. **Journal of Ethnopharmacology**, v.153, n.2, p.469-77, 2014.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. **Annals of Botany**, v.78, p.143–149, 1996.

KANAZIN, V.; FREDERICK, M.L.; SHOEMAKER, R.C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A**, v.93, p.11746-11750, 1996.

KELLER L.F.; WALLER D.M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology Evolution**, v.17, n.5, p.230–241, 2002.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v.10, p.1143-1152, 2001.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Ecologia e Conservação da Caatinga. Recife. UFPE. 804 p., 2003.

LEISTER, D.; BALLVORA, A.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. A. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nature Genetics**, v.14, p.421-429, 1996.

LIMA, L.R.; PIRANI, J.R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica**, v.82, p.177-231, 2008.

LIMA, E.N.; DE ARAUJO, M.E.B; BERTINI, C.H.C.M.; MOURA, C.F.H.; HAWERROTH, M.C. Diversidade genética de clones de aceroleira avaliada por meio de marcadores moleculares ISSR. **Comunicata Scientiae**, v.6, n.2, p.174-180, 2015.

LIRA-NETO, A.C. **Caracterização genética de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste Brasileiro**. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE, 2011.

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

MEYERS, B.C.; KAUSHIK, S.; NANDETY, R.S. Evolving disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.129–134, 2005.

MILLER, R.N.; BERTIOLI, D.J.; BAURENS, F.C.; SANTOS, C.M.; ALVES, P.C.; MARTINS, N.F.; TOGAWA, R.C.; SOUZA, M.T.; JR, PAPPAS G.J. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. **BMC Plant Biology**, v.8, p.1-15, 2008.

MMA- Ministério do Meio Ambiente. Unidades de Conservação por Bioma, 2015. Disponível em:
http://www.mma.gov.br/images/arquivo/80112/CNUCBioma_Fevereiro_2015.pdf. Acesso em 26 jun. 2015.

MMA- Ministério do Meio Ambiente. Subsídios para a Elaboração do Plano de Ação para a Prevenção e Controle do Desmatamento na Caatinga, 2011. Disponível em:
<http://www.mma.gov.br/>. Acesso em 10 jun. 2015.

MOTA, M.L.; LOBO, L.T.; COSTA, J.M.; COSTA, L.S.; ROCHA, H.A.; ROCHA E SILVA, L.F.; POHLIT, A.M.; NETO, V.F. In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. **Planta Medica**, v.78, n.7, p.658-64, 2012.

NEI, M. Molecular evolutionary genetics. **Columbia University Press**, New York, 1987.

NOGUEIRA, L.DE. M.; DA SILVA, M.R.; DOS SANTOS, S.M.; DE ALBUQUERQUE, J.F.; FERRAZ, I.C.; DE ALBUQUERQUE, T.T.; MOTA, C.R.; ARAÚJO, R.M.; VIANA, G.S.; MARTINS, R.D.; HAVT, A.; XIMENES, R.M. Antinociceptive Effect of the Essential Oil Obtained from the Leaves of *Croton cordiifolius* Baill. (Euphorbiaceae) in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p.1-7, 2015.

PAN, Q.; WENDEL, J.; FLUHR, R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. **Journal of Molecular Evolution**, v.50, p.203-213, 2000.

PAULA, M.daS.; FONSECA, M.E.deN.; BOITEUX, L.S.; PEIXOTO, J.R. Caracterização genética de espécies de Passiflora por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.1, p.222-229, 2010.

PRADO, D.E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Ecologia e conservação da Caatinga. **Editores Universitários UFPE**, Recife, 2003.

QIAN, X.; LI, Q.J.; LIU, F.; GONG, M.J.; WANG, C.X.; TIAN, M. Conservation Genetics of an Endangered Lady's Slipper Orchid: *Cypripedium japonicum* in China. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.7, p.11578-11596, 2014.

RAO R.V.; HODGKIN T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, p.1-19, 2002.

RAPINI, A.; QUEIROZ, L.P.DE; GIULIETTI, A.M. PPBio: Programa de Pesquisa em Biodiversidade do Semi-árido. In: QUEIROZ, L.P. DE, RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. Rumo ao amplo conhecimento da biodiversidade do Semi-árido Brasileiro. Brasília, Ministério da Ciência e Tecnologia, 144 p., 2006.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; REDDY, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p.9-17, 2002.

ROCHA, T.DE.O. **Diversidade genética em *Croton* spp. (euphorbiaceae) com potencial fitoterápico e inseticida.** 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, 2015.

ROCHA, T.O.; FREITAS, J.S.; SANTOS, E.S.L.; SCALDAFERRI, M.M.; GONÇALVES, C.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. Estimate of diversity and structure genetic in cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) based on molecular markers. **African Journal of Biotechnology**, v.15, p.518-523, 2016.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.1, p.11-33, 2007.

SAMPAIO, E.V.S.B. Caracterização do bioma Caatinga. In: GARIGLIO, M.A.; SAMPAIO, E.V.S.B.; CESTARO, L.A.; KAGEYAMA, P.Y. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, p.28-48, 2010.

SANTOS, F.R.; FONSECA, C.G.; SOUZA, E.C.; BORBA, E.L.; DERGAM, J.A.; LOVATO, M.B. Diversidade Genética. IN: Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais. (eds) Gláucia Moreira Drummond, Cássio Soares Martins, Magda Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2009. 624 p. Disponível em: <http://w.biodiversitas.org.br/biotaminas/publicacao/biotaminas.pdf>. Acesso em 25 ago. 2014.

SANTOS, J.C.; LEAL, I.R.; CORTEZ, J.S.A.; FERNANDES, G.W.; Tabarelli, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, v.4, p.276-286, 2011.

SANTOS, J.R.P. **Caracterização Genética e Molecular de Acessos de Bananeira a *Radopholus Similis* e *Meloidogyne Incognita*.** p. Tese (Doutorado em), Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

SCALDAFERRI, M.M.; FREITAS, J.S.; SANTOS, E.S.L.; VIEIRA, J.G.P.; GONÇALVES, Z.S.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. Comparison of protocols for genomic DNA extraction from 'velame pimenta' (*Croton linearifolius*), a native species to the Caatinga, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n.30, p.4761-4766, 2013.

SCALDAFERRI, M.M. **Diversidade genética em Velame Pimenta (*Croton linearifolius*) e Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) em ambientes silvestres no Sudoeste da Bahia.** 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga-BA, 2013.

SCALDAFERRI, M.M.; FREITAS, J.S.; VIEIRA, J.G.P.; GONÇALVES, Z.S.; SOUZA, A.M.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. Comparison of methods for estimates of molecular genetic diversity in genus *Croton*: influence of coefficients, clustering strategies and data projection. **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.3, p.5566-5573, 2014.

SCHEJBEL, B.; JENSEN, L.B.; XING, Y.; ASP, T.; LÜBBE RSTEDT, T. Mapping of QTL for powdery mildew resistance and resistance gene analogues in perennial ryegrass. **Plant Breeding**, v.127, p.368-375, 2008.

SCHNEIDER, M.P.C.; BATISTA, C.G.; CARVALHO, D.; CERQUEIRA, R.; CIAMPI, A.Y.; FRANCESCHINELLI, E.V.; GENTILE, R.; GONÇALVES, E.; GRATIVOL, A.D.; NASCIMENTO, M.T. Efeitos da Fragmentação de Hábitat na Genética de populações naturais. In: RAMBALDI, D.; OLIVEIRA, D.A.S. (Org.). Fragmentação de Ecossistemas-Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendação de políticas públicas. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 297-315, 2003.

SILVA, S.L.C.; CARVALHO, M.G.; GUALBERTO, S.A.; CARNEIRO-TORRES, D.S.; VASCONSELOS, K.C.F.; OLIVEIRA, N.S. Bioatividade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, p.252-258, 2010.

SILVA, S.L.C.; GUALBERTO, S.A.; CARVALHO, K.S.; FRIES, D.D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Biotemas**, v.27, n.2, p.79-85, 2014.

SOARES, V.O.; ALMEIDA, N.O. O bioma caatinga sob a percepção da paisagem e a dinâmica da agricultura. **Revista Geográfica de América Central**, p.1-15, 2011.

STASKAWICS, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.E; JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant-disease resistance. **Science**, v.268, p.661-667, 1995.

VALLE, J.S.; FONSECA, B.K.D.; NAKAMURA, S.S.; LINDE, G.A.; MATTANA, R.S.; MING, L.C.; COLAUTO, N.B. Diversidade genética de populações naturais de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] por RAPD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.47-53, 2013.

VELLOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B; PAREYN, F.G.C. Ecorregiões propostas para o Bioma Caatinga. Resultados do Seminário de Planejamento Ecorregional da Caatinga. 2002. Recife. Associação Plantas do Nordeste. The Nature Conservancy do Brasil. Disponível em: http://www.mma.gov.br /estruturas/203/ arquivos/ecorregioes_site_203.pdf Acesso em 28 abr. 2014.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v.11, p.413-418, 1996.

YU, Y.G.; BUSS, G.R.; SAGHAI MAROOF, M.A. Isolation of a super family of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.93, p.11751-11756, 1996.

ZAPPI, D. Fitofisionomia da Caatinga associada à Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v.4, p.34-38, 2008.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176 -183, 1994.

ANEXOS

Apresentação das normas da revista escolhida para submissão do capítulo I: **African Journal of Biotechnology**

Introduction

Authors should read the editorial policy and publication ethics before submitting their manuscripts. Authors should also use the appropriate reporting guidelines in preparing their manuscripts.

Preparing your manuscript

The type of article should determine the manuscript structure. However, the general structure for articles should follow the [IMRAD structure](#).

Title

The title phrase should be brief.

List authors' full names (first-name, middle-name, and last-name).

Affiliations of authors (department and institution).

Emails and phone numbers

Abstract

The abstract should be less than 300 words. Abstract may be presented either in [unstructured or structured format](#). The keywords should be less than 10.

Abbreviations

Abbreviation should be used only for non standard and very long terms.

The Introduction

The statement of the problem should be stated in the introduction in a clear and concise manner.

Materials and methods

Materials and methods should be clearly presented to allow the reproduction of the experiments.

Results and discussion

Results and discussion maybe combined into a single section. Results and discussion may also be presented separately if necessary.

Disclosure of conflict of interest

Authors should disclose all financial/relevant interest that may have influenced the study.

Acknowledgments

Acknowledgement of people, funds etc should be brief.

Tables and figures

Tables should be kept to a minimum.

Tables should have a short descriptive title.

The unit of measurement used in a table should be stated.

Tables should be numbered consecutively.

Tables should be organized in Microsoft Word or Excel spreadsheet.

Figures/Graphics should be prepared in GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint.

Tables and Figures should be appropriately cited in the manuscript.

References

References should be listed in an alphabetical order at the end of the paper. DOIs, PubMed IDs and links to referenced articles should be stated wherever available.

Apresentação das normas da revista escolhida para submissão do capítulo II: **Genetics and Molecular Research.**

Preparation of the manuscript

Order the sections comprising the manuscript as follows: title, running title, author, address, abstract, key words, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, and references.

Title Page: The title page should include the title of the article, authors' names (names and initials (only) thinking in indexing services), and authors' affiliation. The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city, and state (or nation). The title page should include the name and complete mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address of the author designated to review proofs. A running title of no more than 60 characters (including spaces) should be provided.

Abstract: An abstract of up to 250 words, single-spaced, is required of research articles and reports and should be arranged in one paragraph. The following information (without headings) should be included: purpose, methods, results (please report numerical data (means \pm SE) for significant results), and conclusions. Review articles also require an abstract, which need not include all of these items. **Key words:** A list of key words or indexing terms (up to six) should be included.

Text

Format: Headings should be bold, and first letters capitalized and left-aligned. All text should be set in Times New Roman font, 12 point, left-aligned, single-spaced. Do not justify the right margin. Leave only one (1) space after periods. Paragraphs should not be indented; there should not be any blank lines between them. Use line returns only at the end of paragraphs. Do not use tabs or spaces to create indents. Use the Symbol font for symbols and special characters. Do not use equation editors or footnoting utilities. Save equations as images. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page.

Footnotes: Footnotes should be avoided. When their use is absolutely necessary, footnotes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be placed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnote, so that it is set off from the text.

Tables/Charts: Special care should be taken to ensure that all tables are properly formatted. Scientific symbols used should be in Symbol or Times New Roman. Tables should be on a

separate page, numbered consecutively (with Arabic numerals) referred to by number in the text and designed to fit the column or page size of the journal. Use tables with cells to 4 separate columns. Do not use spaces, tabs or vertical lines. Left justify the title above the table. Indicate each table's location within the manuscript.

Illustrations: Illustrations/figures (photographs, drawings, diagrams, and charts) should each be in a single file, numbered in a consecutive series of Arabic numerals in the order in which they are cited in the text. Illustrations must be submitted as separate files. All illustrations are to be supplied in JPEG (jpg) format in either color or black and white. Images must be saved as separate, stand-alone files. The image resolution should be 300 dpi. Do not embed images within the text file. Indicate each figure's location within the text. Do not forget to send the legend in a separate page. The authors should also send, by mail, a printed version of the figures. These should be at least 10 x 15 cm, up to US letter size, so that figures can be scanned (in case the figure files are not adequate) to guarantee good quality for publishing online.

Abbreviations: Try to use abbreviations in the text sparingly. Write out abbreviations in full before the first time they are used in the text. Use the metric system for all measurements without periods (cm, mL, s). Define all symbols used in equations and formulas. Do not abbreviate the word "Figure" or "Table" in titles or text. **Acknowledgments:** All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph directly preceding the reference section. Authors of manuscripts submitted to GMR are requested to state the source of all funding that enabled the described research to be undertaken.

References: References in the text should include the name of the author and the year in parentheses, e.g. (Searle, 1961) or (King and Wilson, 1975). When a reference with more than two authors is cited, only the first author is named, e.g. (Comstock et al., 1958). The reference must be cited in the text in chronological order, e.g. (Ideber, 2001; Uetz, 2002; Ottavai, 2004). References to "unpublished results" and "submitted papers" should appear in the text in parentheses following the name(s) of the individual(s). Example: (Pereira KS, Martins PK and Silva TM, unpublished results). No more than 40 references should be cited in a Full-length paper, 20 references in a Short Communication and 60 references in a Review article.