



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

**ESTUDOS GENÉTICO MOLECULARES EM CASSUTINGA
(*Croton heliotropiifolius*) E VELAME PIMENTA (*Croton
linearifolius*) COM VISTAS À CARACTERIZAÇÃO DA
DIVERSIDADE**

Tallita de Oliveira Rocha

Itapetinga– Bahia

Fevereiro - 2015



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

**Estudos Genético Moleculares em Cassutinga (*Croton
heliotropiifolius*) e Velame Pimenta (*Croton linearifolius*) com
Vistas à Caracterização da Diversidade**

Autora: Tallita de Oliveira Rocha

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaína Silva Freitas

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva

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

Itapetinga - Bahia

Fevereiro - 2015

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todos, sou grata a Jesus que permitiu que eu pudesse participar do mestrado e concluir a pesquisa, me dando saúde, força, ânimo nos momentos ruins e colocando em meu caminho pessoas que foram fundamentais e que contribuíram de formas muito particulares e decisivas para que pudéssemos chegar ao fim dessa jornada.

Entre essas pessoas, a minha orientadora, professora Dr^a Janaína Silva de Freitas, muito obrigada por aceitar me orientar, por todos os conselhos e puxões de orelha, admiro sua garra e determinação!

Aos meus co-orientadores, os professores Dr. Carlos Bernard e Msc. Murilo Scaldaferrri. Obrigada Bernard por todas as vezes que abriu meus olhos e me trouxe de volta à realidade, pelos ensinamentos desde a graduação, por toda contribuição durante a pesquisa e no meu processo de amadurecimento.

Ao professor Murilo, por ter estado comigo desde o início das minhas atividades no laboratório, me ensinando com toda paciência e bom humor, pelas dicas e disponibilidade sempre que necessitei, sou muitíssimo grata.

As professoras Dr^a Elisa Susilene e Dr^a Claudine Gonçalves por terem participado da banca de qualificação e pelas sugestões e correções que fizeram com que o trabalho tomasse forma e pudesse ser lapidado da melhor maneira possível.

À minha família, principalmente meus pais pelo apoio durante todo o processo e por acreditar em mim!

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos divertidos e pelas amizades cultivadas. Desejo todo sucesso e realização para todos!

Aos meus amigos Diane, Rhavena, Talita, Jéssica, Daniel, Maísa, Pedro, Alessandro, Julie, Jack, Bia e Anny. As minhas companheiras Alana e Luma por terem sido pacientes toda vez que eu sumia. E todos os outros, por serem sempre presentes em minha vida, torcerem pelas minhas conquistas e vibrarem junto comigo com cada vitória.

Aos professores e alunos do laboratório de Biologia Molecular do campus de Jequié por me receberem de braços abertos. A Nathana, Renata, Cássio, Matheus, Gabriel, Brenda, Márcia e a galera da citogenética pela companhia e ajuda, vocês são o máximo!

Ao programa de pós-graduação em Ciências Ambientais e toda equipe. A UESB, CAPES e meus colegas de laboratório. Todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão da pesquisa.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1 Características do bioma Caatinga.....	14
1.2 Gênero <i>Croton</i> e principais constituintes químicos.....	16
1.3 Ocorrência de <i>C. heliotropiifolius</i> e <i>C. linearifolius</i> spp. em herbários e locais de coleta no Brasil.....	21
1.4 Diversidade genética molecular.....	22
1.5 Marcadores moleculares aplicados ao estudo do gênero <i>Croton</i>	24
1.5.1 Diversidade genética intraespecífica em <i>Croton</i> spp.....	26
1.5.2 Estudos citogenéticos do gênero <i>Croton</i>	31
1.5.3 Estudos filogenéticos do gênero <i>Croton</i>	32
CAPÍTULO I – Diversidade genética molecular em Cassutinga (<i>Croton heliotropiifolius</i>) espécie com potencial antioxidante e antibacteriano.....	42
CAPÍTULO II – Seleção de marcadores moleculares RAPD e ISSR para estudo de diversidade genética em velame pimenta (<i>Croton linearifolius</i>).....	55
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	59
ANEXO	

LISTA DE TABELAS

Página

REFERENCIAL TEÓRICO

Quadro 1. Espécies de *Croton* que já possuem estudos químicos e farmacológicos nas últimas décadas anos 17

Tabela 1. Espécies de *Croton* com uso medicinal e químico e locais de ocorrência 19

Tabela 2. Tipos de marcadores moleculares e sua natureza 24

Tabela 3. Espécies de *Croton* que já possuem estudos filogenéticos, de diversidade genética e citogenético..... 30

CAPÍTULO I – Diversidade genética em Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) com potencial antioxidante e antibacteriano

Tabela 1. Descrição dos *primers* RAPD utilizados para caracterização dos 42 genótipos de *Croton heliotropiifolius*, coletado em área circunvizinha ao município de Itapetinga, Bahia 47

Tabela 2. Descrição de *primers* ISSR utilizados para caracterização dos 42 genótipos de *Croton heliotropiifolius*, coletados em áreas nativas circunvizinhas ao município de Itapetinga, Bahia 48

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1A. Partes aéreas de <i>Croton heliotropiifolius</i>	12
Figura 1B. Partes aéreas de <i>Croton linearifolius</i>	12
 CAPÍTULO I – Diversidade genética em cassutinga (<i>Croton heliotropiifolius</i>) com potencial antioxidante e antibacteriano	
Figura 1. <i>Croton heliotropiifolius</i>	43
Figura 2. Gráfico apresentando os valores estimados para Delta K (eixo Y) em diferentes pool gênicos (eixo X), em relação as genotipagens realizadas mediante marcadores RAPD e ISSR para populações <i>C. heliotropiifolius</i> , coletados em áreas nativas circunvizinhas aos município Itapetinga-Bahia, respectivamente	49
Figura 3. Histograma gerado pelo programa structure a partir dos dados de genotipagem realizados mediante uso de marcadores RAPD e ISSR para 42 genótipos de <i>C. heliotropiifolius</i> coletados em área nativa circunvizinha ao município de Itapetinga, Bahia	50
 CAPÍTULO II –Seleção de marcadores moleculares rapd e issr para estudo de diversidade genética em velame pimenta (<i>Croton linearifolius</i>)	
Figura 1. Imagem do screening com três primers RAPD e três ISSR selecionados.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA - Deoxyribonucleic Acid
SSR - Simple Sequence Repeats
PCR – Polymerase Chain Reaction
RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA
ISSR - Inter Simple Sequence Repeats
ITS – Internal Transcribed Spacer
AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism
RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism
AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism
SNP - Single Nucleotide Polymorphism
CTAB - Cetyl trimethylammonium bromide
RGA – Resistance for Genes Analogs
NaCl – Cloreto de Sódio
TBE - Tris/Borato/EDTA
IUCN – International Union of Conservation of Nature
UC – Unidade de Conservação
UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
LGMA – Laboratório de Genética Molecular Aplicada
trnL-trnF – Conserved region of chloroplast DNA

RESUMO

A caatinga é o único bioma exclusivo do território brasileiro e abriga uma ampla biodiversidade, incluindo espécies endêmicas e raras. Este bioma possui um clima semi-árido, com espécies adaptadas a altas temperaturas e as condições ambientais, restritivas, típicas do clima. Dentre as diversas famílias de plantas que ocorrem na caatinga, a Euphorbiaceae é uma das mais abundantes em número de espécies e possui o gênero *Croton* como um dos mais representativos, com cerca de 1300 espécies. As espécies deste gênero, presentes na caatinga, apresentam características de interesse econômico, despertando o interesse de se conhecer constituintes químicos, aspectos fisiológicos e sua diversidade genética. Contudo, poucos estudos genéticos estão disponíveis e escassas são as estimativas de diversidade realizadas para o gênero. O objetivo da pesquisa foi conhecer a diversidade genética de *Croton heliotropiifolius* e *C. linearifolius*, coletados na Serra da Torre, no município de Itapetinga – Ba e na Floresta Nacional de Contendas do Sincorá, no município de Contendas do Sincorá - Ba, respectivamente. Para tanto foram utilizados um total de 20 marcadores *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) e 23 marcadores *inter simple sequence repeat* (ISSR) para reações de polimerase em cadeia (PCR). Após genotipagem dos dados e análises estatísticas (estimativa de distancia, construção de dendrograma e estimativas Bayesianas) foi verificado para *C. heliotropiifolius* alto polimorfismo para ambos os marcadores utilizados, sendo observado estruturação genética associada a distribuição espacial dos espécimes ao longo da Serra da Torre. E para *C. linearifolius* foram selecionados 18 marcadores RAPD e 17 ISSR para serem utilizados em estudos de diversidade genética.

Palavras-chave: Caatinga, *Croton heliotropiifolius*, Genética Molecular, Plantas Medicinais

ABSTRACT

The caatinga is the only unique biome of Brazil and hosts a wide biodiversity, including endemic and rare species. This biome has a semi-arid climate, with species adapted to high temperatures and environmental conditions, restrictive, typical climate. Among the various families of plants that occur in the bush, the Euphorbiaceae is one of the most abundant in number of species and has the *Croton* genus as one of the most representative, with about 1300 species. The species of this genus present in the caatinga, have traits of economic interest, arousing the interest of knowing chemical constituents, physiological and genetic diversity. However, few genetic studies are available and few are the range of estimates for the genus. The objective of the research was to identify the genetic diversity of *Croton heliotropiifolius* and *C. linearifolius* collected in the sierra tower in the city of Itapetinga - Ba and Contendas National Forest Sincorá in Contendas municipality of Sincorá - Ba, respectively. Therefore, we used a total of 20 random amplified polymorphic dna markers (RAPD) markers and 23 inter simple sequence repeat (ISSR) for polymerase chain reactions (pcr). After genotyping data and statistical analysis (estimated distance, construction of dendrogram and bayesian estimates) was observed for *C. heliotropiifolius* high polymorphism for both markers used, being observed genetic structure associated with spatial distribution of specimens along the sierra tower. And for *C. linearifolius* were selected 18 and 17 issr molecular markers for use in genetic diversity studies.

Keywords: Caatinga, *Croton heliotropiifolius*, Molecular Genetics, Medicinal Plants

INTRODUÇÃO

O bioma caatinga é amplamente distribuído no território brasileiro e o único no território nacional que não é representado em outros países. Podendo ser encontrada desde a região sudeste (norte de Minas Gerais) até o nordeste brasileiro (Ceará e Rio Grande do Norte), estando presente em ao menos dez estados (Prado, 2003).

Por se tratar de um bioma exclusivo do território brasileiro, a caatinga detém espécies endêmicas, além de ser rica em biodiversidade, com espécies adaptadas ao clima característico desse bioma (Drumond et al., 2004). Contudo, a despeito da sua distribuição no território brasileiro a caatinga tem passado por variados processos de deterioração e uso insustentável de sua biodiversidade (Leal et al., 2003), sendo ainda pouco estudada quando comparada a outros biomas brasileiros.

A vegetação da caatinga pode ser caracterizada pela presença de florestas arbóreas e arbustivas, representadas por árvores e arbustos de pequeno porte que, via de regra, possui estreita relação com povoados locais. Dentre os gêneros mais representativos da caatinga, o gênero *Croton*, pertencente à família Euphorbiaceae merece destaque, pois abriga cerca de 1300 espécies, sendo o segundo gênero com maior número de espécies na família. Consiste principalmente de espécies arbustivas, sendo que uma das características de interesse econômico das espécies deste gênero, é a presença de constituintes químicos que tem despertado o interesse da indústria de fármacos, sendo essas espécies amplamente utilizadas como fitoterápicos, entre outros usos (Silva et al., 2010; Prado, 2003). As espécies do gênero *Croton* formam um grupo taxonomicamente complexo, com ampla diversidade e reconhecido uso popular como potencial fonte de recursos fitoterápico e inseticida (Vunda, 2011). Entretanto, a despeito do seu potencial uso, ainda são escassos estudos que abordem características genéticas. De acordo Porto (2007), a falta de estudos associados ao gênero *Croton* pode ser atribuído, em parte, ao extenso número de espécies do gênero.

Dentre as diversas espécies pertencentes ao gênero *Croton*, as espécies *C. heliotropiifolius* e *C. linearifolius* (Figura 1A e 1B, respectivamente) demonstram possuir propriedades químicas de interesse econômico. Foram constatadas a presença de alcaloides e

polifenóis em *C. heliotropiifolius* (Randau, 2004); e alcaloides, esteroides, flavonóis, flavanonas, taninos, triterpenóide e xantonas em *C. linearifolius*. (Oliveira et al., 2014).



Figura 1A. Partes aéreas de *Croton heliotropiifolius*. Fonte: Flores da Caatinga (INSA) e Embrapa Semiárido. **Figura 1B.** Partes aéreas de *Croton linearifolius*. Fonte: Soma, Sociedade, Meio Ambiente e Desenvolvimento.

Embora de reconhecida importância, o estudo e entendimento das questões biológicas de grande parte das espécies que compõem o bioma caatinga são ainda reduzidos (a exemplo de conhecimentos ecológicos, genéticos e taxonômicos). Pesquisas que contribuam para o entendimento da morfologia, fisiologia e da genética molecular de plantas nativas da caatinga, são recentes e em grande parte representam resultados parciais oriundos de projetos de pesquisa (Oliveira et al., 2014; Scaldaferrri et al, 2013 Costa, 2011). Essa realidade, como discutido por Giulietti et al. (2004) tende a mudar com o avanço das pesquisas e a proposição de novos trabalhos, justificados não apenas em decorrência da carência de informações científicas sobre o bioma, mas sobretudo por continuar sendo vítima de um extenso processo de alteração e deterioração ambiental provocado pelo uso insustentável dos seus recursos (Leal et al., 2003).

A diversidade genética dentro desse contexto se faz importante, na medida em que revela a necessidade de estudos de melhoramento em espécies de interesse econômico, bem como estratégias de conservação (Alvarenga et al., 2010). Nesse sentido, é possível e provável que as informações obtidas com o avanço das caracterizações genéticas desempenhem um papel essencial na elaboração de um plano de manejo que contribua não apenas para o uso, mas principalmente para a conservação da diversidade.

A utilização de marcadores moleculares potencializa a caracterização de diversidade genética, bem como auxilia na detecção de marcadores funcionais associados à genes de

interesse, por meio de procedimentos simples e rápidos (Bered et al., 1997). Marcadores do tipo RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) e ISSR (*inter simple sequence repeat*) contribuem efetivamente nos estudos de diversidade genética de inúmeras espécies vegetais de interesse econômico e de conservação (Guimarães et al., 2009). Informações oriundas de estudos genéticos moleculares contribuem para estudos populacionais, colaborando para o desenvolvimento de ações de manejo e conservação da biodiversidade.

Diante do contexto apresentado, em que a caatinga é entendida como um dos biomas mais vulneráveis do país à incidência da degradação ambiental, o entendimento da sua biodiversidade e a estimativa de variabilidade genética de suas populações, mediante ferramentas clássicas e moleculares, deverá contribuir para elaboração de ações de manejo e conservação. Assim, a pesquisa teve como objetivos caracterizar a diversidade genética em duas populações de *Croton* spp. (*C. heliotropiifolius* e *C. linearifolius*) mediante uso de marcadores moleculares RAPD e ISSR.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Características do bioma Caatinga

A caatinga é considerada um bioma exclusivo do Brasil e ocupa aproximadamente 12% do território nacional, compreendendo os estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Maranhão, Piauí e Minas Gerais (Drumond et al., 2004).

Esse bioma apresenta um clima típico de semi-árido, com temperatura anual variando de 24° C a 29°C e chuvas concentradas nos meses de janeiro a maio (Drumond, 2004; Leal et al., 2003). E apresenta solos rasos, argilosos e rochosos, bem como, solos profundos e arenosos, destacando-se: latossolos, nitossolos, argissolos, luvisolos, chernossolos, cambissolos, planossolos, plintossolos, vertissolos e neossolos (Leal et al., 2003).

A caatinga apresenta diversos tipos de relevo, sendo estes: depressão, bacias sedimentares, planaltos, superfícies cársticas, tabuleiros, várzeas, terraços aluvionares, dunas continentais (Drumond et al., 2004). As espécies que ocorrem na caatinga, especialmente as endêmicas, são extremamente adaptadas as condições de estresse natural característica desse bioma (Giulietti et al., 2004).

Segundo Drumond et al. (2004) a caatinga possui potencial para cultivo de plantas forrageiras, frutíferas, medicinais, bem como espécies vegetais utilizadas para extração madeireira, além de possuir fauna representativa. Ainda de acordo com o autor, a região Nordeste compreende cerca de 25 milhões de habitantes e por conta da elevada prática de atividade extrativista, bem como as sucessivas temporadas de seca, o solo e a água da caatinga vem se deteriorando, ocasionando na perda de biodiversidade.

A vegetação da caatinga é representada basicamente por plantas xerofíticas, ou seja adaptadas a escassez de água, com fisionomia e florística diversificada (Almeida-Cortez et al., 2007). Foram registradas aproximadamente 932 espécies arbóreas e arbustivas, das quais 318 são endêmicas (Guilietti et al. 2004). As famílias com maiores ocorrências de espécies na caatinga são Caesalpinaceae, Mimosaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Cactaceae.

Várias espécies apresentam utilidades para a população local e são utilizadas como importante recurso natural para alimentação humana e animal, como planta medicinal e inseticida. Embora não exista comprovação científica para todos os usos fitoterápicos indicados e, especialmente, para todas as plantas utilizadas, tem-se a título de exemplificação o uso de algumas espécies principalmente para alimentação de animais domésticos, como o umbu (*Spondias tuberosa*), utilizado como alimento para caprinos (Leal et al., 2003), espécies de *Croton*, como o marmeleiro (*C. blanchetianus* Baill.) que tem suas folhas utilizadas na alimentação de bovinos, caprinos e ovinos (Albuquerque et al., 2010), e como fitoterápicos a aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e imburana de cheiro (*Amburana cearensis*) utilizadas na medicina popular e comercializadas nos mercados e feiras locais (Albuquerque e Andrade, 2002), além do cassutinga (*C. heliotropiifolius*) utilizado como fitoterápico (Oliveira et al., 2014).

Em relação a fauna presente na caatinga, os répteis, anfíbios e aves se destacam, apresentando cerca de 97 espécies de répteis e 45 de anfíbios, sendo também rico em aves endêmicas, podendo em um ambiente ultrapassar 200 espécies (Leal et al., 2003).

O bioma também apresenta espécies ameaçadas de extinção, como a *Pyrrhura anaca* e o *Puma concolor* (Silva e Gualberto, 2010). Além destas, a espécie *Anodorhynchus glaucus*, conhecida como arara-azul-pequena, apesar de não ser endêmica, já se encontra extinta do território da caatinga (ICMbio, 2011).

Nas últimas décadas, muitos pesquisadores tem dedicado atenção a regiões do bioma caatinga com o intuito de caracterizar a biologia, ecologia e compostos químicos da flora (Drumond et al, 2012; Moreira et al, 2006 Guilietti et al., 2004), bem como estudar a diversidade genética de espécies (Scaldeferri, 2013; Lira-Neto, 2011). Esses estudos apontam para um caminho de mudanças, em que a atenção de pesquisadores tem se voltado para a caracterização da biodiversidade, buscando então conhecer suas espécies e desenvolver estratégias que visem a conservação e manutenção da diversidade existente. Nesse sentido se percebe e reconhece que o bioma caatinga detém um amplo potencial

científico, com espécies de importância econômica e vastas características a serem ainda estudadas (Silva et al., 2010; Almeida-Cortez, 2007).

1.2 Características gerais do gênero *Croton*

O gênero *Croton* pertence a família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae, sendo composto por aproximadamente 1300 espécies (Berry et al., 2005).

Tem distribuição pantropical, ocorrendo com maior frequência nas Américas. Sendo que a América do Sul, as Antilhas e o México são considerados os mais importantes centros de diversidade.

Na América do Sul, o Brasil é o país que abriga o maior número de espécies, em torno de 350 (Berry et al., 2005; Hoehne, 1935), abrangendo diferentes ambientes e tipos de vegetação. Destas 350 espécies encontradas no Brasil, cerca de 40 ocorrem no estado de Pernambuco (Lucena, 2000; Webster, 1994).

As espécies deste gênero geralmente são subarbustivas ou arbustivas e raras vezes arbóreas; são em geral monóicas e podem apresentar inflorescência onde as pétalas quando não são ausentes, são reduzidas (Silva et al., 2010; Guimarães, 2006). Exibem também um revestimento piloso nas folhas. As flores masculinas e femininas são diminutas e predominantemente brancas (Silva et al., 2009). Apresentam também tricomas de formas variadas, como tricomas estrelados e escamiformes. As sementes via de regra são escuras e oleaginosas e o fruto apresenta-se como cápsula tricoca, medindo de 2 a 6 mm de diâmetro (Silva et al., 2009).

As espécies que compõem esse gênero são consideradas diversas a partir da avaliação morfológica dos seus representantes e apresentam grande complexidade do ponto de vista taxonômico, sendo por vezes o gênero *Croton* negligenciado em favor de outros gêneros menores e mais delimitados (Zioldo, 2007; Lima e Pirani, 2008).

Nas últimas três décadas diversas espécies de *Croton* vêm sendo estudadas do ponto de vista químico e farmacológico (QUADRO 1). Essas espécies possuem diversos compostos secundários de importante atividade biológica, e portanto, são utilizadas como fitoterápicos por pequenas comunidades locais. De acordo Palmeira Jr. et al. (2012) o

gênero *Croton* possui espécies ricas em óleos essenciais, sendo produtoras de substâncias químicas como mono e sesquiterpenóides, além de fenilpropanóides.

Além destes, Lira-Neto (2011) afirma que espécies do gênero *Croton* costumam apresentar constituintes ativos como flavonoides, alcaloides e terpenóides. Dentre as substâncias químicas citadas, os terpenóides possuem diversas propriedades farmacológicas, como antisséptica, anti-inflamatória, antiespasmódica, antipirética, expectorante, hipoglicemiante, repelente, anestésica, entre outras (Passos et al., 2009; Leite et al., 2008). A partir dessas informações a importância econômica do gênero tem se tornado cada vez mais reconhecida.

Quadro 1. Espécies de *Croton* que possuem resultados de estudos químicos e farmacológicos realizados nas últimas décadas

<i>C. argyrophiloides</i>	<i>C. crassifolius</i>	<i>C. humilis</i>	<i>C. menthodoros</i>	<i>C. regelianus</i>
<i>C. antisiphiliticus</i>	<i>C. cuneatus</i>	<i>C. hieronymi</i>	<i>C. mongue</i>	<i>C. salutaris</i>
<i>C. arboreus</i>	<i>C. diasii</i>	<i>C. jatrophioides</i>	<i>C. mucronifolius</i>	<i>C. sacaquinha</i>
<i>C. bonplandianum</i>	<i>C. dichogamus</i>	<i>C. kerrii</i>	<i>C. muscicapa</i>	<i>C. schiedeamus</i>
<i>C. cajucara</i>	<i>C. draconoides</i>	<i>C. kongensis</i>	<i>C. nepetaefolius</i>	<i>C. sarcopetalus</i>
<i>C. californicus</i>	<i>C. eleuteria</i>	<i>C. lechleri</i>	<i>C. nitens</i>	<i>C. sonderianus</i>
<i>C. californicus</i> var. <i>tenuis</i>	<i>C. erythrochilus</i>	<i>C. linearis</i>	<i>C. niveus</i>	<i>C. spaeiciflorus</i>
	<i>C. flavens</i>	<i>C. linearifolius</i>	<i>C. oblongifolius</i>	<i>C. sublyratus</i>
<i>C. campestris</i>	<i>C. floribundus</i>	<i>C. lobatus</i>	<i>C. palanostigma</i>	<i>C. tiglium</i>
<i>C. caudatus</i>	<i>C. geayi</i>	<i>C. macrostachys</i>	<i>C. pseudopulchellus</i>	<i>C. triqueter</i>
<i>C. celtidifolius</i>	<i>C. gossypifolius</i>	<i>C. malambo</i>	<i>C. penduliflorus</i>	<i>C. turumiquirensis</i>
<i>C. citratus</i>	<i>C. humanianus</i>	<i>C. martinianus</i>	<i>C. pulegioides</i>	<i>C. urucurana</i>
<i>C. chilensis</i>	<i>C. hemiargyreus</i>	<i>C. matourensis</i>	<i>C. poilanei</i>	<i>C. verreauxii</i>
<i>C. cortesianus</i>	<i>C. hovarum</i>	<i>C. megalocarpoides</i>	<i>C. rhamnifolioides</i>	<i>C. yecorensis</i>
<i>C. corylifolius</i>	<i>C. heliotropifolius</i>	<i>C. megalocarpus</i>	<i>C. ruizianus</i>	<i>C. zambesicus</i>
				<i>C. aff. Zehntneri</i>

Fonte: Adaptado de Lira-Neto (2011) e Abreu et al. (2001).

Dessas espécies citadas nos estudos, diversas apresentam potencial econômico, sendo utilizadas localmente como alternativas medicinais no combate e controle de doenças (TABELA 1).

Neste contexto, vale ressaltar algumas espécies que já dispõem de estudos científicos do potencial farmacológico, como o *C. argyrophiloides*, que ocorre na região nordeste e é considerado um vegetal arbustivo e conhecido popularmente devido a coloração de suas folhas como “marmeleiro prateado”, indicado popularmente para o tratamento de cólicas intestinais (Farias, 2006). O caule do *C. argyrophiloides* é utilizado

como antimicrobiano e espécie apresenta constituintes químicos, como: espatulenol, β -cariofileno, alfa-pineno, beta-felandreno, beta-elemeno e 1,8-cineol (Farias, 2006).

Outra espécie que apresenta características de interesse econômico é o *C. cajucara*, que ocorre na região leste e central da Floresta Amazônica e consiste num arbusto chamado popularmente como “sacaca”. Seu uso popular consiste no emprego das folhas e cascas do caule no tratamento da diabetes, malária, febre, distúrbios gastrointestinais, renais, hepáticos e no controle do colesterol (Maciel et al., 2002; Hiruma-Lima et al., 1999).

Já o *C. nepetaefolius*, é uma espécie que ocorre na região nordeste, conhecido popularmente como “marmeleiro sabiá”, “marmeleiro cravo” ou “marmeleiro de cheiro”, e é utilizado na medicina popular no alívio de dores estomacais, redução de gases estomacais e cólicas intestinais, sendo sua ação em cólicas intestinais já comprovada cientificamente (Abdon et al., 2002).

Tem-se também, *C. urucurana*, que diferente dos demais, não é uma espécie arbustiva, é considerada arbórea e conhecida popularmente como “sangra d’água”, “sangue de dragão” ou “capixingui”, ocorre na região nordeste e sul do Brasil, e é utilizada como anti-hemorrágica, anti-inflamatória, antisséptica, antiviral e cicatrizante (Lorenzi e Matos, 2008).

Entre as espécies de *Croton*, algumas apresentam potencial inseticida, como, *C. zehntneri*, que consiste num vegetal subarbustivo, encontrado na região Nordeste e conhecido como “canela de cunhã”, “canelinha” ou “canela brava”. Estudos com o óleo essencial dessa espécie demonstraram potencial larvicida contra *Aedes aegypti* (Lima et al., 2006) além de atividade antifúngica e potencial fitoterápico (Fontenelle et al., 2008) bem como, *C. linearifolius* que também apresenta potencial inseticida contra *Aedes aegypti* (Silva et al., 2014).

Tabela 1. Apresentação de espécies do gênero *Croton* utilizadas como fitoterápicos e locais de ocorrência

Espécies	Potencial medicinal e químico	Ocorrência da espécie	Referências
<i>C. antisiphiliticus</i>	Tratamento de infecções ginecológicas	Caatinga	Abreu et al., 2001
<i>C. argyrophiloides</i>	Atividade antimicrobiana	Caatinga	Tieppo, 2007
<i>C. cajucara</i>	Atividade antimicrobiana e no tratamento de diabetes, diarreia, doenças hepáticas controle do colesterol	Mata Atlântica	Silva et al., 2012
<i>C. nepetaefolius</i>	Propriedades antiespasmódicas, antinociceptiva e antiedematogênica	Caatinga	Abdon et al., 2002
<i>C. urucurana</i>	Efeitos analgésico, antiinflamatório e anticancerígeno	Caatinga	Gurgel et al., 2002
<i>C. zehntneri</i>	Efeito sedativo no tratamento de distúrbios gastrointestinais	Caatinga	Alves, 2009
<i>C. bonplandianum</i>	Potencial para curar doenças do fígado, controlar a pressão arterial, tratamento de doenças de pele, cortes e feridas	-----	Dutta et al., 2013
<i>C. crassifolius</i>	Utilizado para tratar picadas de cobra, dor de estômago, esternalgia, dor nas articulações, faringite e icterícia	-----	Zhao et al., 2012
<i>C. cuneatus</i>	Tratamento contra a diabetes e anti-inflamatório	Caatinga	Torrico et al., 2007
<i>C. campestris</i>	Combate a escrofulose, doenças venéreas, impingens, tumores, moléstias da pele, reumatismo, úlcera do útero, diarreia e artrismo	Caatinga	Santos et al., 2005
<i>C. caudatus</i>	Atividade larvicida	Mata Atlântica	Salatino et al., 2007
<i>C. celtidifolius</i>	Efeito antiinflamatório, antioxidante, tratamento da leucemia e úlceras	Caatinga	Horst, 2008
<i>C. flavens</i>	Efeito anticancerígeno	Caatinga	Sylvestre et al., 2006
<i>C. sonderianus</i>	Tratamento em hemorragia uterina, dor de estômago, vômitos e diarreia	Caatinga	Randau et al., 2004
<i>C. rhamnifolioides</i>	Efeito antibacteriano	Caatinga	Randau et al., 2004
<i>C. lechleri</i>	Efeito antiinflamatório e anticancerígeno	Caatinga	Fão et al., 2012
<i>C. linearifolius</i>	Potencial inseticida	Caatinga	Cunha et al., 2014

<i>C. eluteria</i>	Tratamento da diarreia e bronquite	Mexico	Kafuku e Mbarawa, 2010
<i>C. megalocarpus</i>	Produção de biodiesel	Mata Atlântica	Kafuku e Mbarawa, 2010
<i>C. hemiargyreus</i>	Presença de alcanos, alcoois, terpenos e alcaloides	Caatinga	Vunda, 2011
<i>C. ericoides</i>	Atividade amebicida	Mata Atlântica	Vunda, 2011

----- representando as espécies que não foram encontrados locais de ocorrência.

1.3 Ocorrência das espécies *C. heliotropiifolius* e *C. linearifolius* em herbários e locais de coleta no Brasil

Em um levantamento realizado por Cordeiro e Carneiro-Torres (2006) e por Pollito et al. (2004), foram registradas cerca de 90 espécies ocorrendo no Nordeste brasileiro. Além disso, segundo Pollito et al. (2004) das 350 espécies de *Croton* que ocorrem no Brasil, cerca de 300 são consideradas endêmicas.

Uma iniciativa realizada pela FAPESP em 2001 deu origem ao projeto “Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas: a Integração do Species Analyst e do SinBiota”, ou *speciesLink*, e teve como objetivo principal desenvolver e disseminar um sistema de informação acerca de espécies e espécimes, associado a um sistema de previsão de distribuição geográfica dessas espécies.

Em um levantamento realizado das instituições que possuem herbários cadastrados online no *speciesLink* (smlink.cria.org.br), foi apresentado o registro das espécies *C. heliotropiifolius* e *C. linearifolius*. O programa também oferece entre as informações locais de coleta, instituições onde os herbários estão inseridos e coordenadas geográficas de onde as amostras foram encontradas.

Nas buscas realizadas para as duas espécies, a espécie *C. heliotropiifolius* se sobressai com o maior número de registros. Encontram-se disponíveis 1635 registros da espécie.

Dentre as instituições apresentadas, algumas possuem maior número de amostras, como o herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana, na Bahia, sendo a mais representativa das instituições, totalizando 390 registros. Em segundo lugar, se encontra o herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, com 145 registros disponíveis. Outros herbários que também possuem um amplo número de registros são o herbário da Universidade Federal de Sergipe com, 140 e o herbário Alexandre Leal Costa, com 127 registros. Dentre os herbários cadastrados, o da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, apresentou 55 registros e os demais herbários apresentaram número de registro variando em torno de 1 a 103.

Entre os estados onde as amostras foram coletadas, 611 registros foram para a Bahia, sendo considerado como o estado que obteve o maior número de coletas e o município mais explorado foi o de Feira de Santana. O estado do Pernambuco apresentou

300 registros e com maior ocorrência no município de Buíque, com 32. Entretanto, 74 municípios não foram identificados.

Para a espécie *C. linearifolius*, foram encontrados 32 registros. A universidade Estadual de Feira de Santana abriga o maior número de registros da espécie, com 17 ocorrências. As demais instituições apresentam número de registro variando entre 1 e 3. A cidade com o maior número de coletas para a espécie foi Juazeiro, no estado da Bahia.

Diante dos dados disponíveis no *speciesLink*, o Nordeste demonstra ser a região onde prevalece a ocorrência dessas espécies, sendo a Bahia, o estado com mais registros de coletas para ambas as espécies.

1.4 Diversidade genética molecular

Em linhas gerais, a biodiversidade consiste na variedade de ecossistemas, espécies, populações dentro de espécies, bem como diversidade genética presente dentro e entre populações (Frankham et al. 2008). Nesse sentido, segundo estes mesmos autores, é imprescindível que a biodiversidade seja conservada, destacando-se entre as principais razões para tanto os recursos e serviços prestados, além, obviamente, das questões éticas.

Um dos fatores primordiais para a manutenção da biodiversidade é a diversidade genética. Segundo Frankham et al. (2008) a IUCN (*International Union of Conservation of Nature*) reconhece a diversidade genética como uma das principais prioridades globais para a conservação das espécies.

De forma mais específica, a diversidade genética diz respeito a variedade de alelos nos diversos locos de uma espécie, fornecendo para a biodiversidade o material básico para a ação da seleção natural, e portanto, para a evolução das espécies (Solé-Cava, 2001). Alguns fatores afetam diretamente na diversidade genética nas populações. Dentre estes, os principais eventos que podem atuar ampliando a diversidade genética se dão através de mutação e fluxo gênico entre populações. Outros aspectos como, deriva genética, endogamia e seleção natural podem afetar as populações diminuindo a sua diversidade genética (Nei, 1987).

De acordo com Frankham et al. (2008), a diversidade genética pode ser manifestada de diversas formas, podendo ser demonstrada através de diferenças em muitas características, como a cor dos olhos, da pele e do cabelo em seres humanos, cor das flores nas plantas, bem como diferenças protéicas, enzimáticas e em sequências de

DNA da maioria dos organismos. Essas diferenças nas sequências de DNA podem ou não ser expressas. Caso ocorram em regiões de genes, podem alterar a sequência de aminoácidos da proteína codificada e tal variação protéica pode acarretar diferenças em funções bioquímicas, morfológicas ou comportamentais, afetando nas taxas reprodutivas, de sobrevivência ou no comportamento dos indivíduos (Frankham et al., 2008).

Ainda nesse sentido Primack e Rodrigues (2001) afirmam que dentro da população de uma determinada espécie a diversidade genética é constantemente influenciada pelo comportamento reprodutivo dos indivíduos, sendo que espécies que se reproduzem sexualmente costumam favorecer a reorganização dos alelos, o que em combinações distintas, aumentam seu potencial de variação genética. O nível de diversidade genética em uma população além de ser influenciado pelo comportamento de acasalamento dos indivíduos depende, também, da história evolutiva da espécie (Booy et al., 2000).

Essa diversidade possibilita o estabelecimento da espécie em um novo hábitat e também a sua continuidade num contexto de mudanças ambientais. A manutenção de uma população de uma determinada espécie é importante, pois quando a mesma se extingue carrega consigo genes únicos, que são por vezes, a reserva adaptativa da espécie frente a mudanças ambientais (Araújo, 2007).

Neste contexto, a genética de populações representa um ramo da biologia que pode contribuir para o entendimento da dinâmica evolutiva das populações e espécies. Segundo Griffiths et al. (2008) a genética de populações pode compor dois tipos de estudos: experimental e teórico. Como ciência experimental, proporciona descrições dos padrões reais da variação genética existente entre indivíduos das populações, já como teórico, realiza previsões sobre como se espera que a composição genética das populações pode mudar como consequências das diversas forças que operam nela.

O uso conjunto de teorias e de técnicas da genética que buscam reduzir o risco de extinção de espécies ameaçadas é denominado genética da conservação e tem como objetivo, a longo prazo, preservar indivíduos capazes de possuir diversidade genética para serem adaptados as mudanças ambientais (Frankham et al., 2008). Para o gênero *Croton* já existem algumas pesquisas relacionadas à caracterização da diversidade genética (Scaldeferri, 2013; Silvestrini et al, 2009; Bertagna, 2007; Angelo et al., 2006), entretanto as informações moleculares do gênero ainda são reduzidas, fazendo necessário que seja dada continuidade com pesquisas de caracterização de diversidade genética.

1.5 Marcadores moleculares aplicados ao estudo do gênero *Croton*

Encontram-se disponíveis para uso da comunidade científica diferentes técnicas e marcadores moleculares, a exemplo de marcadores baseados em: (i) enzimas de restrição (como as isoenzimas e marcadores baseados em fragmentos de restrição – RFLP (restriction fragment length polymorphism); (ii) primers aleatórios, como os marcadores de amplificação arbitrária de DNA – RAPD (random amplified polymorphic DNA) e ISSR (inter simple sequence repeat); (iii) primers específicos, como os marcadores de regiões de repetição simples - SSR (simple sequence repeats) e ainda; primers associados a regiões expressas, como os marcadores de genes análogos de resistência - RGA (Resistance for Genes Analogs), entre outros (TABELA 2) (Ferreira e Gratapaglia, 1996; Borém e Caixeta, 2009), além de marcadores SNP (Single nucleotide polymorphism).

Tabela 2. Apresentação dos principais marcadores moleculares utilizados em estudos genéticos de plantas, seu padrão de herança (natureza) e referência

Marcador	Natureza	Referência
Isoenzimas	Co-dominante	Lewontin & Hubby, 1996
RFLP	Co-dominante	Grodzicker, 1974
SSR	Co-dominante	Litt & Luty, 1989
RAPD	Dominante	Williams et al., 1990
ISSR	Dominante	Zietkiewicz et al., 1994
AFLP	Dominante	Vos et al., 1995
SNP	Bialélicos	Hayashi et al., 2004
RGA	Dominante	Hayes & Maroof, 2000

Entre os marcadores moleculares estão as isoenzimas que são variadas formas moleculares de uma enzima, resultado de diferentes variações alélicas dos genes codificantes. As principais vantagens da técnica com isoenzimas são o custo baixo, facilidade e rapidez da metodologia, considerada co-dominante, de modo que, permitem a diferenciação de locos homozigotos e heterozigotos. Entre as desvantagens estão o baixo número de sistemas enzimáticos que apresentam polimorfismo e a influência das condições ambientais e do material vegetal nas atividades das enzimas (Faleiro, 2007).

Em um estudo de diversidade genética para uma espécie do gênero *Croton*, a técnica com marcador isoenzimático foi empregada (Bertagna, 2007) (TABELA 3).

Na categoria de marcadores dominantes, se encontra o RAPD, que assim como o marcador isoenzimático, foi utilizado em estudos de diversidade genética de espécies do gênero *Croton* (Scaldaferri, 2013; Angelo et al., 2006, Ziroldo, 2007). Os marcadores RAPD se caracterizam como pequenos fragmentos de DNA, composto geralmente por 10 nucleotídeos, baseados em PCR e cujos primers são aleatórios, podendo se anelar a várias regiões do DNA. As principais vantagens da técnica são a rapidez e facilidade na realização, necessidade de pequena quantidade de DNA, além de poder ser utilizado em qualquer espécie, já que não é necessário se conhecer a priori dados de sequência do DNA para a construção dos *primers*. As principais desvantagens estão na natureza dominante deste marcador, ou seja, na impossibilidade de diferenciar loci heterozigotos e na baixa reprodutibilidade das marcas. Para superar essa característica é necessário que as condições experimentais estejam bem padronizadas. Outra estratégia que pode ser realizada é a construção de *primers* específicos a partir do sequenciamento de determinado marcador RAPD (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Outro marcador, também de natureza dominante, empregado em estudos de diversidade genética em espécies do gênero *Croton*, é o marcador ISSR. Este marcador por sua vez se caracteriza como fragmentos de DNA com aproximadamente 100 a 3000 pares de bases amplificados através da técnica de PCR, sendo utilizado um único *primer*. Os ISSRs apresenta como vantagens o grande número de bandas informativas e assim como RAPD não é necessário um conhecimento prévio de dados de sequência do DNA da espécie estudada, sendo a principal desvantagem o aspecto dominante dos marcadores (Faleiro, 2007).

Também figuram entre os marcadores já utilizados em estudos envolvendo o gênero *Croton* os microssatélites (SSR) (Silvestrini et al., 2009). Estes marcadores acessam regiões curtas do DNA repetidas em *tandem*, ou seja, em sequência. São marcadores baseados em PCR para sua obtenção e utilizam pares de *primers* específicos de aproximadamente 20 pb. Para a construção destes *primers*, se faz necessário, caso não existam dados de sequências genômicas disponíveis em bancos de dados, que seja construída uma biblioteca genômica, seleção e sequenciamento dos clones positivos e por fim, desenho dos *primers* (Litt e Luty, 1989). Suas vantagens são a co-dominância, o alto polimorfismo detectado e alta reprodutibilidade das marcas. Como desvantagem, ou dificuldade para implementação da técnica, destaca-se o investimento inicial, necessário

para o desenvolvimento dos pares de *primers* específicos, além de ser necessário o conhecimento prévio de sequência de DNA (Litt e Luty, 1989).

Alguns marcadores como SNP e RGA ainda não foram empregados em estudos para espécies do gênero *Croton*, sendo, contudo importantes para realização de diferentes estudos genéticos.

Marcadores do tipo SNP são considerados bialélicos, e tem como base alterações no DNA, como mutações e polimorfismos. Esses marcadores podem ser encontrados em qualquer região do genoma, entretanto, ocorre mais em regiões de espaços entre genes e são abundantes em espécies não endogâmicas. Uma das grandes vantagens desses marcadores é a fácil conversão das metodologias em diferentes plataformas (Caetano, 2009). A maior desvantagem do SNP é o alto custo do seu desenvolvimento.

Já os marcadores moleculares do tipo RGA são constituídos por regiões análogas a genes de resistência e tem como vantagem não carecer de um sequenciamento genético da espécie estudada, podendo também ser utilizados em espécies distintas (Santini, 2009), assim como os marcadores RAPD e ISSR, e a principal desvantagem do RGA é a sua natureza dominante.

1.5.1 Diversidade genética intraespecífica em *Croton* spp.

Encontram-se disponíveis na literatura sete estudos de caracterização de diversidade genética em espécies de *Croton* (TABELA 3).

Dentre eles, o estudo realizado por Angelo et al. (2006) de comparação entre dois morfotipos de *C. cajucara* (sacaca), espécie que possui em seu óleo essencial álcool linalol, um terpênico altamente utilizado na indústria de perfumaria. Essa espécie começou a ser utilizada como alternativa para substituir a espécie *Aniba rosaeodora* (Pau-rosa), que se encontrou ameaçada de extinção, já que era fonte principal da exploração do linalol durante muito tempo.

O *C. cajucara* também apresenta propriedades curativas cientificamente comprovadas. Em estudos realizados com camundongos, a mesma foi utilizada para reduzir os níveis de glicose e lipídios. Os morfotipos estudados tinham colorações diferentes. Apresentavam folhas brancas e o outro, folhas vermelhas. Foram utilizados 10 marcadores RAPD e a partir das análises de diversidade, pode-se notar

que as plantas de sacaca vermelha se apresentavam mais diversificadas entre si do que as plantas de sacaca branca e a divergência entre elas também foi reforçada através da análise dos óleos essenciais de cada morfotipo. A sacaca branca apresentou o linalol como principal componente, enquanto a sacaca vermelha apresentou como principal componente hidroxi-calamenene.

Em outro estudo realizado para o gênero, Bertagna (2007), comparou 20 plantas e jovens 20 adultas de *C. floribundus* em seis fragmentos florestais de uma Área de Preservação Ambiental de Souza e Joaquim Egídio, em Campinas. Utilizando a técnica de eletroforese de isoenzimas, com o intuito de verificar como a fragmentação estaria influenciando no fluxo gênico e diversidade genética dessas populações alta variabilidade genética foi encontrada nas amostras.

Nos indivíduos adultos foi observado que as amostras que apresentaram maior diversidade genética, maior número de alelos por loco e menor endogamia foram coletadas em dois fragmentos considerados menos degradados e maiores que os demais. Nos indivíduos jovens, o resultado para diversidade genética também demonstrou ser maior nesses mesmos fragmentos florestais, sendo que em um deles foi também encontrado o maior número de alelos raros em adultos e jovens. As amostras dos indivíduos jovens apresentaram uma maior frequência de alelos raros, quando comparados com os indivíduos velhos, entretanto a variabilidade genética das populações não obteve diferença significativa quando comparadas.

Esse resultado pode ser explicado pelo fato da polinização nessa espécie ser realizada por insetos e pelo vento, podendo percorrer longas distâncias. Também não foi observado estruturação nas populações estudadas. Os valores de diversidade gênica encontrados para as populações da espécie *C. floribundus* foi o maior quando comparados com outras espécies arbóreas tropicais submetidas a mesma análise de isoenzimas, especialmente para espécies encontradas em ambientes fragmentados. Esses resultados podem estar relacionados com características da espécie, como o fato de ser pioneira, ocupando espaços perturbados e apresentando alta densidade populacional.

A espécie apresenta características desejáveis para fazer parte de diversos programas de restauração florestal. Entretanto, Bertagna (2007) conclui que a espécie *C. floribundus* não pode ser considerada como boa indicadora dos efeitos de fragmentação sobre populações de espécies arbóreas, já que a mesma é pioneira invasora e consegue se manter em ambientes antropizados.

Em outra pesquisa realizada para a espécie *C. floribundus*, Zirollo (2007), coletou em três regiões contendo fragmentos de Mata Atlântica. As amostras foram coletadas em seis fragmentos, no Paraná, utilizando marcador molecular RAPD, sendo analisados 96 indivíduos. As populações não apresentaram diferenças significativas de variação genética interpopulacionais quando comparadas com outras espécies arbóreas, porém, esse resultado não está associado com a fragmentação, pois está relacionado com o tipo de reprodução alógama da espécie e já era esperado. A diversidade genética se mostrou maior dentro de cada população estudada e a distribuição da variabilidade genética entre as populações se mostrou baixa, indicando estruturação nas três regiões amostradas. O fragmento mais preservado foi o que apresentou o maior índice de diversidade genética.

Para os marcadores do tipo SSR, os primeiros resultados foram publicados em 2009 (Silvestrini et al., 2009), sendo evidenciado o desenvolvimento e a caracterização de 12 marcadores SSR avaliados em 23 plantas de *C. floribundus*. Embora de grande potencial, estudos de diversidade realizados mediante o uso de marcadores SSR não foram ainda observados na literatura para espécies do gênero *Croton*. Isso pode ser explicado por ainda não haver sequenciado o genoma da espécie.

Em um estudo de diversidade genética realizado por Lira-Neto (2011), foram exploradas as espécies *C. heliotropiifolius*, *C. blanchetianus* e *C. pedicellatus*. Os marcadores aplicados na pesquisa foram do tipo DAF (DNA Amplification Fingerprinting) e marcadores ISSR. Foi efetuado ainda a seleção de *primers* para serem também utilizados em estudos filogenéticos e populacionais.

Para a realização da pesquisa o autor selecionou 4 indivíduos de cada espécie e foram aplicados 29 *primers* DAF, e o resultado obtido nesses *primers* foi de 374 marcas, sendo destes 359 polimórficos. Já para ISSR foram empregados 17 *primers*, e o produto da amplificação foi de 327 *loci*, onde 317 apresentando polimorfismo. O elevado número de polimorfismo encontrado comprovou que o método adotado foi eficiente para o proposto pelo autor.

Scaldeferri (2013) desenvolvendo um estudo de diversidade genética nas espécies *C. linearifolius* e *C. heliotropiifolius*, espécies com potencial inseticida e fitoterápico, respectivamente, por meio de 12 iniciadores RAPD e 15 ISSR, obteve-se alto grau de polimorfismo nas duas espécies, em torno de 98,7% para *C. linearifolius* e 98% para *C. heliotropiifolius*. Plantas da espécie *C. linearifolius* foram coletadas na

Floresta Nacional Contendas do Sincorá, na Bahia, sendo 52 amostras coletadas em dois pontos distintos. Observou-se a existência de dois pool gênicos, demonstrando que o fluxo gênico entre as populações ocorre de forma reduzida. Já a espécie *C. heliotropiifolius* foi coletada no município de Itapetinga, Bahia, em um local de serra, onde ocorre mata nativa. A coleta foi dividida em três pontos, sendo eles: topo da serra, região mediana e base. Nesse estudo foram amostrados 42 indivíduos. O mesmo resultado foi encontrado para *C. heliotropiifolius*, dois pool gênicos foram representados, entretanto, pode-se observar que na região média os pool gênicos se misturavam. Esse fato pode estar relacionado com o transporte de sementes e pólen.

Tabela 3. Espécies de *Croton* que já possuem estudos de diversidade genética, filogenéticos e citogenéticos

Espécie	Técnica utilizada	Objetivos	Referências
<i>C. floribundus</i>	Isoenzimas	Estimar a diversidade genética	Bertagna, 2007
<i>C. floribundus</i>	RAPD	Estimar diversidade genética	Zirolto, 2007
<i>C. cajucara</i>	RAPD	Estimar diversidade genética	Angelo et al., 2006
<i>C. sublyratus</i>	ISSR	Estimar diversidade genética	Klinbantom, 2004
<i>C. linerarifolius</i>	ISSR e RAPD	Estimar diversidade genética	Scaldaferri, 2013
<i>C. heliotropiifolius</i>	ISSR e RAPD	Estimar diversidade genética	Scaldaferri, 2013
<i>C. alabamensis</i>	RFLP	Reconstruir as relações filogenéticas	Benjamim et al., 2006
<i>C. pallidulus</i>	AFLP	Reconstruir as relações filogenéticas	Suzaki, 2011
Diversas espécies	Análise de regiões ITS e trnL-trnF	Reconstruir relações filogenéticas	Berry et al., 2005
<i>C. heliotropiifolius</i>	Técnica de FISH e coloração com AgNO ₃	Contagem cromossômica	Lira-Neto, 2011
<i>C. sellowi</i>	Técnica de FISH e coloração com AgNO ₃	Contagem cromossômica	Lira-Neto, 2011
<i>C. lundianus</i>	Técnica de FISH e coloração com AgNO ₃	Contagem cromossômica	Lira-Neto, 2011
<i>C. draconoides</i>	Técnica de FISH e coloração com AgNO ₃	Contagem cromossômica	Rios e Figueroa, 2011
<i>C. palanostigma</i>	Técnica de FISH e coloração com AgNO ₃	Contagem cromossômica	Rios e Figueroa, 2011
<i>C. urticifolius</i>	Técnica de FISH e coloração com AgNO ₃	Contagem cromossômica	Junior e Benko-Iseppon, 2011

1.5.2 Estudos citogenéticos do gênero *Croton*

De todos os estudos genéticos empregados para espécies do gênero *Croton*, os estudos citogenéticos ainda são os mais recentes. E de acordo com Perry (1943), espécies que pertencem a família Euphorbiaceae, assim como as espécies do gênero *Croton*, além de possuir morfologia variada, possuem também números e tamanhos cromossômicos diversos, tornando o grupo das euforbiáceas interessante do ponto de vista citogenético.

De acordo com Lira-Neto (2011), a literatura aponta que apenas cerca de 5% das espécies do gênero *Croton* possuem estudos cromossômicos e aponta que os números $n=8$ e $n=32$ são apresentados como o menor e maior número haploides detectados, respectivamente. Entretanto, o gênero exibe $n=10$ como o mais frequente.

Um trabalho inédito de citogenética em 6 espécies do gênero *Croton* realizado por Lira-Neto (2011), com as espécies, *C. heliotropiifolius*, *C. blanchetianus*, *C. adenocalyx*, *C. sellowi*, *C. lundianus* e *C. lobatus*, todas apresentaram $2n=20$, com exceção de *C. adenocalyx* e *C. lobatus* que apresentaram $2n=40$. Já a espécie *C. heliotropiifolius* que nesse estudo apresentou uma contagem de $2n=20$, em um estudo realizado por Pôrto (2007), apresentou $2n=40$ cromossomos.

Em um estudo citogenético realizado por Rios e Figueroa (2011) com espécies de *Croton* produtoras de látex (*C. draconoides*, *C. lechleri* e *C. palanostigma*) o número observado foi de $2n=40$ cromossomos para as 3 espécies.

Já em seu trabalho com as espécies *C. adenocalyx*, *C. urticolius*, *C. heliotropiifolius* e *C. lundianus*, Junior e Benko-Iseppon (2011), encontraram os números de $2n=40$ para *C. adenocalyx*, $2n=22$ para *C. urticifolius* e assim como Lira-Neto observou em seu estudo (2011) a espécie *C. heliotropiifolius* apresentou $2n=20$, corroborando com seus resultados. A espécie *C. lundianus* também apresentou $2n=20$ cromossomos.

1.5.3 Estudos filogenéticos do gênero *Croton*

Estudos filogenéticos em espécies de *Croton* também são importantes para o conhecimento da taxonomia do gênero e sua história evolutiva. Nesse sentido, as primeiras pesquisas foram realizadas em 2005 por Berry et al. (2005) em diversas espécies do gênero, em 2006 para a espécie *C. alabamensis* (Benjamin et al., 2006) e em 2011 para *C. pallidulus* (Suzaki, 2011), existindo aproximadamente três estudos dedicados a reconstrução das relações filogenéticas de espécies de *Croton*.

No estudo filogenético molecular realizado por Berry et al., (2005) foram analisadas regiões ITS (*internal transcribed spacer*) trnL –trnF (*conserved region of chloroplast DNA*). Com o resultado destas análises de ITS, foram encontrados indels informativos. Entretanto, quando analisados isoladamente, os dados indel mostraram pouca estrutura filogenética e divergiram fortemente a partir de dados de sequência em vários níveis na filogenia. Os resultados suportaram o monofiletismo desde que o grupo *Moacroton* Croizat esteja incluído, esse grupo corresponde a um pequeno gênero encontrado em Cuba. Entretanto, Berry et al. (2005) apontaram para uma necessidade de que seja reavaliado a classificação infragenérica de *Croton*.

Os estudos realizados com *C. alabamensis* e *C. pallidulus* por Benjamin et al. (2006) foram utilizados marcadores moleculares AFLP (amplified fragment length polymorfism). Para *C. alabamensis* foram analisadas as sequências ITS e trnL-trnF de populações que vivem em locais distintos, sendo que uma é denominada *C. texensis*, que se trata de uma variedade da espécie *C. alabamensis* e através das análises o monofiletismo foi confirmado. Todos os acessos tanto de *C. alabamensis*, quanto do *C. texensis* tiveram suas sequências ITS idênticas. Análise molecular do relógio demonstrou que a divergência entre as variedades de *C. alabamensis* era relativamente recente. As populações também demonstraram variação genética estruturada.

Já no estudo com as variedades da espécie *C. pallidulus*, Suzaki (2011), utilizou táxons próximos, *C. ceanothifolius*, *C. dichrous*, *C. myrianthus* e *C. splendidus*, para reconstruir as relações filogenéticas, também analisando a região nuclear ITS, com marcador molecular AFLP. Foram avaliados aspectos como a estrutura genética das populações e a diversidade genética das espécies. Foi observado que as variações de *C. pallidulus* comportam-se como um grupo parafilético e

constatado que as espécies de *Croton* se agrupam num clado com um forte suporte. Houve também a descoberta de uma possível nova espécie para o gênero, a *C. aff. erythroxyloides*, que apresentou diferenças significativas.

CONCLUSÃO

Diversas espécies do gênero *Croton* apresentam compostos químicos de interesse farmacológico e por essa razão já apresentam na literatura estudos relacionados a características químicas que possuem. Já para aspectos genéticos e moleculares, ainda existem poucos trabalhos, sendo esta uma área que carece de estudos com o objetivo de se conhecer mais características relevantes para o gênero.

Entretanto, grupos de pesquisa já têm demonstrado interesse em se conhecer a respeito da diversidade genética em espécies do gênero, podendo posteriormente ampliar tanto o uso dos marcadores, quanto abranger um maior número de espécies estudadas, fazendo com que aumente informações gerais sobre o gênero *Croton*. Dessa forma o desenvolvimento de estratégias de conservação e melhoramento genético para o gênero se tornará possível.

REFERÊNCIAS

- ABDON, A.P.V.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; MORAIS, S.M.; SANTOS, C.F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** vol. 35 no.10, 2002.
- ABREU, A.S.; BARBOSA, P.S.; MULLER, A.H.;GUILHON, G.M.S.P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var. *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**, vol. 1, n.2, 2001.
- ALBUQUERQUE et al. **Caatinga: Biodiversidade e qualidade de vida**. Ed. Nupeea, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
- ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; CORTEZ, P.H.M.; FRANCO, F.M.V.; et al. **Caatinga**. São Paulo: Harbra, 2007. 64p.
- ALVES, C.M.H. **Óleo essencial de *Croton zehntneri* e seus principais constituintes químicos anetol e estragol inibem parâmetros contráteis do músculo liso traqueal do rato**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará, 2009.
- ANGELO, P.C.S et al. Avaliação inicial do RAPD como forma de acessar a variabilidade genética na espécie rica em linalol *Croton cajuçara* Benth. (sacaca). **Comunicado técnico**, ISSN 1517-3887, Manaus, 2006.
- ARAÚJO, M.A.R. Unidades de conservação no Brasil: da República à Gestão de Classe Mundial. **SEGRAC**, 2007.
- BENJAMIM, W.V.E et al. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. **Molecular Ecology**, p. 2735-2751, 2006.
- 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-trnF DNA sequence data**. Amer. J. Bot. 92:1520-1534, 2005.
- BERED, F.; NETO, J.F.B. Marcadores Moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.27, n.3, p.513-520, 1997.
- BERTAGNA, M. **Variabilidade genética de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) em seis fragmentos de Mata Atlântica do município de Campinas, SP**. Dissertação, 54 p. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

BORÉM, A. & CAIXETA, E.T.C. **Marcadores Moleculares**. Editora Folha de Viçosa. Viçosa, MG. 2, 2009. CAETANO, A.R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71, 2009.

BOOY, G.R.J.; HENDRIKS, J.M.J.; SMULDERS, M.J.; VAN GROENENDAEL, M., VOSMAN, B. Genetic Diversity and the survival of populations. **Plant. Biol.**, v. 2, p. 379-395, 2000.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Atlas da fauna brasileira ameaçada de extinção em unidades de conservação federais**, Brasília, 2011.

CAETANO, A.R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **R. Bras. Zootec.**, v.38, p.64-71, 2009.

CORDEIRO, I.; CARNEIRO-TORRES, D. Euphorbiaceae. In: M. Barbosa et al., (eds) **Checklist das plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas**. MMA, Brasília, p.71-74, 2006.

COSTA, A.C.V. **Perfil químico e atividade antibacteriana *in vitro* e em matriz alimentar do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm**. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos), 104 p. Universidade Federal da Paraíba, 2011.

CUNHA, S.L.S.; 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.

DUTTA, S.; DEY, P.; CHAUDHURI, T.K. Assesment of bioactive phytochemicals presente in the root of *Croton bonplandianum* available in the sub-himalayan region of west Bengal. **Int. J. Pharm. Sci**, v.5, p.540-545, 2013.

DRUMOND, M. A., SANTANA, A. C., ANTONIOLI, A. et al. Recomendações para o uso sustentável da biodiversidade no bioma da Caatinga. In: **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: MMA-UFPE, 2004. p.47-90. 2004.

FAO, F.; ZAN, R.A.; BRONDANI, F.M.M.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lecheleri* (Mull. Arg.), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **Rev. Saúde e Biol.** v.7, n.1, p.91-98, 2012.

FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. **Embrapa**, 2007.

FARIAS, M.S.Q. **Efeitos do óleo essencial do *Croton argyrophiloides* Muell. Arg. e do beta cariofileno sobre a contratilidade de anéis de aorta em ratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) p.127. Universidade Estadual do Ceará, 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores Moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 220p, 1996.

FONTENELLE, R.O.; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R.A.; NASCIMENTO, N.R.; KERNTOPF, M.R.; SIDRIM, J.J.; ROCHA, M.F. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from Brazilian Caatinge biome. **J Appl Microbiol**, v.104, n.5, p.1383-90, 2008.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

GIULIETTI, A. M., BOCAGE NETA, A. L., CASTRO, A. A. J. F. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma da caatinga. In: **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: MMA-UFPE, 2004. p.47-90, 2004.

GUIMARÃES, L.A.C. **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, 2006.

GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.V.; LANZA, M.A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.253, 2009.

GURGEL, L.A.; MARTINS, D.T.O.; MATTOS, P.O.; RAO, V.S. Estudo da atividade do látex do *Croton urucurana* Baill. sobre o trânsito gastrointestinal de camundongos. **Rev. Bras. Farmacogn.** v,12, 2012.

GRIFFITHS, A.J.F et al. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold. Sprin. Harbor. Symp. Quant. Biol.** n.39, p.439-446, 2004.

HAYASHI,K.; HASHIMOTO, N.; DAIGEN, M.; ASHIKAWA, I. Development of PCR based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz locus*. **Theor. Appl. Genet**, v.108, n.7, p.12-20, 2004.

HAYES, A.J, SAGHAY MAROOF M.A. Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. **Theor Appl Genet** n.100, p.1279-1283, 2000.

HIRUMA-LIMA, C.A.; SPADARI-BRATFISCH. R.C.; GRASSI-KASSISSE, D.M. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol**, n.69, p.229-234, 1999.

HOEHNE, F.C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas**. São Paulo. Graficars, 1935.

HORST, H. **Análise química e biológica dos constituintes fenólicos de *Croton celtidifolius* Baill.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

- KAFUKU, G.; MBARAWA, M. Biodiesel production from *Croton megalocarpus* oil and its process optimization. **Fuel**, v.89, p.2556-2560, 2010.
- KLIMBANTON, R. ISSR analysis of *Croton sublyratus* Kurtz in Thailand. **Digital Research Information Center**, 2004.
- JUNIOR, M.A.G.S.; BENKO-ISEPPON, A.M. Estudo citogenético de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) ocorrentes na Caatinga nordestina. **XIX Conic**, Universidade Federal do Pernambuco, 2011.
- LEAL, R.I.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Ed. Universitária da UFPE, p.822, 2003.
- LEITE, M.P.; FASSIN, Jr.J.; BAZILONI, E.M.F.; ALMEIDA, R.N. MATTEI, R.; LEITE, J.R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Rev. Bras. Farmacogn**, n.18, p.661-666, 2008.
- LEWONTIN, M.P.; FASSIN, Jr.J.; BAZILONI, E.M.F.; ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.; LEITE, J.R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. **Rev. Bras. Farmacogn**, n.18, p.661-666, 2008.
- LIMA, L.R.; PIRANI, J.R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll.Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s) **Biota Neotrop**, 177-231, 2008.
- LIMA, M.G.A.; MAIA, I.C.C.; SOUSA, B.D.; MORAIS, S.M.; FREITAS, S.F. Effect of stalk and leaf extracts from euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (diptera, culicidae) larvae. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v. 48, n.4, p.211-14, 2006.
- LIRA-NETO, A.C. **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, 2011.
- LITT, M.; LUTH, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Atlanta, v.44, p.398-401, 1989.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, p.544, 2008.
- LUCENA, M.F.A. **Estudos taxonômicos do gênero *Croton* L. (Crotonoideae-Euphorbiaceae) nas zonas do litoral e da mata do estado do Pernambuco – Brasil**. Dissertação. Universidade Federal Rural do Pernambuco, 2001.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.
- MELO, J.G. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid Northeastern Brazil. **Molecules**, p.8534-8542, 2010.

- MOREIRA, J.N.; LIRA, M.A.; SANTOS, M.V.F.; FERREIRA, M.A. Caracterização da vegetação de Caatinga e da dieta de novilhos no sertão do Pernambuco. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.41, n.11, p.1643-1651, 2006.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York, 1987.
- OLIVEIRA, G.P.; SILVA, S.L.C.; GUALBERTO, S.A.; CRUZ, R.C.D.; CARVALHO, K.S. Atividade larvicida do extrato etanólico da raiz de *Croton linearifolius* sobre *Aedes Aegypti*. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.10, n.18; p.442, 2014.
- PALMEIRA-JUNIOR, R.S.F.; ALVES, F.S.M.; VIEIRA, L.F.A.; CONVERSA, L.M.; LEMOS, R.P.L. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowi* (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmacog.**, vol.16, p.397-402, 2006.
- PASSOS, C.S.; ARBO, M.D.; RATES, S.M.K.; POSER, G.L. Terpenóides com atividade sobre o sistema nervoso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.19, p.140-149, 2009.
- PEREIRA, A.S.; AMARAL, A.C.F.; SILVA, M.A.; NETO, F.R.A. Seasonal variation of the chemical constituents from *Croton* species. **Z. Naturforsch.**, p.357-362, 2001.
- PERRY, B.A. Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. **Amer. J. Bot.**, v.30, p.527-543.
- POLLITO, P.A.Z.; TOMAZELLO, M.; TAKASHIBA, H.E. Contribuição ao conhecimento do status de conservação das espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Brasil. **Natureza e Conservação**, v.2, p.42-55, 2004.
- PÔRTO, N.A. **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, 2007.
- PRADO, D.E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, R.I.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Ed. Universitária da UFPE, p.822, 2003.
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Ed. Dos autores, Londrina, p.328, 2001.
- RANDAU, K.P.; FLORENCIO, D.C.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K e *Croton rhamnifolioides* Pax e Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 14:89-96, 2004.
- RIOS, A.R.; FIGUEROA, M.L.T. Micropropagacion y determinacion cromosómica del género *Croton* productor de látex. **Escuela de Posgrad**. 2010.
- SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J. Bras. Chem. Soc.**, v.18, n.1, 2007.
- SANTINI, L. RGA e sua utilização no mapeamento genético de plantas. **Seminários em Genética e Melhoramento de Plantas**. Esalq, 2009.

SANTOS, P.M.L.; SCHIRISPSEMA, J.; KUSTER, R.M. Flavonóides o-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn**, v.15, n.4, 2005.

SILVA, F.R.; JUNIOR, V.C.; NUNES, D.S. Chemical composition of essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. **ActaScientiarum**,v.34, n.3, p.325-329, 2012.

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

SILVA, J.S. **O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) em Pernambuco, com ênfase nas espécies da microrregião do Vale do Ipanema**. Dissertação. (Mestrado em Botânica) Universidade Federal Rural de Pernambuco. UFRPE. Recife, 2009.

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**, 2014.

SILVESTRINI, M. et al. Development and characterization of microsatellite loci for a Brazilian pioneer tree species, *Croton floribundus* (Euphorbiaceae). **Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética**, 2009.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **J. Ethnopharmacol**, v.3, n.1, p.99-102, 2006.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: **Biologia Molecular e Evolução**. Ed. Holos, São Paulo, 2001.

SUZAKI, V.J. **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, 2011.

SCALDAFERRI, M.M. **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, 2013.

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, p.4761-4766, 2013.

TIEPPO, M. ***Croton cajucara* Benth. (sacaca) uma planta da Amazônia – avaliação de seu potencial antioxidante**. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Medicina) p.65. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

TORRICO, F.; CEPEDA, M.; GUERRERO, G.; MELENDEZ, F.; BLANCO, Z. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Rev.Bras. Farmacogn**, v.17, n.7, 2007.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEECKER, M.; REIJANS, M.; HOMES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Rev**, n.11, p.4407-4414, 1995.

VUNDA, S.L.L. **Estudo químico e biológico de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) nativas do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) p.75. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WEBSTER, G.L. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon**, v.42, p.793-823, 1994.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.L.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Rev**, n.18, p.6531-6535, 1990.

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

ZIROLDO, B.D. **Estrutura genética em populações de *Croton floribundus* spreng. de diferentes fragmentos de mata**. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina, 2007.

ZHAO, J.; FANG, F.; WANG, G.; YANG, L. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton crassifolius* ethanol extract. **J. Ethnopharmacol**, v.13,n.2, 2012.

CAPÍTULO I

Periódico pretendido para submissão: Genetics and Molecular Research

(o artigo será traduzido e posteriormente submetido para revisão do inglês)

Diversidade Genética Molecular Em Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) Espécie Com Potencial Antioxidante E Antibacteriana

T. O. Rocha¹, J. S. Freitas², M. M. Scaldaferrri², E. S. L. Santos² e C. B. M. Cerqueira-Silva²

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 correspondente C.B.M Cerqueira-Silva
E-mail: csilva@uesb.edu.br

Dentre as 1300 espécies que compõem o gênero *Croton* (família Euphorbiaceae), encontra-se a *C. heliotropiifolius*, popularmente chamada de cassutinga. Trata-se de um vegetal arbustivo, com propriedades químicas que tem despertado interesse de pesquisadores, tanto no sentido da conservação, quanto farmacológico. Estudos vêm sendo desenvolvidos para a caracterização da espécie, contudo resultados são ainda recentes e escassos. Com objetivo de caracterizar a diversidade genética de espécimes cassutinga, distribuídos em um fragmento de mata no município de Itapetinga, Bahia, foram coletadas folhas jovens representativas de 42 indivíduos. Após extração de DNA genômico, 18 marcadores RAPD e 15 ISSR foram utilizados para genotipagem em géis de agarose (2%). Métodos estatísticos frequentistas e Bayesianos foram utilizados para estimar a diversidade e a estrutura genética. Foi observado um total de 164 bandas polimórficas, sendo em média 5,5 bandas por iniciador RAPD e 4,3 bandas por iniciador ISSR. O percentual médio de polimorfismo foi de 93%. Estrutura genética foi observada entre os subconjuntos dos espécimes coletados, sendo evidenciado a ocorrência de três prováveis pool gênicos e a diversidade calculada pela distância de Dice (1945) variou entre 0,17 e 0,48. Esse resultado pode estar relacionado tanto com o transporte de sementes realizados por formigas, quanto pela polinização

Palavras-chaves: Variabilidade genética; Caatinga; Marcador molecular; Euphorbiaceae

INTRODUÇÃO

O gênero *Croton* possui aproximadamente 1300 espécies (Zioldo, 2007) e caracterizam-se como espécies comumente subarborescentes e arbustivas, monóicas e raras vezes arbóreas. Possui folhas em sua maioria alternas, mas podem apresentar outros tipos de posição, como opostas e pseudo-verticiladas. As inflorescências na maioria das espécies são terminais, tirsóides e contínuas. O fruto é uma cápsula, geralmente orbicular e as sementes são carunculadas, lisas ou rugosas, apresentando as cores variando entre castanho-alaranjadas, marrons e pretas (Silva et al., 2010).

Muitas das espécies do gênero *Croton* são reconhecidas popularmente e cientificamente pelo seu potencial uso medicinal, antioxidante e antimicrobiano, sendo algumas espécies utilizadas por populações locais/regionais, como fitoterápico (Abreu et al., 2001).

Como exemplo de espécie utilizada para fins medicinais, a espécie conhecida popularmente como cassutinga (*C. heliotropiifolius*) (Figura 1) é utilizada na medicina alternativa para alívio estomacal, mal estar gástrico, vômitos, diarreia com sangue e para amenizar a febre (Randau, 2001). Essa espécie possui diversas características químicas de interesse comercial, destacando-se entre elas a presença de alcaloides, polifenóis e oses redutoras, importantes constituintes para estudos farmacológicos e fitoquímicos (Randau et al., 2004). Espécimes de cassutinga ocorrem em diferentes locais do território da caatinga, sendo encontrado em toda região nordestina, tendo também sua ocorrência registrada em parte do estado de Minas Gerais (Silva et al., 2010).



Figura 1. Imagem ilustrativa de *C. heliotropiifolius* (Fonte:www.flickr.com)

Apesar de haver alguns estudos realizados e, ou, sendo desenvolvidos para o *C. heliotropiifolius*, pouco se sabe acerca de sua diversidade genética (Scaldeferri, 2013). De acordo com Frankham et al. (2008), a diversidade genética consiste tanto no aparecimento de caracteres distintos, como nas diferenças enzimáticas, protéicas e em sequências de DNA na maioria dos indivíduos.

Nesse sentido Futuyma (2002), destaca que é imprescindível a realização de estudos genéticos com organismos diversos, com o objetivo de compreender aspectos como: diversidade genética, adaptações fisiológicas à escassez de água em espécies que ocorrem em regiões desérticas, recursos que os parasitas possuem para suprimir os sistemas imunológicos de seus hospedeiros, entre outros fatores. Portanto, estudos relacionados com a diversidade genética em níveis intra e interespecíficos são importantes para o conhecimento das espécies e conservação da biodiversidade (Santos et al., 2009).

Algumas ferramentas são amplamente utilizadas com o objetivo de acessar a diversidade genética e os marcadores moleculares são exemplos de técnicas/ferramentas que tornam possível avaliar o polimorfismo existente entre indivíduos de uma espécie ou espécies distintas, além de possibilitar a realização de estudos populacionais e de mapeamento (Aguar, 2012).

Estão disponíveis para uso uma grande variedade de marcadores moleculares, dentre os quais é possível destacar pelo baixo custo e pela facilidade de implantação em laboratórios dedicados a caracterização de diversidade genética, os marcadores RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) e ISSR (*inter simple sequence repeat*). Ambos considerados marcadores dominantes. O marcador molecular RAPD vem sendo utilizado em estudos de diversidade genética, bem como, na descoberta de genes e mapeamentos genéticos (Scaldeferri, 2013; Guimarães et al., 2009). O marcador ISSR possui potencial tanto em estudos de diversidade genética, quanto em estudos de identificação de clones e indivíduos aparentados (Scaldeferri, 2013; Salimath et al., 1995). Por sua vez, merece também destaque pelo volume de dados que fornecem os marcadores baseados em sequenciamento, a exemplo de microssatélites e especialmente os SNPs (*single nucleotide polymorphism*).

Na presente pesquisa objetivou-se caracterizar a diversidade genética existente em 42 indivíduos de cassutinga presentes em um fragmento de mata nativa no município de Itapetinga, Bahia, por meio de marcadores moleculares RAPD e ISSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

A coleta foi realizada no município de Itapetinga, Bahia, Brasil. Localizada na região sudoeste do estado, aproximadamente 580 km da capital, Salvador. Em um local popularmente conhecido pelos moradores da região como “Serra da Torre”. A vegetação encontrada no sudoeste da Bahia é relativamente diversa, sendo que na zona de transição de vegetação de caatinga, onde o município de Itapetinga está situado, encontra-se floresta estacional decidual e semi-decidual (RadamBrasil, 1981)

Foram coletadas folhas representativas de 42 genótipos de cassutinga. A coleta foi realizada na Serra da Torre, que possui aproximadamente 2 km de extensão. A área foi dividida em três subgrupos, a saber: a parte mais alta da serra constituiu o primeiro subgrupo e nela foram coletados 12 indivíduos; a região mediana da serra que constitui o segundo subgrupo, e nela foram coletados 16 indivíduos; por fim a base da serra que constituiu o terceiro subgrupo, sendo coletados 14 indivíduos nessa área.

Extração de ácidos nucléicos

A extração do DNA foi realizada mediante uso do protocolo de Doyle e Doyle (1990) seguindo o método CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio) com modificações previamente testadas para *Croton* por Scaldaferrri et al. (2013). As amostras foram expostas à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), por 1 hora e 40 minutos, sob carga elétrica de 100 V. Foram coradas com loading (azul de bromofenol e xileno cianol) e gel red (Invitrogen). A visualização das amostras foi realizada por meio de fotodocumentador Kodak, com incidência de luz ultravioleta. A verificação da qualidade da extração e a quantificação do DNA extraído foram realizadas com base em avaliações comparativas dos padrões de bandas observadas e o marcador de peso molecular Lambda (Invitrogen).

Genotipagem das populações

As amostras de DNA foram utilizadas em reações de amplificação (via PCR) mediante uso de primers RAPD e ISSR. Um screening com 20 primers RAPD e 23 primers ISSR foi

inicialmente realizado para seleção dos primers que demonstraram melhor qualidade nos padrões de bandas e de polimorfismo.

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 15 μ L, contendo 12 ng de DNA molde, tampão de PCR 1 x (20 mM de Tris HCl [pH 8.4] e 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl, 0,2 μ M de cada nucleotídeo, 0,5 μ M de primer e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Para as amplificações com primers RAPD, o programa seguiu as seguintes etapas: 94°C por 5 minutos; 34 ciclos de 94°C por 40 segundos, 34°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Enquanto que para as amplificações com primers ISSR, as etapas foram: 95°C por 5 minutos; 34 ciclos de 94°C por 50 segundos; 48°C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados a partir de corrida eletroforética em gel de agarose a 2% (m/v) e solução de corrida TBE 1x, por aproximadamente duas horas, com voltagem de 120V. A visualização do resultado da corrida eletroforética foi observado com a utilização de fotodocumentador Kodak com incidência de luz ultravioleta.

Avaliação dos dados moleculares

A avaliação dos dados foi a partir da análise das imagens com os padrões de bandas obtidos com o uso de cada primer, sendo gerada matrizes de dados binários (0 e 1), sendo zero atribuído para a ausência de bandas e um para a presença de bandas. Os dados foram submetidos à análise de similaridade pelo coeficiente de Dice (1945) por meio do programa Genes (Cruz, 2006). A análise Bayesiana foi realizada com o objetivo de estimar a quantidade de pools gênicos, utilizando o programa Structure (Pritchard et al., 2000). Como parâmetros gerais foram utilizados 100,000 corridas em uma etapa de burning, seguida por 400,000 corridas para a cadeia de Markov (MCMC). Foram analisados de 1 a 10 pool gênicos (K) e realizadas 10 interações para cada K estimado. Após as corridas realizadas com o programa STRUCTURE, foi utilizado a metodologia proposta por Evanno et al. (2005) para estimar o número de pools gênico mais provável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 18 primers RAPD e 15 primers ISSR, que geraram (100 e 64 amplicons, respectivamente). Com o uso dos primers RAPD foi observado um polimorfismo de aproximadamente 98%, com média de 5,5 bandas por primer. Dos primers RAPD

selecionados o que possibilitou a obtenção de maior e o menor número de bandas foram os OPD-05 com seis bandas e o OPD-13, OPD-16, OPD-19, OPE-04 e OPE-05 com três bandas (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição de primers RAPD utilizados para caracterização dos 42 genótipos de *C. heliotropiifolius*, coletados em áreas nativas circunvizinhas ao município de Itapetinga, Bahia

Primer	Sequência	TA	Nº de bandas	Nº polimórficos	Polimorfismo (%)
OPD-01	ACCGCGAAGG	34° C	4	4	100
OPD-02	GGAACCCAACC	34° C	4	4	100
OPD-03	GTCGCCGTCA	34° C	5	4	80
OPD-05	TGAGCGGACA	34° C	6	6	100
OPD-08	GTGTGCCCCA	34° C	4	4	100
OPD-10	GGTCTACACC	34° C	5	5	100
OPD-13	GGGGTGACGA	34° C	3	3	100
OPD-15	CATCCGTGCT	34° C	4	4	100
OPD-16	AGGGCGTAAG	34° C	3	3	100
OPD-18	GAGAGCCAAC	34° C	4	4	100
OPD-19	CTGGGGACTT	34° C	3	3	100
OPD-20	ACCCGGTCAC	34° C	4	4	100
OPE-01	CCCAAGGTCC	34° C	5	5	100
OPE-02	GGTGCGGGAA	34° C	5	5	100
OPE-03	CCAGATGAC	34° C	4	4	100
OPE-04	GTGACATGCC	34° C	3	3	100
OPE-05	TCAGGGAGGT	34° C	3	2	80
OPE-06	AAGACCCCTC	34° C	4	4	100
Total			73	71	

OPD/OPE: Série D e E de oligonucleotídeos aleatórios comprados de *Operon Technologies Inc.* TA: Temperatura de anelamento.

Por sua vez, foram selecionados 15 primers ISSR, os quais apresentaram uma média de 4,3 bandas por *primer* e um polimorfismo médio de 95%. Os primers que apresentaram maior e menor número de produtos de amplificação foram DiCA 3G com 7 bandas e TriCAC 5CY com 2 bandas (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição de primers ISSR utilizados para caracterização dos 42 genótipos de *C. heliotropiifolius*, coletados em áreas nativas circunvizinhas ao município de Itapetinga, Bahia

Primer	Sequência	TA	Nº de bandas	Número de Polimórficos	Polimorfismo (%)
DiCA 3G	CACACACACACACACAG	48°C	7	7	100
DiCA 3RG	CACACACACACACACARG	48°C	5	4	80
DiGA 3C	GAGAGAGAGAGAGAGAG	48°C	3	3	100
DiGA 3RC	GAGAGAGAGAGAGAGARC	48°C	4	4	100
DiGA 3T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	48°C	4	3	80
TriCAC 3RC	CACCACCACCACCACRC	48°C	3	3	100
TriCAC 5CY	CACCACCACCACCACCY	48°C	2	2	100
TriCAG 3RC	CAGCAGCAGCAGCAGCAGRC	48°C	4	3	80
TriTGT 3YC	TGTTGTTGTTGTTGTYC	48°C	5	5	100
TriAAR 3RC	AACAACAACAACAACRC	48°C	4	4	100
TriAAG 3RC	AAGAAGAAGAAGAAGRC	48°C	5	5	100
TriACG 3RC	ACGACGACGACGACGRC	48°C	4	3	80
TriAGA 3RC	AGAAGAAGAAGAAGARC	48°C	5	5	100
TriCGC 3RC	CGCCGCCGCCGCCGRC	48°C	5	5	100
TriGAC 3RC	GACGACGACGACGACRC	48°C	4	4	100
	Total		64	60	94,6

TA: Temperatura de anelamento. DiCA: Repetições de CA. TriCAC: Repetições de CAC. TriCAG: Repetições de CAG. TriTGT: Repetições de TGT. TriAAG: Repetições de AAG. TriACG: Repetições de ACG. TriAGA: Repetições de AGA. TriCGC: Repetições CGC. TriGAC: Repetições de GAC.

Para os resultados obtidos com os marcadores RAPD, em um estudo realizado para a espécie *Croton cajucara* (sacaca), Angelo et al. (2005) utilizaram 10 marcadores RAPD e destes foram geradas 71 bandas, sendo 66 polimórficas. Em um estudo desenvolvido por Vasconcelos (1995) utilizando 45 marcadores RAPD, obteve um resultado de 276 bandas, sendo que destas, 144 foram polimórficas e 132 monomórficas para a espécie de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), em uma população com 28 cultivares.

Já para os resultados encontrados com os marcadores ISSR, Ansari et al. (2012) utilizando 5 marcadores ISSR, obtiveram um resultado de 100% de polimorfismo, sendo geradas 43 bandas para uma população com 29 indivíduos de *Tectona grandis*. Já em um estudo com a espécie *Pilocarpus pennatifolius*, Bandeira et al. (2010) utilizaram 11 marcadores ISSR que deram origem a 131 produtos de amplificação, com 96,3% de polimorfismo, de cinco populações e um total de 118 indivíduos de jaborandi. Em um estudo realizado por Souza et al. (2008) utilizando também 5 marcadores ISSR em 12 populações de *Zabrotes subfasciatus*, com um total de 269 indivíduos, foram reproduzidos um total de 51 bandas polimórficas.

A estimativa de Delta K indicou a existencia de prováveis três pools gênicos como sendo a estrutura mais adequada para distribuição e agrupamento dos 42 genótipos de cassutinga avaliados (Figura 2).

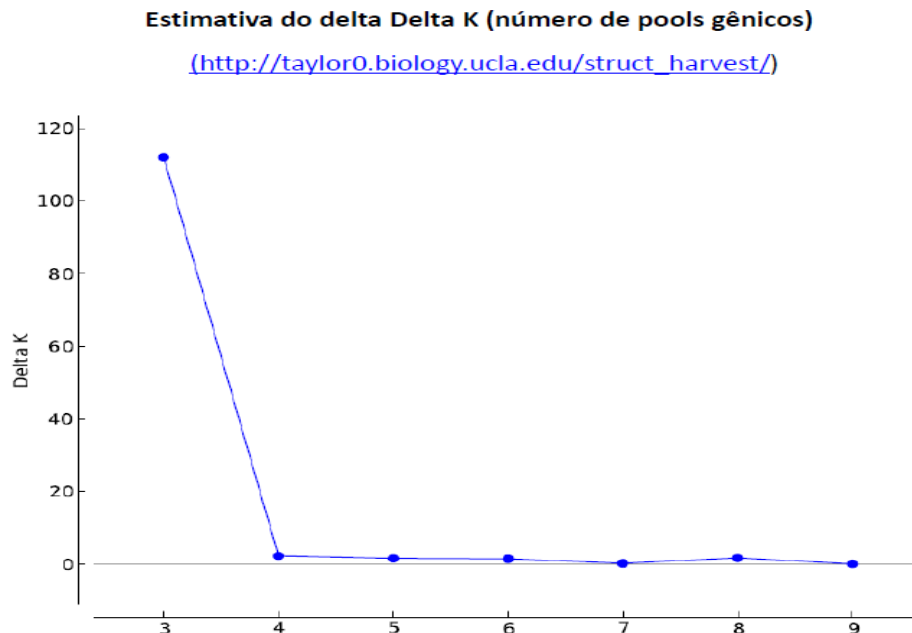


Figura 2. Gráfico apresentando os valores estimados para Delta K (eixo Y) em diferentes pool gênicos (eixo X), em relação as genotipagens realizadas com marcadores RAPD e ISSR para população de cassutinga.

As análises realizadas a partir do programa STRUCTURE e do programa Darwin apresentaram resultados semelhantes que corroboram com a existencia de estruturação genética na distribuição dos indivíduos avaliados ao longo da Serra da Torre (Figura 3). O histograma e dendrograma demonstram a ocorrência de 3 pool gênicos na população de *C. heliotropiifolius*. Sendo que tanto na região do alto da torre, quanto na baixada, os pool gênicos representados pelas cores azul e verde se sobressaem em relação aos demais, respectivamente. Já na região mediana, pode-se observar uma mistura dos 3 pool gênicos. Isso demonstra que existe certa estruturação ocorrendo tanto nos indivíduos do alto da torre, quanto os que estão na região da baixada. E na região mediana/cerca é encontrada a maior diversidade, onde os 3 pool gênicos podem ser encontrados em proporções semelhantes. O box-plot também corrobora com a diversidade genética sendo maior nos indivíduos que estão na região mediana/cerca.

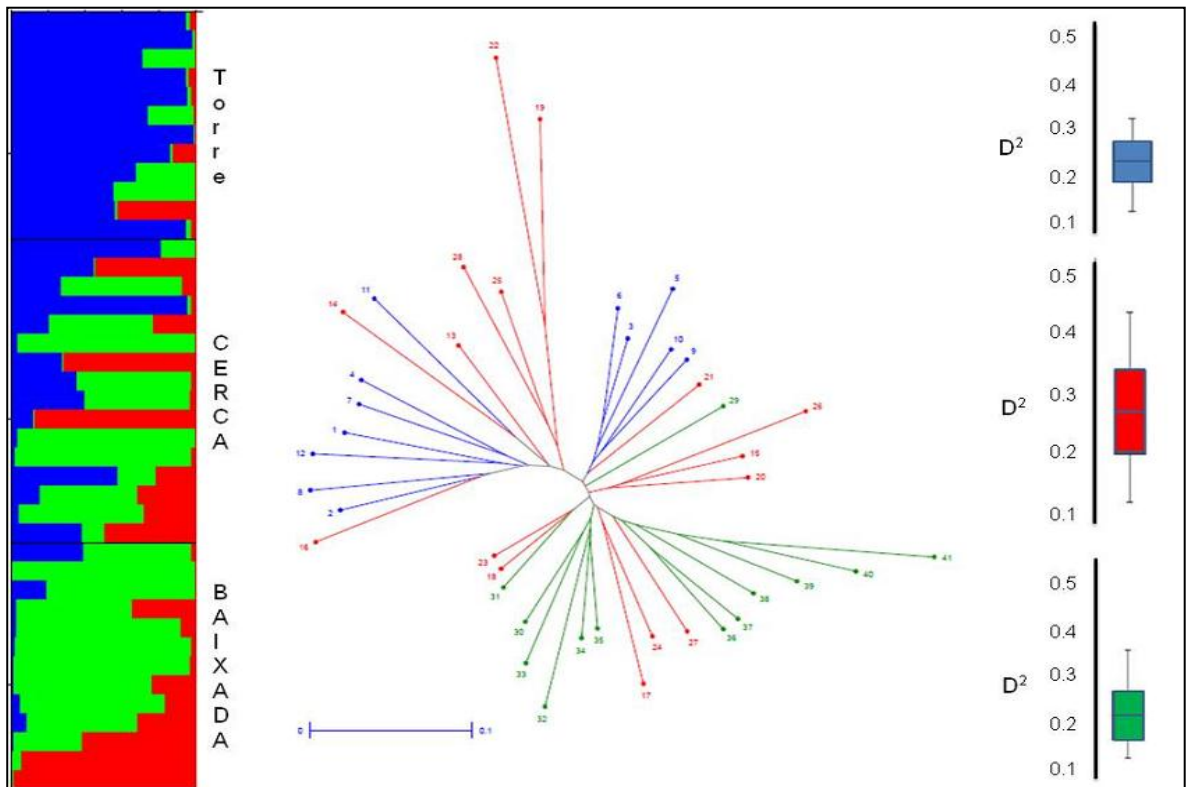


Figura 3. Histograma, dendrograma e box-plot gerados pelos programas Structure e Darwin a partir dos dados de genotipagem realizados mediante uso de marcadores RAPD e ISSR para os 42 genótipos de cassutinga coletados em área nativa circunvizinha ao município de Itapetinga, Bahia.

A partir dessa análise, pode-se inferir que há ocorrência de uma possível barreira impedindo o cruzamento entre os indivíduos do alto da serra com os da região da base, porém, existe fluxo gênico entre os indivíduos dos extremos, com os que se encontram na região mediana, que pode estar ocorrendo através do transporte de pólen e sementes. Nesse sentido, é relevante o estudo do mecanismo de dispersão de sementes e polinização. Neste contexto, um estudo realizado por Leal et al. (2003) foi observado que espécies da família Euphorbiaceae que ocorrem na caatinga, possuem em sua maioria o transporte de sementes realizados por formigas. Nesse estudo, foi constatado que as espécies *C. campestris* A St-Hil, *C. argyophyllus* Kunth. e *C. blanchetianus* Baill. apresentam diásporos que possuem uma estrutura rica em compostos lipídicos que tem como importante função atrair formigas. Ainda nesse sentido, Passos e Ferreira (1996) estudaram a dispersão de sementes em *C. priscus* Croizad e encontraram aproximadamente 11 espécies diferentes de formigas que interagem com as sementes da espécie. Já em um estudo realizado por Pimentel e Castro (2009) em *C. sellowi*, que assim como cassutinga se trata de um arbusto encontrada na caatinga, foi observado um total de 19 espécies de visitantes florais, representada em sua maioria por

insetos, sendo a maior parte das visitas realizadas por abelhas. Assim, Silva et al, (2014) concluíram que dentre as espécies observadas em seu estudo, o *C. heliotropiifolius* é importante na dieta das abelhas, visto que as abelhas visitaram as flores da espécie com muita frequência. Resultados similares foram encontrados num estudo realizado por Dominguez e Bullock (1989), para a espécie *C. suberosus*, onde foi observado que os insetos representavam maior espécies de visitantes florais.

Em se tratando do transporte de sementes, a cassutinga possui uma estrutura em suas sementes, denominada elaiossomo, rica em lipídio que atua como fator de atração para as formigas (Leal et al., 2003). Assim, uma vez que a semente cai da planta, as formigas se alimentam do elaiossomo, deixando a semente exposta, por vezes próxima da planta-mãe, o que pode ocasionar uma estruturação espacial local (Bertagna, 2007). Em um estudo sobre a dispersão de sementes da espécie *Mabea fistulifera*, que assim como cassutinga, atrai formigas por meio do elaiossomo, Peternelliet al. (2004) observaram que algumas formigas transportavam as sementes, sendo que as operárias do gênero *Atta*, carregaram cerca de 4 metros, em média, e as operárias de *Acromyrmex*, cerca de 2 metros. Esse fato explicaria a estruturação nas regiões do topo da serra e base.

CONCLUSÃO

Existe estrutura e diversidade genética na população de cassutinga (*C. heliotropiifolius*) considerada neste estudo, sendo possível identificar pools gênicos distintos para composição genética dos indivíduos avaliados, bem como relação entre diversidade genética e distribuição espacial dos indivíduos nos pontos de coleta. É provável que existam fatores que diminuem o fluxo gênico entre os indivíduos que se encontram no alto da serra da torre com os indivíduos da parte da baixada da torre, sendo uma possível explicação para esse fato relacionada diretamente ao transporte de sementes realizado pelas formigas, bem como a polinização realizada por insetos.

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, aos Laboratórios de Genética Molecular Aplicada, localizado no Centro de Estudos (LGMA / CEDETEC) e de Biologia Molecular no campus de Jequié pela possibilidade de realização dos ensaios laboratoriais.

REFERÊNCIAS

Abreu AS, Barbosa PS, Muller AH, Guilhon GMSP (2001). Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var. *Glaborior* (Euphorbiaceae). *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA* 1:2.

Aguiar MS (2012). Marcadores genéticos como ferramenta no melhoramento de plantas. Ciclo de palestras sobre o uso dos marcadores moleculares na pesquisa agropecuária. Anais. *Embrapa*.

Ansari SA, Narayanan C, Wali SA, Kumar R, Shukla N, Rahangdale SK (2012). ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* L.f) populations. *Ann. For. Res.* 55:11-23.

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.

Bandeira AJ, Deimling LI, Georg-kraemer JE (2010). Variabilidade genética do jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lemaire; Rutaceae) em populações naturais da região noroeste do Rio Grande do Sul. *Revista de Iniciação Científica da ULBRA*.

Bertagna M (2007). Variabilidade genética de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) em seis fragmentos de Mata Atlântica do município de Campinas. Master's thesis, Universidade Estadual de Campinas.

Brasil Ministério Das Minas E Energia/Secretária Geral (1981). Projeto RADAMBRASIL, Salvador: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro: *Ministério de Minas e Energia/Secretária Geral (Levantamento de Recursos Naturais)*

Cruz CD (2006). Programa Genes: Análise multivariada e simulação. *Editores da Universidade Federal de Viçosa*.

Doyle JJ, Doyle JM (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:11-15.

Dominguez CA, Bullock SH (1989). La reproduction de *Croton suberosus* (Euphorbiaceae) en luz y sombra. *Revista de Biología Tropical* 37:1-10.

- Evano G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Futuyma, DJ (2002). Evolução, ciência e sociedade. *Sociedade Brasileira de Genética*.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008). Fundamentos de genética da conservação. *Sociedade Brasileira de Genética*.
- Giulietti AM, Harley RM, Queiroz LP, Barbosa MRV, Bocage Neta AL, Figueiredo MA (2002). Espécies da Caatinga. In: Vegetação e flora da Caatinga. *Associação de Plantas do Nordeste*.
- Guimarães CT, Magalhães JV, Lanza MA, Schuster I (2009). Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. *Informe agropecuário* 30: 253, Belo Horizonte.
- Leal RI, Tabarelli M, Silva JMC (2003). Ecologia e conservação da Caatinga. *Ed. Universitária da UFPE* 822.
- Passos L, Ferreira SO (1996). Ant dispersal of *Croton priscus* (Euphorbiaceae) seeds in a tropical semideciduous forest in southeastern. *Brazil. Biotropica* 28: 697-700.
- Peternelli EFO, Lucia TMCD, Martins SV (2004). Espécies de formigas que interagem com as sementes de *Mabea fistulifera* Mart.(Euphorbiaceae). Sociedade de Investigações Florestais. *Revista Árvore* 28:733-738.
- Pimentel KGM, Castro CC (2009). Biologia reprodutiva de *Croton sellowi* Baill. (Euphorbiaceae) em uma restinga de Pernambuco. *Jepex*.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Randau KP (2001). Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacológico) e atividade biológica de *Croton rhamnifolius* H.B.K e *Croton rhamnifolioides* Pax e Hoffm. (Euphorbiaceae). Master's thesis. Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE.
- Randau KP, Florêncio DC, Ferreira CP, Xavier HS (2004). Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K e *Croton rhamnifolioides* Pax e Hoffm. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14:89-96.
- Salimath SS, Oliveira AC, Godwin IOAC, Bennetzen JL (1995). Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus eleusine with DNA markers. *Genome* 38:757-763.
- Santos FR, Lacerda DR, Redondo RAF, Nascimento AMA, Chartone-Souza E, Borba EL, Ribeiro RA, Lovato MB (2009). Diversidade genética: diagnóstico do conhecimento da diversidade genética. *Biota Minas*. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Silva JS, Sales MF, Gomes APS, Carneiro-Torres DS (2010). Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado do Pernambuco, Brasil. *Acta. Bot. Bras.* 24:2.

Silva GAR, Bastos EM, Sobreira JAR (2014). Levantamento da flora apícola em duas áreas produtoras de mel no estado do Piauí. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer. 10:18-3305.

Souza GA, Carvalho MRO, Martins ER, Guedes RNC, Oliveira LO (2008). Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesq. Agropec. Bras.* 43:843-849.

Scaldeferri MM (2013). Diversidade genética em Velame Pimenta (*Croton linearifolius*) e Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) em ambientes silvestres no Sudoeste da Bahia. Master's thesis. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Vasconcelos MJV (1995). Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD. Master's thesis.

Zioldo BD (2007). Estrutura genética em populações de *Croton floribundus* spreng. de diferentes fragmentos de mata. Master's thesis. Universidade Estadual de Londrina.

CAPÍTULO II

RESULTADOS COMPLEMENTARES

SELEÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD E ISSR PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM VELAME PIMENTA (*Croton linearifolius*)

Resumo

Croton linearifolius é uma espécie arbustiva pertencente ao gênero *Croton* e como diversas espécies desse gênero, possui constituintes químicos de interesse econômico. No presente estudo foram coletados 64 indivíduos de *C. linearifolius* na unidade de conservação Floresta Nacional Contendas do Sincorá, na Bahia. Foi realizada a extração do DNA dos indivíduos e posteriormente a seleção de *primers* RAPD e ISSR para compor o estudo de diversidade. Dos *primers* selecionados, 18 são RAPD e 16 ISSR.

Palavras-chave: *Croton* spp; Caatinga Flona; Euphorbiaceae; Marcadores moleculares; Variabilidade Genética

A espécie *Croton linearifolius*, conhecida popularmente como velame pimenta consiste em um arbusto, podendo medir até dois metros de altura, sendo considerada rica em triterpenos e esteróides, entre outros compostos importantes para a atividade biológica (Feliu, 2012). O *C. linearifolius* apresenta também potencial inseticida (Silva et al., 2010), sendo essa uma das características que tem despertado o interesse de pesquisadores.

Algumas pesquisas já vêm sendo desenvolvidas para a caracterização do *C. linearifolius*. Esses estudos estão relacionados tanto com a anatomia da espécie quanto a aspectos genéticos (Scaldeferri et al., 2013; Brito et al., 2011). É importante que estudos de diversidade genética sejam realizados com o objetivo de criar estratégias de conservação, bem como para futuros projetos de melhoramento genético da espécie.

Técnicas que utilizam marcadores moleculares tornam possível a caracterização da diversidade genética a partir de procedimentos simples e rápidos (Bered et al, 1997). Entre os diversos marcadores moleculares disponíveis, estão os marcadores ISSR (*inter simple sequence repeat*) e RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). Ambos são marcadores que envolvem técnicas de baixo custo e demonstram bons resultados para estudos de caracterização de diversidade genética (Guimarães et al., 2009; Salimath et al., 1995).

Para o presente estudo foram coletadas amostras de *C. linearifolius* na unidade de conservação Floresta Nacional Contendas do Sincorá. A coleta foi realizada em três pontos, onde após visita exploratória com auxílio de ‘mateiros’, foram observados indivíduos da espécie. No primeiro ponto foram coletados 14 indivíduos. No segundo e terceiro ponto, por se tratar de áreas mais extensas que o primeiro ponto, foram divididas em quatro e cinco subgrupos. Nos subgrupos do segundo e em quatro subgrupos do terceiro ponto foram coletados cinco indivíduos por subponto e, por fim, no quinto subgrupo do terceiro ponto foram coletados 10 indivíduos. Totalizando 64 indivíduos coletados da espécie.

Extração de DNA das 64 amostras foi realizada seguindo o método CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio) modificado (Cerqueira-Silva, 2009; Scaldaferrri et al 2013). Em seguida foi realizada a quantificação do DNA extraído e a seleção dos primers. As reações de PCR foram realizadas de maneira similar as descrições apresentada no primeiro capítulo.

Para seleção de primers, foi feito um screening com 20 primers RAPD e 23 primers ISSR. Destes, foram selecionados 17 primers RAPD e 16 primers ISSR.

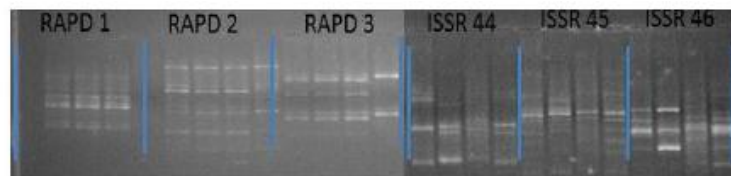


Figura 1. Imagem do screening com três primers RAPD e três primers ISSR selecionados.

REFERÊNCIAS

BERED, F.; NETO, J.F.B. Marcadores Moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.27, n.3, p.513-520, 1997.

BRITO, M.S.; FRIES, D.D.; SILVA, S.L.C.; GUALBERTO, S.A. Anatomia foliar de *Croton linearifolius* Mull. Arg. Centro Científico Conhecer. **Enciclopédia Biosfera**, vol.7, n.13, 2011.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. **Avaliações Biométricas, Genéticas e Moleculares Visando Conservação e Melhoramento de Passiflora spp.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) p. 158. Universidade Estadual de Santa Cruz, 2009.

FELIU, D.A. **Análise de terpenóides de espécies de Croton sect. Lamprocroton (Mull.Arg.) Pax (Euphorbiaceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências na area de Botânica) p. 117. Universidade de São Paulo, 2012.

GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.V.; LANZA, M.A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.253, 2009.

SALIMATH, S.S.; OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.O.A.C. & BENNETZEN, J.L. **Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus eleusine with DNA markers.** Genome, Canada, v.38, p.757-763, 1995.

SILVA, S.L.C.; CARVALHO, M.G.; GUALBERTO, S.A.; CARNEIRO-TORRES, D.S.; VASCONCELOS, K.C.F.; OLIVEIRA, N.F. Bioatividade do extrato etanólico do caule de

Croton linearifolius Mull.Arg. (Euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.4, p.252-258, 2010.

SCALDAFERRI, M.M. **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, 2013.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O gênero *Croton* é considerado taxonomicamente complexo e principalmente por conta do seu tamanho, ainda poucas espécies foram estudadas nas últimas décadas. Entretanto, pode-se perceber que por meio dos estudos já realizados, é notório que o gênero abriga espécies com potencial principalmente fitoterápico, pois apresentam diversos metabólitos secundários de interesse farmacológico, que atuam em variadas patologias humanas, incluindo o câncer. Além disso, estudos de cunho genéticos são recentes e ainda não abrangem muitas espécies para o gênero. Porém, já é percebido o interesse de grupos de pesquisa com o objetivo de levantar informações de diversidade genética, filogenético e citogenéticos para o grupo.

Para as espécies alvo da pesquisa, o desenvolvimento da pesquisa gerou resultados significativos para a espécie *C. heliotropiifolius*, através da utilização dos marcadores RAPD e ISSR. O uso dos marcadores permitiu serem alcançados os objetivos propostos no estudo, tornando possível a estimativa de diversidade genética na população analisada.

Já para a segunda espécie, *C. linearifolius*, foi realizada a seleção dos primers que serão utilizados posteriormente em pesquisas realizadas pelo grupo, para acessar a diversidade genética da população disponível, gerando mais informações que se somarão com outros estudos realizados pelo grupo de pesquisa BioGen.

ANEXO

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.

References, under the heading “References”, should include only works referred to in the text. This section should be arranged in alphabetical order under the first author’s last name. References should be cited as follows: journal papers - names and initials of the first four authors (after that using et al.), year, journal title abbreviated according to PubMed or Web of Science, volume number, first and last page numbers; books - names of authors, year, full title, edition, publishers, address (city); articles published in symposia - names of authors, year, full title of book, name(s) of editor(s) in parentheses, publisher, address (city), first and last page numbers. The references should consist mainly of articles from indexed journals. References for techniques that are essential for understanding or repeating the methods should always be in easily accessible (indexed) journals.

