



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**CENTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO SOCIO-AMBIENTAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

DIVERSIDADE GENÉTICA EM VELAME PIMENTA (*Croton linearifolius*) E CASSUTINGA (*Croton heliotropiifolius*) EM AMBIENTES SILVESTRES NO SUDOESTE DA BAHIA.

MURILO MARQUES SCALDAFERRI

ITAPETINGA – BA

2013

DIVERSIDADE GENÉTICA EM VELAME PIMENTA (*Croton linearifolius*) E CASSUTINGA (*Croton heliotropiifolius*) EM AMBIENTES SILVESTRES NO SUDOESTE DA BAHIA.

MURILO MARQUES SCALDAFERRI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB / Campus Itapetinga, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> DSc Janaína Silva Freitas - UESB

Co-Orientador: Prof. DSc Ronam Xavier– UESC

ITAPETINGA – BA

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**CENTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO SOCIO-**  
**AMBIENTAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** DIVERSIDADE GENÉTICA EM VELAME PIMENTA (*Croton linearifolius*) E CASSUTINGA (*Croton heliotropiifolius*) EM AMBIENTES SILVESTRES NO SUDOESTE DA BAHIA.

**AUTOR:** Murilo Marques Scaldaferrri

**ORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaína Silva Freitas

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. Ronam Xavier

**APROVADA em** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaína Silva Freitas**  
**UESB - Orientadora**

**ITAPETINGA - BA**

**2013**

## DEDICATÓRIA

À minha família e amigos que sempre estão dispostos a ajudar-me a alcançar meus objetivos, dedico.

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, por sempre colocar em meu caminho pessoas que são fundamentais para as minhas conquistas.

À minha esposa Kelly, pelo apoio e por entender a minha ausência em vários momentos.

Ao meu pequeno Theo, simplesmente por sorrir pra mim e me encher de força todos os dias.

À Dr<sup>a</sup> Janaína Freitas, por acreditar em nosso trabalho e pela sua importante orientação.

Aos professores Carlos Bernard e Elisa Lisboa, pelos ensinamentos e presença constante em todas as etapas deste trabalho.

Aos amigos e pesquisadores Alisson Maia, Zanom Santana e João Guilherme Portugal pelo auxílio nas coletas e atividades laboratoriais.

À Ciro Bezerra, pelo auxílio na elaboração das figuras e tabelas.

À minha mãe Isabel, meu pai Flávio e meus irmãos Danilo e Isabela, pelos exemplos que busco sempre seguir.

“Só posso levantar as mãos pro céu, agradecer e ser fiel ao destino que DEUS me deu”.

Sergio Meriti

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Apresentação e descrição das espécies de <i>Croton</i> com características medicinais comprovadas ou potencial uso indicado por estudos científicos	21
<b>Tabela 02.</b> Apresentação e descrição geral das principais características de alguns marcadores moleculares amplamente utilizados em estudos genéticos, bem como exemplos de uso em <i>Croton SSP</i>	33
<b>Table 01.</b> Description of the buffer solution used in the protocol available for DNA extraction from <i>Croton linearifolius</i> .	60
<b>Table 02.</b> Description of the results observed from the spectrophotometric reading (NanoDrop Technologies) performed with 1uL of genomic DNA samples of ‘velame pimenta’ ( <i>Croton linearifolius</i> ) obtained with the use of different protocols.	61
<b>Table 01.</b> Similarity (and dissimilarity) coefficients used among 40 wild genotypes de <i>Croton linearifolius</i> genotyped with ISSR and RAPD markers.	70
<b>Table 02.</b> Spearman correlation coefficients between 10 coefficients related DNA amplifications with 15 ISSR and 12 RAPD primers, detected in 40 wild genotypes of <i>Croton linearifolius</i> .	71
<b>Table 03.</b> Efficacy of the projection of similarity (and dissimilarity) coefficients in two-dimensional space, in wild genotypes of <i>Croton linearifolius</i> , based on distortion percentage (D), correlation between the original and the projected ( $r_c$ ) distance (D) and stress (S) values.	72

- Table 04.** Efficacy of five grouping methods (closest neighbor - CN; farthest neighbor - FN, Ward method - W, weighted pair-group method using arithmetic averages - WPGMA, average linkage in groups - ALG, unweighted pair-group method using arithmetic averages - UPGMA, Gower method - WPGMC e Centroid method - UPGMC) from different similarity (and dissimilarity) coefficients in wild genotypes of *Croton linearifolius*, based on criteria of distortion percentage (D), cophenetic correlation ( $r_c$ ) and stress percentage values (S). 73
- Tabela 01.** Descrição dos primers RAPD utilizados para caracterização dos 52 genótipos de velame pimenta (*Croton linearifolius*) e 42 de Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*), coletados áreas nativas circunvizinhas aos municípios de Contendas do Sincora e Itapetinga, Bahia, respectivamente. 79
- Tabela 02.** Descrição dos primers ISSR utilizados para caracterização dos 52 genótipos de velame pimenta (*Croton linearifolius*) e 42 de Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*), coletados áreas nativas circunvizinhas aos municípios de Contendas do Sincora e Itapetinga, Bahia, respectivamente. 80

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição espacial de *Croton* ssp. no continente americano e nos estados brasileiros. 20
- Figura 2.** *Croton heliotropiifolius* encontrado na Serra da Torre, município de Itapetinga, Bahia. Fonte: www.flickr.com 24
- Figura 3.** Estacas de *Croton linearifolius* em casa de vegetação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, oriundas de expedição de coleta realizadas em Contendas do Sincorá, BA. Fonte: Acervo Pessoal 25
- Figure 01.** Gel agarose (1%) for the quantification of ‘velame pimenta’ (*Croton linearifolius*) DNA extracted with protocols previously described in literature (left); Agarose gel (3%) showing amplification result of fragments obtained with primer ISSR. Gel presenting Standard molecular weight (400 and 200 ng / uL), followed by DNA samples obtained from six different extraction protocols [left figure]; Gel Ladder presented, followed by amplification results of RAPD primers, used as template DNA obtained from five different extraction protocols [right figure]. 62
- Figura 1.** Gráficos 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 *Croton linearifolius* (esquerda) e *C. heliotropiifolius* (direita), coletados áreas nativas circunvizinhas aos municípios de Contendas do Sincora e Itapetinga, Bahia, respectivamente. 81
- Figura 2.** Histograma gerado pelo programa structure a partir dos dados de genotipagem realizados mediante uso de marcadores RAPD e ISSR para 52 genotipos de *Croton linearifolius* coletados em área nativa circunvizinha ao município de Contendas do Sincora, Bahia. 83

- 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 *Croton heliotropiifolius* coletados em área nativa circunvizinha ao município de Itapetinga, Bahia. 83
- Figura 4.** Projeção dos agrupamentos realizados pelo método Neiber Joiner a partir de dados moleculares (RAPD e ISSR) obtidos dos 47 genótipos de *Croton linearifolius* (esquerda) e 42 genótipos de *C. heliotropiifolius* (direita), coletados áreas nativas circunvizinhas aos municípios de Contendas do Sincora e Itapetinga, Bahia, respectivamente. 85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DNA – Deoxyribonucleic Acid  
RNA – Ribonucleic Acid  
AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome  
ITS - Internal Transcribed  
RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism  
SSR - Simple Sequence Repeats  
STR - Short Tandem Repeats  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA  
ISSR - Inter Simple Sequence Repeats  
AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism  
SNP - Single Nucleotide Polymorphism  
LGMA - Laboratório de Genética Molecular Aplicada  
UESB - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
CTAB - Cetyl trimethylammonium bromide  
SDS - Sodium dodecyl sulfate  
NaCl – Cloreto de Sódio  
TE – TRIS/EDTA  
TRIS – Hidroximetil  
EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid  
UV – Ultravioleta  
RGA – Analogs Genes for Resistance  
TBE - Tris/Borato/EDTA  
CBMEG - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética  
UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas  
CN - Closest Neighbor  
FN - Farthest Neighbor  
W - Ward Method  
WPGMA - Weighted Pair-Group Method using arithmetic Averages  
ALG - Average Linkage in Groups  
UPGMA - Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages

WPGMC - Gower method

UPGMC - Centroid method

D - Distortion Percentage

$r_c$  - Cophenetic Correlation

S - Stress Percentage

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 1 – Marcadores Moleculares na avaliação da diversidade genética e conservação de <i>Croton</i> spp. encontrados na Caatinga	16
CAPÍTULO II - Comparison of protocols for genomic DNA extraction from ‘velame pimenta’ ( <i>Croton linearifolius</i> ), a species native to the Caatinga, Brazil	41
CAPÍTULO III - Comparison of Methodologies for Estimates of Molecular Genetic Diversity in Genus <i>Croton</i> : Influence of Coefficients, Clustering Strategies and Data Projection.	63
CAPÍTULO IV - Estimativa de diversidade genética entre genótipos silvestres de <i>Croton</i> spp. mediante uso de marcadores moleculares	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
REFERENCIAS	89

## 1. INTRODUÇÃO

A Caatinga ocupa cerca de 12% do território nacional. Abrange os estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e norte de Minas Gerais. Com sua ampla extensão, é um bioma que oferece muitos recursos naturais e desta forma requer estudos que visem a caracterização, prospecção e proteção de suas espécies (ALMEIDA-CORTEZ et al., 2007).

O bioma Caatinga é vítima de um extenso processo de deterioração provocado pelo uso insustentável de seus recursos. Como consequência da exploração adotada através dos tempos, essa região se tornou uma das áreas mais vulneráveis do Brasil à incidência da degradação ambiental. A cobertura vegetal está reduzida a menos de 50% da área dos estados que este bioma abrange e a taxa anual de desmatamento é de aproximadamente meio milhão de hectares (VELOSO et al., 2002). Essas modificações no ambiente natural tornam importantes estudos no âmbito morfológico, fisiológico e molecular, de plantas nativas desse bioma, assim como a conservação de sua biodiversidade (LEAL et al., 2003).

Dentre as espécies da Caatinga, várias são utilizadas pela população para fins fitoterápicos. Neste sentido, as espécies do gênero *Croton* são frequentemente empregadas na medicina popular como depurativos energéticos e detêm expressiva relevância econômica, alicerçada em seu conteúdo de óleos essenciais e outras substâncias ativas como terpenóides, flavonóides e alcalóides (BRAGA, 1960; ABREU et al., 2011; COSTA & FORNI-MARTINS). O *Croton linearifolius* e o *Croton heliotropiifolius* são exemplos de espécies que, de acordo com estudos preliminares, apresentam características que lhe conferem um biopotencial (CUNHA e SILVA et al., 2010; Souza et al., 2010).

Do ponto de vista ecológico, gênero *Croton*, bastante comum na Caatinga, é um grupo funcionalmente importante dentro do ecossistema terrestre já que várias de suas espécies são pioneiras, colonizando locais perturbados, tais como beira de estradas, margem de rios e clareiras de matas. (LIMA & PIRANI, 2008). Desta forma, a ampla diversidade de espécies e o grande potencial a ser explorado econômica e cientificamente, denota que o bioma Caatinga deve ser estudado para que possamos usufruir dos seus recursos de forma sustentável.

Entender como a diversidade genética está distribuída nas populações vem se tornando um ponto chave na elaboração de estratégias de manejo e restauração (LOWE et al., 2004). O conhecimento da estruturação genética de uma população permite realizar inferências a respeito de sua diversidade genética e da seleção natural que levam a diferenciação entre as espécies. Essas informações podem auxiliar a montagem de um perfil genético e tem um papel fundamental na confecção de um plano de manejo mais eficiente.

Nos últimos anos, com os avanços da genética e da biologia molecular, principalmente com advento do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase e do sequenciamento automático do DNA foram desenvolvidas poderosas técnicas para o desenvolvimento de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos. Muitos artigos científicos fazem referência a tais técnicas no estudo de várias espécies e com as mais diversas aplicações, evidenciando assim o impacto dessa tecnologia nos programas de conservação e uso de recursos genéticos (AYADA et. al., 1997; BORÉM & CAIXETA, 2009; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Contudo, inexistem estudos moleculares relacionados à boa parte das espécies de *Croton*, a exemplo do que ocorre para *C. linearifolius* e *C. heliotropiifolius*.

Desta forma, trabalhos que busquem analisar diferentes métodos para análises genéticas dessas espécies, com o intuito estabelecer àqueles que apresentem os melhores resultados, são relevantes para o levantamento de novas informações que auxiliem em estratégias de conservação e manejo.

Considerando a importância ecológica e o potencial uso das espécies do gênero *Croton* enquanto recurso natural, bem como a escassez de informações genético moleculares para o gênero objetivou-se na presente pesquisa: a) estabelecer protocolo padrão para extração de DNA a ser utilizado em reações de amplificação com marcadores moleculares; b) avaliar a eficiência e a influência de estratégias estatísticas multivariadas (coeficientes, agrupamentos e projeções) para estimativas genéticas; c) caracterizar a diversidade genética de genótipos silvestres de *C. linearifolius* e *C. heliotropiifolius*.

**Artigo de revisão formatado para submissão**

**Periódico: Enciclopédia Biosfera**

## **2. CAPÍTULO I**

### **MARCADORES MOLECULARES NA AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E CONSERVAÇÃO DE *Croton* spp ENCONTRADOS NA CAATINGA**

Murilo Marques Scaldaferr<sup>1, 2</sup>, Janaína Silva Freitas<sup>1</sup>, Elisa Susilene Lisboa dos Santos<sup>1, 2</sup>, Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Molecular Aplicada, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - Ba, 45700-000, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Geral e Botânica, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - Ba, 45700-000, Brasil.

\* [csilva@uesb.edu.br](mailto:csilva@uesb.edu.br)

#### **RESUMO**

A caatinga é um bioma que ocupa grande parte do território brasileiro e oferece muitos recursos naturais. A exploração descontrolada desses recursos provoca uma extensa deterioração de sua área e coloca em risco de extinção suas espécies. Dentre as diversas espécies da Caatinga, várias plantas são utilizadas pela população para fins fitoterápicos. As espécies do gênero *Croton*, como o *C. linearifolius* e o *C. heliotropiifolius*, são frequentemente empregadas na medicina popular como depurativos energéticos ou pelos seus biopotenciais e detém expressiva relevância econômica. Conhecer geneticamente espécies que apresentam interesse comercial pode ser de fundamental importância para elaboração de estratégias de manejo sustentável. Muitos trabalhos científicos fazem referência aos marcadores moleculares no estudo de várias espécies e com as mais diversas aplicações, evidenciando assim o impacto dessa tecnologia nos programas de conservação e uso de recursos genéticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *C. linearifolius*, *C. heliotropiifolius*, biopotencial, conservação.

## **1 A CAATINGA**

### **1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS**

Geograficamente a Caatinga estende-se de 2°54' a 17°21' S, concentrando-se na região nordeste do Brasil. É comum encontrarmos na literatura variações numéricas com relação aos limites desse bioma. A área ocupada citada varia de 735.000 km<sup>2</sup> (LEAL et al., 2005) a 1.037.518 km<sup>2</sup> (IBGE, 2004), enquanto que a área indicada no site do Ministério do Meio Ambiente corresponde a 800.000 km<sup>2</sup> (SILVA et al., 2003).

Ao se acreditar que a caatinga seria o resultado da degradação de formações vegetais mais exuberantes, como a Mata Atlântica ou a Floresta Amazônica, construiu-se uma falsa ideia de que o bioma seria homogêneo, com biota pobre em espécies, estando pouco alterada ou ameaçada. Entretanto, estudos apontam a caatinga como rica em biodiversidade, endemismos, isto é, espécies que só ocorrem naquela região, bastante heterogênea e considerada um bioma extremamente frágil (ALVES, 2007).

Considerando os estudos de TABARELLI & SILVA (2002), a respeito da sua biodiversidade, a Caatinga abriga pelo menos 932 espécies de vegetais superiores, 185 espécies de peixes, 156 espécies de répteis e anfíbios, 358 espécies de aves e 148 espécies de mamíferos. De acordo com os resultados do seminário de Planejamento Ecorregional da Caatinga (VELLOSO et al., 2002), o bioma apresenta uma surpreendente diversidade também de ambientes, proporcionados por um mosaico de vegetação, em geral caducifólia, xerófila e, por vezes, espinhosa, variando com os tipos de solos e a disponibilidade de água, o que confirma o seu caráter heterogêneo. Segundo LEAL et al. (2005), o endemismo varia de 7% a 57%. A fragilidade desse bioma pode ser observada em dados como o do Sistema Estadual de Informações Ambientais que informa que nos últimos quinze anos aproximadamente 40.000 Km<sup>2</sup> se transformaram em deserto devido à interferência do homem na região (SISTEMA, 2007).

Geologicamente, a região da Caatinga é composta de vários tipos diferentes de rochas (ALVES et al., 2009). As precipitações atmosféricas reduzidas e irregulares associados às temperaturas elevadas favorecem o surgimento de um relevo de formas incomuns. (AB" SABER, 2003). De forma geral, o solo é raso, rico em minerais, mas pobre em matéria orgânica, já que a decomposição desta matéria é prejudicada pelo calor e a luminosidade que são intensos durante quase todo ano na caatinga. A salinização do solo ocorre devido à pequena profundidade do mesmo e a evaporação da água que ocorre rapidamente devido ao calor. Fragmentos de rochas são frequentes na superfície, o que dá ao solo um aspecto pedregoso. A presença de minerais no solo da caatinga é garantia de fertilidade em um ambiente que sofre com a falta de chuvas. (ALVES et al., 2009). No meio da aridez, a Caatinga surpreende com suas "ilhas de umidade", que apresentam solos férteis, formando brejos, que quebram a monotonia das condições físicas e geológicas dos sertões. Essas importantes áreas, normalmente localizam-se próximas às serras, onde a abundância de chuvas é maior durante alguns meses do ano (SOARES & ALMEIDA, 2011).

Com altas temperaturas (24 a 29 °C) e chuva escassa (240 a 1500 mm), a Caatinga apresenta um ambiente em déficit hídrico durante quase todo o ano (DRUMOND, 2000). Na caatinga é possível identificar dois períodos anuais, um com longo déficit hídrico seguido de chuvas intermitentes e outro com seca curta seguida de chuvas torrenciais mal distribuídas (SOARES & ALMEIDA, 2011).

As médias mensais de temperatura variam pouco e são mais afetadas pela altitude, que varia de 0 a 600 m, do que pelas mudanças na insolação. Já as variações diárias de temperatura e umidade são comuns, tanto nas áreas de planície como nas regiões mais altas do planalto (ALVES et al., 2009). Sendo assim, na caatinga é comum a ocorrência de noites frias e dias quentes, o que pode influenciar diretamente o tipo de espécies vegetais que se instalam nessas regiões.

## 1.2 VEGETAÇÃO

A vegetação típica do bioma caatinga é bem semelhante à vegetação encontrada no sertão nordestino. Estacional-decidual, com estrato arbóreo e gramíneo-lenhoso em alguns períodos e com incidência de plantas suculentas onde podemos destacar as cactáceas (SOARES & ALMEIDA, 2011). É possível a identificação de três estratos: arbóreo (8 a 12 metros), arbustivo (2 a 5 metros) e o herbáceo (abaixo de 2 metros) (ALVES, 2007). Por serem capazes de desenvolver mecanismos de sobrevivência em ambientes com poucas chuvas e baixa umidade, espécies de plantas xerófilas acabaram se constituindo no bioma. Para entender melhor as estratégias de adaptação desses vegetais, estudos moleculares podem ser de grande importância, contribuindo para identificação de rotas metabólicas e de genes associados à resistência destas plantas às adversidades do ambiente.

Uma forma de adaptação à ambientes secos e que é facilmente observado em plantas da caatinga é a presença de espinhos em muitas espécies, sendo estes, folhas que se modificaram ao longo da evolução fazendo com que a perda de água pela transpiração seja menor.

Em trabalhos qualitativos e quantitativos sobre a flora e vegetação da caatinga realizados por ALVES et al. (2009), foram registradas cerca de 932 espécies, sendo 380 endêmicas. As famílias mais frequentes são Caesalpinaceae, Mimosaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Cactaceae, dentre estas os gêneros *Senna*, *Mimosa* e *Pithecellobium* se destacam por serem encontrados com maior frequência. As juremas (*Mimosa* spp.) também foram citadas por DRUMOND (2000), que na época destacou ainda a abundância da catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.) e dos marmeleiros (*Croton* spp.) em seus estudos.

## 2. O GÊNERO CROTON

O gênero *Croton* L. é o segundo maior e mais diverso da família Euphorbiaceae, possuindo cerca de 1.200 espécies, agrupadas em 40 seções, com distribuição pantropical, das quais a maioria ocorre nas Américas. O Brasil é um país que congrega um grande número de espécies, aproximadamente 350 (LIMA & PIRANI, 2008). Muitas espécies do gênero são bastante utilizadas por seu potencial fitoterápico e/ou biológico. Algumas dessas características já foram comprovadas cientificamente e outras são conhecidas através de pesquisas

etnobotânicas. Aprofundar no conhecimento de espécies ainda pouco conhecidas é fundamental para a comprovação dos seus biopotenciais e manejo consciente.

## 2.1 TAXONOMIA

O gênero *Croton*, de acordo com Pax e Hoffman, pertence à subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae e é um dos gêneros mais numerosos de Euphorbiaceae (HOEHNE, 1935). Cerca de 1200 espécies compõem o gênero *Croton* das quais mais de 350 estão no Brasil (BERRY *et al.*, 2005).

Esse gênero é de difícil classificação taxonômica devido ao seu elevado número de espécies, problemas de delimitação específica, nomenclatura e polimorfia de seus representantes (WEBSTER, 1993). Diversos novos táxons de *Croton* têm sido propostos para o Brasil desde a revisão de MULLER (1873), geralmente em trabalhos esparsos, o que tem tornado ainda mais confusa a taxonomia do gênero, dificultando especialmente a identificação.

CRAVEIRO & SILVEIRA (1982), afirmam que existe espécies do gênero *Croton* como árvores, arbustos, subarbustos, ervas e ainda, não muito comum, lianas, podendo ser monóicas ou dióicas, com tricomas de formas variadas (estrelados, escamiformes, etc.). Identifica-se um revestimento piloso nas folhas, inteiras ou raramente trilobadas com estípulas, principalmente nos ramos jovens e novos. Algumas apresentam pelos estrelados enquanto que outras possuem pelos lepdotos ou escamosos. As flores masculinas e femininas são pequenas, com o branco como cor predominante e organizadas em racemos algumas vezes especiformes. As masculinas são mais numerosas e ficam na parte apical enquanto as femininas na parte basal. Suas 5 pétalas são livres enquanto que o número de estames varia de acordo com a espécie, nunca sendo inferior a 5. Já o fruto é uma cápsula triococa, de 2 a 6 mm de diâmetro e as sementes são geralmente escuras e oleaginosas. Para maiores detalhes sobre a taxonomia das espécies do gênero *Croton* ver SILVA *et al.* (2009) e CRAVEIRO & SILVEIRA (1982).

## 2.2 DISTRIBUIÇÃO

Estima-se que na Caatinga ocorram cerca de 70 espécies de *Croton* (SILVA, 2009). Muitas crescem predominantemente, em locais perturbados tais como beira de estradas, margem de rios e clareiras de matas. Essas e outras características ecológicas, como a produção massiva de flores e frutos durante a maior parte do ano, fazem dos membros do gênero peças importantes para a restauração de florestas degradadas e ocupação nos mais diferentes ecossistemas.

Estudos mostram a existência de *Croton* por países da América (Figura 1), destacando-se: (i) a ocorrência de 61 espécies na América do Norte, sendo 14 nos Estados Unidos e 47 no México (WEBSTER, 2001); (ii) a ocorrência de 88 espécies na América Central, sendo 21 destas relatadas no Panamá (WEBSTER & HULF, 1988), 8 na Guatemala (CROIZAT, 1945) e 59 em Cuba (BORHIDI & MUÑIZ, 1977) e por fim; (iii) a ocorrência de 33 espécies na América do Sul, estando 10 situadas no Brasil, uma na Argentina, seis na Bolívia, uma na Guiana, oito no Paraguai e sete no Peru (CROIZAT, 1940).

No Brasil já foram encontradas as mais variadas espécies espalhadas por todos os estados. Trata-se de um grupo neotropical com a maioria das espécies ocorrendo nas regiões Sudeste e Sul.



Figura 1: Distribuição espacial de *Croton* spp. no continente americano (verde) e nos estados brasileiros (amarelo).

Após mais de cinco décadas dos estudos de CROIZAT (1940), onde descreveu a existência de dez espécies no Brasil, CORDEIRO (1995), reconheceu este mesmo número de espécies apenas na Flora do Pico das Almas, estado da Bahia. Posteriormente, CARNEIRO et al. (2002), tratando as Euphorbiaceae dos inselbergs da região de Milagres, também na Bahia, registraram a ocorrência de sete espécies de *Croton*. Já LIMA & PIRANI (2008), relataram a existência de aproximadamente 350 espécies no Brasil.

### 2.3 PROPRIEDADES QUÍMICAS

As espécies de *Croton* têm sido largamente estudadas com relação aos seus constituintes voláteis e não-voláteis. Muitas espécies são produtoras de um grande número de substâncias pertencente às classes dos alcalóides, fenilpropanóides e terpenóides, tendo as suas propriedades químicas e farmacológicas conhecidas e representadas tanto com potencial medicinal como tóxicas (HOEHNE, 1935; RANDAU et al., 2004). Uma síntese em relação às espécies de *Croton* com suas propriedades fitoterápicas reconhecidas é apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Apresentação e descrição das espécies de *Croton* com características medicinais comprovadas ou potencial uso indicados por estudos científicos.

Espécies de <i>Croton</i>	Partes utilizadas	Principais Compostos Químicos	Uso Medicinal
<i>C. cajucara</i>	Folhas e casca do caule	Diterpenos (copaeno, cipereno)	Diabetes, Colesterol alto, Perturbações Hepáticas
<i>C. celtidifolius</i>	Folhas e casca do caule	Fenóis	Doenças Inflamatórias, Leucemia, Úlcera
<i>C. eluteria</i>	Casca do caule	Diterpenos (cascarilina, furoclerodanos)	Bronquite, Diarreia
<i>C. lechleri</i>	Látex	Alcalóides (taspina)	Cicatrização, Diarréia
<i>C. humilis</i> <i>C. malambo</i>	Casca e folhas Casca do caule	Fenóis Metileugenol, Fenilpropanois	Distúrbios Urinários Reumatismo, Úlcera Gástrica, Anti-inflamatório
<i>C. nepataefolius</i>	Folhas e casca do caule	Diterpeno (casbano)	Tratamentos Intestinais
<i>C. palanostigma</i>	Látex	Linalol, Cariofileno	Cicatrização, Úlcera Gástrica e Intestinal
<i>C. schiedeanus</i>	Folhas	Flavonóis Metoxilados	Hipertensão
<i>C. urucurana</i>	Látex	Diterpenos (sonderianina), Compostos Fenólicos	Anti-inflamatório, Cicatrização
<i>C. zehntneri</i>	Folhas e casca do caule	Anetol, Eugenol, Estragol	Sedativo, Estimulante de apetite.
<i>C. tiglium</i>	Folhas	Alcalóides (taspina)	Purgante.

Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies de *Croton* de ocorrência brasileira têm proporcionado o isolamento de 109 compostos pertencentes às mais variadas classes estruturais tais como diterpenos (35,6%), alcalóides (24,8%) flavonóides (12,8%) e triterpenos (11%) (TORRES, 2008), cujas características se destacam como agentes para aliviar a dor. Outras atividades farmacológicas detectadas para espécies do gênero *Croton* são antiinflamatória, antiulcerogênica, analgésica e anti-hipertensiva (RANDAU, 2001).

Extratos das espécies popularmente conhecidas como “sangue-de-dragão” (*Croton lechleri* Müll. Arg.) e outras espécies relacionadas têm sido utilizados por curandeiros “shaman” como remédios antidiarréicos em pacientes com AIDS (JONES, 2003). O óleo extraído de *Croton tiglium* L. é um forte purgante usado no Velho Mundo. *Croton humilis* L., empregado no tratamento de distúrbios urinários; *C. palanostigma*, cuja resina é usada para úlcera e *C. lechleri* Müll. Arg., um excelente cicatrizante usado no Peru, Equador e Bolívia (GUIMARÃES, 2006).

Outras espécies se destacam na produção de óleos essenciais, com ação antioxidante, encontrados no caule, folhas, flores, frutos, sementes e raízes (MORAES et al., 2006). Em um recente trabalho onde foram compiladas informações sobre o uso medicinal, a química e a farmacologia das espécies de *Croton* (SALATINO et al., 2007), ficou evidente que o potencial destas é enorme, porém mais estudos químicos e farmacológicos são necessários, dada a magnitude do gênero.

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Croton* se apresentam como bioativo para ações bioinseticidas. ALMEIDA et al. (2002), relata que o poder inseticida do *Croton* encontra-se principalmente em suas sementes. VIEGAS JUNIOR (2003), cita o efeito de substâncias obtidas de *Croton cajucara* sobre o crescimento de *Heliothis virescens* e sobre formigas da espécie *Cylas formicarius*. TORRES et al. (2001), verificaram que a utilização do extrato aquoso de *Croton* sp. afetou a viabilidade de pupas de *P. xylostella*.

## 2.4 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

O gênero *Croton* destaca-se por sua diversidade morfológica inter e intraespecífica, o que dificulta a delimitação de seus táxons. Diante disso, os caracteres vegetativos e florais, são muitas vezes insuficientes para a caracterização de algumas espécies (SILVA, 2009). Por esse motivo, trabalhos envolvendo citogenética e biologia molecular auxiliam na compreensão do gênero.

O gênero *Croton* apresenta alta diversidade numérica dos cromossomos variando entre  $2n=16$  (PERRY, 1943) até  $2n=64$  (FEDEROV, 1969). uma característica comum a outros gêneros da família Euphorbiaceae, como *Euphorbia* (PERRY, 1943). Essa variabilidade tem-se mostrado bastante útil para a análise citotaxonômica e para a compreensão da evolução cariológica como, por exemplo, na família Alismataceae (COSTA & FORNI-MARTINS, 2003). Acredita-se que as diferenças cromossômicas numéricas das espécies de *Croton* sejam responsáveis por eventos de isolamento reprodutivo. Nas espécies encontradas no Nordeste não é incomum a existência de várias espécies de *Croton* ocorrendo em simpatria, existência simultânea em uma mesma região geográfica de duas ou mais populações sem que haja cruzamento entre seus indivíduos, florindo geralmente em estações úmidas, porém ainda não se tem

evidências claras de hibridização interespecífica. Além das diferenças numéricas, as diferenças nos tamanhos dos cromossomos de diferentes espécies também pode impedir a hibridização interespecífica, pois dificultaria o pareamento meiótico (PÔRTO, 2007).

PÔRTO (2007), estudando o cariótipo de 11 espécies típicas do semiárido nordestino, observou que a variação cromossômica numérica encontrada em *Croton*, quando comparada com a proposta de filogenia para o grupo, sugere que  $n = 8$  seja o número básico para o gênero. Entende-se como número básico o número haplóide observado em um táxon que mais moderadamente explica a variabilidade cromossômica de um grupo (GUERRA, 2000). Das cerca de 1200 espécies do gênero, são conhecidas contagens cromossômicas para apenas 39, a maioria em outros países, o que representa menos de 3% do total das espécies. Não se conhece publicações que caracterize espécies encontradas exclusivamente do Brasil.

Quem primeiro caracterizou cromossomicamente o gênero *Croton* foi PERRY (1943) quando, ao estudar três espécies ocorrentes na América do Norte, encontrou  $2n=16$  para todas as espécies de *Croton*, sugerindo que este seja o gênero mais primitivo da família. Já URBASCH et al., (1975), sugere que  $x=10$  seja o número básico do gênero e que  $x= 7, 8, 9$  são derivados secundários por aneuploidia. Para BERNADELLO et al. (1990), os números determinados para *Croton* confirmariam a existência de vários números básicos, sendo  $x=10$  o mais frequente.

O gênero *Croton* passou por uma análise filogenética parcial onde foram reconhecidos 11 clados distribuídos em duas regiões fitogeográficas, uma do velho mundo (denominado de clado quatro) e outra do novo mundo (os demais) (BERRY et al. 2005).

Uma análise filogenética recente, que utilizou dados moleculares das regiões ITS (Internal Transcribed), que estão localizadas em regiões altamente conservadas do DNA, demonstrou que *Croton*, como tradicionalmente circunscrito, não é um táxon monofilético (LIMA & PIRANE, 2008).

### **2.5 *Croton heliotropiifolius***

O *Croton heliotropiifolius* (Figura 2) (sinonímia *Croton rhamnifolius*), conhecido popularmente na Bahia como cassutinga ou velame é comum, principalmente, nas áreas de Caatinga do nordeste. Em um levantamento sobre sua distribuição SILVA et al. (2010) indicaram ampla ocorrência na região Neotropical, desde o Panamá até o Brasil (GOVAERTS et al. 2000). No Brasil é encontrada em praticamente toda região Nordeste estendendo-se até o estado de Minas Gerais (LUCENA, 2000), crescendo predominantemente em vegetação de caatinga, embora também ocorra em bordas de florestas serranas, restinga e cerrado.



Figura 2: *Croton heliotropiifolius* encontrado na Serra da Torre, município de Itapetinga, Bahia. Fonte: www.flickr.com

Ao longo de sua área de distribuição, *C. heliotropiifolius* apresenta grande variação morfológica quanto ao tamanho e forma das folhas, cor do indumento e comprimento das inflorescências, o que dificulta sua identificação. No entanto, pode ser diferenciada das demais espécies, principalmente, pela columela do fruto tripartida no ápice após a deiscência do fruto. Caracteriza-se, ainda, pelos tricomas estrelado-porrectos adensados nas estruturas vegetativas e reprodutivas. Além disso, geralmente não apresenta glândulas no pecíolo ou elas são inconspícuas e globosas, muitas vezes encobertas pelos tricomas (SILVA et al., 2010).

Taxonomicamente o *C. heliotropifolius* apresenta pecíolo normalmente sem glândulas ou, quando presentes, inconspícuas (0,2–0,3 mm), sésseis, globosas; columela do fruto com ápice tripartido após a deiscência possui indumento denso em ambas as faces foliares (SILVA et al., 2010). As folhas apresentam epiderme simples com paredes periclinais externas espessas e cutícula delgada na face adaxial. A folha é anfiestomática com predominância dos estômatos na face abaxial; estes se encontram no mesmo nível das demais células epidérmicas. Os tricomas são estrelados, lignificados, com base cutinizada ou suberificada (BARROS & SOARES, 2013).

É uma planta com aroma característico, muito utilizada na medicina tradicional para o alívio de dores de estômago, mal-estar gástrico, vômitos, diarreia e banhos para atenuar a febre (RANDAU, 2001).

Analisando os constituintes majoritários presentes na casca e folhas do *C. heliotropiifolius*, SOUZA et al. (2010), identificaram como componentes majoritários o  $\alpha$ -pineno, cânfora,  $\beta$ -pineno e germacreno. Neste mesmo trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana dos óleos e das cascas do *C. heliotropiifolius*, sendo que não foi identificada ação inibitória diante dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

## 2.6 *Croton linearifolius*

A partir de um levantamento etnobotânico realizado junto a curandeiros e mateiros do município de Contendas do Sincorá, região do semiárido baiano, a espécie *Croton linearifolius* (Figura 3), identificada popularmente como velame pimenta, foi citada por seu efeito inseticida (CUNHA e SILVA et al., 2010).

O extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* apresentou um efeito inseticida significativo sob os adultos de *Cochliomyia macellaria*. A prospecção fitoquímica do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* revelou a

presença de alcalóides, esteróides, flavonóides, taninos, açúcares redutores e bases quaternárias, assim como a ausência de antocianidina, antocianina, antraquinona, auronas, chalconas, cumarina, leucoantocianidina e saponinas (CUNHA e SILVA et al., 2010).

O *Croton linearifolius* possui folhas estreitas variando de lanceoladas a estreitamente elípticas sendo a face adaxial completamente glabra (LIMA & PIRANI, 2008). São anfiestomáticas, com estômatos paracíticos e tricomas glandulares e tricomas tectores estrelados-rotados em ambas as faces da folha. A presença e características dos tricomas tectores estrelados, com interconexão entre as faces da folha realizada por esclereídes, assim como, as drusas são características de adaptação ao estresse hídrico (BRITO et al., 2011).



Figura 3: Estacas de *Croton linearifolius* em casa de vegetação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, oriundas de expedição de coleta realizadas em Contendas do Sincorá, BA.

Fonte: Acervo Pessoal

Em trabalho de levantamento taxonômico de *Croton*, LIMA & PIRANI, (2008) indicam a Bahia, Paraná e Santa Catarina como estados de ocorrência do *Croton linearifolius*, mas acreditam que a mesma esteja mais concentrada na região Sul do país, onde ocorrem, especialmente, em locais com baixa drenagem como campos úmidos e próximos a brejos, e também, na borda de matas degradadas, a cerca de 750 m de altura.

Diante do já comprovado potencial, o *C. heliotropiifolius* e o *C. linearifolius* tornam-se espécies que despertam um significativo interesse econômico e a exploração dos seus recursos deve ser realizada de forma sustentável. Dessa maneira se justifica o conhecimento e a caracterização genética dessas espécies com o intuito de construir estratégias de manejo e conservação, diminuindo consideravelmente o risco de extinção. Para dar suporte e criar condições de realizar a caracterização genética do gênero *Croton*, ferramentas de biologia molecular podem ser úteis nestes estudos.

### **3 GENÉTICA DE POPULAÇÕES**

A genética de populações estuda a hereditariedade entre indivíduos de uma população. População pode ser definida como um grupo de indivíduos de mesma espécie que se reproduzem entre si e por isso apresentam propriedades comuns. A descrição da composição genética de um grupo de indivíduos depende das proporções de genótipos e de genes (alelos) dentro da população (MYERS et al., 200), sendo necessário para tanto a caracterização das suas frequências gênicas (transmissão dos genes de uma geração para outra) e genotípicas (porcentagem ou proporção de ocorrência de determinado genótipo em relação aos outros genótipos observados dentro de uma população).

O Teorema de Hardy-Weinberg explica a dinâmica dos genes na população e propõe que em uma população infinitamente grande sob acasalamento ao acaso, na ausência de migração, mutação e seleção, as frequências gênicas e genotípicas permanecem constantes na população de uma geração para outra. Logo, as frequências gênicas podem ser determinadas a partir das frequências genotípicas.

Alguns fatores podem alterar a frequência gênica de uma população como os processos sistemáticos e dispersivos. Os processos sistemáticos são aqueles cuja alteração na frequência gênica podem ser conhecidos, tanto em termos de magnitude quanto em direção. Considera-se como processos sistemáticos a seleção (eliminação de determinados genótipos da população em função da viabilidade e fertilidade diferencial dos indivíduos, os quais deixam números diferentes de descendentes para a próxima geração, sendo preservados os genes dos indivíduos que deixam maior número de descendentes), a migração (transferência de indivíduos de uma população para outra, propiciando o cruzamento entre os indivíduos das duas populações) e mutação (fenômeno genético que origina novos alelos nas populações). Já os processos dispersivos são aqueles em que é possível conhecer apenas a magnitude da alteração da frequência, mas não a direção em que ela foi alterada. Como processo dispersivo é considerado a deriva genética (flutuações aleatórias de frequências gênicas ao longo das gerações).

A genética de populações é hoje estudada com larga aplicação na classificação sistemática e ações de conservação da natureza por exemplo. Do ponto de vista da Genética de Populações, o atributo mais importante de uma população é a sua variabilidade genética, já que esta constitui a matéria prima sobre a qual a mutação, a migração, a deriva genética e especialmente a seleção natural vão atuar, permitindo a adaptação, especiação e evolução dos seres vivos. Baixos níveis de diversidade genética, reduz o número de alelos no pool gênico da espécie, diminuem severamente o potencial evolutivo, aumentando assim o risco de extinção (REIS, 1996).

#### **3.1 FLUXO GÊNICO EM PLANTAS**

A perda da variabilidade genética é o tópico central da conservação genética (AVISE, 1994). Biólogos e conservacionistas afirmam que o declínio na variação genética pode diminuir a capacidade de adaptação do organismo diante das mudanças ambientais e conseqüentemente limitar seu potencial evolutivo.

O fluxo gênico é um importante mecanismo que está ligado diretamente às variações genéticas de uma população, podendo ser definido como o movimento

de genes em populações (NEIGEL, 1997). Em plantas esse movimento pode ser realizado através da semente e do pólen. LEVIN & KERSTER (1974), definem fluxo gênico potencial como a deposição de pólen e sementes a partir de uma população fonte em função da distância. O fluxo gênico efetivo refere-se à incidência de fertilização e ao estabelecimento de indivíduos reprodutivos, em função da distância da população fonte e fluxo gênico no tempo (ZUCCHI, 2002).

O fluxo gênico tem sido amplamente discutido em relação à sua magnitude e influência na estrutura genética das populações. A importância do fluxo gênico principalmente em populações naturais está na homogeneização das frequências alélicas entre as populações pequenas, deste modo, mesmo que separadas geograficamente elas comportam-se como uma grande população panmítica. A maior importância do fluxo gênico está na manutenção da diversidade genética e do polimorfismo. Em plantas a transferência dos genes pode ocorrer tanto pelo movimento de organismos individuais (sementes, rizomas, estolões), como, pelo movimento de gametas (pólen) (ZUCCHI, 2002).

O fluxo gênico pode ser quantificado através de medidas diretas e indiretas. Os métodos diretos incluem o uso de corantes, marcadores morfológicos e análise da paternidade. Abordagens mais precisas vêm utilizando marcadores organelares (cpDNA e mtDNA) e análise de paternidade com uso de microssatélites. Os métodos indiretos por sua vez abrangem alelos privados, autocorrelação espacial e coalescência.

Existem vários trabalhos que caracterizam geneticamente algumas espécies de *Croton* e geram uma série de informações importantes para o manejo visando, por exemplo, conservação ou exploração de seus recursos de forma sustentável (ANGELO et al., 2006; BENJAMIN et al., 2006; BERRY et al., 2005; LUCENA, 2000). Estas caracterizações são importantes pois o conhecimento da estruturação genética das populações permite ao pesquisador fazer inferência sobre sua diversidade genética, ação da deriva genética, fluxo gênico, seleção natural e outros dados relevantes acerca da história natural das espécies.

A variabilidade genética presente nas espécies pode ser dividida em três elementos principais. Diversidade genética, que se refere a quantidade de variação genética presente em uma espécie ou em grupos de indivíduos; diferenciação genética, que determina como a variação genética é distribuída entre as populações e distância genética, relacionada com a quantidade de variação genética existente entre pares de populações. Assim, o conhecimento de como a diversidade genética está distribuída nas populações vem tornando-se cada vez mais importante na elaboração de estratégias de manejo, conservação ou restauração de áreas degradadas.

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis no estudo de variabilidade genética de uma espécie. A avaliação utilizando estes marcadores pode fornecer uma identificação direta da variabilidade genética e, neste sentido, auxiliar na indicação de genitores para produção de híbridos específicos com vistas no melhoramento genético, ou ainda permitir a geração de populações para mapeamento genético, realizar estudos de sintenia genômica ou ainda auxiliar no estabelecimento e manutenção de bancos de germoplasma, entre outras aplicações (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; BORÉM & CAIXETA, 2009).

## **4 MARCADORES MOLECULARES**

Os marcadores moleculares têm grande importância nos estudos genéticos de plantas, no melhoramento e na conservação das espécies. Assim, os mesmos tornam-se indispensáveis para detectar variações no genoma e realizar detalhada análise genética das plantas. São vários os marcadores utilizados em diferentes espécies vegetais, sendo os principais descritos ao longo desta revisão e sumarizados na tabela 2.

### **4.1 MARCADORES ISOENZIMÁTICOS**

O termo isoenzima, também encontrado na literatura como isozima, foi introduzido por MARKET & MOLLER (1959), para designar formas moleculares múltiplas de enzimas, que ocorrem em um mesmo organismo e em membros da mesma espécie.

As enzimas são controladas geneticamente por um ou vários genes, situados em um mesmo loco ou locos diferentes (MARKERT, 1975; SCANDALIOS, 1969). Quando elas representam a expressão fenotípica de alelos situados em um mesmo loco, são denominados alozimas (CONKLE et al., 1982).

Existem vários métodos bioquímicos que detectam, isolam e distinguem as isoenzimas: cromatografia, filtração gélida, eletroforese e outros. A eletroforese é uma das técnicas mais importantes visto o seu poder analítico disponível para separar isoenzimas, seja pelas contínuas pesquisas e inovações da área, seja pela simplificação dos equipamentos utilizados (BROWN, 1978; PIERCE & BREWBAKER, 1973).

Dentre as vantagens dos marcadores isoenzimáticos estão o baixo custo operacional, a possibilidade da determinação genotípica dos locos ser feita em partes variadas da planta mesmo em número pequeno, a análise de vários locos isoenzimáticos de uma só vez em géis de amido, e a não detecção de efeitos deletérios, epistáticos ou pleiotrópicos associados aos alelos isoenzimáticos. A propriedade mais expressiva das isoenzimas como marcadores genéticos é a herança mendeliana simples, com caráter co-dominante para a maioria dos locos, isto é, possibilitam distinguir os indivíduos homocigotos dos heterocigotos, gerando volume maior de informações para estudos genéticos. Com essas vantagens, as isoenzimas são muito utilizadas em casos que não são necessárias ampla amostragem do genoma, mesmo já existindo marcadores mais modernos.

As duas principais limitações dos marcadores isoenzimáticos são a reduzida cobertura que é feita nos genomas investigados, em função do pequeno número de locos que podem ser detectados, e o baixo nível de polimorfismo identificado por loco.

### **4.2 MARCADORES RFLP ( RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)**

Um dos grandes desafios dos geneticistas moleculares na segunda metade do século XX era acessar variações naturais presentes nas fitas de DNA dos indivíduos, bem como torná-las úteis nas diversas investigações genéticas. Assim, surgiu em 1974, por Grodzicker, o primeiro marcador molecular, que permitiu detectar as diferenças entre indivíduos, diretamente no DNA. Esses marcadores, conhecidos como RFLP, surgiram após a descoberta das enzimas de restrição por LINN & ARBER (1968) e MESELSON & YUAN (1968). Essas

enzimas, consideradas “tesouras” moleculares, clivam o DNA em locais específicos, denominados sítios de restrição, constituídos por quatro a oito pares de bases, distribuídos ao longo da molécula de DNA, Mutações nos sítios de restrições são as principais fontes de polimorfismos detectados pelo RFLP.

A maior vantagem dos marcadores RFLP é a sua expressão co-dominante, além destes não serem afetados por pleiotropia, epistasia ou variações ambientais. O DNA a ser analisado pode ser extraído de qualquer parte do organismo, independentemente do estágio de desenvolvimento.

Como limitações, pode-se se dizer que desenvolvimento de marcadores RFLP é um processo caro e laborioso, pois envolve execução de muitas etapas, e requer consideráveis investimentos em pessoal, equipamentos e cuidados especiais com sondas radioativas. Outra limitação é a inexistência de uma biblioteca de sondas para espécies de plantas de pouca importância econômica ou que contenham informações limitadas no campo da biologia molecular.

### **4.3 MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Os genomas eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. Essas regiões são denominadas microssatélites, SSR (Simple Sequence Repeats) ou STR (Short Tandem Repeats). Independentemente da origem da variação e do elemento repetitivo, cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia do PCR, faz desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucarióticos.

Diferentes estudos têm mostrado que os microssatélites são amplamente distribuídos no genoma das plantas superiores. MORGANTE & OLIVIERI (1993) estimaram uma frequência de um microssatélite, a cada 50 kb. No entanto, a estimativa de abundância de microssatélite varia com os critérios adotados. Diferentes pesquisas estão sendo realizadas visando identificar as classes de microssatélites mais abundantes em espécies de plantas.

A hipervariabilidade dos microssatélites, seu caráter co-dominante e sua ampla distribuição nos genomas eucariotos, fazem destes marcadores uma excelente opção para diversos estudos moleculares, englobando desde estudos de diversidade genética, até análise de paternidade e estudos de filogenia. Além disso, o fato de serem baseados em amplificação por PCR o que implica que uma vez desenvolvidos os primers que flanqueiam a região alvo, são de fácil manipulação, fizeram com que estes marcadores sejam um dos mais utilizados em estudos moleculares atualmente.

Por outro lado, a grande limitação dos microssatélites é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos primers específicos para cada espécie, não sendo possível utilizar a estratégia de desenho de primers universais.

### **4.4 MARCADORES RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)**

A facilidade, rapidez e sensibilidade da PCR possibilitaram o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares, que provocou grande impulso na geração de dados moleculares em várias espécies. Dois grupos de pesquisadores, trabalhando independentemente, desenvolveram um tipo de marcador molecular baseado em PCR que utiliza um único primer mais curto,

normalmente de dez nucleotídeos com sequência arbitrária, para realizar a amplificação. Esta estratégia elimina a necessidade do conhecimento prévio dos fragmentos a serem amplificados. Os idealizadores da técnica batizaram-na com o nome de RAPD (WILLIAMS et al., 1990).

Os marcadores RAPD apresentam como característica básica a dominância, ou seja, esse tipo de marcador não permite distinguir homozigotos dominantes de heterozigotos em uma população. A sensibilidade da técnica não permite discriminar quantitativamente os dois casos. Portanto, ausência da banda no gel é atribuída ao genótipo homozigoto recessivo, enquanto a presença da banda é denominada pelos genótipos homozigoto dominante e heterozigoto.

As vantagens da técnica são demonstradas pela facilidade de execução, rapidez na obtenção de dados, custo relativamente reduzido, em relação a outras técnicas moleculares, e a aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo. Não envolve a utilização de mão-de-obra altamente especializada e não emprega radioatividade. A técnica não exige seqüenciamento de nucleotídeos, nem desenho de primers específicos e não requer desenvolvimento prévio de bibliotecas de sondas específicas para o organismo de interesse.

Uma das principais limitações dessa técnica é o baixo conteúdo de informação genética em cada loco, pois apenas um alelo é detectado pelo fragmento amplificado, sendo as demais variações alélicas classificadas conjuntamente como um alelo nulo.

#### **4.5 MARCADORES ISSR (INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS)**

Desde 1994, uma técnica de marcador molecular, chamada ISSR está disponível (ZIETKIEWICZ et al., 1994). ISSRs são marcadores semiarbitrários, ampliados por PCR em presença de um oligonucleotídeo complementar para um microssatélite designado.

Como um marcador com base em PCR, o ISSR tem algumas vantagens quando comparado aos outros marcadores. A amplificação não requer informações de sucessão do genoma e de padrões altamente polimórficos (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Cada faixa corresponde a uma seqüência de DNA delimitada por dois microssatélites invertidos. Também, as seqüências-alvo dos ISSRs são abundantes ao longo do genoma de eucariontes e evoluem rapidamente (FANG & ROOSE, 1997; ESSELMAN et al., 1999). Então, ISSRs têm provado serem úteis dentro de populações de estudos genéticos, especialmente em detecção clonal, diversidade e revelação de indivíduos proximamente relacionados (SALIMATH et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1996). Como desvantagem desses marcadores podemos citar a apresentação de menor número de polimorfismo. ISSRs também apresentam fragmentos de DNA co-migrantes, que podem apresentar lócus distintos, mas serem interpretados como homólogos devido ao tamanho idêntico (BUSSEL et al., 2005).

#### **4.6 MARCADORES AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)**

A técnica é baseada na amplificação, via PCR, de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição tipo II, que clivam o DNA em sítios específicos, de corte raro e de corte frequente (VOS et al., 1995).

A vantagem que mais destaca esta tecnologia das demais é o grande número de fragmentos que são gerados e resolvidos em um único gel. O índice de “multiplex” do ensaio AFLP, ou seja, o número de marcadores simultaneamente analisados em um único gel, é o mais alto entre as tecnologias disponíveis. A técnica de AFLP é, portanto, muito eficiente na amostragem ampla e simultânea de um genoma. A segunda vantagem é o grande poder de detecção de variabilidade genética, que explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no ensaio de RFLP, e a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias, tal como no ensaio de RAPD.

A principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por loco, devido ao seu caráter dominante. A análise de marcadores AFLP envolve um maior número de etapas do que a análise RAPD. Uma maior quantidade de reagentes é necessária juntamente com maior número de equipamentos de biologia molecular. O DNA necessário deve ser mais puro para que as enzimas de restrição digerir completamente o DNA, o que demanda protocolos de extração mais elaborados.

#### **4.7 MARCADORES SNP (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM)**

Os marcadores SNP tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, estes marcadores permitem detectar mutações em bases únicas em uma determinada sequência de nucleotídeos. As mutações mais comuns são as transições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina. Menos frequentes, as transversões ocorrem quando há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa. Normalmente, os marcadores SNP são bi-alélicos, ou seja, geralmente são encontrados apenas dois variantes em uma espécie. Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada.

SNPs tem se tornado marcadores de preferência pela sua grande abundância e pelo desenvolvimento de tecnologias de genotipagem em larga escala. A sua taxa de mutação é baixa, são frequentes no genoma e facilmente automatizados. A sua principal desvantagem é a necessidade de sequenciamento de DNA em grande escala, o que pode encarecer a genotipagem. Entretanto, com o avanço das técnicas e evolução dos equipamentos que detectam tais polimorfismos, existe uma tendência de ampliação do uso deste marcador entre diversas espécies.

## 5. CONCLUSÃO

A Caatinga é um bioma que sofre com um severo processo de degradação. Sendo um bioma com grande diversidade, apresenta um grande número de espécies que são exploradas por apresentarem poder medicinal ou biopotenciais.

Espécies do gênero *Croton* estão largamente distribuídas pelas Américas e estudos mostram que são encontradas em todos os estados brasileiros. Algumas espécies do gênero *Croton* possuem comprovado poder medicinal e a sua utilização pela comunidade aumenta cada vez mais. O interesse pelas espécies do gênero *Croton* já direcionou uma série de estudos que fizeram uso de marcadores moleculares para caracterizações genéticas. O levantamento dessas informações são importantes para o pesquisador desenvolver atividades que visem a conservação e o manejo de forma eficiente, buscando minimizar os impactos causados pela sua utilização.

A caracterização genética utilizando marcadores moleculares já vem sendo feita em algumas espécies do gênero *Croton*, porém ainda existem espécies como o *C. linearifolius* e o *C. heliotropiifolius* cujas informações genéticas ainda são desconhecidas, propondo a condução de novos estudos genéticos moleculares associados à espécies silvestres.

Tabela 2: Apresentação e descrição geral das principais características de alguns marcadores moleculares amplamente utilizados em estudos genéticos, bem como exemplos de uso em *Croto ssp.*

<b>Marcador</b>	<b>Segregação</b>	<b>Referência</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Em <i>Croton</i></b>
Isoenzimas	Co-Dominância	Lewontin e Hubby, 1996	Caracterização de variabilidade genética, estudos de evolução, dispersão de espécies, análises filogenéticas.	Baixo custo, análise de vários loci de uma só vez, não detecção de efeito deletério.	Reduzida cobertura nos genomas estudados, baixo nível de polimorfismo identificado.	Variabilidade genética em <i>C. floribundus</i> (Bertagna, 2007).
RFLP	Co-Dominância	Grodzicker, 1974	Caracterização e análise de variabilidade genética.	Distinguir homocigotos de heterocigotos, não são afetados por variações ambientais, pleiotropia e epistasia.	Caro e laborioso, ausência de uma biblioteca de sondas para algumas espécies.	Estudos filogenéticos e biogeografia de <i>C. alabamensis</i> (Benjamin et al, 2006).
SSR	Co-Dominância	Litt e Luty, 1989	Estruturação de populações, frequência de fenômenos migratórios e fluxo gênico.	Conteúdo informativo bastante alto, detecção de alto número de alelos em um loco.	Obtenção de primers, custo elevado, mão de obra especializada.	Diversidade genética em populações e fluxo gênico de <i>C. floribundus</i> (Zucchi, 2009).
RAPD	Dominância	Williams <i>et al</i> , 1990	Caracterização de variabilidade genética, construção de mapas de ligação genética.	Fácil execução, baixo custo, não requer primers específicos.	Baixo conteúdo de informações em cada loco, não distinção entre homocigotos e heterocigotos.	Estudos de diversidade genética em <i>C. cajucara</i> (Angelo et al, 2006).
ISSR	Dominância	Zietkiewicz <i>et al</i> , 1994	Estimar diversidade genética, estudo de populações, mapeamento genético.	Não requer informações prévias, grande reprodutividade, requer pouca infraestrutura.	Apresentam menor número de polimorfismo, apresentam fragmentos de DNA co-migrantes.	Estudo de diversidade genética de <i>C. sublyratus</i> (Klinbantom, 2004).
AFLP	Dominância	Vos <i>et al</i> , 1995	Monitoramento de herança, diagnóstico de doenças, diversidade genética, estudos de erosão genética.	Analisa simultaneamente várias regiões diferentes do genoma, maior repetibilidade e confiabilidade.	Dificuldade de identificar variantes alélicas em loco específico.	Estudos filogenéticos em <i>C. pallidulus</i> (Suzaki, 2011).
SNP	Bialélicos		Melhoramento assistido, mapeamento de EST, integração de mapas físicos e genéticos, estudos de populações e filogenia.	Taxa de mutação baixa, são frequentes no genoma, facilmente automatizados.	Sequenciamento de DNA em grande escala.	

## 6. REFERÊNCIAS

- AB`SÁBER, N.A. **Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. Primeira aproximação.** Geomorfologia. 52: 1-21, 2003.
- 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 Científica.* 1: 1-9, 2011.
- ALMEIDA, A.B.A.; MIOTTO, A.M.; NUNES, D.S.; SPADARI-BRATISCH, R.C.; SOUZA-BRITO, A.R.M. **Mechanism of antiulcerogenic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth.** *Rev Bras Farmacogn* 12(Supl. 1): 105-110, 2002.
- ALMEIDA-CORTEZ ,J.S.; CORTEZ P.H.M.; FRANCO J.M.V. & UZUNIAN A. **Caatinga – coleção biomas do Brasil.** Harbra. São Paulo. 64, 2007.
- ALVES, J.J.A. **Geoecologia da caatinga no semi-árido do Nordeste brasileiro.** CLIMEP: Climatologia e Estudos da Paisagem, Rio Claro. 2: 58-71, 2007.
- ALVES, J.J.A.; ARAÚJO, M.A. & NASCIMENTO, S.S. **Degradação da caatinga: Uma investigação ecogeográfica.** *Revista Caatinga.* 22: 126-135, 2009.
- AYAD, A.; SOUSA, N.M.; SULON, J.; HORNICK, J.L.; WATTS, J.; LOPEZ-GATIUS, F.; IGUER-OUADA, M. & BECKERS, J.F. **Influence of progesterone concentrations on secretory functions of trophoblast and pituitary during the first trimester of pregnancy in dairy cattle.** *Theriogenology* 67:1503-1511, 1997.
- AVISE, J.C. **Molecular markers. Natural history and evolution.** New York: Chapman & Hall, 511p, 1994.
- BERNARDELLO, L. M.; STIEFKENS, L. B.; PIOVANO, M. A. **Numeros cromossômicos en dicotiledoneas Argentinas.** *Boletín de La Sociedad Argentina Botánica*, v. 26, n. 3-4, p. 149-157, 1990.
- BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; VAN, E.E.B. & RIINA, R. **Molecular phylogenetics of the giants genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu strictu) using ITS and trnL-trn-F DNA sequence data.** *Amer. J. Bot.* 92:1520-1534, 2005.
- BORÉM, A. & CAIXETA, E.T.C. **Marcadores Moleculares.** Editora Folha de Viçosa. Viçosa, MG. 2, 2009.

BORHIDI, A. & O. MUÑIZ. **Revisión del género *Croton* L. (Euphorbiaceae) en Cuba.** *Ann. Hist.-Nat. Mus. Natl. Hung.* 69: 41-53, 1977.

BRAGA, R.A. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** 2.ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960.

BRITO, M.S.; FRIES, D.D.; CUNHA e SILVA, S.L. & GUALBERTO, S.A. **Anatomia foliar de *Croton linearifolius* Mull. Arg.** *Enciclopédia Biosfera.* 7, 2011.

BROWN, M.S.; ANDERSON, R.G.W. & GOLDSTEIN, J. **Transport of Macromolecules in Cellular System.** ed. Silverstein, S. C. 197–212, 1978.

BUSSEL, J.D.; WAYCOTT, M. & CHAPPILL, J.A. **Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference.** *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 7: 3–26, 2005.

CONKLE, M.T.; HODGSKISS, P.D.; NUNNALLY, L.B.; HUNTER, S.C. **Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual.** USDA For Serv Gen Tech Rep, PSW-64, 1982.

CORDEIRO, I. **Euphorbiaceae.** In: **Stannard BL. Flora do Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia-Brasil.** Royal Botanic Gardens. 300-317, 1995.

COSTA, J.Y. & FORNI-MARTINS, E.R. **Karyology of some Brazilian species of Craveiro AA and Silveira ER (1982). Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*.** *Phytochemistry*.21: 2571-2574, 2003.

CRAVEIRO, A.A.; SILVEIRA, E.R. **Two cleisthane type diterpenes from *Croton sonderianus*.** *Phytochemistry*,v.10, n.21, p.2571-2574, 1982.

CROIZAT, L. **Thirty-five new species of American *Croton*.** *J. Arnold Arbor.* 21: 78-107, 1940.

CROIZAT, L. **New or critical Euphorbiaceae from the Americas.** *J. Arnold Arbor.* 26: 181-196, 1945.

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

DRUMOND, M.A.; KILL, L.H.P.; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S. & CAVALCANTE, J. **Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga.** [online], 2000 EMBRAPA. CPATSA. Disponível em [\[http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/33873/1/uso-sustentavel.pdf\]](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/33873/1/uso-sustentavel.pdf). Acessado Agosto, 2012.

ESSELMAN, E. J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D.J.; WINDUS, J.L. & WELFE, A.D. **Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porter* spp. *Insperrata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA and inter-simple sequence repeat markers.** *Mol. Ecol.* 8, 443–453, 1999.

FANG, D.Q. & ROOSE, M.L. **Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers.** *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.95. p.408-417, 1997.

FEDEROV, A.A. **Kromosomnye chisla tsvetkovykh rastenii. Chromosome numbers of flowering plants.** Leningrad: Komarov Botanical Institute, 926p, 1969.

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

FLOSS, P.A. **Variações genéticas entre populações naturais de *Ilex paraguariensis* St.Hil. (erva-mate) avaliados em Chapecó, SC e Três Barras, SC.** Piracicaba, 1994. 94p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – USP, 1994.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G. & RADACLIFFE-SMITH, A. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae) v.1-4.** Royal Botanical Gardens, Kew, 2000.

GUERRA, M. **Chromosome number variation and evolution in monocots.** In: Wilson, K. L.; Morrison, D. A. (Eds.). *Monocots II - Systematics and Evolution.* Collingwood: CSIRO Publ., p. 127-136, 2000.

GUIMARÃES, L.A.C. **O Gênero *Croton* L. secção *Cyclostigma* Griseb. e secção *Luntia* (Raf.) G. L. Webster (Euphorbiaceae) ocorrentes na Amazônia Brasileira.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, 2006.

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação.** [online], 2004 Rio de Janeiro : IBGE. Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). 2012.

JONES, K. **Review of Sangre de Drago (Croton lechleri) – A south american tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research.** The Journal of Alternative and Complementary Medicine 9:877-896, 2003.

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

LEAL, I.R. et al. **Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. Conservação Internacional do Brasil.** [online], 2005 Megadiversidade.1:139-146. Disponível: [http://www.conservacao.org/publicacoes/files/19\\_Leal\\_et\\_al.pdf](http://www.conservacao.org/publicacoes/files/19_Leal_et_al.pdf) Acessado em 10 de set. 2012.

LEVIN, D.A. & KESTER, H.W. **Gene flow in seed plants.** Evolutionary Biology. 7: 139-220, 1974.

LIMA, L.R. & PIRANI, J.R. **Revisão taxonômica de Croton sect. Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.).** Biota Neotrop. 82:177-231, 2008.

LINN, S. & ARBER, W. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A, 59, pp. 1300–1306, 1968.

LOWWE, A.; HARRIS, S. & ASHTON, P. **Ecological genetics. Desing, analysis and application.** In: Paula de, F.M. **Diversidade genética de Prochilodus lineatus das escadas de transposição de peixes das usinas hidrelétricas do complexo Canoas – Rio Paranapanema.** Master's thesis. UEL, Londrina, PR, 2004.

LUCENA, M.F.A. **Diversidade de Euphorbiaceae sensu lato no Nordeste do Brasil.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. & ARRUDA, A.C. **Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of Croton cajucara.** Journal of Ethnopharmacology. 70: 41-45, 2000.

MARKERT, C. L. & MOLLER, F. **Multiple forms of enzymes tissue , ontogenetic and species specific patterns.** Proceeding of the National Academy of Sciences 45: 753-62, 1959.

MARKERT, C. L. **Biology of isozymes.** In: Markert, C. L. **Isozymes: molecular structure.** New York: Academic Press 1: 1-9, 1975.

MESELSON, M. & YUAN, R. Nature. London, 217 , pp. 1110–1114, 1968.

MORAIS, S.M.; CATUNDA JÚNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; STONE, J.; MARTINS NETO, R.D.; CARDOSO, J.H.L. **Atividade antioxidante de óleos**

**essenciais de espécies de *croton* do Nordeste do Brasil.** *Quim Nova* 29: 907-910, 2006.

MORGANTE, M. & OLIVEIRI, A.M. **PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics.** *Plant J* 3: 175-182, 1993.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; da FONSECA, G.A.B.; KENT, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** *Nature* 403: 853–858, 2000.

NEIGEL, J.E. **A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers.** *Annual Review Ecology Systematics*. 28: 105-128, 1997.

OLIVEIRA, A.C.; RICHTER, T. & BENNETZEN, J.L. **Regional and racial specificities in sorghum germplasm assessed with DNA markers.** *Genome*, Canada, v.39, p.579-587, 1996.

PERRY, B.A. **Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae.** *American Journal of Botany*. 30: 527-543, 1943.

PIERCE, L.C. & BREWBAKER, J.L. **Applications of isozyme analysis in horticultural science.** *Hort. Science* 8, 17–22, 1973.

PÔRTO, N.A. **Citotaxonomia de espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae: Crotonoideae) ocorrentes no Nordeste do Brasil.** Master's thesis. Programa de Pós Graduação em Agronomia. Universidade Federal da Paraíba. Areia, 2007.

RANDAU, K.P. **Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacológico) e atividade biológica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae).** Recife, 143p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2001.

RANDAU, K.P.; FLORÊNCIO, D.C.; FERREIRA, C.P. & XAVIER, H.S. **Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae).** *Rev. Bras. Farmacogn.* 4: 89-96, 2004.

REIS, S.R. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* Martius).** Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1996.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. **Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae).** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 18, n. 1, p. 11-37, 2007.

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.

SCANDALIOS, J.G. **Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review.** *Biochem. Genetics* 3:37-39, 1969.

SILVA, J.M.C. *et al.* **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação.** [online], 2003. Ministério do Meio Ambiente e Universidade Federal do Pernambuco. Brasília. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=14&idConteudo=2464> Acessado em 10 set. 2012.

SILVA, J.S. **O gênero Croton L. (Euphorbiaceae) em Pernambuco, com ênfase nas espécies da microrregião do Vale do Ipanema.** Master's thesis. Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco. UFRPE. Recife, 2009.

SILVA, J.S.; SALES, S.M.F.; CARNEIRO-TORRES, D.S. **O genero Croton na microregião do vale do Ipanema.** *Rodriguésia* 60: 879-901, 2010.

Sistema Estadual de Informações Ambientais [online], 2007 Disponível em: <http://www.seia.ba.gov.br> Acesso em: 10 de set. 2012.

SOARES, V.O. & ALMEIDA, N.O. **O bioma caatinga sob a percepção da paisagem e a dinâmica da agricultura.** *Revista geográfica da América Central*. Número Especial EGAL. 1-15, 2011.

TABARELLI, M. & SILVA, J.M.C. **Áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga.** Universidade Federal de Pernambuco. 47-52, 2002.

TABARELLI, M. & GASCON, C. **Lessons from Fragmentation Research: Improving Management and Policy Guidelines for Biodiversity Conservation.** *Conservation Biol.* 19: 734-739, 2005.

TORRES, A.L.; BARROS, R.; & Oliveira, J.V. **Efeito de Extratos Aquosos de Plantas no Desenvolvimento de Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae).** *Neotropical Entomology* 30(1), 2001.

TORRES, M.C.M. **Estudo Químico e Biológico de Croton regelianus Var. matosii (Euphorbiaceae).** Master's thesis, UFC, Fortaleza, 2008.

URBATSCH, L. E.; BACON, J. D.; HARTMAN, R. L.; JOHNSTON, M. C.; WATSON-JR, T. J. & WEBSTER, G. L. **Chromosome numbers for North American Euphorbiaceae.** *American Journal of Botany*, v. 62, n. 5, p. 494-500, 1975.

VELLOSO, A.L.; SAMPAIO, E.V.S.B & PAREYN, F.G.C. **Ecorregiões propostas para o Bioma Caatinga. Resultados do Seminário de Planejamento Ecorregional da Caatinga.** [online], 2002. Recife. Associação Plantas do Nordeste. The Nature Conservancy do Brasil. Disponível em [[http://www.mma.gov.br/estruturas/203/arquivos/ecorregioes\\_site\\_203.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/203/arquivos/ecorregioes_site_203.pdf)], Acessado em Agosto 28, 2012.

VIEGAS Jr., C. **Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos.** Quím. Nova, 26: 390-400, 2003.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN de LEE, T.; HOMES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. A.F.L.P. **A new technique for DNA fingerprinting.** Nucleic Acids Research, London, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

WATTIAUX, M. A. Milk **Composition and nutritional value.** Madison: University of Wisconsin. Disponível em: [www.babcock.cals.wisc.edu](http://www.babcock.cals.wisc.edu). Acesso em 25 de agosto de 2013.

WEBSTER, G.L. **A provisional synopsis of the sections of the genus Croton (Euphorbiaceae).** Taxon. 42:793-823, 1993.

WEBSTER, G.L. Croton. In G.L. Webster & M. Huft (eds.), **Revised synopsis of Panamanian Euphorbiaceae.** Annals Missouri Bot. Gard. 75: 1087-1144, 1988.

WEBSTER, G.L. **Synopsis of Croton and Phyllanthus (Euphorbiaceae) in Western tropical Mexico.** Contr. Univ. Michigan Herb. 23: 353-388, 2001.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. & RAFALSKI, J.A. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535, 1990.

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

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* utilizando marcadores RAPD e SSR.** Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Tese de Doutorado. Piracicaba. São Paulo, 2002.

### 3. CAPÍTULO II

Artigo Submetido para Publicação em 24 de fevereiro de 2013-02-25

Periódico: *African Journal of Biotechnology*

**Comparison of protocols for genomic DNA extraction from 'velame pimenta' (*Croton linearifolius*), a species native to the Caatinga, Brazil**

MM Scaldaferri<sup>12</sup>, JS Freitas<sup>2</sup>, Santos ESL<sup>12</sup>, JGP Vieira<sup>2</sup>, ZS Gonçalves<sup>2</sup>, CBM  
Cerqueira-Silva<sup>21</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Molecular Genetics, Departamento de Estudos básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - Ba, 45700-000, Brazil. <sup>2</sup>Laboratory of general biology and botany, Departamento de Estudos básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - Ba, 45700-000, Brazil.

The Caatinga biome occupies some 12% of the Brazilian territory, being present in at least nine states. The species that constitute its biodiversity have potential to be used as natural resources, among them the approximately 700 species of the genus *Croton*. As an example of this potential, the *C. linearifolius* specie is used by local communities as a natural insecticide. Associated with the economic potential of the Caatinga species, one must stress the risk of extinction or of genetic erosion due to the growing deforestation of natural areas

---

<sup>1</sup> Corresponding author. E-mail: csilva@uesb.edu.br. Tel: +55 77 3261-8677. Fax: +55 77 3261-8609.

of this biome. These factors make it relevant studies genetic in order to guide conservation strategies. Considering the lack of molecular studies involving *C. linearifolius*, we compare the efficiency of six protocols for genomic DNA extraction previously described in literature. The DNA extraction buffers (based on the use of CTAB, SDS, mannitol and sorbitol) were differed in their efficiency to obtaining the genomic DNA of *C. linearifloius*. In general, protocols using CTAB buffer were more efficient. The use of liquid nitrogen in the maceration process was also evaluated and its use was considered a non-obligatory factor in obtaining DNA in adequate quantity and quality for PCR platform procedures.

**Keywords:** DNA Isolation, molecular markers, native species of Caatinga.

## INTRODUCTION

The Caatinga biome occupies some 12% of the Brazilian territory, including the states of Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí and the north of Minas Gerais (Almeida-Cortez et al., 2007; Prado, 2003). The Caatinga vegetation is considered xerophytic, with diverse aspect and floristics, average rainfall between 240 and 1 500 mm, and temperature ranging between 24 and 29°C (Almeida-Cortez et al., 2007; Velloso et al., 2002). Such temperatures, present almost throughout the year, interfere with the decomposition process, causing the soil in the region to be poor in organic matter, shallow, but rich in minerals, assuring fertility in environments where there is little rain.

Faced with the environmental characteristics presented, the Caatinga vegetation is adapted to water deficiency conditions, and produces tree, shrub and moss layers characterized by water-retaining structures, and/or superficial roots (Almeida- Cortez et al., 2007). With such typical environmental characteristics, the Caatinga harbors large quantities of endemic species. Although there is not an authoritative list of Caatinga species, qualitative and quantitative studies about the flora and vegetation of this biome register approximately 600 species, of which at least 30% are endemic (Tabarelli, 2005).

Among the species that constitute the Caatinga biodiversity are those that belong to the genus *Croton*. Its taxonomic classification is difficult due to the diversity of species, nomenclatures and polymorphisms of its representatives (Webster, 1993). According to Pax and Hoffman, the genus

*Croton* belongs to the Crotonoideae sub-family and its approximate 700 species make up one of the most numerous of Euphorbiaceae genera (Hoehne, 1935 apud Abreu et al., 2001). For Silva et al. (2009), the species in the genus *Croton* should be classified as trees, shrubs, subshrubs or less frequently as herbs or vines. These species are also very important for the consolidation of an ecosystem, because they form a group of pioneers that are fundamental to recover degraded areas, roadsides and river banks (Lima and Pirani, 2008).

There are some 300 registered *Croton* species in Brazil, many with known chemical and/or pharmacological properties and described as having medicinal potential or as being toxic (Hoehne, 1935 apud Abreu et al., 2001). Having had its extracts used popularly by dwellers of the regions surrounding its area of occurrence, *Croton spp.* is being submitted to chemical analyses, and studies have proved the existence of essential oils and a number of active substances (Randau et al., 2004; Torres, 2008). *Croton linearifolius* is one of such species that according to ethnobotanic studies is largely used as a natural insecticide by the bushmen of Bahia's semiarid region in the Contendas do Sincorá area (Cunha e Silva et al., 2010).

The region's size, the enormous variety of species that populates it and the technological potential currently available for its transformation into economic value render the Caatinga biodiversity an effective wealth, however, it generates a permanent challenge for its conservation.

Even when faced with a wealth of biodiversity, with the potential use of its species as natural resources and with the growing risk of genetic erosion caused by the exploitation and degradation of natural environments, many

native plant species or species that are endemic to the Caatinga have not been subjected to genetic diversity studies.

It should be stressed that genetic characterizations, especially when associated with the use of molecular markers, are an effective contribution to understanding ecological characteristics, as well as to steer natural resources management and conservation strategies.

Among the large number of techniques and methodologies available for molecular studies involving the characterization of genetic diversity, we highlight the use of the following markers: Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD, Inter Simple Sequence Repeats - ISSR, Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP, Simple Sequence Repeat - SSR and Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs. Broadly speaking, each of these markers have specific characteristics that should be considered by the researcher at the moment of choosing the methodology to be adopted.

As examples of molecular genetic characterizations of native Caatinga species, we can cite the works of Pinto *et al.* (2011) about *Lippia gracilis*, and of Sousa *et al.* (2011) about *Piptadenia moniliformis*, both using RAPD.

We highlight that molecular studies initially lack well-established protocols to obtain DNA, RNA and/or proteins from the targeted species, since the efficiency of standard procedures to extract such molecules can vary among species. Such variations occur, among other factors, as discussed by Moreira and Oliveira (2011) and Porebski *et al.* (1997), due to the differential presence of secondary compounds such as polyphenols, tannins and polysaccharides, as well as tissue rigidity.

Due to the lack of molecular studies involving *Croton linearifolius* and the need for molecular genetic studies, our objective was to compare the efficiency of protocols for genomic DNA extraction from “velame pimenta” (*C. linearifolius*), a species native to the Caatinga.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Obtaining and storing biological material**

Young leaf tissue was collected from ‘velame pimenta’ (*C. linearifolius*) at a native forest in the municipal area of Contendas do Sincorá, Bahia, and stored in an ultra-cold freezer at the Applied Molecular Genetics Laboratory (LGMA) of Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga. In order to standardize the extraction tests, 0.2 g of leaf tissue was used by repetition in each protocol.

### **Description of extraction protocols**

Six protocols previously described in literature were assessed for genomic DNA extraction. We performed three repetitions for each extraction protocol (repetition = extraction carried out in a 1.5 mL tube). All protocols used samples macerated in buffer solution (using the descriptions in the articles describing the protocols, cited further on and showed in Table 1), which were transferred (800 uL) to 1.5 mL tubes (totaling 18 tubes, three for each of the six protocols), and to which we added 10 uL of proteinase-K (20 mg/mL). Changes made are described in the text referent the each a of the protocols used.

### **Protocol 01 – Sunnucks and Hales (1996)**

The samples were incubated for 3 h at 55°C in buffer sodium sulfate dodecyl (SDS), and inverted every 20 minutes. By the end of the incubation period, the samples were centrifuged at 12000 xg, for 10 minutes, at 15°C; the supernatant was removed and 700 uL of cold isopropanol was added. The samples were gently homogenized and again centrifuged at 12000 xg for 10 minutes at 15°C. The supernatant was removed and 800 uL of cold ethanol 70% was added. The samples were centrifuged at 12000 XG for 5 minutes at 15°C; the supernatant was removed and 800 uL of cold ethanol 95% was added; they were then centrifuged at 12000 xg, for 5 minutes, at 15°C; the supernatant was discarded. When fully dry, the pellet was resuspended in 60 uL Milli Q water.

### **Protocol 02 – Modified method Cerqueira-Silva (2009)**

The samples were incubated for 3 h at 55°C in buffer solution containing Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), and inverted every 20 minutes. After the end of the incubation period, 700 uL of chloroform isoamyl alcohol 24/1 was added and the samples were homogenized by inversion. They were centrifuged at 12000 xg for 10 minutes at 15°C; the supernatant was removed and placed in a new tube (550 uL) with the addition of 600 uL of chloroform isoamyl alcohol 24/1 and homogenized by inversion. It was once again centrifuged at 12000 xg for 10 minutes at 15°C; the supernatant was removed and placed in a new tube with the addition of cold isopropanol (in the proportion 1/1), gently

homogenized, and the samples were incubated overnight at 4°C for precipitation. After this period, they were centrifuged at 10000 xg for 10 minutes at 15°C; the supernatant was discarded and 500 uL of cold alcohol 70% was added to it. They were centrifuged at 10000 xg for 5 minutes at 15°C; the supernatant was discarded and 500 uL of cold alcohol 95% was added. The samples were centrifuged at 10000 for 5 minutes at 15°C and then the supernatant was discarded. Once dry, the pellet was resuspended in 60 uL of Milli Q water.

### **Protocol 03 – Modified method Storchova et al. (2000)**

The samples were incubated at room temperature for 20 minutes in extraction buffer containing mannitol. After the end of the incubation period, they were centrifuged for 3 minutes at 10000 xg at 15°C; the supernatant was discarded and 300 uL of lysis buffer was added, containing CTAB 2% and NaCl. Following these stages, the samples were incubated at 65°C for 15 minutes and 600 uL of chloroform isoamyl alcohol 24/1 was added; the solution was homogenized by inversion during 5 minutes. The material was subsequently centrifuged for 3 minutes at 10000 xg at 15°C. The supernatant was transferred to a new tube, to which 500 uL of cold isopropanol was added; the samples were incubated during 1h in a freezer at -20°C. After this period, they were centrifuged for 3 minutes at 10000 xg, 15°C. The supernatant was discarded and the pellet was washed with 400 uL alcohol 70%. The alcohol used for the wash was discarded and the pellet was left to dry completely. Once dry, it was resuspended in 60 uL of Milli Q water.

#### **Protocol 04 – Modified method Russel et al. (2010)**

The samples containing sorbitol buffer were centrifuged for 10 minutes at 5700 xg at 15°C. After centrifugation, the supernatant was discarded and the sediment was dissolved with 1 mL sorbitol buffer (procedure repeated until there was no mucilage). Once the sample was dissolved, 1 mL of CTAB buffer was added to it, and it was incubated for 1 h at 60°C. By the end of the incubation period, 700 uL of chloroform isoamyl alcohol 24/1 was added, and the solution was homogenized by inversion during 20 minutes. In the following stage, it was centrifuged during 10 minutes at 13000 xg and 15°C. The supernatant was transferred to a new tube, to which sodium acetate (1/10 v/v) and cold isopropanol (2/3 v/v) were added, and incubated overnight in a freezer at -20°C. After incubation, it was centrifuged during 30 minutes at 13000 xg and 15°C. Afterwards, the pellet was washed twice with 500 uL of ethanol. Once dry, the pellet was resuspended in 60 uL of Milli Q water.

#### **Protocol 05 – Mogg and Bond (2003)**

The samples were incubated overnight at 37°C in buffer solution containing SDS and NaCl. Subsequently, 520 uL of NaCl 5M was added and the samples were centrifuged for 5 minutes, 3000 xg, at 15°C. The supernatant was transferred to a new tube, to which 800 uL of isopropanol 85% was added and the solution was homogenized by inversion. The samples were incubated at 4°C for 3h. They were centrifuged at 10000 xg for 3 minutes at 15°C and subsequently, the samples were washed with alcohol 70%. Once dry, the pellet was resuspended in 60 uL of Milli Q water.

### **Protocol 06 – Barnwell et al. (1998)**

The samples were incubated at 65°C for 1h in buffer solution containing CTAB 2%. After the incubation period they were centrifuged for 5 minutes at 10000 xg and 15°C. The supernatant was transferred to a new tube, to which NaCl 0.7M (1/10 v/v) was added, as well as 1.25X of the original leaf tissue volume of the precipitation buffer CTAB 1%. The samples were mixed by inversion and incubated for 30 minutes at room temperature. They were centrifuged for 15 minutes at 10000 xg at 15°C and subsequently the supernatant was discarded. 3.0 uL of saturated TE buffer and 400 uL of ethanol 100% were added. The material was incubated for 1h in a freezer at -20°C. It was centrifuged for 10 minutes at 10000 xg at 15°C. The pellet was washed with alcohol 70%. Once dry, the pellet was resuspended in 60 uL of Milli Q water.

### **Quantifying the DNA**

The quality of the DNA samples was assessed in agarose gel 1% (m/v) by electrophoresis (90 minutes in a 90 V electric current) and visualized with an EZ Vision buffer (according to the manufacturer's specifications) in a Kodak photodocumentation system, with incidence of UV light. In order to quantify the DNA concentration (n/uL), we adopted an intact Lambda molecular weight marker as standard (undigested Lambda DNA). In order to standardize and improve the reliability of comparing the efficiency of tested protocols, the quantification of DNA samples was also carried out by means of a spectrophotometric reading using 1uL aliquots of Genomic DNA with a NanoDrop™ spectrometer (NanoDrop Technologies), adopting the

manufacturer's recommendations. The concentration of DNA was estimated from absorbance at 260nm. The relationship between nucleic acids and proteins present in the sample was estimated by the relation between absorbance rates at 260 and 280nm (A260/A280) (Sambrook and Russell, 2001).

### **Liquid nitrogen influence assessment test**

Tests were carried out for the protocols that displayed the best results (intact DNA with concentrations over 200 ng/uL) to determine the influence of the use of liquid nitrogen in breaking the physical barriers inherent to the maceration process and initial exposure of the cell contents to the detergents.

### **Amplification tests**

**Primer tests:** ISSR and RAPD primers were tested with base in the methods used by Santos et al. (2011) and Williams et al. (1990) in initial amplification via PCR in three individuals from natural populations of Contendas do Sincorá city, Bahia. The amplifications with both primers were conducted in a MJ 96 thermocycler (Biocycler) at a total volume of 15 uL containing 15 ng of the DNA extracted, PCR buffer 1X (20 mM Tris HCl [pH 8.4] and 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM of each dNTP, 1 μM primer and 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

**Amplification reactions via PCR:** The amplification program adopted was the one chosen for ISSR reactions by Santos et al. (2011) with slight modifications, such as: 94 °C for 5 min, followed by 34 cycles [94° C for 50 seconds, 48 °C for 50 seconds and 72 °C for 1 min], with the final extension at 72 °C for 5 min, and

finalizing with 12 °C indefinitely. The amplification products were separated by electrophoresis in agarose gel 2% (m/v) in running buffer TBE 1X, at a constant voltage of 120 V for approximately two hours.

Gel staining and the acquisition of images were carried out as described for the quantification of nucleic acids, based on the use of EZ Vision buffer and Kodak photodocumentation system. The molecular weight marker 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) was used on all runs.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Although the DNA extraction buffers assessed (based on the use of CTAB, SDS, mannitol and sorbitol) are established for different species (Ojeda, 2012; Souza, 2012; Mogg and Bond, 2003; Štorchová et al., 2000) they differ in their efficiency in obtaining *Croton linearifolius* genomic DNA (Figure 1A and Table 2).

Protocol 01, which is based on the isolated use of SDS for digestion of the membranes, was not efficient for extraction, in view of the absence of bands detectable in agarose gel (Figure 01A) and low concentration of DNA detectable in spectrometry (46.7ng/uL). In contrast with the results obtained for protocol 01, a high concentration of DNA was observed when protocols 02, 04 and 06 were adopted (approximately 866ng/uL) (Table 02). Significant concentration of DNA was observed, albeit in smaller quantity, with the use of protocol 05 (approximately 560ng/uL). Protocols 02, 04 and 06 have the use of detergent CTAB in common, which although present in protocol 03, where a reduced quantity of DNA was observed (approximately 270 ng/ul), is used in the latter in a smaller concentration and for a short period of time.

The use and special efficiency of these detergents (CTAB and SDS) with plant species is reported in literature, where it is possible to observe the indication of such detergents for different groups of plants (Romano and Brasileiro, 1999). As an example, we can quote the use of SDS for *Oryza sativa* (rice) (Caverzan, 2008), as well as of CTAB for *Passiflora cincinnata* (wild passion fruit) (Cerqueira-Silva et al., 2012) and *Theobroma cacao* (cacao) (Santos et al., 2012).

The protocols that had the best results in obtaining DNA (protocols 02, 04 and 06) showed no differences in the tests performed for extractions conducted with and without the presence of liquid nitrogen during the physical barrier breaking phase (maceration of the samples). Therefore, it is possible to infer that in the case of 'velame pimenta' the use of liquid nitrogen does not bring about real benefits for DNA extraction.

With the exception of protocol 1, the DNA amplification tests using ISSR primers showed bands for amplifications performed with DNA obtained with the tested protocols (Figure 1B). In short, the amplifications performed attest to the quality of the DNA extracted for these protocols, in view that the use of inadequate protocols would result in an absence of amplifications, as observed for tests performed with protocol 1 (data not shown), or still, bands difficult to evaluate, as reported for *Dimorphandra mollies* by Novais et al. (2009).

## **CONCLUSIONS**

The choice of protocols and the use of different detergents interfere in the result of genomic DNA extraction for 'velame pimenta' (*C. linearifolius*). Buffer CTAB was the most efficient, whereas the use of liquid nitrogen proved

to be a non-obligatory factor for obtaining DNA in adequate quantity and quality for PCR platform procedures.

The work adds to the actions of the 'BioGen' research group, with the objective of performing molecular studies that enable molecular genetic characterizations of native Caatinga species.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

To Master's degree candidate Alisson Maia de Souza for his contributions during sampling and laboratory activities and to Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG – Center of Molecular Biology and Genetic Engineering) of Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) for the availability of equipment used for quantification.

### **REFERENCES**

Abreu AS, Barbosa PS, Muller AH, Guilhon GMSP (2001). Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var. *glabrior* (Euphorbiaceae). Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA. 1: 1-9.

Almeida-Cortez JS, Cortez PHM, Franco JMV Uzunian A (2007). Caatinga – coleção biomas do Brasil. Harbra. São Paulo.

Barnwell P, Blanchard AN, Bryant JA Smirnoff N (1998). Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant *Sedum telephium*. Plant Mol. Biol. Rep. 16: 133-138.

Caverzan, A (2008). Caracterização funcional dos genes de ascorbato peroxidase de arroz (*Oryza sativa L.*) nas interações entre estresses oxidativos e estresses abióticos. Master's thesis, Programa de Pós graduação em biologia celular e molecular, UFRGS, Porto Alegre.

Cerqueira-Silva CBM, Santos ESL, Souza AM, Mori GM, Oliveira EJ, Correa RX Souza AP (2012) . Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). Am J Bot. 99: 170-172.

Cunha e Silva SL, Carvalho MG, Gualberto SA, Carneiro-Torres DS, Vasconcelos KCF Oliveira NS (2010). Bioatividade do extrato etanolico do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). Acta Veterinaria Brasilica. 4: 252-258.

Doyle JJ and Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 11-15.

Lima LR, Pirani JR (2008). Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). Biota Neotrop. 82:177-231.

Mogg RJ, Bond JM (2003). A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants. Mol. Ecol. Notes 3: 666-668.

Moreira PA, Oliveira DA (2011). Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. *Genet. Mol. Res.* 10: 353-358.

Novaes RM, Rodrigues JG, Lovato MB (2009). An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genet. Mol. Res.* 8: 86-96.

Ojeda GN, Amavet PS, Rueda EC, Siroski PA (2012). DNA extraction from skins of wild (*Hydrochoerus hydrochaeris* and *Pecari tajacu*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) species using a novel protocol. *Genet. Mol. Res.* 11: 672-678.

Pinto JAO, Blank AF, Cruz EMOIB, Goes SS, Fontes SA, Mann RS, Blank M de FA (2011). Caracterização molecular (RAPD) de acessos de alecrim-detabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer). *Scientia Plena.* 7: 1-6.

Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 8-15.

Prado D (2003). As caatingas da América do Sul. In: *Ecologia e conservação da Caatinga* (Leal IR, Tabarelli M and Silva JMC, eds.). Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 3-73.

Randau KP, Florêncio DC, Ferreira CP, Xavier HS (2004). Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). Rev. Bras. Farmacogn. 4: 89-96.

Romano E, Brasileiro ACM (1999). Extração de DNA de plantas. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. 9: 40 - 43.

Russell A, Samuel R, Rupp B, Barfuss MHJ (2010). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandeeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. Taxon 59: 389- 404.

Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Santos LF, Oliveira EJ, Silva AS, Carvalho FM, Costa JL, Padua JG (2011) ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in Passiflora. Biochem Genet. 49: 540-554.

Santos ESL, Cerqueira-Silva CBM, Mori GM, Ahnert D, Corrêa RX, Souza AP, Cerqueira-Silva CBM (2012). New polymorphic microsatellite loci for *Theobroma cacao*: isolation and characterization of microsatellites from enriched genomic libraries. Biologia Plantarum. 56: 789-792.

Silva JS, Sales SMF, Carneiro-Torres DS (2009). O genero *Croton* na microregião do vale do Ipanema. Rodriguésia 60: 879-901.

Sousa FMS, Mendes RFM, Mendes RFM, Neto RBA, Nascimento MPSC, Lima PSC (2011). Similaridade genética entre acessos de angico de bezerro (*Piptadenia moniliformis* Benth.) por meio de marcadores RAPD. Proceedings of the III International Symposium on Forage Breeding. Bonito, 97-99.

Souza HAV, Muller LAC, Brandão RL, Lovato MB (2012). Isolation of high-quality DNA of *Dimorphandra mollis*. Genet. Mol. Res. 11: 756-764.

Štorchová H, Hrdličková R, Chrtěk J, Tetera M (2000). An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. Taxon 49: 79-84.

Sunnucks P, Hales DF (1996). Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus Sitobion (Hemiptera: Aphididae). Mol. Biol. Evol. 13: 510-524.

Tai TH, Tanksley SD (1990). A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. Plant Mol. Biol. Rep. 8: 297-303.

Tabarelli M, Gascon C (2005). Lessons from Fragmentation Research: Improving Management and Policy Guidelines for Biodiversity Conservation. Conservation Biol. 19: 734-739.

Torres MCM (2008). Estudo Químico e Biológico de *Croton regelianus* Var. *matosii* (Euphorbiaceae). Master's thesis, UFC, Fortaleza.

Velloso AL, Sampaio EVSB, Pareyn FGC (2002). Ecorregiões propostas para o Bioma Caatinga. Resultados do Seminário de Planejamento Ecorregional da Caatinga. Recife. Associação Plantas do Nordeste. The Nature Conservancy do Brasil. ([http://www.mma.gov.br/estruturas/203/arquivos/ecorregioes\\_site\\_203.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/203/arquivos/ecorregioes_site_203.pdf)).

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

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, et al. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

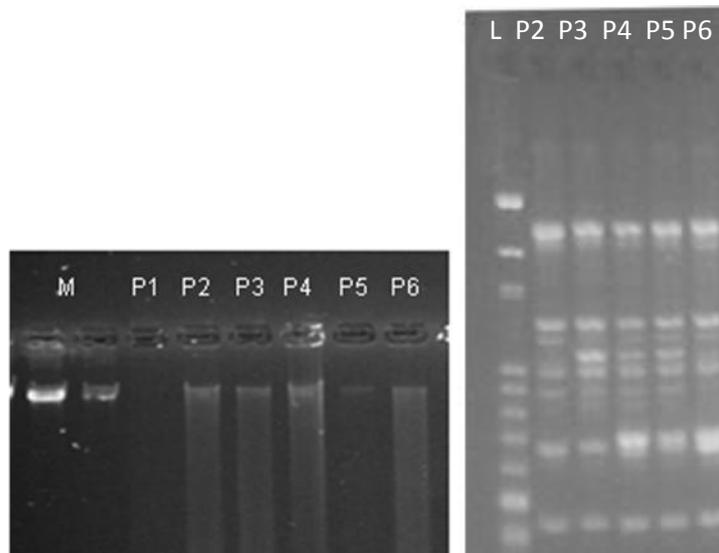
**Table 1.** Description of the buffer solution used in the protocol available for DNA extraction from *Croton linearifolius*.

<b>Buffer</b>	<b>References</b>	<b>Solution</b>
Extraction buffer SDS 10%	Sunnucks and Hales (1996)	100 mM Tris, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10% sodium sulfate dodecyl, 50 $\mu$ g/mL Proteinase K and 50 $\mu$ g/mL RNase
Extraction buffer CTAB 5%	Modified method Cerqueira-Silva (2009)	5% (w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1% (w/v) PVP
Extraction buffer with Manitol	Modified method Storchova et al. (2000)	100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM EDTA, pH 8.0, 0.35 M mannitol and 0.3% b-mercaptoethanol
Lysis buffer		200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM EDTA, pH 8.0, 2 M NaCl, 2% (w/v) CTAB
Extraction buffer with Sorbitol	Modified method Russel et al. (2010)	100mM Tris, 350mM sorbitol, 5 mM EDTA, 1% PVP
Extraction buffer SDS and NaCl	Mogg and Bond (2003)	100 mM Tris, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0.7% sodium dodecyl sulfate, 50 $\mu$ g/mL Proteinase K and 50 $\mu$ g/mL RNase
Extraction buffer CTAB 2% and NaCl		2% (w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1% (w/v) PVP
Precipitation buffer	Barnwell et al. (1998)	50 mM Tris-HCl, 10mM EDTA, CTAB 1%
Saturated TE buffer		10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1M NaCl

**Table 02.** Description of the results observed from the spectrophotometric reading (NanoDrop Technologies) performed with 1uL of genomic DNA samples of 'velame pimenta' (*Croton linearifolius*) obtained with the use of different protocols.

<b>Protocols evaluated</b>	<b>Concentration (ng/uL) (% CV)</b>	<b>260/280 (% CV)</b>	<b>260/230 (% CV)</b>
Protocol 1 (Sunnucks and Hales 1996)	46.7 (15%)	2.5 (10%)	0.6 (18%)
Protocol 2 (Cerqueira-Silva 2009)	873.1 (2%)	2.5 (6%)	1 (1%)
Protocol 3 (Storchova et. al. 2000)	276.7 (5%)	3.9 (1%)	0.3 (32%)
Protocol 4 (Russel et al. 2010)	879.3 (6%)	3.5 (2%)	0.6 (21%)
Protocol 5 (Mogg e Bond 2003)	558.6 (20%)	3 (1%)	1 (11%)
Protocol 6 (Barnwell et al. 1998)	847.1 (22%)	2.2 (3%)	1.3 (11%)

CV = coefficient of variation.



**Figure 01.** Gel agarose (1%) for the quantification of ‘velame pimenta’ (*Croton linearifolius*) DNA extracted with protocols previously described in literature (left); Agarose gel (3%) showing amplification result of fragments obtained with primer ISSR. Gel presenting Standard molecular weight (400 and 200 ng / uL), followed by DNA samples obtained from six different extraction protocols [left figure]; Gel Ladder presented, followed by amplification results of RAPD primers, used as template DNA obtained from five different extraction protocols [right figure].

#### 4.CAPÍTULO III

**Artigo formatado para submissão**  
**Periódico: Genetics and Molecular Resource**

**Comparison of Methodologies for Estimates of Molecular Genetic Diversity in Genus *Croton*: Influence of Coefficients, Clustering Strategies and Data Projection.**

M.M. Scaldaferr<sup>12</sup>, J.S. Freitas<sup>1</sup>, J.G.P. Vieira<sup>1</sup>, Z.S. Gonçalves<sup>1</sup>, A. M. Souza<sup>1</sup>, C.B.M. Cerqueira-Silva<sup>12</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Molecular Genetics, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratory of general biology and botany, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, Brasil.

**Corresponding author:** C.B.M. Cerqueira-Silva

**E-mail:** [csilva@uesb.edu.br](mailto:csilva@uesb.edu.br)

**ABSTRACT.** We investigated 10 similarity coefficients (and dissimilarity) in a set 40 wild genotypes of *Croton linearifolius* submitted to analyses with hierarchical grouping methods, grouping methods by optimization and data projection in two-dimensional space. Genotypes were characterized through of analyze DNA polymorphism with the use of 23 ISSR markers and 12 RAPD markers. The distance measurements were compared by the Spearman correlation test, projection in two-dimensional space and grouping efficiency. The Spearman correlation among the ten coefficients evaluated were significant ( $P < 0.001$ ) and indicate significant changes in genotype ranking due to type of coefficient used ( $0.76 \leq r_s \leq 1$ ). Wide variation was also observed in the efficiency of clustering methods, being the unweighted pair group method with arithmetic mean the method most adequate ( $0.5 \leq D \leq 1.5$ ;  $0.41 \leq r_c \leq 0.77$ ;  $5.9 \leq S \leq 10.5$ ). Projection efficiencies in two-dimensional space showed elevated stress values ( $65 < S < 89\%$ ). Similar to the results observed for hierarchical clustering methods and for projection in two-dimensional space, the formation of groups with grouping methods by optimization showed variations when using different coefficients. We understand that the results confirm the influence of the coefficients in studies of genetic diversity, being necessary the use of criteria and standards for selecting appropriate methods for genetic studies of the genus *Croton*.

**Key words:** Grouping analysis; Genetic divergence; Multivariate statistics; Molecular markers.

## INTRODUCTION

The Caatinga biome is distributed along the Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí and the north of Minas Gerais states (Almeida-Cortez et al., 2007). Although there is not an authoritative list with the number of Caatinga species, studies indicate to the flora and vegetation of this biome has approximately register approximately 600 species, with approximately 200 endemic species (Tabarelli, 2005).

Among the wild species of Caatinga are those that belong to the genus *Croton*. Many *Croton* species are recognized are known to have properties chemical and/or pharmacological and described as having medicinal potential (Souza et al., 2006; Palmeira Junior et al., 2006). In this context, its extracts are used popularly for various purposes. Among the species of *Croton*, the *C. linearifolius* presents the popular use as natural insecticide in Bahia's semiarid region (Cunha e Silva et al., 2010).

However, despite its potential use as natural insecticide genetic studies with *C. linearifolius* are limited to tests protocols for DNA extraction (Scaldaferri et al., 2013) well as preliminary studies of genetic diversity (Cerqueira-Silva CBM, personal communication). Although there are genetic studies to other species of the genus *Croton*, such studies are also limited, example of research conducted by Angelo et al. (2006) in *C. cajucara* based on RAPD markers, Benjamin et al. (2006) in *C. alabamensis* based on AFLP markers.

Specifically for conducting genetic studies aiming characterize the diversity of plants, is remarkable the growth and improvement of molecular techniques. In this context, it is possible to highlight the use of co-dominant (Restriction fragment length polymorphism - RFLP and Simple Sequence Repeats - SSR) and dominant (random amplification of polymorphic DNA – RAPD; Amplified fragment length polymorphism – AFLP; Inter-Simple Sequence Repeat - ISSR) markers. Numerous statistical methodologies for data analysis related to estimates of genetic diversity, as well as for graphical presentation of these estimates are also available.

Among the statistical methods used for diversity studies are (i) similarity coefficients (and similarity), (ii) hierarchical grouping methods and grouping methods by optimization, and (iii) data projection in two-dimensional space (Dias, 1998; Duarte et al., 1999; Mohammadi and Prasanna, 2003). In view of the large number of statistical methods available in the literature and the fact that existing comparative studies reveal that the choice of statistical methods can affect the results (Meyer et al., 2004; Gonçalves et al., 2008; Cerqueira-Silva et al., 2009; Sesli and Yegenoglu, 2010; Alves et al., 2012), becomes important to establish criteria for choosing appropriate statistical methodologies to the reality of each study to be conducted.

Considering that coefficients and cluster methods used in genetics analysis data may influence in the results obtained and that there are no studies related to the efficiency of these methods for species of genus *Croton*, we evaluated the influence of 10 coefficients, eight clustering methods, as well as the efficiency projection in twodimensional space in the characterization of the diversity of 40 wild genotypes of *Croton linearifolius*, based on ISSR and RAPD markers.

## MATERIAL AND METHODS

### Obtaining of genotypes and DNA extraction

Young leaf tissue was collected from 40 wild genotypes of *Croton linearifolius* (popularly known in Brazil as 'Velame pimenta') at National Forest Contendas Sincorá, the city of Contention Sincorá, Bahia, Brazil, and stored in an ultra-cold freezer at the Applied Molecular Genetics Laboratory of *Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia* – UESB, Itapetinga, BA. In order to standardize the DNA extraction, 0.2 g of leaf tissue was used in each extraction.

Genomic DNA used in this study was extracted according to the method described by Doyle and Doyle (1990), using routines and modifications described by Scaldaferrri et al., (2013), and belong to the genomic DNA bank of the Applied Molecular Genetics Laboratory, UESB.

### Obtaining of molecular data

Genotyping was performed through of analyze DNA polymorphism with the use of 23 ISSR primers (DiCA 3G, DiCA 3RG, DiGA 3C, DiGA 3RC, DiGA 3T, TriCAC 3RC, TriCAC 5CY, TriCAG 3RC, TriTGT 3YC, TriAAR 3RC, TriAAG 3RC, TriACG 3RC, TriAGA 3RC, TriCGC 3RC e TriGAC 3RC) and 12 RAPD primers (OPD-01, OPD-03, OPD-05, OPD-06, OPD-08, OPD-10, OPD11, OPD13, OPD15, OPD-16, OPD-18 e OPD-20). These primers were preliminarily selected among the 23 ISSR primers and 40 RAPD primers that comprise the Operon© OPD series, since they result in the best standards of amplification (data not shown). In order to increase the reliability of data, genotyping were always performed by two researchers.

Amplification reactions with ISSR and RAPD primers were performed according to Santos et al. (2011) and Williams et al. (1990), respectively, using a MJ 96 thermocycler (Biocycler). Amplification products were then mixed with an EZ Vision buffer (according to the manufacturer's specifications) and separated by electrophoresis in agarose gel 2% (m/v) submerged in Tris-borate and EDTA buffer (TBE 1X), at a constant voltage of 120 V for approximately two hours. Finally, the gels were exposed to ultraviolet light and visualized in a Kodak photodocumentation system.

With the evaluation of gels by two researchers was constructed a binary data matrix (being 0 for absence and 1 for the presence of bands).

### Statistical analyzes

To genetic estimate, with binary data, the complement of Distance Sokal (S), as well as, simple matching (SM), Rogers e Tanimoto (RT), Sokal e Sneath (SS), Russel e Rao (RR), Jacard (J), Sorensen-Dice (SD), Ochiai (O), Baroni; Urbani e Buser (BUB) e Índice II (I - II) coefficients were obtained (Table 1). Aiming to verify the existence of difference in genotype ranking, observed with the use 10 coefficients used in this study, were performed estimates of Spearman (rs) correlation.

The use of different hierarchical clustering methods [closest neighbor (CN); farthest neighbor (FN), Ward method (W), weighted pair-group method using arithmetic averages (WPGMA), average linkage in groups (ALG), unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA), Gower method (WPGMC) e Centroid method (UPGMC)]. Distortion values (D), cophenetic correlation coefficient ( $r_c$ ) and stress (S), were used as parameters for evaluate the efficiency of grouping methods and data projection in two-dimensional space. Stress level (%) observed from the grouping and projections were classified according to Kruskal (1964), as follows: unsatisfactory ( $S \geq 40\%$ ), regular ( $20\% \leq S < 40\%$ ), good ( $10\% \leq S < 20\%$ ), excellent

( $5\% \leq S < 10\%$ ) and perfect ( $0\% \leq S < 5\%$ ). Grouping methods by optimization (Tocher's and Tocher's modified method), contained in the Genes program (Cruz, 2006), was also evaluated.

Estimates of similarity, projection in two-dimensional space, estimates of  $D$ ,  $r_c$ ,  $S$ , and Grouping methods by optimization were carried out using the Genes program (Cruz, 2006). In turn, for correlation analyses the BioEstat 5.0 program was used (Ayres et al., 2005).

## RESULTS AND DISCUSSION

The Spearman correlation among the ten coefficients evaluated were elevated and significant ( $r_s \geq 0.95$ ;  $P < 0.001$ ) for most of the correlations evaluated, the example of values observed between DB and CS, RT and SS (Table 2). However, significant changes in genotype ranking are expected from the values of correlation observed between RR and DB, CS, RT, SS, among others ( $0.76 \leq r_s \leq 0.89$ ,  $P < 0.001$ ). Variations in correlation values were also observed in studies comparing similarity coefficients in Maize (*Zea mays* L.) (Meyer, 2004) and passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) (Cerqueira-Silva et al., 2009), showing variation in the values of correlation 0.74 to 1 and 0.31 to 1, respectively.

In relation to distances estimated based on 10 coefficients, the projection efficiencies in two-dimensional space displayed elevated stress values ( $65 < S < 89\%$ ) (Table 3). These stress values, according to the classification of Kruskal (1964), are considered inadequate for projection in two-dimensional space, based on the matrix of binary data from dominant markers, in *C. linearifolius*. However, considering the values of cophenetic correlation for *C. linearifolius*, the best results were observed in Russel and Rao ( $r_c = 0.57$ ) and Ochiai ( $r_c = 0.55$ ) coefficients. Contrasting results in relation the projection of the genetic distances in two-dimensional are available in the literature, such as the high levels of stress of these projections in studies with passion fruit ( $54 < S < 75$ ), based on RAPD markers (Cerqueira-Silva et al. 2009) and lower values in studies with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ( $11 < S < 57$ ), based on RAPD markers (Duarte et al., 1999) and with mango (*Mangifera indica* L.) ( $17 < S < 23$ ), based on fruit physicochemical descriptors (Alves et al., 2012).

The different combinations between 10 coefficients and the eight hierarchical clustering methods have generated distinct results concerning the efficacy of the grouping data in presenting the distance original data ( $-32370 \leq D \leq 55.1$ ;  $0.10 \leq r_c \leq 0.77$ ;  $5.9 \leq S \leq 1703$ ) (Table 4). In synthesis, the methods WPGMA ( $0.41 < r_c < 0.75$ ;  $-26.19 < D < 2.52$ ;  $6.3 < S < 18.95$ ) and UPGMA ( $0.41 < r_c < 0.77$ ;  $0.36 < D < 1.59$ ;  $5.99 < S < 12.61$ ) were the ones that showed the best results for *C. linearifolius*. In turn, the Ward method showed the most unsatisfactory results ( $0.27 < r_c < 0.62$ ;  $-20379 < D < 32370$ ;  $1333 < S < 1703$ ). Similar results were found by Gonçalves et al. (2008) in studies with tomato accessions and by sesli and Yegenoglu (2010) in studies with wild olives. In general terms results corroborate with the fact presented by Mohammadi et al. (2003) in that the UPGMA is among agglomerative hierarchical methods most commonly used.

Similar to the results observed for hierarchical clustering methods and for projection in two-dimensional space, the formation of groups with grouping methods by optimization (Tocher's and Tocher's modified method) showed variations when using different coefficients (data not shown). Variations in the results from clustering by optimization methods were also observed by Alves et al. (2012) and Duarte et al. (1999)

demonstrating the importance of the choice of coefficients to be used in estimating the similarity (or dissimilarity), since this choice influences the results of grouping, regardless of the method chosen for training groups. Should be alert to the fact that the combined use of hierarchical clustering methods and by optimization are commonly observed in the literature, the example of works of Duarte et al. (1999), with common bean, Bertan et al. (2006), and with wheat genotypes; Alves et al. (2012), with progenies of mango.

In order to check the consistency of results to other species of the genus *Croton*, the evaluations performed with *C. linearifolius* were also performed in bouts of *C. heliotropiifolius* (belonging to the genomic DNA bank of the Applied Molecular Genetics Laboratory, UESB) and observed the same patterns of results (data not shown).

Considering the results obtained in this study, as well as discussions available in literature about the choice of coefficients and clustering methods for genetic studies of plants, we understand that the results confirm the influence of the coefficients in studies of genetic diversity, which can lead to difficulties in comparisons between different results of research. Therefore is necessary to use criteria and standards for selecting appropriate methods for genetic studies of the genus *Croton*, being possible to identify clearly inadequate methodological strategies for evaluating genetic data in *Croton*, at least based on molecular data considered in this study.

## ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by UESB, CNPq and Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais of UESB (*Campus* Itapetinga, BA). Professor Elisa Susilene Lisboa dos Santos contributed to this study during the writing of this article. This study is part of the Master's dissertation of M. M. Scaldaferrri.

## REFERENCES

Almeida-Cortez JS, Cortez PHM, Franco JMV and Uzunian A (2007). *Caatinga – coleção biomas do Brasil*. Harbra. São Paulo. 64.

Alves EOS, Cerqueira-Silva CBM, Souza AM, Santos CAF, Lima Neto FP, Corrêa RX (2012) Comparison of efficiency of distance measurement methodologies in mango (*Mangifera indica*) progenies based on physicochemical descriptors. *Genet. Mol. Res.* 11: 591-596.

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.

Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL and Santos AS (2005). Programa BioEstat 5.0. Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.

Benjamin WVEE, Nicolas J, Paul EB, Andrew LHIPP (2006). Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. *Molecular Ecology*. 15: 2735–2751

Bertan I, Carvalho FIF, Oliveira AC, Vieira EA, Hartwig I, Silva JAG, Shimidt DAM, Valério IP, Busato CC, Ribeiro G (1999) Comparison of clustering methods representing morphological distances between Wheat genotypes. *R. Bras. Agrociência*. 12: 279-286.

Cerqueira-Silva CB, Cardoso-Silva CB, Conceicao LD, Nonato JV, et al. (2009). Comparison of coefficients and distance measurements in passion fruit plants based on molecular markers and physicochemical descriptors. *Genet. Mol. Res.* 8: 870-879.

Cruz CD (2006). Programa Genes: Análise Multivariada e Simulação. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Cunha e Silva SL, Carvalho MG, Gualberto SA, Carneiro-Torres DS, Vasconcelos KCF and Oliveira NS (2010). Bioatividade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Acta Veterinaria Brasilica*. 4: 252-258.

Doyle JJ and Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Dias LAS (1998). Análises Multidimensionais. In: Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins: Fundamentos e Aplicações em Plantas e Microrganismos (Alfenas AC, ed.). Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 405-476.

Duarte JM, Santos JB and Melo LC (1999). Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genet. Mol. Biol.* 22: 427-432.

Gonçalves LS, Rodrigues R, Amaral AT Jr, Karasawa M, et al. (2008). Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. *Genet. Mol. Res.* 7: 1289-1297.

Kruskal J (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* 29: 1-27.

Meyer AS, Garcia AAF, Souza AP, Souza CL Jr, et al. (2004). Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L). *Genet. Mol. Biol.* 27: 83-91.

Mohammadi SA and Prasanna BM (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.* 43: 1235-1248.

Palmeira Júnior SF, Alves VL, Moura FS, Vieira LFA, Conserva LM, Lemos RPL (2006). Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 16: 397-402.

Scaldeferri MM, Cerqueira-Silva CBM, Freitas JS (2012) Comparação de Protocolos para Extração de DNA Genômico de velame pimenta (*Croton linearifolius*), Espécie Nativa da Caatinga. In: II Congresso Brasileiro de Recurso Genéticos, 24–28 setembro SBRG (Sociedade Brasileira de recursos genéticos), Belém .

Scaldeferri MM, Freitas JS, Santos ESL, Vieira JGP, Gonçalves ZS, Cerqueira-Silva CBM (2013) Comparison of protocols for genomic DNA extraction from ‘velame pimenta’ (*Croton linearifolius*), a species native to the Caatinga, Brazil. *African Journal Biotechnology*. XX:XXX-XXX.

Sesli M and Yegenoglu ED (2010). Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis based on RAPD markers in wild olives. *Genet. Mol. Res.* 9: 2248-2253.

Santos LF, Oliveira EJ, Silva AS, Carvalho FM, Costa JL, Padua JG (2011) ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. *Biochem Genet.* 49: 540-554.

Souza MAA, Souza SR, Veiga Júnior VF, Cortez JKPC, Leal RS, Dantas TNC, Maciel MAM (2006). Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e determinação das suas propriedades fungicidas. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16: 599-610.

Tabarelli M, Gascon C (2005). Lessons from Fragmentation Research: Improving Management and Policy Guidelines for Biodiversity Conservation. *Conservation Biol.* 19: 734-739.

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, et al. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

**Table 1.** Similarity (and dissimilarity) coefficients used among 40 wild genotypes de *Croton linearifolius* genotyped with ISSR and RAPD markers.

**Table 2.** Spearman correlation coefficients between 10 coefficients related DNA amplifications with 15 ISSR and 12 RAPD primers, detected in 40 wild genotypes of *Croton linearifolius*.

**Table 3.** Efficacy of the projection of similarity (and dissimilarity) coefficients in two-dimensional space, in wild genotypes of *Croton linearifolius*, based on distortion percentage (D), correlation between the original and the projected (CCC) distance (D) and stress (S) values.

**Table 4.** Efficacy of five grouping methods (closest neighbor - CN; farthest neighbor - FN, Ward method - W, Median method - WPGMA, average linkage in groups - ALG, average linkage between groups - UPGMA, Gower method - WPGMC e Centroid method - UPGMC) from different similarity (and dissimilarity) coefficients in wild genotypes of *Croton linearifolius*, based on criteria of distortion percentage (D), cophenetic correlation ( $r_c$ ) and stress percentage values (S).

**Table 1.** Similarity (and dissimilarity) coefficients used among 40 wild genotypes de *Croton linearifolius* genotyped with ISSR and RAPD markers.

Coefficient	Expression	Interval
Distance Sokal (S)	$[(b+c)/(a+b+c+d)]^{1/2}$	0-1
Simple matching (SM)	$(a+d)/(a+b+c+d)$	0-1
Rogers e Tanimoto (RT)	$(a+d)/[a+2(b+c)+d]$	0-1
Sokal e Sneath (SS)	$2(a+d)/[2(a+d)+b+c]$	0-1
Russel e Rao (RR)	$a/(a+b+c+d)$	0-1
Jacard (J)	$a/(a+b+c)$	0-1
Sorensen-Dice (SD)	$2a/(2a+b+c)$	0-1
Ochiai (O)	$a/[(a+b)(a+c)]^{1/2}$	0-1
Baroni; Urbani e Buser (BUB)	$[a+(ad)^{1/2}]/[a+b+c+(ad)^{1/2}]$	0-1
Index II (I - II)	$0,5[a/(a+b)+a/(a+c)]$	0-1

a=1-1   b=1-0   c=0-1   d=0-0

**Table 2.** Spearman correlation coefficients\* between 10 coefficients related DNA amplifications with 15 ISSR and 12 RAPD markers, detected in 40 wild genotypes of *Croton linearifolius*.

Coefficient	DB	CS	RT	SS	RR	J	D	O	BUB	I-II
Distância Binária – DB	1.00									
Coincidência Simples - CS	1.00	1.00								
Rogers and Tanimoto - RT	1.00	1.00	1.00							
Sokal and Sneath – SS	1.00	1.00	0.99	1.00						
Russel and Rao – RR	0.77	0.76	0.77	0.76	1.00					
Jacard – J	0.89	0.89	0.89	0.89	0.97	1.00				
Dice – D	0.88	0.89	0.88	0.89	0.97	1.00	1.00			
Ochiai – O	0.88	0.88	0.88	0.88	0.96	1.00	1.00	1.00		
Baroni, Urbani and Buser – BUB	0.98	0.98	0.98	0.98	0.86	0.96	0.96	0.96	1.00	
Índice II - I-II	0.88	0.88	0.88	0.88	0.96	0.99	0.99	1.00	0.95	1.00

\*All correlation coefficients in the table are highly significant ( $P < 0.001$ ).

**Table 3.** Efficacy of the projection of similarity (and dissimilarity) coefficients in two-dimensional space, in wild genotypes of *Croton linearifolius*, based on distortion percentage (D), correlation between the original and the projected ( $r_c$ ) distance (D) and stress (S) values.

Coefficients	<i>Croton linearifolius</i>		
	$r_c$	D	S
Distância Binária – DB	0.22	78.93	81.24
Coincidência Simples – CS	0.28	67.32	70.37
Rogers and Tanimoto – RT	0.24	74.73	77.18
Sokal and Sneath – SS	0.30	60.86	65.03
Russel and Rao – RR	0.57	79.15	81.20
Jacard – J	0.37	72.47	75.11
Dice – D	0.42	65.24	68.64
Ochiai – O	0.55	64.68	67.53
Baroni, Urbani and Buser – BUB	0.32	67.10	70.28
Índice II - I-II	0.53	64.64	67.69

**Table 4.** Efficacy of five grouping methods (closest neighbor - CN; farthest neighbor - FN, Ward method - W, weighted pair-group method using arithmetic averages - WPGMA, average linkage in groups - ALG, unweighted pair-group method using arithmetic averages - UPGMA, Gower method - WPGMC e Centroid method - UPGMC) from different similarity (and dissimilarity) coefficients in wild genotypes of *Croton linearifolius*, based on criteria of distortion percentage (D), cophenetic correlation ( $r_c$ ) and stress percentage values (S).

Agrupamentos																								
Coefficient*	CN			FN			W			WPGMA			ALG			UPGMA			WPGMC			UPGMC		
	$r_c$	D	S	$r_c$	D	S	$r_c$	D	S	$r_c$	D	S	$r_c$	D	S	$r_c$	D	S	$r_c$	D	S	$r_c$	D	S
DB	0.24	38.0	23.9	0.25	-80.5	38.7	0.30	-31829	1688	0.41	-3.0	11.6	0.32	6.4	12.1	0.41	1.3	11.41	0.37	55.1	35.24	0.10	18.86	16.90
CS	0.25	32.4	19.9	0.26	-57.4	28.8	0.31	-31822	1688	0.42	-2.5	9.4	0.33	5.0	9.8	0.42	0.8	9.19	0.37	54.7	34.14	0.11	15.33	13.82
RT	0.24	41.2	26.2	0.25	-91.7	43.3	0.29	-30800	1659	0.41	-3.1	12.9	0.32	7.2	13.4	0.41	1.5	12.61	0.37	54.8	35.50	0.10	20.80	18.61
SS	0.26	22.7	13.5	0.28	-32.8	17.4	0.33	-32370	1703	0.42	-2.6	6.3	0.35	3.2	6.4	0.44	0.3	5.99	0.34	55.3	33.78	0.12	10.09	9.17
RR	0.71	49.0	30.9	0.67	-58.8	30.8	0.62	-20379	1333	0.75	-26.1	18.9	0.74	26.7	19.0	0.77	1.5	12.52	0.74	42.5	27.22	0.69	48.31	30.60
J	0.54	45.2	28.5	0.35	-78.2	38.6	0.28	-30531	1652	0.64	-17.9	16.1	0.42	13.7	15.8	0.66	1.4	12.12	0.64	47.9	30.32	0.50	43.72	27.78
D	0.56	34.3	20.7	0.36	-46.8	24.7	0.27	-31681	1684	0.64	-11.8	10.9	0.43	9.3	11.0	0.66	0.7	8.51	0.64	50.9	31.00	0.51	32.90	20.14
O	0.61	32.4	19.5	0.24	-50.7	26.8	0.32	-30828	1660	0.67	-11.6	10.4	0.52	11.2	10.9	0.70	0.6	7.99	0.66	51.4	31.26	0.57	30.94	18.87
BUB	0.35	32.5	19.8	0.25	-56.1	28.3	0.29	-32357	1703	0.50	-7.9	10.2	0.33	5.6	9.9	0.53	0.7	8.68	0.46	53.7	33.22	0.23	27.98	17.80
Índice II	0.65	30.4	18.3	0.24	-46.7	25.2	0.33	-30595	1654	0.70	-10.8	9.8	0.55	11.7	10.8	0.72	0.5	7.62	0.70	51.6	31.30	0.62	28.95	17.61

\* The coefficients presented follow the order and nomenclature presented in the previous tables.

## 5. CAPÍTULO IV

### Estimativa de diversidade genética entre genótipos silvestres de *Croton* spp. mediante uso de marcadores moleculares

MM Scaldaferrri<sup>1,2</sup>, JS Freitas<sup>2</sup>, Santos ESL<sup>1,2</sup>, JGP Vieira<sup>2</sup>, ZS Gonçalves<sup>2</sup>, CBM Cerqueira-Silva<sup>2,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Molecular Aplicada, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - BA, 45700-000, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Geral e Botânica, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga - BA, 45700-000, Brazil.

**RESUMO.** O gênero *Croton* pertence à família Euphorbiaceae e possui cerca de 1.200 espécies, algumas destas, conhecidas pelo seu potencial econômico, a exemplo de *C. heliotropifolius*, e *C. linearifolius*, que ocorrem no Brasil e possuem propriedades medicinais e bioinseticida, respectivamente. Em detrimento da importância econômica reconhecida, inexistem estudos moleculares acerca das bases genéticas destas duas espécies, o que prejudica o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação eficientes que possam auxiliar no uso sustentável destas. . Neste sentido, buscou-se estimar a diversidade a partir da análise de perfil de amplificação de 15 marcadores ISSR e 10 marcadores RAPD em genótipos de *C. linearifolius* e *C. heliotropifolius* coletados na Floresta Nacional (FLONA) no município de Contendas do Sincorá e na “Serra da Torre” município de Itapetinga, respectivamente. Os primers RAPD e ISSR selecionados apresentaram percentual médio de 98% e 96% de polimorfismo, respectivamente, para as espécies avaliadas. As estimativas geradas com o programa Structure indicam a presença de dois pools gênicos para ambas as espécies.

Palavras-Chave: RAPD, ISSR, *C.linearifolius*, *C.heliotropiifolius*

---

<sup>2</sup> Corresponding author. E-mail: csilva@uesb.edu.br. Tel: +55 77 3261-8677. Fax: +55 77 3261-8609.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Croton* pertence à família Euphorbiaceae com distribuição pantropical, sendo que cerca de 350 das quase 1.200 espécies que este gênero possui, podem ser encontradas no Brasil (Lima & Pirani, 2008).

Para Silva (2009), taxonomicamente, *Croton* deve ser classificado como árvores, arbustos, subarbustos e, menos frequentemente como ervas ou trepadeiras. Este é um gênero de difícil classificação taxonômica devido, principalmente a ampla variação fenotípica entre seus representantes e até em um mesmo indivíduo em diferentes fases de desenvolvimento (Webster, 1993).

Estudos apontam para a existência de espécies de *Croton* em vários países da América (Silva, 2009; Webster, 2001; Webster & Hulf, 1988). É possível encontrar exemplares de *Croton* em todos os estados Brasileiros, porém sua maior concentração está nas regiões Sudeste e Sul.

Muitas espécies de *Croton* são conhecidas devido às suas propriedades químicas e farmacológicas podendo ser utilizadas especialmente para fins medicinais (Hoehne, 1935; Randau *et al.*, 2004). *C. heliotropiifolius* é um exemplo de espécie que é utilizada para alívio da dor e desconforto gástrico. Outras espécies, a exemplo do *C. cajucara* (Maciel *et al.*, 2000) e do *C. malambo* (Moraes *et al.*, 2006), são exploradas devido à produção de óleos essenciais que podem ser extraídos do caule, flores, frutos, sementes e raízes. *C. linearifolius* é uma dessas espécies, pois o seu extrato etanólico extraído do caule apresenta um poder inseticida sob os adultos de *Cochliomyia macellaria*, moscas que provam feridas (bicheiras) na pele de mamíferos. (Cunha e Silva *et al.*, 2010).

Sendo assim, é importante que a exploração das espécies desse gênero seja feita de forma consciente e sustentável para que os possíveis impactos negativos oriundos da extração de espécimes do ambiente sejam minimizados. Neste contexto, a caracterização genética das espécies de *Croton* é importante para o conhecimento de sua base genética, bem como para a construção de estratégias de manejo e conservação.

Os marcadores moleculares são ferramentas da biologia molecular que vêm sendo bastante utilizados nos estudos genéticos dos mais diferentes organismos, no melhoramento e na conservação das espécies, a exemplos dos marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Estes marcadores são úteis para estudos pioneiros de uma espécie, onde informações prévias do genoma são inexistentes, além serem obtidos com um relativo baixo custo para a genotipagem, bem

como serem baseados em PCR, o que torna a técnica automatizada e de fácil execução (Borém & Caixeta, 2009). Os marcadores RAPD e ISSR já foram empregados com sucesso em estudos prévios de diversidade genética em espécies do gênero *Croton* a exemplo do *C. cajucara* (Angelo et al, 2006) e *C. sublyratus* (Klinbantom, 2004).

Diante do que se foi relatado, o presente trabalho teve como objetivo estimar a diversidade genética de exemplares de *C. linearifolius* e *C. heliotropifolius* encontrados em áreas dos municípios de Contendas do Sincorá, Bahia e Itapetinga, Bahia.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras de *C. linearifolius* foram coletadas na Floresta Nacional (FLONA) no município de Contendas do Sincorá, Bahia. Após visita prévia à FLONA, reserva com 1.034 hectares, registrado no Cartório de Registro de Imóveis da Comarca de Ituaçu, Estado da Bahia em nome do Ibama, foram identificados dois pontos distantes aproximadamente 10 Km com ocorrência do *C. linearifolius*. Em cada um dos pontos foram coletadas amostras de aproximadamente cinco indivíduos de cada subgrupo. Em um dos pontos foram obtidos 30 indivíduos divididos em seis subgrupos e no outro 22 indivíduos divididos em quatro subgrupos, totalizando cinquenta e dois indivíduos adultos.

As amostras de *C. heliotropifolius* foram coletadas em três subgrupos distribuídas na Serra da Torre ao longo de aproximadamente 2 km de extensão no município de Itapetinga, Bahia. No primeiro subgrupo, encontrado na região mais alta da serra, foram coletados 12 indivíduos; no segundo subgrupo, situado em altura mediana da serra, foram coletados 16 indivíduos e do terceiro subgrupo, situado na base da serra, foram coletados 14 indivíduos, totalizando assim, quarenta e dois indivíduos nesta região.

As amostras obtidas foram submetidas à extração de DNA seguindo o método CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio) modificado (Cerqueira-Silva, 2009) tendo este método sido previamente analisado (Scaldeferri et al., 2013). A avaliação da qualidade da extração e quantificação do DNA foi realizada tomando como base o marcador de peso molecular Lambda íntegro (DNA Lambda não digerido). As amostras foram submetidas à eletroforese por 90 minutos sob carga elétrica de 90 V, em gel de agarose 1% (m/v), coradas com tampão EZ Vision (conforme especificações do fabricante). A visualização foi feita utilizando fotodocumentador Kodak, com incidência de iluminação Ultravioleta.

Para as reações de amplificação foram testados 20 primers RAPD e 23 ISSR, sendo destes selecionados de acordo com a qualidade dos padrões de bandas gerados, 14 RAPD (Tabela 1) e 15 ISSR (Tabela 2).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 15  $\mu$ L, onde continham 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<sub>2</sub> , 0,2  $\mu$ M de cada nucleotídeo, 0,5  $\mu$ M de primer e 1 unidade de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). As amplificações de locos ISSR foram realizadas por meio do seguinte protocolo: 95 °C por 5 min; 34 ciclos de 94 °C por 50 s, 48 °C por 50 s, 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Para as amplificações dos locos RAPD, o programa de amplificação seguiu as seguintes etapas: 94 °C por 5 min; 34 ciclos de 94 °C por 40 s, 34 °C por 50 s, 72 °C por 1 min e 30 s; e uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Os produtos da amplificação dos locos ISSR e RAPD foram corados com uso de tampão EZ Vision e submetidos à eletroforese em voltagem constante de 120 V por aproximadamente duas horas, em gel de agarose 2% (m/v) e tampão de corrida TBE 1X. Para visualização dos amplicons, foi utilizado fotodocumentador Kodak com incidência de luz ultravioleta.

Após análise das imagens para avaliação dos padrões de bandas obtidos com o uso de cada primer, foi construída uma matriz de dados binários, onde 0 foi atribuído para a ausência de bandas em um determinado loco e 1 para presença de bandas. Estes dados foram submetidos à análise da similaridade, realizada com base no coeficiente de Dice (1945) utilizando o programa Genes (Cruz, 2006) e os agrupamentos dos genótipos foram realizados pelos métodos das médias aritméticas (UPGMA) e Neighbor Joining através dos programas Genes (Cruz, 2006) e Darwin (Perrier, 2009). Análise Bayesiana também foi realizada com intuito de estimatimar a distribuição dos pools gênicos, fazendo uso do programa Structure (Pritchard et al., 2000) e Structure Harvester (Earl e vonHoldt, 2012).

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Os 12 primers RAPD selecionados para análises em *Croton linearifolius* geraram um total de 76 amplicons (sendo 98,7% polimorficos) com média de 6,3 amplicons por

primers. O primer OPD-08 e OPD-20 geraram o menor e maior número de amplicons (três e 10, respectivamente). Para os genótipos de *C. heliotropiifolius*, também foram selecionados 12 primers RAPD que geraram 49 produtos de amplificação (sendo 98% polimorficos) com média de 4,1 amplicons por primers. Para esta espécie o primer que apresentou o menor número de amplicons foi OPD-13 e maior número de amplicons foi observado com o uso do primer OPD-5 (três e seis, respectivamente) (Tabela 1). Números semelhantes de amplicons foram encontrados por Angelo et al. (2005) ao fazer uma avaliação inicial da variabilidade genética de *Croton cajuçara*, rica em linalol, utilizando marcadores RAPD. Em seus resultados Angelo et al., (2005) apresenta 71 produtos de amplificação com 93% de polimorfismo. Em outro trabalho, dedicado a avaliação da estrutura genética de *C. florinbundus*, Ziroldo (2007), utilizou 15 primers RAPD e alcançou um número de 157 produtos de amplificação com 89,2% de polimorfismo.

Por sua vez, as análises realizadas a partir dos 15 primers ISSR selecionados geraram 101 produtos de amplificação com uma média de 6,7 amplicons e polimorfismo de 98,3%. O primer ISSR TriGAC 3RC gerou o menor número de amplicons, enquanto o maior número foi observado com o primers TriCAG 3RC (2 e 10 amplicons, respectivamente). Os mesmos primers ISSR foram utilizados para *Croton helitropiifolius* onde foi possível observar 64 amplificações com média de 4,3 amplicons e 94,6% de polimorfismo. O primer TriCAC 5CY apresentou menor número de amplicons, enquanto o maior número de amplicons foi gerado pelo primer DiCA 3G (2 e 7 amplicons respectivamente) (Tabela 2).

Os resultados obtidos a partir da utilização de primers ISSR são semelhantes aos valores apresentados em outros trabalhos. Para *Pilocarpus pennatifolius* (jaborandi), planta com largo interesse econômico por suas propriedades medicinais e cosméticas, assim como muitas espécies de *Croton*, Bandeira et al., (2010) utilizou 11 marcadores ISSR que geraram 131 produtos de amplificação com 96,3% de polimorfismo.

**Tabela 1.** Descrição dos primers RAPD utilizados para caracterização dos 52 genótipos de velame pimenta (*Croton linearifolius*) e 42 de Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*), coletados áreas nativas circunvizinhas aos municípios de Contendas do Sincora e Itapetinga, Bahia, respectivamente.

Primer	Sequência	TA *	<i>Croton linearifolius</i>			<i>Croton heliotropiifolius</i>		
			Nº locos	Nº polimórficos	Polimorfismo (%)	Nº locos	Nº polimórficos	Polimorfismo (%)
OPD-01	ACCGCGAAGG	34 °C	5	5	100	4	4	100
OPD-02	GGAACCCAACC	34 °C	---	---	---	4	4	100
OPD-03	GTCGCCGTCA	34 °C	6	6	100	5	4	80
OPD-05	TGAGCGGACA	34 °C	9	9	100	6	6	100
OPD-06	ACCTGAACGG	34 °C	7	7	100	---	---	---
OPD-08	GTGTGCCCCA	34 °C	3	3	100	4	4	100
OPD-10	GGTCTACACC	34 °C	6	6	100	5	5	100
OPD-11	AGCGCCATTG	34 °C	7	7	100	---	---	---
OPD-13	GGGGTGACGA	34 °C	6	6	100	3	3	100
OPD-15	CATCCGTGCT	34 °C	5	4	80	4	4	100
OPD-16	AGGGCGTAAG	34 °C	5	5	100	3	3	100
OPD-18	GAGAGCCAAC	34 °C	7	7	100	4	4	100
OPD-19	CTGGGGACTT	34 °C	---	---	---	3	3	100
OPD-20	ACCCGGTCAC	34 °C	10	10	100	4	4	100
Total			76	75	98.7	49	48	98

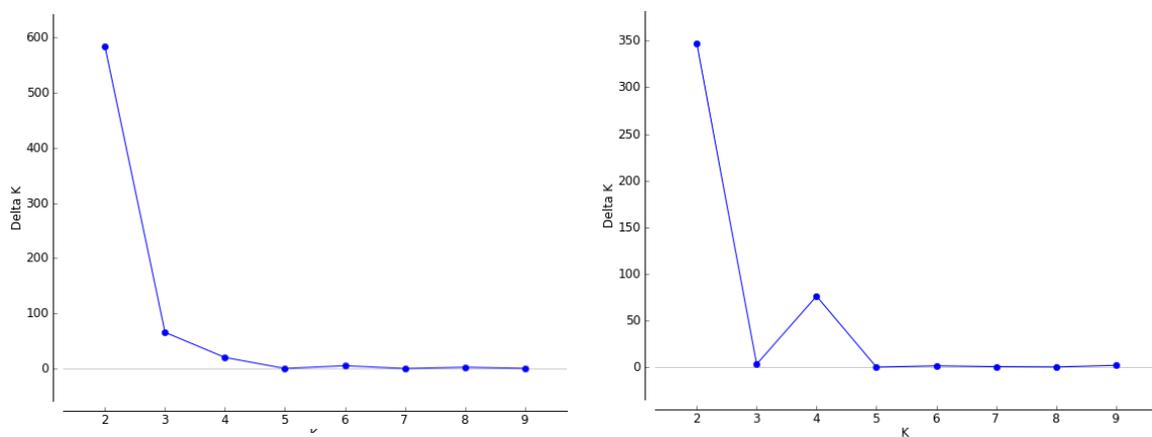
\*TA: Temperatura de Anelamento

**Tabela 2.** Descrição dos primers ISSR utilizados para caracterização dos 52 genótipos de velame pimenta (*Croton linearifolius*) e 42 de Cassutinga (*Croton heliotropiifolius*), coletados áreas nativas circunvizinhas aos municípios de Contendas do Sincora e Itapetinga, Bahia, respectivamente.

Primer	Sequência	TA	<i>Croton linearifolius</i>			<i>Croton heliotropiifolius</i>		
			Nº locos	Nº polimórficos	Polimorfismo (%)	Nº locos	Nº polimórficos	Polimorfismo (%)
DiCA 3G	CACACACACACACAG	48 °C	6	6	100	7	7	100
DiCA 3RG	CACACACACACACARG	48 °C	5	4	80	5	4	80
DiGA 3C	GAGAGAGAGAGAGAG	48 °C	9	9	100	3	3	100
DiGA 3RC	GAGAGAGAGAGAGAGARC	48 °C	8	8	100	4	4	100
DiGA 3T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	48 °C	6	6	100	4	3	80
TriCAC 3RC	CACCACCACCACRC	48 °C	6	6	100	3	3	100
TriCAC 5CY	CACCACCACCACCACY	48 °C	8	8	100	2	2	100
TriCAG 3RC	CAGCAGCAGCAGCAGRC	48 °C	10	10	100	4	3	80
TriTGT 3YC	TGTTGTTGTTGTYC	48 °C	6	6	100	5	5	100
TriAAR 3RC	AACAACAACAACRC	48 °C	7	7	100	4	4	100
TriAAG 3RC	AAGAAGAAGAAGRC	48 °C	6	6	100	5	5	100
TriACG 3RC	ACGACGACGACGRC	48 °C	7	7	100	4	3	80
TriAGA 3RC	AGAAGAAGAAGARC	48 °C	7	7	100	5	5	100
TriCGC 3RC	CGCCGCCGCCGRC	48 °C	8	8	100	5	5	100
TriGAC 3RC	GACGACGACGACRC	48 °C	2	2	100	4	4	100
	Total		101	100	98,3	64	60	94,6

A existência de dois pools gênicos na área da Floresta Nacional – FLONA onde foram coletadas as amostras de *C. linearifolius* foi confirmada após a análise do cálculo do Delta K (Evano *et al.*, 2005) onde encontramos o maior valor de K (aprox. 600) para K=2. Valores significativamente menores de K (abaixo de 100) podem ser observados se levarmos em consideração a existência de três ou quatro pools gênicos (Figura 2, esquerda). A mesma quantidade de pools gênicos é confirmada pelos valores de Delta K, quando avaliado os genótipos de *C. heliotropiifolius* coletados na Serra da Torre. Para esta espécie o K=2 foi de 350, resultado consideravelmente maior do que se compararmos com K=4 que foi abaixo de 100 (Figura 2, direita).

A baixa quantidade de pools gênicos encontrada para ambas as espécies de *Croton* avaliadas no presente estudo, pode estar relacionada ao tamanho das populações avaliadas e não ser um indicativo de baixa variabilidade para as espécies como um todo.



**Figura 1.** Gráficos 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 *Croton linearifolius* (esquerda) e *C. heliotropiifolius* (direita), coletados áreas nativas circunvizinhas aos municípios de Contendas do Sincora e Itapetinga, Bahia, respectivamente.

Com a utilização do modelo com base em distância e em estatística bayesiana, por meio do programa Structure, foi possível caracterizar os pools gênicos dos genótipos de *Croton linearifolius* coletados em dois pontos distintos da FLONA. Na figura 3 podemos

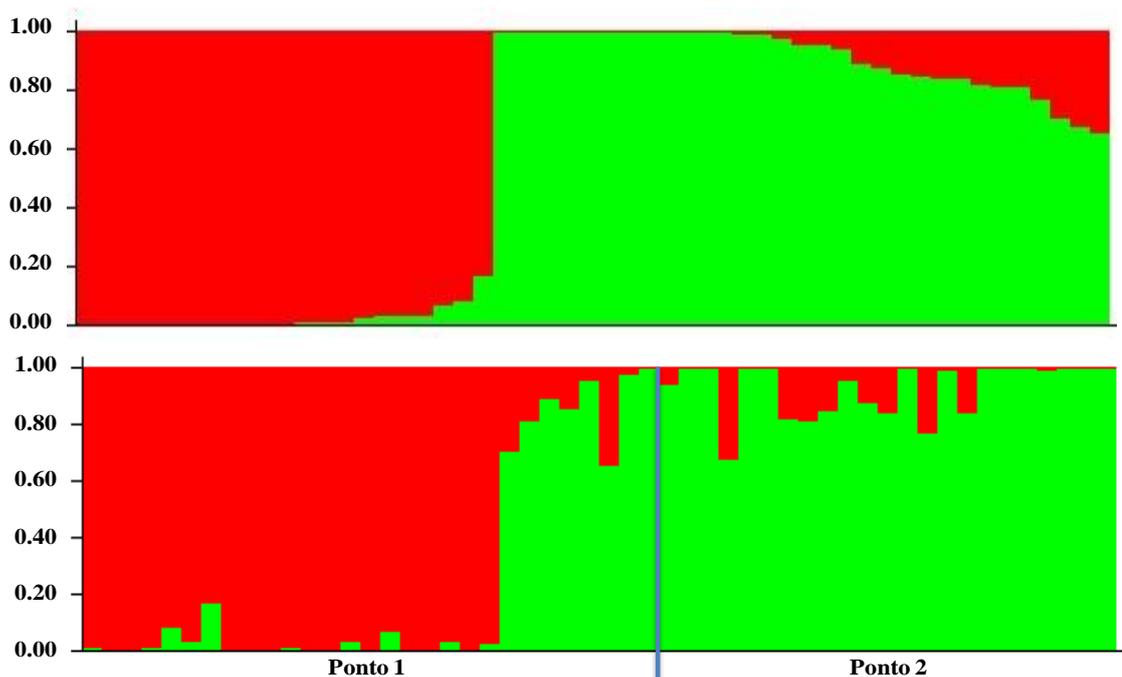
observar a presença de pools gênicos distintos (vermelho) no ponto 1 e (verde) no ponto dois, com exceção de alguns indivíduos do ponto 1 (subgrupos 5 e 6) que apresentam pool gênico característico do ponto 2.

Analisando estes resultados, pode-se constatar que a distância entre os dois pontos (aproximadamente 10 Km), minora o fluxo gênico entre os indivíduos dos dois pontos. Contudo, a existência dos subgrupos 5 e 6, coletados no ponto 1, mas que apresentam pool gênico característico do ponto 2, permite inferir que o fluxo gênico ocorre devido o transporte de sementes entre os dois pontos, podendo o mesmo ser realizado por pássaros típicos da região como por exemplo o periquito-da-caatinga (*Aratinga cactorum*) que se alimenta de Croton (OLMOS & ALBANO, 2012).

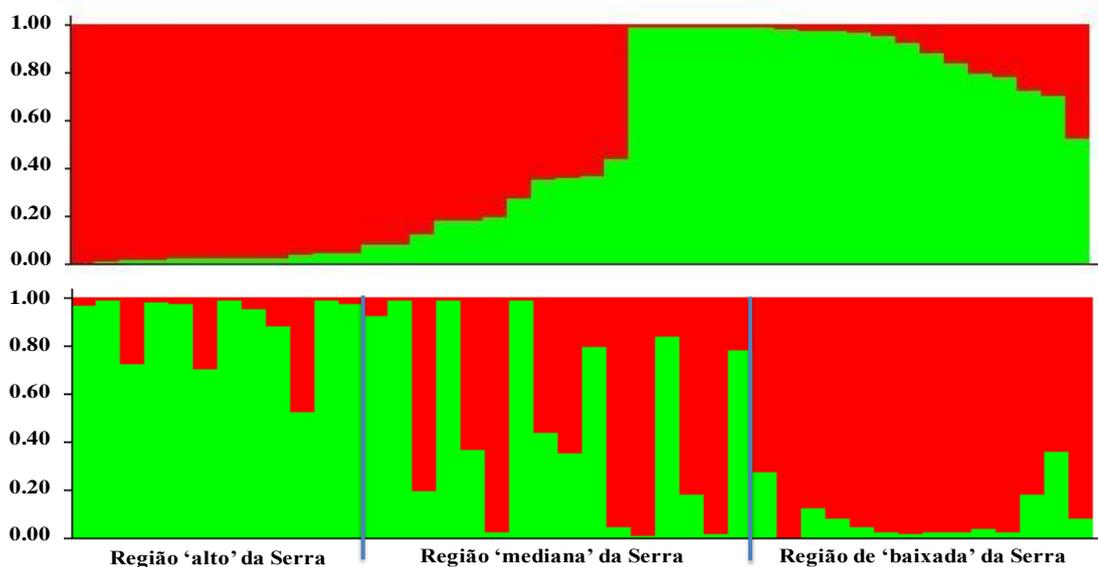
Para os genótipos de *C. heliotropiifolius* coletados em diferentes pontos da Serra da Torre, levando em consideração a altitude (ponto mais alto, mediano e base da torre), com a utilização do programa Structure, foi possível identificar a existência de pools gênicos distintos entre os indivíduos do ponto mais alto (vermelho) e os da base da torre (verde) e presença de genótipos com uma mistura dos dois pools gênicos na região mediana da torre (Figura 4).

Em relação ao *C. heliotropiifolius* a presença de indivíduos com mistura dos dois pools gênicos, na região mediana da torre, permite inferir que o fluxo gênico ocorre entre os subgrupos mais próximos através do transporte de pólen e sementes. Os diferentes pools gênicos observados entre os indivíduos da região mais alta da torre e da baixada indicam que fluxo gênico não está acontecendo entre os limites desta área, o que ao menos em parte deve ser associado às influências da distância e da altitude.

A existência de indivíduos que apresentam uma mistura de pools gênicos também pode ser observada em trabalhos como o de Silveira et. al. (2005) e Cançado et. al. (2010) que fizeram análises genéticas utilizando marcadores moleculares em Caroá (*Neoglaziovia variegata*) e em Oliveira (*Olea europaea*) respectivamente.



**Figura 2.** Histograma gerado pelo programa structure a partir dos dados de genotipagem realizados mediante uso de marcadores RAPD e ISSR para 52 genótipos de *Croton linearifolius* coletados em área nativa circunvizinha ao município de Contendas do Sincora, Bahia. (Os genótipos estão ordenados por pool gênico e pontos de coleta, respectivamente).

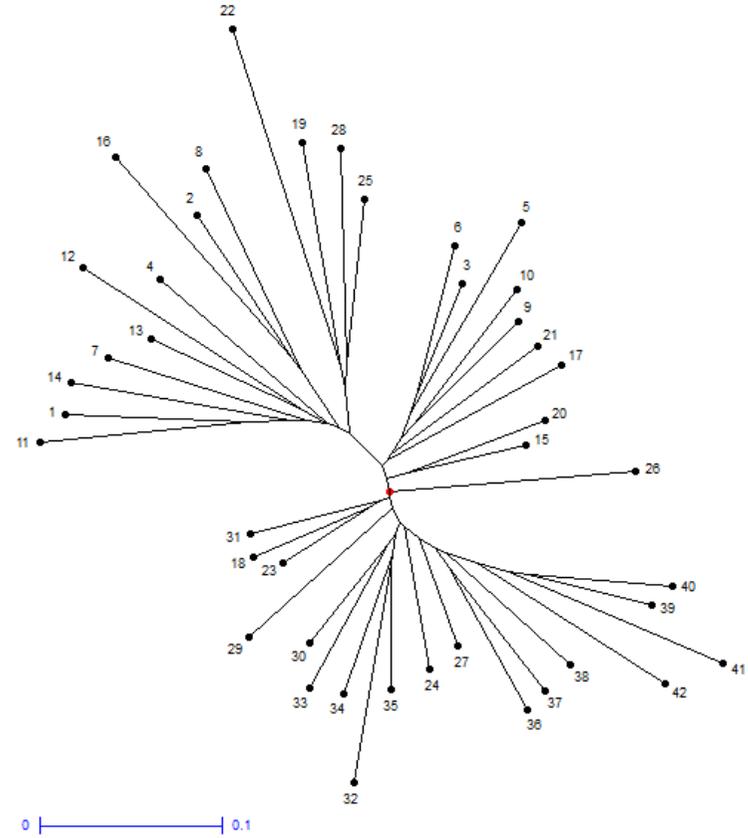
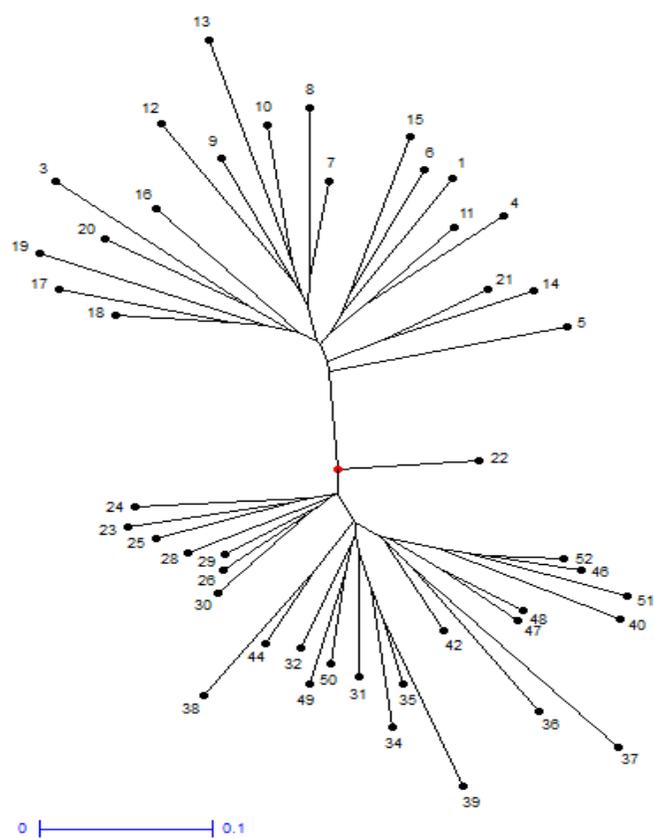


**Figura 3.** Histograma gerado pelo programa structure a partir dos dados de genotipagem realizados mediante uso de marcadores RAPD e ISSR para 42 genótipos de *Croton heliotropiifolius* coletados em área nativa circunvizinha ao município de Itapetinga, Bahia. (Os genótipos estão ordenados por pool gênico e pontos de coleta, respectivamente).

Com a projeção dos agrupamentos realizados pelo método Neibor Joinher a partir de dados moleculares (RAPD e ISSR) de *Croton linearifolius* coletados na FLONA (Figura 5-esquerda) foi possível identificar maior diversidade entre os grupos de indivíduos de 1 a 30 (Ponto 1) e o grupo de indivíduos 31 a 52 (Ponto 2). Confirmando o resultado do histograma gerado pelo programa Structure, os indivíduos (22 a 30) das subpopulações 5 e 6 coletados no ponto 1 são geneticamente mais próximos dos indivíduos coletados no ponto 2.

Para os genótipos de *C. heliotropiifolius* submetidos a projeção dos agrupamentos realizados pelo método Neibor Joinher (Figura 5, direita), os resultados corroboram com as informações sobre os pools gênicos observados no histograma gerado pelo programa Structure. Os indivíduos coletados na parte mais alta da torre (um a 12) apresenta maior diversidade genética quando comparados aos indivíduos da base (30 a 42). A mistura entre esses dois pools gênicos é confirmada quando observamos a proximidade entre alguns indivíduos da região mediana (13, 14, 15, 19, 22, 25 e 28) com os indivíduos da parte mais alta e outros indivíduos também coletados na região mediana (24 e 27) com os indivíduos da parte mais baixa. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de fluxo gênico discutida anteriormente nos resultados do Structure.

Com o conhecimento prévio do quão convergentes ou divergentes são os indivíduos analisados, é possível pensar estratégias de manejo e conservação dessas espécies em seu ambiente natural, bem como auxiliar melhoristas na escolha de combinações genotípicas que potencializem os ganhos genéticos, priorizando assim os cruzamentos entre genitores mais distantes, o que aumenta a exploração da variabilidade genética, ou promove cruzamentos entre genótipos mais próximos aumentando assim as chances de algumas características importantes se repetirem nas novas gerações.



**Figura 4.** Projeção dos agrupamentos realizados pelo método Neibor Joiner a partir de dados moleculares (RAPD e ISSR) obtidos dos 47 genótipos de *Croton linearifolius* (esquerda) e 42 genótipos de *C. heliotropiifolius* (direita), coletados áreas nativas circunvizinhas aos municípios de Contendas do Sincora e Itapetinga, Bahia, respectivamente.

## REFERENCIAS

Ângelo, PCS; Chaves, FCM; Xavier, JJB; da Cruz, JC & Lira, MPS (2005). Avaliação inicial do RAPD como forma de acessar a variabilidade genética na espécie rica em linalol *Croton cajuçara* Benth. (sacaca). Comunicado técnico 28. Embrapa.

Ângelo, PCS et. al. (2006). Genetic diversity in sacaca (*Croton cajuçara* Benth.) accessed by RAPD markers. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 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*. 43–51.

Borém, A. & Caixeta, ETC (2009). *Marcadores Moleculares*. Editora Folha de Viçosa. Viçosa, MG. 2

Cançado, GMA; Sant'Ana, GC; do Va, ADB & Ferreira JL (2010). Marcadores moleculares de DNA e suas aplicações na caracterização, identificação e melhoramento genético da oliveira . *EPAMIG Sul de Minas – FEMF* cap. 8

Cerqueira-Silva CBM, Cardoso-Silva CB, Conceicao LDHCS (2009). Comparison of coefficients and distance measurements in passion fruit plants based on molecular markers and physicochemical descriptors. *Genetics and Molecular Research* 8. 870-879.

Cunha e Silva SL, Carvalho MG, Gualberto SA, Carneiro-Torres DS, Vasconcelos KCF and Oliveira NS (2010). Bioatividade do extrato etanolico do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. 44 (Euphorbiaceae) sobre *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Acta Veterinaria Brasilica*. 4: 252-258.

De Moraes SM, Júnior FEAC, Silva ARA & Neto JSM (2006). Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. *Química Nova*. 29: 907-910.

Earl DA, vonHoldt BM (2012) Structure harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.

Evanno et al., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14 , 2611 – 2620

Hoehne FC (1935). *Plantas e substâncias vegetais tóxicas*. São Paulo. Graficars.

Lima LR and Pirani JR (2008). Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). *Biota Neotrop.* 82:177-231.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, v.155, p.945-959.

Randau KP, Florêncio DC, Ferreira CP and Xavier HS (2004). Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 4: 89-96.

Silva JS (2009). O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) em Pernambuco, com ênfase nas espécies da microrregião do Vale do Ipanema. Master's thesis. Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco. UFRPE. Recife.

Silveira, DG; Amorim, EP; de Jesus ON; Souza, FVD; Pestana, KN; dos Santos, VJ & Santana, JRF (2009). Variabilidade genética de populações naturais de caroá por meio de marcadores RAPD. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.44, n.3, p.283-290.

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

Webster GL (2001). Synopsis of *Croton* and *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) in Western tropical Mexico. *Contr. Univ. Michigan Herb.* 23: 353-388.

Zirolto, BD (2007). Estrutura genética em diferentes populações de *Croton floribundus* Spreng. de diferentes fragmentos de mata. Dissertação de Mestrado. Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos ensaios experimentais conduzidos para *Croton linearifolius* e *C. heliotropiifolius* foi possível observar variação na eficiência de diferentes estratégias metodológicas para extração de DNA genômico total e para estimativa de diversidade. Neste contexto, o uso de protocolos extração baseados em tampão CTAB são aconselháveis, não sendo necessária a utilização de nitrogênio líquido para obtenção de DNA em quantidade e qualidade desejáveis para uso em plataforma PCR. Por sua vez, estimativas de diversidade para essas espécies devem priorizar, ao menos para dados oriundos de marcadores dominantes, coeficientes que não levem em consideração a ausência de bandas como fator de similaridade. O método hierárquico de agrupamento baseado no UPGMA também deve ser priorizado.

Por fim, entende-se que as informações geradas contribuem para proposição e condução de novos estudos genético moleculares associados à espécies silvestres de *Croton*. Além do que, potencializa direta e indiretamente o uso, o manejo e a conservação do grupo.

## 7. REFERENCIAS

Almeida-Cortez JS, Cortez PHM, Franco JMV and Uzunian A (2007). Caatinga – coleção biomas do Brasil. Harbra. São Paulo. 64.

Ayad A, Sousa NM, Sulon J, Hornick JL, Watts J, Lopez-Gatius F, Iguer-Ouada M and Beckers JF (1997). Influence of progesterone concentrations on secretory functions of trophoblast and pituitary during the first trimester of pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 67:1503-1511.

Braga, RA. (1960) *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. 2.ed. Fortaleza: Imprensa Oficial.

Cruz CD (2006). Programa Genes: Análise Multivariada e Simulação. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Leal IR, Tabarelli M and Silva JMC (2003). Ecologia e Conservação da Caatinga. Recife. UFPE. 804.

Lima LR and Pirani JR (2008). Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). *Biota Neotrop.* 82:177-231.

Lowe A, Harris S and Ashton P (2004). Ecological genetics. Design, analysis and application. In: Paula de, F.M. Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* das escadas de transposição de peixes das usinas hidrelétricas do complexo Canoas – Rio Paranapanema. (2005). Master's thesis. UEL, Londrina, PR

Velloso AL, Sampaio EVSB and Pareyn FGC (2002). Ecorregiões propostas para o Bioma Caatinga. Resultados do Seminário de Planejamento Ecorregional da Caatinga. Recife. Associação Plantas do Nordeste. The Nature Conservancy do Brasil. Disponível em [[http://www.mma.gov.br/estruturas/203/arquivos/ecorregioes\\_site\\_203.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/203/arquivos/ecorregioes_site_203.pdf)], Acessado em Agosto 28, 2012.