



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

Estudos genético moleculares em *Calotropis procera* Ait. R. Br. a partir de comparação de protocolos de extração de DNA genômico e estimativas populacionais em microrregião do Sudoeste da Bahia, Brasil

Cibelle Santos Dias

Itapetinga - Ba  
Março - 2019

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

Estudos genético moleculares em *Calotropis procera* Ait. R. Br. a partir de comparação de protocolos de extração de DNA genômico e estimativas populacionais em microrregião do Sudoeste da Bahia, Brasil

Autora: Cibelle Santos Dias  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisa Susilene Lisboa dos Santos

“Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRA EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração Ambiente e Desenvolvimento”

Itapetinga - Ba  
Março - 2019

575.15 Dias, Cibelle Santos  
D531e Estudos genético moleculares em *Calotropis procera* Ait. R. Br. a partir de comparação de protocolos de extração de DNA genômico e estimativas populacionais em microrregião do Sudoeste da Bahia, Brasil. / Cibelle Santos Dias. – Itapetinga, BA: UESB, 2019.  
92fl.

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRA EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva e coorientação de Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Elisa Susilene Lisboa dos Santos.

1. Flor-de-seda - Extração de DNA - ISSR. 2. Flor-de-seda - Genética de populações. 3. *Calotropis procera* - Microrregião do Sudoeste da Bahia, Brasil. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, *Campus* de Itapetinga. II. Cerqueira, Carlos Bernard Moreno. III. Santos, Elisa Susilene Lisboa dos. IV. Título.

**CDD(21): 575.15**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Flor-de-seda - Extração de DNA - ISSR
2. Flor-de-seda - Genética de populações
3. *Calotropis procera* - Microrregião do Sudoeste da Bahia, Brasil

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

Aos meus pais, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam a melhor de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser a melhor, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

Ao meu querido orientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Carlos Bernard Cerqueira Silva e a minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisa Susilene Lisboa dos Santos, que acreditaram em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponíveis e dispostos a ajudar. Obrigada por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientaram neste trabalho. Vocês não foram somente orientadores, mas, em alguns momentos, conselheiros, confidentes e amigos. Vocês foram e são referências profissionais e pessoais para meu crescimento. Obrigada por estarem a meu lado e acreditarem tanto em mim!

Aos mais que colegas de trabalho, à família do Laboratório de Genética Molecular Aplicada. Especialmente aos estudantes de Iniciação Científica: Jardy, Thamy, Rafa e Gibran e aos Doutorandos: Luiz e Thalana, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta Dissertação. Obrigada por terem deixado as rotinas do Lab. mais divertidas. Amo vocês!

À Universidade do Sudoeste da Bahia, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e à LGMA por me propiciar os espaços e as ferramentas necessárias para a execução do meu projeto de Mestrado.

À agência de apoio CAPES pelo financiamento de minha bolsa de estudos.

Às agências de apoio e financiamento: CNPq, FAPESB e CAPES pela concessão das Bolsas de Iniciação a Pesquisa.

Aos professores Murilo Scaldaferrri e Sebastián Lacau pelo acompanhamento e apoio.

À Virgínia e a toda equipe dos serviços gerais da UESB, por todo carinho e preocupação que demonstraram durante as minhas rotinas do laboratório.

À Daniella, Nilzinha e Denise, secretarias do Programa de Pós-graduação em Ciência Ambientais da UESB, pela disposição e suporte nas questões administrativas.

À Walter e aos meus amigos: Arlécio, Saymon, Jéssica, Lays e Jó. Quem tem bons amigos tem tudo. Eu sou grata por ter vocês na minha vida.

“Esforçai-vos, e animai-vos; não temais, nem vos espanteis diante deles; porque o Senhor teu Deus é o que vai contigo; não te deixará nem te desampará.”

Deuteronômio 31:6

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	13
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	15
<b>Família Apocynaceae, subfamília Asclepiadoideae</b> .....	15
<i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br. – Informações gerais .....	16
Características botânicas .....	18
Utilização de <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br. ....	19
Diversidade genética .....	20
Estudos genéticos moleculares .....	21
Marcador molecular <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> – ISSR.....	22
Regiões de Coleta .....	22
CAPÍTULO I.....	24
<b>Comparação de Protocolos para Extração de DNA Genômico de <i>Calotropis procera</i> Ait. R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae)</b> .....	24
CAPÍTULO II.....	30
CAPÍTULO III .....	41
<b>Caracterização da Diversidade Genética de <i>Calotropis procera</i> Ait. R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae) em Três Regiões do Médio Sudoeste</b> .....	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	63
REFERÊNCIAS .....	64
ANEXOS.....	79

## LISTA DE ABREVIACOES

AFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados  
AMOVA – Análise Molecular de Variância  
CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamnio  
dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
EDTA – cido Etilenodiaminotetracético  
He – Heterozigosidade esperada  
Ho – Heterozigosidade observada  
*I* – ndice de Shannon  
ISSR – Inter Simple Sequence Repeats  
LBSA – Laboratório de Biosistemtica Animal  
LGMA – Laboratório de Genética Molecular Aplicada  
m/v – Massa por volume  
MgCl – Cloreto de Magnésio  
NaCl – Cloreto de Sódio  
PCoA – Análise de Coordenadas Principais  
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase  
PIC – Conteúdo de Informações Polimórficas  
Pop – População  
PP% – Percentual de Polimorfismo  
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism  
RGA – Resistance Genes Analogs  
SDS – Dodecilsulfato de Sódio  
SNP – Single Nucleotide Polymorphism  
SSR – Simple Sequence Repeats  
TBE - Tris/Borato/EDTA  
TRIS – Hidroximetil  
UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
UPGMA – Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages  
UV – Ultravioleta

## APRESENTAÇÃO

*Calotropis procera* (Ait.) R. Br., também conhecida no Nordeste brasileiro como flor de seda, está atualmente incluída na família Apocynaceae e subfamília Asclepiadoideae, antiga Asclepiadaceae. A espécie apresenta potencial invasor por seu eficiente mecanismo de dispersão anemocórica e por ser bem adaptada em ambientes de solos pobres em nutrientes e de baixa precipitação.

Nos municípios de Itororó, Itapetinga e Itambé, Bahia, Brasil, são encontrados representantes da espécie em ambientes com atividade antrópica como terrenos baldios, áreas de pastagens e beira de estradas. Neste cenário, buscou-se conhecer a variabilidade genética dentro e entre dessas populações. Para tanto, foi necessário testar metodologias que antecedem aos estudos de diversidade genética a exemplo de ensaios para testar protocolos de extração de DNA genômico e seleção de marcadores moleculares, a fim de otimizar os estudos de efetiva caracterização genética da referida espécie.

No capítulo I, buscou-se descrever o protocolo de extração de DNA genômico mais eficiente para a espécie *C. procera* em relação a quantidade e a qualidade das amostras de DNA. No Capítulo II, caracterizou-se o perfil de amplificação de 23 iniciadores ISSR, selecionando os melhores para serem priorizados nos estudos genéticos moleculares da referida espécie, tendo como base, na média de fragmentos gerados por iniciador, percentual de fragmentos polimórficos, conteúdo de informações polimórficas e índice de Heterozigosidade esperada. Por fim, para o Capítulo III buscou-se realizar estudos de diversidade genética intra e interpopulacional de *C. procera* pertencentes aos municípios de Itororó, Itapetinga e Itambé - Ba.

## RESUMO

*Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae) é uma espécie nativa que tem se destacado devido aos diversos usos atribuídos à mesma. Dentre os atributos, pode-se citar seu uso tradicional tanto medicinal quanto nutricional na dieta animal, na indústria para fabricação de cosméticos e produtos têxtil, bem como ambiental no controle de doenças fúngicas e virais. Devido à importância econômica e ecológica, a espécie tem recebido atenção em estudos genéticos-moleculares. Com o propósito de contribuir para o avanço dos estudos genéticos para *C. procera*, objetivou-se gerar subsídios metodológicos e informações genético-moleculares que possibilitem compreender a variabilidade e a estrutura genética de três populações em diferentes regiões do Médio Sudoeste da Bahia. Para isto, foram testados para a espécie sete protocolos de extração de DNA genômico, disponíveis na literatura e já adotados por vários grupos de pesquisas para diferentes espécies vegetais; identificados como P1, P2, P3, P4, P5, P6 e P7, respectivamente. Após as etapas de extração, a qualidade e quantidade de DNA obtido por cada protocolo, foram avaliadas com base no resultado de eletroforeses em gel de agarose, na leitura espectrofotométrica e no teste de amplificação com uso de iniciador ISSR. A partir dos resultados, selecionou-se os protocolos mais eficientes na obtenção do DNA genômico da espécie, sendo por ordem classificatória os protocolos P4, P1, P5 e P2. Posteriormente, iniciou-se a fase de caracterização do perfil de amplificação de 23 marcadores ISSR e a seleção do conjunto de marcadores que melhor respondesse à amplificação e que apresentasse maior polimorfismo para a espécie objeto de estudo. Sendo esses classificados em: adequado; razoável e inadequado quanto a capacidade e perfil de amplificação. Para as análises descritivas, considerou-se o número total de marcadores gerados, a média de marcadores observado por iniciador, o percentual de polimorfismo, a Heterozigosidade esperada, e o conteúdo de informações polimórficas. De posse dos estudos preliminares supracitados, coletou-se em casa local de estudos, folhas jovens de aproximadamente 40 indivíduos de *C. procera* as quais foram submetidas a extração do DNA genômico. A qualidade das amostras foram avaliadas a partir da imagem do gel de agarose, resultante da fotodocumentação com a incidência de luz ultravioleta. Dos 23 marcadores ISSR analisados, doze deles foram selecionados para amplificação do material genético adotando protocolos padrões de amplificação, cujos perfis de amplificação, também foram avaliados por eletroforese em gel de agarose. Para as análises estatísticas dos dados construiu-se uma tabela de dados binários, a partir das imagens resultantes das corridas em géis de agorose, onde foi atribuído Zero para a

ausência de bandas e um para a presença, o número nove foi utilizado para os dados faltantes. As análises descritivas, análise molecular de variância (AMOVA) e Análise de coordenadas principais (PCoA), foram feitas nos programas *Genes Software*, *GenALEX v.6.5* e *Structure* e com o auxílio da ferramenta *on line Structure Harvester*, respectivamente. Para a construção do dendograma utilizou-se o método hierárquico UPGMA. Sendo assim, os padrões de amplificação observados foram satisfatórios para estimar a diversidade genética das três populações. Em síntese os resultados sustentam uma associação da diversidade e estruturação genética com a distribuição geográfica das populações analisadas. De acordo com a análise Bayesiana, observou-se estruturação em dois pools gênicos e subestruturação em três pools gênicos. A AMOVA indicou maior distância genética entre as populações de Itororó e Itapetinga, Ba e menor distância entre Itapetinga e Itambé, Ba. O método UPGMA foi eficiente na representação da diversidade genética existente entre os genótipos e as populações estudadas.

**Palavras-chave:** Extração de DNA, ISSR, genética de populações, flor-de-seda.

## ABSTRACT

*Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae) is a native species that has been outstanding due to the different uses attributed to it. Among the attributes, it is possible to cite its traditional medicinal and nutritional use in the animal, industrial diet in the manufacture of cosmetics and textile products as well as environmental in the control of fungal and viral diseases. Because of its economic and ecological influence, the species has received attention in relation to genetic-molecular studies. With the purpose of contributing to the advancement of genetic studies for *C. procera*, the objective of this research was to generate methodological subsidies and genetic and molecular information to understand the variability and population genetic structure of three populations in different regions of the South-West from Bahia. For this, seven genomic DNA extraction protocols available in the literature and already adopted by several research groups for different plant species were tested in the species, namely: Sunnucks and Hales (1996), a method modified by Storchova et al. (2000), method modified by Cerqueira-Silva (2009), method modified by Russel et al. (2010), Mogg and Bond (2003), Barnwell et al. (1998) and Doyle and Doyle (1990) - modified by SILVA (2015), adopting as P1, P2, P3, P4, P5, P6 and P7, respectively. After the extraction steps, the quality and quantity of DNA obtained by each protocol were evaluated based on the results of 1% agarose gel electrophoresis in the spectrophotometric reading performed through the BioDrop  $\mu$ LITE and in the amplification test using primer ISSR. From the results, the most efficient protocols were obtained to obtain the genomic DNA of the species, being P4, P1, P5 and P2 in the order of classification. Subsequently, the characterization phase of the amplification profile of 23 dominant markers and the selection of the set of markers that better responded to the amplification and that presented greater polymorphism for the species object of study was started. Being those classified in: (i) Adequate; (ii) Reasonable and (iii) Inadequate as to the amplification capacity. For the descriptive analyzes, we considered (i) the total number of markers generated, (ii) the average markers observed by the initiator, (iii) the percentage of polymorphism (PP%), (iv) the expected Heterozygosity, and (v) the content of polymorphic information (PIC). To meet the proposed objective, young leaves of approximately 40 specimens of *C. procera* were harvested in each region, which were subjected to genomic DNA extraction. The quality of the samples was evaluated from the 1% agarose gel image, resulting from the photodocumentation (in the Kodak system) with the incidence of ultraviolet light. Subsequently, among the 23 ISSR markers, twelve were selected for amplification of the

genetic material using standard amplification protocols. Amplification patterns were evaluated by 2% agarose gel electrophoresis (m / v) with 0.5X TBE run solution. For the statistical analyzes of the data a binary data table was constructed, from the images resulting from the runs on agarose gels. Zero (0) will correspond to the absence of bands, one (1) presence and nine (9) missing data. The descriptive analyzes, AMOVA and PCoA, were performed using the Genes Software, GenALEX v.6.5 and Structure programs and with the help of the online tool Harvester, respectively. The UPGMA hierarchical method was used to construct the dendrogram. Thus, the observed amplification patterns were satisfactory to estimate the genetic diversity of the three populations. According to the Bayesian analysis, it was observed structuration in two gene pools and substructure in three gene pools. AMOVA indicated greater genetic distance between the populations of Itororó and Itapetinga, Ba and smaller distance between Itapetinga and Itambé, Ba. The UPGMA method was able to represent significantly the genetic diversity existing between the genotypes and the populations.

**Keywords:** DNA extraction, ISSR, population genetics, silk flower.

## INTRODUÇÃO GERAL

*Calotropis procera* Ait. R. Br. é uma planta exótica proveniente da África Tropical e Ásia, que foi inserida no Brasil para ser utilizada como planta ornamental (Kissmann e Ghoth, 1999; Esndress e Bruyns, 2000; Abbassi et al., 2003; Brandes, 2005). A partir desta inserção, passou a se disseminar rapidamente. Devido ao seu caráter ruderal e eficiência na dispersão de sementes, é amplamente distribuída em diferentes ambientes antropizados e edáficos, como beiras de estradas e áreas de pastagens (Souto et al., 2008; Costa et al., 2009). Atualmente, é encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, com maior propagação nos estados nordestinos e com ampla distribuição nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Koch et al., 2015).

É produtora de látex, cujo metabólico secundário está presente em todos os órgãos da planta. Suas propriedades químicas, conferem a espécie valor medicinal, alimentício, agrícola contra patógenos e industrial no âmbito têxtil, cosmético e farmacêutico. (Ramos et al., 2009; Garcez, et al., 2014). Apesar de existir informações disponíveis sobre as aplicações desta planta enquanto recurso natural e ao interesse ecológico relacionado ao seu histórico como invasora e bioindicadora de áreas de pastagens, ainda são escassas as informações sobre sua diversidade, limitando-se a poucos estudos genéticos-moleculares (EMPARN, 2004; Bekhit et al., 2008; El-Bakry et al., 2014; Priya et al., 2015; Almeida et al., 2017; Muriira et al., 2018).

A diversidade genética pode ser definida como a variação presente no material genético de uma espécie animal ou vegetal (Rao e Hodgkin, 2002). Portanto, essa variação é acumulada durante o processo evolutivo, podendo ser gerada, principalmente, por mutação na sequência nucleotídica durante a replicação do DNA (Santos et al., 2009). O grau de diversidade dentro e entre populações podem ser estimadas utilizando diferentes técnicas. Dentre elas está as moleculares, a exemplo dos marcadores moleculares (Santos et al., 2009).

Diante disto, o conhecimento da diversidade e estrutura genética de populações, bem como as informações genéticas são fundamentais para o avanço das propostas relacionadas à conservação, manejo e melhoramento dos recursos genéticos, em geral. Porém, a maior parte dos estudos genético moleculares perpassam a obtenção de ácidos nucleicos em quantidades e qualidades específicas, considerando que o processo de extração de DNA genômico é parte fundamental para qualquer análise que utilizam técnicas moleculares (Demeke e Jenkins, 2010).

Em se tratando de técnicas moleculares para caracterizar diferenças entre indivíduos ou espécies existe vários métodos. Dentre esses, estão os tradicionais, que envolvem descritores

morfológicos e agrônômicos ou aplicações bioquímicas para detecção de diferenças entre proteínas, isoenzimas e marcadores moleculares (Vicente et al., 2005). Entretanto, os marcadores moleculares se sobressaem diante as outras classes de marcadores por possibilitar a detecção de polimorfismos nas sequências de DNA, por determinar as relações genéticas entre indivíduos (Reddy et al., 2002; Costa, 2010), acessar uma gama de informações quanto à estrutura das populações, fluxo gênico, relações filogenéticas, padrões biogeográficos e análises de paternidade e parentesco (Féral, 2002).

Os principais marcadores moleculares utilizados para a amplificação do DNA gênomico são os RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Agarwal et al., 2008), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos et al., 1995), Microsatélite (ou SSR - *Simple Sequence Repeats*) (Akkaya et al., 1992), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (Zietkiewicz et al., 1994) e os SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Syvanen et al. 1999; Zolte et al., 2017). Cada um desses marcadores, possuem propriedades e aplicações que variam de acordo com a espécie e conseqüentemente, necessitam de um conhecimento prévio antes da sua utilização (Semagn et al., 2006).

Os ISSR se destacam sobre outros sistemas de marcadores moleculares pela detecção de polimorfismos em *locos* intermicrosatélites (Zietkiewicz et al., 1994) e produzir grande número de fragmentos por iniciador (Fang et al., 1997). Outras vantagens estão relacionadas à alta reprodutibilidade, custo relativamente baixo, cujos atributos conferem sua eficiência (Vijayan, 2005; Zolet et al., 2017) em seleção assistida por marcadores, filogenia, mapeamento genético bem como em análises de diversidade genética (Liu et al., 2008).

Diante do potencial invasor, das propriedades químicas e da escassez de estudos genéticos moleculares para a espécie vegetal, *C. procera*, o propósito deste trabalho é gerar subsídios para o avanço de pesquisas relacionadas a caracterizações genético-moleculares para esta espécie. Para tanto, objetivou-se comparar a eficiência de sete protocolos de extração de DNA gênomico previamente descritos na literatura para outras espécies, caracterizar o padrão de amplificação e selecionar iniciadores ISSR a serem utilizados nas análises de genética para estimar a diversidade de populações de *C. procera* pertencentes a mesorregião do Médio Sudoeste da Bahia, Brasil.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### **Família Apocynaceae, subfamília Asclepiadoideae**

A família Apocynaceae está entre as maiores famílias que constitui o grupo das Angiospermas e ordem Gentianales, por agrupar mais de 5000 espécies incluídas em cerca de 400 gêneros distribuídos atualmente em cinco subfamílias e 25 tribos (Endress 2004; Endress et al., 2014; APG IV, 2016). As subfamílias pertencentes a família Apocynaceae são as Apocynoideae (82 gêneros), Rauvolfioideae (79 gêneros), Periplocoideae (33 gêneros), Asclepiadoideae (164 gêneros) e Secamonoideae (8 gêneros) (Endress et al., 2014). Os gêneros que agrupam estas subfamílias estão dispersos predominantemente em regiões pantropical e subtropical e com alguns representantes em regiões temperadas (Sennblad e Bremer 2002).

No Brasil, são reconhecidos 77 gêneros e 754 espécies com ampla distribuição em todos os domínios fitogeográficos, no entanto, é no bioma Mata Atlântica que a família se mostra mais diversa, contando com cerca de 370 espécies (Koch et al., 2015). Dentre as subfamílias de Apocynaceae com maior ocorrência no Brasil estão as Rauvolfioideae, Apocynoideae e Asclepiadoideae, sendo pouco representada por algumas espécies cultivadas de Periplocoideae e Secamonoideae (Viana et al., 2017).

A subfamília Asclepiadoideae está representada por cerca de 215 gêneros e mais de 2300 espécies (Rapini et al., 2007). É conhecida na literatura em inglês como “*milkeeds*” por possuir látex em diversas estruturas e órgãos de suas plantas. Por consequência da sua diversidade morfológica, ampla distribuição e estrutura floral complexa, associados ao desconhecimento das relações filogenéticas de seus representantes, as espécies inclusas na família Asclepiadoideae passaram por dificuldades de classificação taxonômica (Simões et al., 2010).

Antigamente a subfamília estava inclusa filogeneticamente na família Asclepiadaceae (Brow, 1810) e no ano de 1926, Hutchinson propôs que as famílias Apocynaceae e Asclepiadaceae tornassem uma única família. Desde então, começaram a acontecer estudos cladísticos baseados em dados morfológicos, anatômicos, embriológicos (Judd et al., 1994) e de *rbcL* (Sennblad e Bremer, 2000) com o propósito de confirmar a inclusão de Asclepiadaceae em Apocynaceae.

Dentre as subfamílias de Apocynaceae, as Asclepiadoideae agrupam as mais complexas e elaboradas flores com sépalas (5), pétalas (5), estames (5) e carpelos (2) em números estáveis (Endress, 1994) e com câmara internas complexas que protegem em seu interior as partes férteis

(Kunze, 1991). As superfícies estigmáticas restritas e as baixas razões entre pólen e óvulo encontradas nesta subfamília, são características evolutivas que foram adquiridas com a finalidade de evitar o aborto ocasionado pela chegada de pólen misto, visto que existem mecanismos de auto-incompatibilidade encontrados na família (Wyatt et al., 2000).

As espécies inclusas na subfamília Asclepiadoideae são polinizadas por Hymenopteras, Lepidopteras e Dipteras (Endress, 1994). Portanto, *Calotropis procera* é a única espécie da subfamília que possui as abelhas do gênero *Xylocopa* como principal polinizador e o grupo Vespidae como os visitantes florais mais frequentes (Ali e Ali, 1989).

### ***Calotropis procera* (Ait.) R. Br. – Informações gerais**

*Calotropis procera* (Ait.) R. Br. pertence à família Apocynaceae, subfamília Asclepiadoideae e a tribo Asclepiadeae (Endress e Bruyns, 2000; Sennblad e Bremer, 2002; Tabatinga Filho, 2008). Essa espécie apresenta ampla distribuição, sendo nativa do sudoeste da Ásia (Índia, Paquistão, Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Jordânia) e da África (Somália, Egito, Líbia, Argélia, Marrocos, Mauritânia e Senegal) (Abbassi et al., 2003), sendo também observada na maior parte das regiões tropicais e semiáridas da América (Ulhôa et al., 2007). No século XIX, foi introduzida no Brasil para ser utilizada como planta ornamental por apresentar uma bonita inflorescência no verão (Ferreira e Gomes, 1974; Kissmann e Ghoth, 1999), e até então, a espécie passou a ser considerada como invasoras de áreas de pastagens em consequência do potencial de dispersão de suas sementes pelo vento, que é facilitada pela presença de painas brancas e leves e pela sua adaptação a diversas variações de temperatura e níveis pluviométricos (Ferreira, 1973; Souto et al., 2008).

No Brasil, *Calotropis procera* possui ocorrências confirmadas no Norte (Amapá, Pará e Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-oeste (Distrito Federal e Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo) com possíveis ocorrências no Norte (Amazonas e Roraima), Centro-oeste (Goiás) e Sudeste (Rio de Janeiro) (Koch et al., 2015; Ulhôa et al., 2007) (Figura 1). Em relação aos domínios fitogeográficos, a espécie se estabelece facilmente nos biomas de Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica com o tipo de vegetação características de áreas antrópicas, da Caatinga (*stricto sensu*), do Cerrado (*lato sensu*) e da Restinga (Koch et al., 2015).

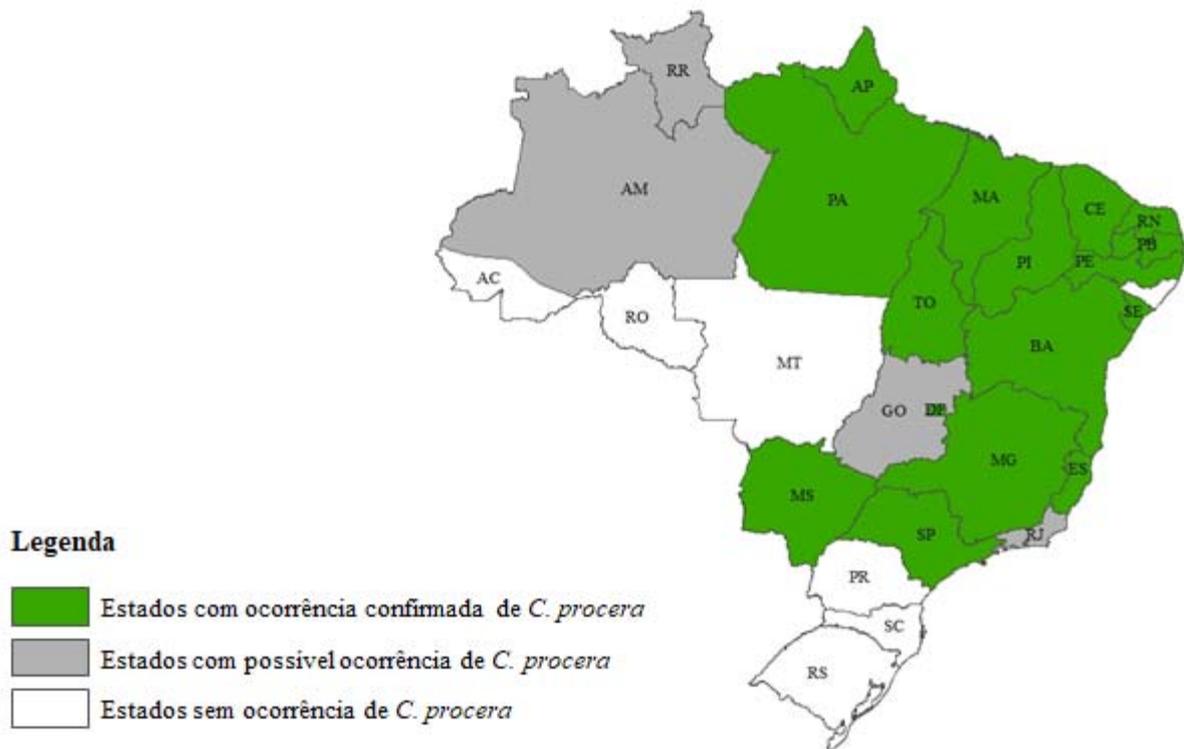


Figura 1: Mapa de distribuição da espécie *Calotropis procera* no Brasil. Fonte: Adaptado de BFG (2015).

No Brasil, *Calotropis procera* também é conhecida como Algodão de seda, Algodão de praia, Flor de Seda, Ciumeira, Ciúme, Paininha de seda, Leiteira, Saco de Velho, Jarnaúba, Pé de Balão e Queimadeira (Souto et al., 2008). Os nomes populares para a espécie variam de acordo com a região (SiSTSP, 2018).

Atualmente a espécie, tem recebido destaque por se desenvolver nas mais diversas condições edafoclimáticas, pois é adaptada a áreas com baixo índice pluviométrico, solos arenosos, pobres em nutrientes, ácidos e degradados (Khan e Malik, 1989; Andrade et al., 2005), em ambientes salinos e com altas temperaturas (Carvalho Júnior et al., 2010). Por conseguir se estabelecer nesses ambientes, é facilmente encontrada em áreas de pastagens, em dunas de areia, terrenos baldios, margens de estradas, no litoral a beira do mar e em ambientes com vestígio de perturbação humana (Souto et al., 2008; Instituto Hórus, 2013). Por ser uma espécie de baixa exigência nutricional, possui uma amplitude de ambientes para o seu desenvolvimento (Instituto Hórus, 2013).

## Características botânicas

*Calotropis procera* (Ait.) R. Br., é uma planta arbustiva ou subarbórea ereta, perene. Com poucas ramificações, que pode atingir de 2,5 a 6,0 metros de altura e que apresenta sistema radicular bastante desenvolvido. Sua raiz principal é pivotante, que varia entre 1,7 a 3,0m de profundidade em solos arenosos de deserto (Kissman e Groth, 1999; Úlhoa et al., 2007).

O caule é glauco, inerme, lactescente, corticiforme e apresenta fissuras que correspondem a uma adaptação morfofisiológica que tem como objetivo reduzir a perda excessiva de água e funcionar como isolante térmico (Kissman e Groth, 1999; Fabricante e Siqueira-Filho, 2013). Possui poucos galhos com folhas grandes, simples, sésseis, subcoriáceas que se organizam de forma oposta ao longo do caule e que na maioria das vezes são cobertas por cerosidade nas partes mais jovens (Úlhoa et al., 2007, Rangel e Nascimento, 2011). Quando o caule e as folhas são cortados, obtém-se um fluxo abundante de látex devido ao rompimento dos tecidos (Moreira Filho e Viana, 2007).

A inflorescência é constituída de pedúnculos carnosos e cilíndricos, terminais e axilares, onde encontram-se umbelas de flores pediceladas dispostas em cachos, com uma coloração que varia de branco a cor-de-rosa ou com aparência púrpura (Kissmann e Groth, 1999; Lorenzi e Matos, 2002). As flores são grandes, maciças e com o néctar fortemente protegido (Endress, 1994). São actinomorfas e hermafroditas, cálice envolvente, com 5 lobos agudos, pouco perceptível por estar ajustado sobre a corola e apresentar-se com a mesma textura e coloração (Little et al., 1974). Pela sua complexidade, o único polinizador conhecido são as abelhas do gênero *Xylocopa*, com as quais tem forte relação coevolutiva (Endress, 1994).

O pólen das flores de *C. procera* é agrupado em cinco pares de polínias, as quais são suas unidades de polinização (Peter e Johnson, 2006). A região estigmática é subdividida em cinco câmaras interiorizadas, localizadas individualmente entre um par de polínias. No total, existem cerca de 350 grãos de pólen em cada polínia de *C. procera* e cerca de 570 óvulos por flor (Ali e Ali, 1989).

O florescimento e a frutificação são contínuos, com grande produção de frutos e sementes durante todo o ano (Baker 1974; Lorenzi e Matos, 2002). Os frutos são cápsulas infladas, globosas, grandes e leves devido ao grande espaço ocupado com ar, cujo o tamanho varia de sete a doze centímetros (Kissmann e Groth, 1999; Lorenzi e Matos, 2002; Oliveira-Bento et al., 2013). Tal variação no tamanho dos frutos pode estar relacionada a estratégia de utilização de nutrientes e disponibilidade dos recursos hídricos disponíveis (Silva Júnior et al., 2012).

As sementes são ovoides, achatadas de superfície pouco rugosa, envoltas por painas sedosas e brancas que facilita no processo de dispersão pelo vento (Kissmann e Groth, 1999; Lorenzi e Matos, 2002). São sensíveis a variações de temperatura, suportando entre 18° e 37°C, sendo a temperatura de 28° a 32°C, considerada ideal para germinação (Labouriau e Valadares, 1976; Galal et al., 2015).

Possuem canais lactíferos, constituídos por exsudado citoplasmático de células especializadas (Freitas, 2006). Estes laticíferos são unidades ou séries conectadas que contém látex distribuídos em vários tecidos da planta, sendo esta uma característica da família Apocynaceae (Esau, 1974). Apesar de ser encontrados em vários tecidos, os canais laticíferos de *Calotropis procera* são abundantes nas extremidades foliares. Nesse órgão, é possível coletar o látex, que é produzido e acumulado para ser liberado como uma estratégia de defesa contra fungos, insetos e outros microrganismos (Bandeira e Ramos 2006).

#### **Utilização de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.**

O látex de *Calotropis procera* é aplicado na medicina tradicional, na agricultura, na indústria têxtil (Hindi, 2013; Coelho, 2015; Silva et al., 2016) e cosmética (Portugal-Cohen et al., 2018), bem como no combate a fungos (Jain et al., 1996; Hassan et al., 2006; Kareem et al., 2008; Nenaah, 2013), vírus (Locher et al., 1995; Velmurugan et al, 2012) e larvas (Moursy, 1997), devido às propriedades químicas associadas ao seu látex (Ramos et al., 2009; Shahi et al, 2010). O látex de *C. procera* é um composto biologicamente ativo que apresenta propriedades fungicida, anti-sifilítico, antiinflamatório, abortivo, purgativo, dentre outras (Kuta, 2008; El Badwi, 1997; Arya e Kumar, 2005; Sharma e Sharma, 2000). É constituído por cardenólídeos, enzimas proteolíticas, alcalóides e carboidratos, além dos carbonatos, vitaminas, lipídeos, terpenos, alcalóides e proteínas (Morcelle et al., 2004). As proteínas presentes no látex apresentam ação nociva para pragas agrícolas, toxicidade sobre o desenvolvimento larval e eclosão do ovo do mosquito da dengue e estão relacionadas a defesa contra patógenos (Freitas, 2006; Ramos et al., 2009).

Diferentes partes de *C. procera* são consideradas fitoterapêuticas na medicina tradicional indiana, sendo utilizadas como anti-inflamatório, analgésico, anti-helmínticos, antimicrobianos, larvicidas, nematicidas, anticancerígenos, no tratamento de úlceras gástricas e doenças hepáticas e como antídoto de envenenamento por serpentes (Tanira et al., 1994; Warriar et al., 1994). No estado do Ceará a planta é utilizada no tratamento de doenças de pele causadas por fungos e bactérias (Rabelo, 2014).

Ainda no Brasil, a planta é utilizada na alimentação de caprinos (Melo et al., 2001; Marques et al., 2008; Silva et al., 2010; Pereira et al., 2010), ovinos (Lima et al., 2005; Torres, et al., 2010) e outros ruminantes nos períodos mais secos do ano. Onde suas folhas são misturadas com outros alimentos como suplemento nutritivo (Garcez, et al., 2014). Na Índia são mantidas em cultivo consorciado de *C. procera*, *Zizyphus mauritiana*, *Euphorbia tirucalli* e *Scattered faidherbia*, em sistemas agroflorestais para alimentação de bovinos em período crítico (Oliveira (2002).

Begum et al. (2013), relataram o potencial químico considerável de extratos de folhas de *C. procera* no controle de insetos que são caracterizados como pragas na agricultura e silvicultura. Lázaro et al. (2012), avaliaram a eficácia *in vitro* do extrato aquoso das folhas da espécie em diferentes concentrações no controle da postura e eclodibilidade dos ovos do carrapato (*Rhipicephalus microplus*) e, concluíram seu efeito carrapaticida potencial. Assim como as flores são usadas na forma de decocção ou pulverizada, bem como extrato hidroalcoólico e aquoso como anti-helmínticos em pequenos ruminantes (Larhsini, 1997; Aggarwal et al., 2016).

### **Diversidade genética**

A diversidade biológica pode ser definida como a variação presente no material genético de todos os seres vivos (Rao e Hodgkin, 2002). Essa diversidade se deve à mutação na sequência nucleotídica durante a replicação do DN, cuja variação biológica é acumulada durante o processo evolutivo (Santos et al., 2009). O grau e a variabilidade genética, podem ser afetados por mutação e fluxo gênico entre populações; bem como por fatores que podem intervir diminuindo a diversidade, como, a endogamia, seleção natural e deriva genética (Nei, 1987).

Desde o surgimento das técnicas moleculares, a biologia molecular se tornou uma poderosa ferramenta para os estudos de diversidade genética, permitindo, assim, comparar indivíduos, populações e espécies diferentes (Hillis et al., 1996). Tal variação genética pode ocorrer com indivíduos da mesma espécie e entre espécies, classificando respectivamente como diversidade intraespecífica e interespecífica (Santos et al., 2009). Sendo que estas podem ser avaliadas por meio da utilização de diferentes técnicas moleculares (Guimarães et al., 2009).

Para estimar a variabilidade genética são utilizados marcadores moleculares que permitem acessar uma gama de informações quanto à estrutura das populações, fluxo gênico, relações filogenéticas, padrões biogeográficos e análises de paternidade e parentesco (Féral, 2002). Para a realização dos estudos genético-moleculares, não se faz necessário que todas as

populações uniformes e conectadas por fluxo gênico sejam amostradas. No entanto, um maior número de populações deve ser representado quando as mesmas estão estruturadas em subpopulações (Cavallari, 2004).

### **Estudos genéticos moleculares**

Com o desenvolvimento tecnológico e os avanços das técnicas de biologia molecular, foi possível efetuar a análise da molécula do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (Guimarães et al., 2009) por meio da utilização de técnicas como exemplo a Reação em Cadeia de Polimerase (*Polimerase Chain Reaction-PCR*) (Ramalho, 2008). Esta técnica consiste na duplicação quantitativa da molécula de DNA por meio de replicação *in vitro*, possibilitando o desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares (Ramalho, 2008; Guimarães et al., 2009).

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis para obtenção de informações de sequências de DNA disponível (Guimarães et al., 2009), construção de árvores filogenéticas, realização de mapeamento genômico, (Oliveira, 2010), caracterizações e estimativas genéticas de populações e análises genética detalhadas e precisas sobre diversidade e evolução das espécies (Reddy et al., 2002; Costa et al., 2009; Costa, 2010). As aplicações dos marcadores moleculares abrangem desde o melhoramento até a conservação dos recursos vegetais (Reddy et al., 2002; Costa, 2010) e animais (Andrade, 2014; Nogueira, 2009; Clímaco, 2013), como também, na identificação de microrganismos como cepas bacterianas (Abo-Sereih et al., 2016).

Dentre os diversos marcadores moleculares existentes, pode-se citar como sendo os principais para a amplificação de DNA gênomico: os RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Agarwal et al., 2008), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos et al., 1995), Microssatélite (ou SSR - *Simple Sequence Repeats*) (Akkaya et al., 1992), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (Zietkiewicz et al., 1994) e os SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Syvanen et al. 1999; Zolte et al., 2017)

Os marcadores ISSR são fragmentos de DNA obtidos a partir da amplificação via PCR, baseados no RAPD e SSR, no qual confere rapidez e acurácia por utilizar um só iniciador, com tamanho entre 16 a 20 pares de bases (Faleiro, 2007). Foram desenvolvidos com o propósito de explorar repetições de microssatélites sem a necessidade do conhecimento prévio do sequenciamento do DNA da espécie-alvo (Zietjiewicz et al., 1994). Embora tenha sido baseado em microssatélite, possui um caráter dominante, onde seu loco não diferencia o gene homocigoto do heterocigoto (Zietjiewicz et al., 1994; WANG *et al.*, 1998).

Cada um dos marcadores citados, possuem propriedades e aplicações que variam de acordo com a espécie e conseqüentemente, necessitam de um conhecimento prévio antes da sua utilização (Semagn et al., 2006). Uma destas variações é referente a temperatura de anelamento, onde cada marcador possui sua especificidade (Gomes et al., 2012) e sua eficiência pode ser mensurada pela quantidade de polimorfismo detectável entre os acessos sob investigação (Grativol et al., 2011). Entretanto existe poucos estudos genéticos referentes ao gênero *Calotropis* sp., limitando-se à poucas populações e a qualidade fisiológica das sementes (Bekhit et al., 2008; El-Bakry et al., 2014; Priya et al., 2015; Muriira et al., 2018; Almeida et al., 2017)

### **Marcador molecular *Inter Simple Sequence Repeat* – ISSR**

Os marcadores ISSR se destaca sobre outros sistemas de marcadores moleculares por detectar polimorfismos em *locos* intermicrosatélites (Zietkiewicz et al., 1994) e produzir altos números de fragmentos por iniciador (Fang et al., 1997). Outras vantagens estão associadas com a alta reprodutibilidade e custo relativamente baixo quando comparado com os demais marcadores (Vijayan, 2005; Zolte et al., 2017). Além de ser eficazes nas análises de diversidade genética, em estudos de impressão digital do DNA, seleção assistida por marcadores, filogenia e mapeamento genético (Liu et al., 2008).

Atualmente, os marcadores ISSR têm sido utilizados com sucesso para estimar a diversidade genética de diversas espécies, como *Catharanthus roseus* L. (Ibrahim et al., 2013), *Minaria* spp. T.U.P. Konno (Ribeiro, 2011), *Decalepis arayalpathra* J. Joseph & V. Chandras (Mishra et al., 2015), *Hancornia speciosa* Gomes (Vitória et al., 2013; Jimenez et al., 2015; Costa et al., 2015; Soares et al., 2017) e *Nerium oleander* L. (Lazzaro et al., 2017). dentre outras. Entretanto, os estudos genéticos moleculares referentes ao gênero *Calotropis* utilizando o marcador ISSR são escassos, limitando-se ao estudo de distâncias genéticas entre três genótipos Ushaar (*Calotropis procera* (Ait) f.) medidos pelas técnicas de RAPD e ISSR (Bekhit et al., 2008).

### **Regiões de Coleta**

Os municípios de Itapetinga, Itororó e Itambé compõe o Território de Identidade do Médio Sudoeste da Bahia (SEI – BA, 2018). Essas microrregiões possuem grandes áreas com pastagens, tendo a pecuária como uma das principais atividades econômicas (Silva et al., 2007).

As características edafoclimáticas conciliadas com as atividades antrópicas, contribuiu para o estabelecimento, aumento populacional e propagação da espécie *Calotropis procera* em cada uma das regiões.

Os municípios estão inseridos no Bioma Mata Atlântica (SEI, 2019). A Lei nº 11.428 (Lei da Mata Atlântica), de 2006, define que a Mata Atlântica contempla diferentes formações florestais e ecossistemas associados os quais foram detalhados pelo Decreto nº 6.660, de 2008, e delimitados no “Mapa da Área de Aplicação da Lei nº 11.428”, de 2006, elaborado e publicado pelo IBGE. Sendo assim, os municípios estudados são caracterizados como Floresta Estacional Semidecidual, onde é condicionada por dupla estacionalidade climática. Na região tropical, é definida por dois períodos pluviométricos bem marcados, um chuvoso e outro seco, com temperaturas médias anuais em torno de 21°C; e na região subtropical, por um curto período de seca acompanhado de acentuada queda da temperatura, com as médias mensais abaixo de 15°C (Campanili e Schaffer, 2010).

O município de Itororó se estende por 314,064 km<sup>2</sup> (IBGE, 2018) e se situa a cerca de 33 km de Itapetinga e a 74 km de Itambé. A temperatura média do município é de 21,0 °C e a pluviosidade média anual é de 865 mm (Climate-Data, 2018). A área de unidade territorial de Itambé, Ba abrange 1.536,269 km<sup>2</sup>. O município está a cerca de 44 km de distância de Itapetinga, Ba (IBGE, 2018). Itambé possui uma temperatura média de 21,0 °C. 750 mm é a pluviosidade média anual (Climate-Data, 2018). Itapetinga, Ba, possui uma área total que abrange 1.651,153 km<sup>2</sup>. (IBGE, 2018). A temperatura média é de 21,0 °C com a pluviosidade média anual de 857 mm. (Climate-Data, 2018).

## CAPÍTULO I

### **Comparação de Protocolos para Extração de DNA Genômico de *Calotropis procera* Ait. R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae)**

**Artigo publicado na revista Multi-Science Journal.**











## CAPÍTULO II

Manuscrito a ser submetido a revista *Genetics and Molecular Research: GMR*

### **Amplification profile of ISSR markers and selection of primers for genetic studies in *Calotropis procera* (Apocynaceae: Asclepiadoideae)**

Amplification profile of ISSR markers in *Calotropis procera*

**Cibelle Santos Dias<sup>1</sup>, Luiz Henrique Tolentino Santos<sup>1</sup>, Jardyelle Carvalho Lima<sup>1</sup>,  
Rafaella Almeida Soares<sup>1</sup>, Thamires Oliveira dos Santos<sup>1</sup>, Messulan Rodrigues Meira<sup>1</sup>,  
E.S.L dos Santos<sup>1,2</sup> and C.B.M. Cerqueira-Silva<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Molecular Aplicada, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, Brazil. <sup>2</sup>Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Rodovia da BR 415, Km 04, S/N, CEP 45000-700, Itapetinga, Bahia, Brazil.

\*Author for correspondence. E-mail: csilva@uesb.edu.br

**ABSTRACT.** *Calotropis procera* is a plant species native to Southwest Asia and Africa, being observed in the tropical and semi-arid regions of America. The species is adapted to several ecosystems and has the capacity to expand its distribution in anthropized environments. Genetic and molecular studies are scarce for *C. procera*. However, genetic estimates with the use of molecular markers are, in general, indispensable for characterization of diversity and for the understanding of evolutionary aspects. We aimed to characterize the amplification profile of 23 ISSR primers and to select markers to support genetic studies. For that, young leaves of 33 specimens from a *C. procera* population were collected. The genomic DNA was extracted using the protocol previously selected by the research group and analysis of the amplification patterns obtained using ISSR primers carried out from electrophoresis. Characterization of the PCR amplification profile was performed to classify the amplification profiles in adequate, reasonable and inadequate. After that the descriptive analyzes were performed considering the total number of markers generated, the average number of markers observed per primer, the percentage of polymorphism, the expected heterozygosity (He) and the polymorphism information content (PIC). All ISSR primers generated amplification profile classified as adequate and polymorphic, presenting an average of 7.5 markers per primer. A mean of 0.30

and 0.24 was also observed for the estimates of PIC and He. The ISSR primers prove to be useful for supporting genetic studies associated with *C. procera*.

**Key words:** Diversity, molecular markers, genetics, molecular polymorphism, silk flower.

## INTRODUCTION

*Calotropis procera* Ait. R. Br. Is an exotic species belonging to the family *Apocynaceae*, the subfamily *Asclepiadoideae* and the tribe *Asclepiadeae* (Sennblad & Bremer, 2002). The species is native to Africa and Asia (Lottermoser, 2011) found in arid, semi-arid and tropical regions of the Americas (Rangel & Nascimento, 2011; Sobrinho, Tabatinga, Machado & Lopes, 2013). In Brazil the species was introduced in XIXth (Kissmann & Groth, 1999). In which it is well adapted in arid and semi-arid tropical conditions.

As natural resources, the *C. procera* species possesses multiple applicability. In Africa, Asia and Brazil, is used in the traditional medicine, agriculture, textile industry, cosmetics and in combating fungi, viruses and larvae (Ramos et al., 2009; Shahi, Hanafi-Bojd, Iranshahi, Vatandoost & Hanafibojd, 2010). As well as manufacture of the pillow filling (Rani, Sharma, Chaturvedi, & Yadav, 2017). Being that in Brazil, firstly introduced to be ornamental plant. While that in Africa and Asia it is used in fabric manufacture, pillow filling and traditional medicine. This species is easily found in road borders, pasture areas and anthropic environments. Which is characterized as indicator of degraded areas (Souto, Sales, Souto, Santos & Sousa, 2008).

Molecular markers are useful tools for genomic characterization and are indispensable for diversity estimates and evolutionary studies. The applications of molecular markers range from genetic breeding, plants and animal conservation (Tavares et al., 2013), and identification of bacterial strains (Cruvinel, Melo & Lacorte, 2017).

Molecular markers have particular characteristics and polymorphism patterns that can make their efficiency and cost variable according to the species and to the research goal. According to Grativol, Lira-Medeiros, Hemerly and Ferreira (2010), the efficiency of molecular markers can be measured by the amount of detectable polymorphism between the accesses under investigation (Grativol et al., 2010).

Among the available molecular markers, the Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers are characterized by detection of polymorphisms in microsatellite flanked loci (Zietkiewicz, Rafalski & Labuda 1994), and are potentially capable of producing high numbers of fragments by using primer (Fang, Roose, Krueger & Federice 1997). Other advantages are associated with high reproducibility and relatively low cost when compared to other molecular markers (Zolet, Turchetto, Zanella & Bassaio, 2017).

ISSR markers have been used successfully to estimate genetic diversity in several species, such as: *Catharanthus roseus* L. (Ibrahim, Abou El-Nasr, Abdel-Samea & Aboud, 2013), *Decalepis arayalpathra* J. Joseph & V. Chandras (Mishra, Kumar, Kumar, Gokul, Ravikumar, Shukla & Sundaresan, 2015), *Hancornia speciosa* Gomes (Jimenez et al., 2015; Costa, Vieira, Fajardo & Chagas, 2015; Soares et al., 2017) and *Nerium oleander* L. (Lazzaro, Sarracco, Benesperi & Coppi, 2017).

Despite the many uses attributed to the species, there are few genetic and molecular studies for the species, limiting itself to the study of Almeida, Ramos, Dutra, Bruno and Alves (2017), dedicated to genetic diversity among genotypes of *C. procera* aimed at physiological quality of seeds. However, we aimed to characterize the amplification profile from ISSR, as well as to select primers to be prioritized in genetic analyzes of *Calotropis procera* Ait. R. Br.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **DNA extraction and ISSR marker amplification**

The research was accomplished from February the year of the 2018. In the period fresh leaves of 33 plants of *Calotropis procera*, located in three municipalities, of micro region of middle Sudoeste of Bahia, was collected. All population were georeferenced with Garmin GPS Oregon (Global position system) received and registered in SisGen (National System of Management of Genetic Heritage and traditional Associated knowledge). These natural environments são: located near Itororó, under the geographical coordinates 15°7,571'S and 40°2,271'W. The procedures adopted for DNA extraction followed the protocols described in Russell, Samuel, Rupp & Barfuss (2010), which was previously selected as suitable for *C. procera* (Dias, Santos, Lima, Soares, Santos, & Cerqueira-Silva 2018). The quality of the samples was evaluated by electrophoresis on 1% agarose (w/s) gels at 120 V for 90 minutes. The samples were stained with GelRed Biotium and the amplification products were visualized

under U.V light and registered by on a digital camera coupled to Kodak Photodocumentation System and KODAK MI Software.

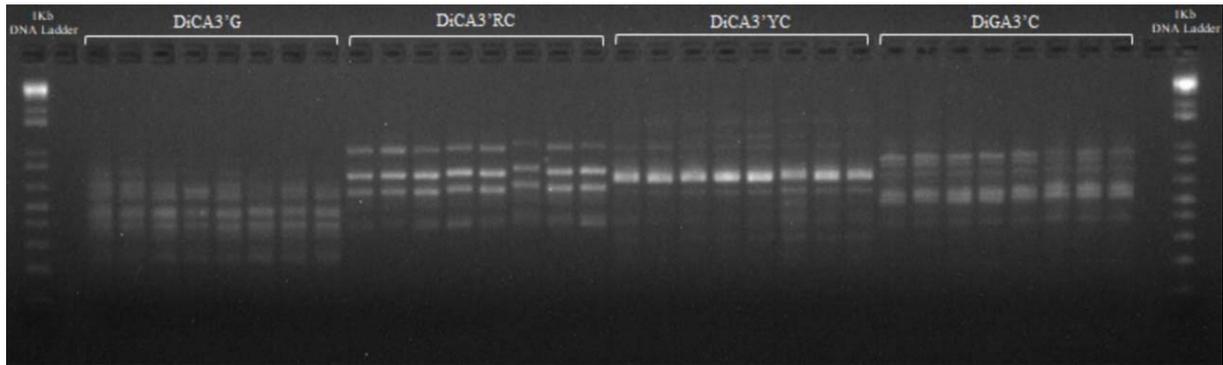
The 33 samples were submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR), performed in Laboratory of Applied Molecular Genetics (UESB, Itapetinga, BA, Brazil), using 23 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) primers (Table 1). The amplifications were performed in Veriti Thermalcycler (Applied Biosystems) using programmed under the following protocol: 5 minutes at 94° C followed by 34 cycles (50 seconds at 94 °C, 50 seconds at 48 °C and 1 minute at 72 °C), and a final extension for 5 minutes at 72 °C. In summary, the reactions were performed in a volume of 16 µl, containing: 2ng template DNA, buffer 10X PCR, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM dNTP mix, and 1 unit Taq polymerase (LGC biotechnology) and ISSR primer 10 ng and sterile H<sub>2</sub>O.

The amplification profiles were evaluated by electrophoresis on 2% agarose (w/v) gel at 120 V for 120 minutes. The samples were stained with GelRed Biotium and photodocumented under same operating conditions of genomic DNA as above mentioned. Profile analysis of amplification was performed by two researchers separately, and only patterns clearly observed by both were considered.

The Characterization of amplification profile was performed in two-step sequences. In the first step, we tried to analyze the amplification profiles generated with the 23 ISSR primers and then classify them into: (i) Adequate - amplifications in all samples easy to visualization; (ii) Reasonable - amplification in parts of samples with little difficult to visualization, and (iii) Inadequate - absence of visible amplification products. In the second step, descriptive analyzes were performed, considering (i) the total number of markers generated, (ii) the average number of markers observed per primer, (iii) percentage of polymorphism, (iv) expected Heterozygosity, (v) the Polymorphic Information Content (PIC), using the GenAlex (Peakall & Smouse, 2012) and Genes (Cruz, 2013) software.

## RESULTS AND DISCUSSION

The 23 ISSR markers tested allowed the amplification and satisfactory visualization of the fragments from the PCR reactions using the genomic DNA of *Calotropis procera* and were classified as adequate (Figure 1).



**Figure 1:** Amplification profile observed from ISSR primers, DiCA3'G, DiCA3'RC, DiCA3'YC and DiGA3'C, tested in eight individuals of *Calotropis procera* Ait. R. Br..

The annealing temperature is one of the factors that directly contribute to the specificity of the molecular markers (Atienzar, Evenden, Jha, Savva & Depledge, 2000). In this context, ISSR markers have a relatively high annealing temperature, varying from 40°C to 55°C (Moraga-Suazo, Hasbún, Balocchi & Valenzuela 2012; Nascimento, Sá, Ledo & Silva, 2017), compared to other dominant markers, example of Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD which usually ranges from 34°C to 37°C (Mishra et al., 2015; Priya, 2015).

In spite of the fact that we observed an adequate amplification profile from all the ISSR primers evaluated in *C. procera*, attesting the efficiency of this marker for genetic studies of this species, different results are described in the literature for other species. Ibrahim et al. (2013), when evaluating the amplification profile of the genomic DNA of vinca (*Catharanthus roseus*), found that 77% of the primers tested did not generate adequate amplification profiles. In contrast to Ibrahim et al. (2013), Nascimento et al., (2017) observed that 66% of the ISSR markers tested produced an adequate amplification product for mangaba (*Hancornia speciosa*).

Although ISSR markers show adequate amplification pattern in most studies involving primer characterization and selection, there are, as demonstrated, variations in relation to their efficiency in different species. Therefore, preliminary studies aiming at the characterization and selection of primers contribute to obtain better results related to molecular genetic studies.

The 23 ISSR primers tested generated a total of 173 amplified tags with average number of 7.5 markers per primer. All primers tested were polymorphic, with average of 6.7 markers. The percentage of polymorphism (PP %) ranged from 100% (with primers DiCA3'RG, DiCA3'YG, DiGA3'RC, DiGA3'T, TriCAC3'RC, TriCAC3'YC, TriGTG3'YC, TriTGT3'YC, TriTGG3'RC, TriCGC3'RC and TriGCC3'RC) and 38% (with the initiator

TriAGA3'RC), being that the marker TriAGA3'RC was the only one that presented the PP (%) below of 50% (Table 1). The total percentage of polymorphism obtained from 23 ISSR primers for the *Calotropis procera* species was approximately 90%.

**Table 1:** Amplification profile genomic regions of *Calotropis procera* based on 23 Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) primers.

Code	Primers Sequence (5'-3')	Number of fragments (markers)		PP (%)	<i>He</i>	PIC
		Total	Polymorphic			
DiCA3'G	(CA) <sub>8</sub> G	8	7	88	0,21	0,26
DiCA3'RG	(CA) <sub>8</sub> RG	7	7	100	0,29	0,36
DiCA3'YG	(CA) <sub>8</sub> YG	8	8	100	0,24	0,29
DiGA3'C	(GA) <sub>8</sub> C	8	7	88	0,27	0,34
DiGA3'RC	(GA) <sub>8</sub> RC	9	9	100	0,26	0,32
DiGA3'T	(GA) <sub>8</sub> T	5	5	100	0,33	0,43
TriCAC3'RC	(CAC) <sub>5</sub> RC	11	11	100	0,19	0,23
TriCAC3'YC	(CAC) <sub>5</sub> YC	9	9	100	0,30	0,38
TriCAC5'CY	(CAC) <sub>5</sub> CY	6	3	50	0,12	0,15
TriCAG3'RC	(CAG) <sub>5</sub> RC	5	4	80	0,20	0,24
TriGTG3'YC	(GTG) <sub>5</sub> YC	8	8	100	0,25	0,30
TriTGT3'YC	(TGT) <sub>5</sub> YC	10	10	100	0,28	0,35
TriAAC3'RC	(AAC) <sub>5</sub> RC	6	5	83	0,18	0,22
TriAAG3'RC	(AAG) <sub>5</sub> RC	6	5	83	0,23	0,28
TriACG3'RC	(ACG) <sub>5</sub> RC	6	5	83	0,26	0,32
TriAGA3'RC	(AGA) <sub>5</sub> RC	8	3	38	0,10	0,11
TriTGG3'RC	(TGG) <sub>5</sub> RC	9	9	100	0,32	0,41
TriCGA3'RC	(CGA) <sub>5</sub> RC	7	6	86	0,23	0,27
TriCGC3'RC	(CGC) <sub>5</sub> RC	9	9	100	0,30	0,37
TriGAC3'RC	(GAC) <sub>5</sub> RC	7	6	86	0,29	0,38
TriGCA3'RC	(GCA) <sub>5</sub> RC	10	9	90	0,28	0,36
TriGCC3'RC	(GCC) <sub>5</sub> RC	6	6	100	0,25	0,30

TriGGA3'RC	(GGA) <sub>5</sub> RC	5	4	80	0,24	0,30
Total		173	155	-	-	-
Average		7,5	6,7	89,6	0,24	0,30

R: purine (A or G); Y: pyrimidine (C or T); PP: percent of polymorphism; He: expected heterozygosity; PIC: polymorphic information content.

ISSR markers are a reality for genetic diversity studies to provide reproducible results and to identify considerable polymorphisms in populations. These characteristics are evidenced in different percentages, ranging from values greater than 85% of the polymorphism (Jimenez et al., 2015) to values close to 50% of the polymorphism (Ibrahim et al., 2013; Soares et al., 2017; Lazzaro et al., 2017).

The high percentage of polymorphism found in the population of *Calotropis procera* analyzed using ISSR markers confirms the efficiency of the marker in the detection of polymorphism and its applicability in studies of genetic variability of populations. The success of the marker was also evidenced by Soares et al. (2016) by obtaining 100% polymorphism using 15 markers in ten natural populations of mangaba in the state of Sergipe. Shahnawaz et al. (2012) reported the efficiency of eight ISSR markers in the detection of polymorphism of twenty-two populations of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. In total, a mean of 5.5 polymorphic marks and a polymorphism percentage of 84, 61% (Shahnawaz et al., 2012).

Regarding the potential of the markers to identify polymorphism among individuals of a population, were observed mean values of 0.24 and 0.30 for estimates of He and PIC, respectively. These results corroborate the idea of efficiency of these markers for genetic studies of *C. procera*. In particular, the ISSR primers that presented higher values of He and PIC could be prioritized in population studies, as the initiators DiGA3'T, TriTGG3'RC, TriCAC3'YC e TriGAC3'RC.

## CONCLUSION

The ISSR markers are a suitable tool for genetic studies in *Calotropis procera*, since in their totality the 23 primers generated amplification profile passible of analysis, besides presenting percentages of polymorphism and statistical values that attest their informative potential.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB); Programa de Pós-Graduação em Zootecnia of the UESB and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) for financial and technical support the realization of this study.

## REFERENCES

- Cruvinel, L. A., Melo, S. N., & Lacorte, G. A. (2017). Use of genetic tools in the identification of bacterial communities of artisan cheeses: a review systems of literature. *For Science*, 5(2), 1-10. DOI: 0.29069/forscience.2017v5n2.e310
- Almeida, I. V. B., Ramos, J. P. C., Dutra, W. F., Bruno, R. L. A. & Alves, E. U. (2017). Genetic Diversity Among *Calotropis procera* (Aiton) Wt Aiton Genotypes According to Seed Physiological Quality. *Revista Caatinga*, 30(4): 912-919. DOI: 10.1590/1983-21252017v30n411rc.
- Tavares, M. G., Almeida, B. S., Passamani, P. Z., Paiva, S. R., Resende, H. C., Campos, L. A. O., ... Waldschmidt, A. M. (2013). Genetic variability and population structure in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) from Bahia, Brazil, based on molecular markers. *Apidologie*, 8(6), 720-728. DOI: 10.1007/s13592-013-0220-y
- Atienzar, F. A., Evenden, A., Jha, A., Savva, D. & Depledge, M. (2000). Optimized RAPD Analysis Generates HighQuality Genomic DNA Profiles at High Annealing Temperature. *Bio Techniques*. 28(1): 52-54. DOI: 10.2144/00281bm09
- Costa, D. F., Vieira, F. A., Fajardo, C. G. & Chagas, K. P. T. (2015). Genetic diversity and selection of ISSR primers in a natural population of Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37(4): 970-976. DOI: 10.1590/0100-2945-246/14

- Cruz, C. D. (2013). *GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. Acta Scientiarum*, 35(3): 271-276. DOI: 10.4025/actasciagron.v35i3.21251
- Dias, C. S., Santos, L. H. T., Lima, J. C., Soares, A. B. L. Santos, E. S. L. & Cerqueira-Silva, C. B. (2018). Comparison of protocols for extraction of genomic DNA from *Calotropis procera* Ait. R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae). *Multi-Science Journal*, 1(13): 277-281. DOI: 10.33837/msj.v1i13.654
- Fang, D. Q., Roose, M. L., Krueger, R. R. & Federice CT. (1997). Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and intersimple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 211–219. DOI: 10.1007/s001220050550
- Grativol, C., Lira-Medeiros, C. F., Hemerly, A. S. & Ferreira, P. V. C. (2010). High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. *Molecular Biology Reports*, 38(7): 4245–4256. DOI: 10.1007/s11033-010-0547-7
- Ibrahim, M. M., Abou El-Nasr, T. H. S., Abdel-Samea, N. S. & Aboud, K. A. (2013). Efficiency of RAPD and ISSR Markers in Assessment of Genetic Diversity in Some *Catharanthus roseus* L. Cultivars Grown in Egypt. *World App. Sci. J.* 26(11): 107-1415. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2013.26.11.13581
- Jimenez, H. J., Martins, L. S. S., Montarroyos, A. V. V., Silva Júnior, J. F., Alzate-Marin, A. L., Moraes Filho, R. M. (2015). Genetic diversity of the Neotropical tree *Hancornia speciosa* Gomes in natural populations in Northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 14(4): 17749-17757. DOI: 10.4238/2015
- Rani, R., Sharma, D., Chaturvedi, M. & Yadav, J. P. (2017). Antibacterial Activity of Twenty Different Endophytic Fungi Isolated from *Calotropis procera* and Time Kill Assay. *Clinical Microbiology*, 6(3), 1-6. DOI:10.4172/2327-5073.1000280
- Kissmann KG & Groth D. (1999). *Plants Infestantes e Nocivas*. Tomo II. Editora BASF - São Paulo.
- Lazzaro, L., Sarracco, E., Benesperi, R. & Coppi, A. (2017). A probable anthropic origin of *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) population in Montecristo island (Italy, Tuscany): evidence from loci polymorphism and ISSR analysis. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*. 71(1): 50-57. DOI: 10.1080/00087114.2017.1410634.

- Mishra, P., Kumar, L. D., Kumar, A., Gokul, S., Ravikumar, K., Shukla, A. K. & Sundaresan, V. (2015). Population Dynamics and Conservation Implications of *Decalepis arayalpathra* (J. Joseph and V. Chandras.) Venter., a Steno Endemic Species of Western Ghats, India. *App. Biochem. Biotechnol.* 176(5): 1413-1430. DOI: 10.1007/s12010-015-1654-7
- Moraga-Suazo P, Hasbún R, Balocchi C & Valenzuela S. (2012). Establishment and optimization of ISSR and SAMPL molecular markers as a tool for breeding programs of *Pinus radiata*. *Bosque.* 33(1): 91-98. DOI: 10.4067/S0717-92002012000100011
- Nascimento, A. L. S., Sá, A. J., Ledo, A. S. & Silva, A. V. C. (2017). DNA extraction in Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Nucleus.* 14(2): 97-106. DOI: 10.3738/1982.2278.2727
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012) GenALEX 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teach-ing and research-na update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Priya, T. A., Manimekalai, V. & Ravichandran, P. (2015) Intra Specific Genetic Diversity Studies on *Calotropis gigantea* (L) R. Br. - Using RAPD Markers. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 3(4): 7-9.
- Ramos, M. V., Pereira, D. A., Araújo, E. S., Freitas, C. D., Cavalheiro, M. G., Matos, M. P. V. & Carvalho, A. F. (2009). Potential of laticifer fluids for innibiting larvae development of *Stegomyia (Aedes) aegypti*: Evidences fot the involvement of proteolytic activity. *Memories of the Institute Oswaldo CRUZ*, 104(6): 805-8012. DOI: 10.1590/S0074-02762009000600001
- Shahi, M., Hanafi-Bojd, A. A., Iranshahi, M., Vatandoost, H. & Hanafibojd, M. Y. (2010). Larvicidal efficacy of latex and extract of *Calotropis procera* (Gentianales: Asclepiadaceae) against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Borne Diseases*, 47, 185-188. PMID:20834091
- Russell, A., Samuel, R., Rupp, B. E. & Barfuss, M. H. J. (2010). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon.* 59(2): 389-404. DOI: 10.2307/25677598
- Sennblad, B. & Bremer, B. (2002). Classification of Apocynaceae s.l. According to a New Approach Combining Linnaean and Phylogenetic Taxonomy. *Systematic Biology*, 5(3): 389-409. DOI: 10.1080/10635150290069869

- Soares, A. N. R., Vitória, M. F., Nascimento, A. L. S., Ledo, A. S., Rabbani, A. R. & Silva, A. V. (2016). Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 15(3): 1-12. DOI: 10.4238/gmr.15038624
- Soares, F. S., Rossi, A. A. B., Silva, B. M., Cochev, J. S., Sobrinho, S. P. & Luz, P. B. (2017). Diversity and genetic structure of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), a fruit species from Cerrado. *Semina: Ciências Agrárias.* 38(4): 2478-2488. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n4Supl1p2479.
- Souto, P. C., Sales, S. C. V., Souto, J. S., Santos, R. V. & Sousa, A. A. (2008). Biometrics of Fruits and Number of Seeds of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br in the Semi-Arid of Paraíba. *Green Magazine.* 3(1): 108-113. DOI: 10.18378/rvads.v3i1.67
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics,* 20(2): 176–183. DOI: 10.1006/geno.1994.1151.
- Zolet, A. C. T., Turchetto, C., Zanella, C. M. & Bassaio, G. (2017). *Molecular Markers in the Genomic Age: Methodologies and Applications.* Brazilian Society of Genetics. Ribeirão Preto-SP.
- Shahnawaz, M., Zanan, R. L., Wakte, K. V., Mathure, S. V., Kad, T. D., Deokule, S. S. & Nadaf, A. B. (2012). Genetic diversity assessment of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Sm. populations from Western Ghats of Maharashtra, India. Genetic Resources and Crop Evolution, 59, 125–134. DOI: 10.1007/s10722-011-9757-7
- Rangel, E. S. & Nascimento, M. T. (2011). Occurrence of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae) as an invasive species in restinga vegetation. *Acta Botanica Brasilica*, 25(3): 657-663. DOI: 10.1590/S0102-33062011000300019
- Sobrinho, M. S., Tabatinga, G. M., Machado, I. C. & Lopes, A. V. (2013). Reproductive phenological pattern of *Calotropis procera* (Apocynaceae), an invasive species in Brazil: annual in native areas; continuous in invaded areas of caatinga. *Acta Botanica Brasilica*, 27(2): 456-459. DOI: 10.1590/S0102-33062013000200018
- Lottermoser, B. G. (2011) Colonisation of the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine site (Australia) by *Calotropis procera*: toxicity risk to grazing animals. *Journal of Geochemical Exploration*, 111: 39-46. DOI: 10.1016/j.gexplo.2011.07.005

## CAPÍTULO III

Manuscrito a ser submetido a revista *Genetics and Molecular Research: GMR*

**Caracterização da Diversidade Genética de *Calotropis procera* Ait. R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae) em Três Regiões do Médio Sudoeste**

**C.S. Dias<sup>1</sup>, L.H.T. Santos<sup>1</sup>, J.C. Lima<sup>1</sup>, T. O. Santos<sup>1</sup>, M.R. Meira<sup>1</sup>, E.S.L dos Santos<sup>1,2</sup> and C.B.M. Cerqueira-Silva<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Molecular Aplicada, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brazil.

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

**RESUMO.** *Calotropis pocera* (Ait.) R. Br. é arbusto natural da África tropical e Ásia que foi introduzido no Brasil para ser utilizada como planta ornamental. Devido ao seu potencial de dispersão, tornou-se invasora de área de pastagens. Portanto, objetivou-se estimar a diversidade genética intra e interpopulacional de *C. procera* pertencentes a três regiões do Médio Sudoeste da Bahia, Brasil. Folhas jovens de aproximadamente 40 espécimes de *C. procera* em três ambientes, localizados nos municípios de Itororó Itapetinga e Itambé, Bahia, Brasil. O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo previamente selecionado pelo grupo de pesquisa. As amostras de DNA foram submetidas à amplificação utilizando doze marcadores ISSR. Para as análises estatísticas dos dados foram avaliadas imagens resultantes das eletroforeses. Para as análises descritivas dos dados, considerou-se o número de fragmentos por marcadores nas populações, percentual de polimorfismo, conteúdo de informações polimórficas, índice de Shannon, Heterozigosidade esperada e Heterozigosidade observada. A análise de variância molecular foi realizada para estimar a diversidade genética inter e intrapopulacional. O

agrupamento UPGMA e PCoA, bem como, Análise Bayesiana, também foram estimados. Os resultados apresentaram um total de 142 marcas, sendo 94% polimórficas. O conteúdo de informação polimórfica variou entre 0,08 a 0,23. O índice de Shannon apresentou valores que entre 0,13 e 0,41. A Heterozigosidade esperada e a Heterozigosidade observada variaram entre 0,09 e 0,28. A análise Bayesiana, apresentou estruturação em dois *pools* gênicos e subestruturação em três *pools* gênicos. A variância molecular indicou maior distância genética entre as populações de Itororó e Itapetinga e menor distância entre Itapetinga e Itambé. O método UPGMA foi capaz de representar significativamente a diversidade genética existente entre os genótipos e as populações.

**Palavras-chave:** Flor de seda, planta medicinal, ISSR, variabilidade, genética de populações.

**ABSTRACT.** *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. is a natural shrub from tropical Africa and Asia that was introduced in Brazil to be used as an ornamental plant. Therefore, the objective was to estimate the intra and interpopulational genetic diversity of *C. procera* belonging to three regions of the Middle Southwest of Bahia, Brazil. Young leaves of approximately 40 specimens of *C. procera* in three environments, located in the municipalities of Itororó Itapetinga and Itambé, Bahia, Brazil. The genomic DNA was extracted using the protocol previously selected by the research group. The DNA samples were subjected to amplification using twelve ISSR markers. For the statistical analysis of the data, images resulting from electrophoresis were evaluated. For the descriptive analyzes of the data, the number of fragments by markers in the populations, percentage of polymorphism, content of polymorphic information, Shannon index, expected heterozygosity and observed heterozygosity were considered. The analysis of molecular variance was performed to estimate inter and intrapopulational genetic diversity. The UPGMA and PCoA clustering, as well as, Bayesian Analysis, were also estimated. The results presented a total of 142 marks, being 94% polymorphic. The content of polymorphic

information ranged from 0.08 to 0.23. The Shannon index presented values between 0.13 and 0.41. Expected Heterozygosity and Heterozygosity varied between 0.09 and 0.28. The Bayesian analysis showed structure in two gene pools and substructure in three gene pools. The molecular variance indicated greater genetic distance between the populations of Itororó and Itapetinga and smaller distance between Itapetinga and Itambé. The UPGMA method was able to represent significantly the genetic diversity between genotypes and populations.

**Keywords:** Silk flower, medicinal plant, ISSR, variability, population genetics.

## INTRODUÇÃO

*Calotropis procera* Ait. R. Br. é um arbusto perene pertencente à família Apocynaceae, a subfamília Asclepiadoideae e a tribo Asclepiadeae (Sennblad & Bremer, 2002). A espécie é proveniente da África tropical e Ásia e foi inserida no Brasil em meados do século XIX como planta ornamental por consequência da sua inflorescência durante todo o ano (Ulhôa et al., 2007). Atualmente, tem recebido destaque por se desenvolver nas mais diversas condições edafoclimáticas, como em áreas com baixo índice pluviométrico, solos arenosos, pobres em nutrientes, ácidos e degradados (Khan e Malik, 1989; Andrade et al., 2005), em ambientes salinos e com altas temperaturas (Carvalho Júnior et al., 2010). Em consequência da sua capacidade de se disseminar nesses ambientes, tornou-se invasora de áreas de pastagens e bioindicadora de áreas degradadas (Souto et al., 2008).

A fragmentação de habitats para o desenvolvimento socioeconômico, tem transformado ambientes naturais em áreas propícias a invasão de espécies exóticas (Sala et al, 2000; Resende e Coelho, 2015). A introdução dessas espécies está diretamente associada a atividades antrópicas por interesses comerciais, estético e alimentar (Resende e Coelho, 2015), como a

pecuária, agricultura, ambientes urbanos e outros usos (Silva, 2016). A rápida adaptação de *C. procera*, aliada com potencial de dispersão anemocórica de suas sementes, contribui para o desenvolvimento e estabelecimento da espécie em uma amplitude de ambientes fragmentados (Souto et al., 2008; Instituto Hórus, 2013). A conversão dos ambientes naturais para o uso e ocupação humana, causa a perda de diversidade biológica, visto que, esses fatores comprometem o fluxo gênico entre as populações e possui grande influência na determinação dos padrões espaciais e temporais de diversidade genética (Silva, 2016).

A diversidade genética é a responsável pela estabilidade e manutenção do equilíbrio dos ecossistemas, determinando as chances de sobrevivência, reprodução e adaptação das espécies diante das possíveis mudanças ambientais (Fleishman et al., 2001). A informação prévia acerca da diversidade e estrutura genética das espécies, trazem vantagens para a elaboração de estratégias de manejo sustentável, conservação e melhoramento dos recursos genéticos (Costa et al., 2009). Neste sentido o uso de marcadores moleculares em estudos genéticos moleculares tem facilitado as pesquisas relacionadas à diversidade genética de espécies de muitos organismos (Santos et al., 2009).

Os marcadores moleculares possibilitam a detecção de polimorfismos nas sequências de DNA, determinam as relações genéticas entre indivíduos (Reddy et al., 2002; Costa, 2010). Acessam informações quanto à estrutura das populações, fluxo gênico, relações filogenéticas e padrões (Féral, 2002). Dentre os marcadores moleculares existentes, os ISSR se destacam por detectar polimorfismos em *locos* intermicrosatélites (Zietkiewicz et al., 1994), por produzir altos números de fragmentos por iniciador (Fang et al., 1997), possuem alta reprodutibilidade, custo relativamente baixo quando comparado com os demais marcadores (Vijayan, 2005; Zolte et al., 2017) e por serem eficazes em estudos de diversidade genética (Liu et al., 2008). Diante do exposto, objetivou-se estimar a diversidade genética intra e interpopulacional da espécie pertencentes à três regiões do Médio Sudoeste da Bahia, Brasil.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada a partir de fevereiro do ano de 2018. No período foram colhidas folhas frescas de 33 plantas de *Calotropis procera*, localizadas em três municípios, da microrregião do médio Sudoeste da Bahia. Todas as populações foram georreferenciadas com o Garmin GPS Oregon (Sistema de Posicionamento Global) recebido e registrado no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado). Estes ambientes naturais são: localizados perto de Itororó, sob as coordenadas geográficas 15 ° 7,571'S e 40 ° 2,271'W.

Para a condução do experimento, foram utilizadas três populações de *Calotropis procera*, que se encontram distribuídas nos municípios de Itororó (Pop 1), Itapetinga (Pop 2) e Itambé (Pop 3), Bahia, Brasil (Figura 1 e Material suplementar 1). Cada município foi denominado de acordo com a ordem de coleta, sendo respectivamente o município de Itororó, Itapetinga e Itambé-Ba. Em cada região, coletou-se folhas jovens de 40 indivíduos de *C. procera* as quais foram submetidas a extração do DNA genômico utilizando o protocolo de extração definido por Dias et al. (2018), cujo tampão de extração foi o Sorbitol.

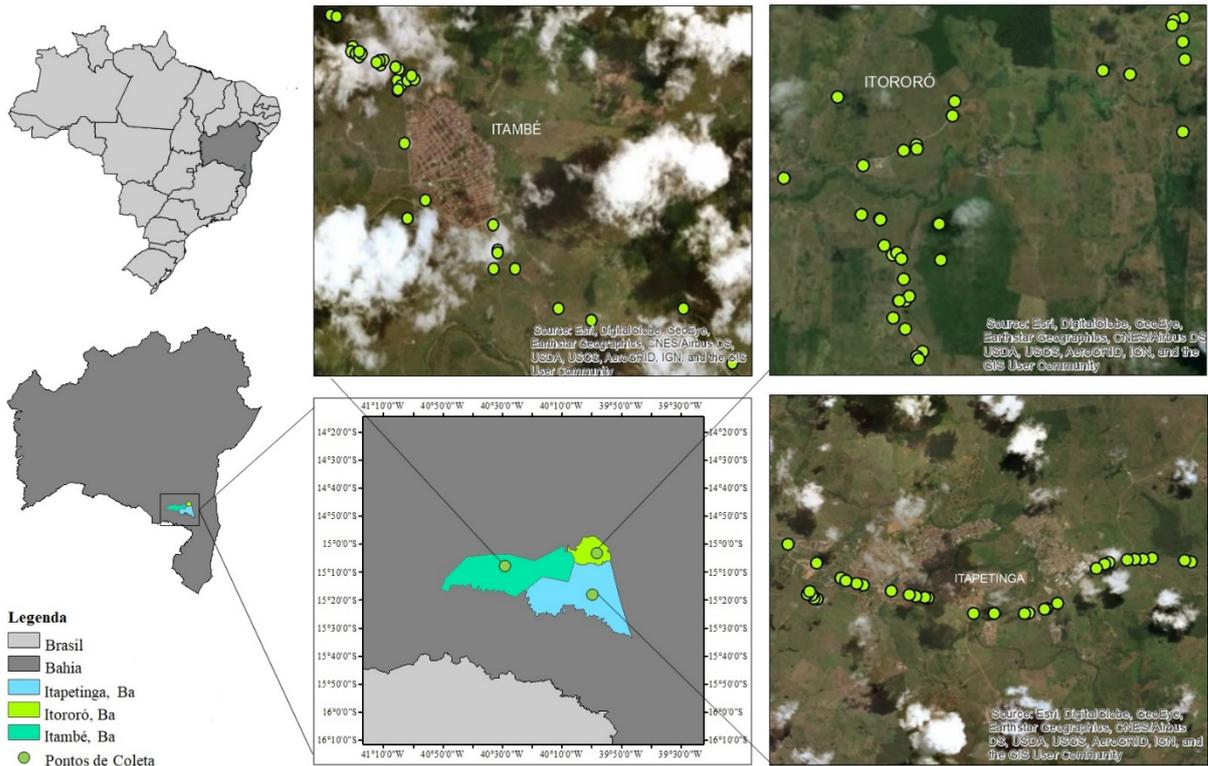


Figura 1. Ambiente de coleta de *Calotropis procera* Ait. R. Br., localizados em Itororó, Itapetinga e Itambé, Bahia, Brasil. Os pontos verdes representam os espécimes coletados e posteriormente aplicados nos estudos genéticos moleculares.

A qualidade das amostras foi avaliada a partir da imagem do gel de agarose a 1% (90 min a 90 V). Após eletroforese os géis (m/v) foram submetidos a fotodocumentação em sistema Kodak com incidência de luz ultravioleta. De posse da análise da integridade do DNA genômico, o material foi diluído para obter a concentração de reação. Na sequência as amostras foram submetidas à amplificação utilizando doze marcadores ISSR previamente selecionados. O processo de amplificação foi efetuado por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em um termociclador MJ 96 (*Bioclycer*) com um volume total de 16  $\mu$ l, contendo 2 ng/ $\mu$ l de DNA, 1,7  $\mu$ L de tampão de PCR 10X (*LGC biotecnologia*), 1,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50mM (*LGC Biotecnologia*), 1  $\mu$ L de dNTP mix 2,5mM (*LGC biotecnologia*), 1 unidade de Taq DNA polimerase (*LGC biotecnologia*), água Milli-Q e 1  $\mu$ L de cada iniciador.

As amplificações foram realizadas com o uso de 12 marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), previamente classificados como ideal para *Calotropis procera* (Dias et al., 2019), adotando-se os seguintes programas: 5 minutos a 94°C seguido por 34 ciclos (50 segundos a 94°C; 50 segundos a 48°C e 1 minuto a 72°C) finalizando com 5 minutos a 72°C. Os padrões de amplificação foram avaliados por eletroforese (120 minutos sob uma corrente elétrica de 120 V) em gel de agarose a 2% (m/v) com solução de corrida TBE 0,5X (Tris-Ácido Bórico-EDTA). Os resultados foram visualizados com uso de *GelRed* (*Biotium*) e sistema de fotodocumentação Kodak (*KODAK MI Software*) com incidência de luz ultravioleta.

Para as análises estatísticas dos dados, considerou-se as imagens das reações de PCR para cada iniciador. A partir dessa observação, construiu-se uma matriz binária de presença (1) e ausência (0), tendo o numeral 9 como identificador de elementos faltantes. De posse da matriz, os descritores quantitativos de frequência alélica, foram calculados. Adicionalmente, mensurou-se o percentual de polimorfismo e PIC para cada iniciador. Dentre os descritores os Índice de Shannon ( $H'$ ), Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), Heterozigosidade observada ( $H_o$ ), Conteúdo de Informação Polimórficas (PIC), Percentual de Polimorfismo (PP%), Monomorfismo (M) e Polimorfismo (P), cujas análises foram viabilizadas com o auxílio do *Software Genes* (Cruz, 2013). Para observar a variabilidade genética entre e dentro das populações utilizou-se a Análise de Variância Molecular (AMOVA) e a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), considerando 999 permutações ao acaso, também foram calculadas. Essa etapa foi realizada utilizando o pacote estatístico *GenALEX* v.6.5 (Peakall e Smouse, 2012).

Assumindo que dentro dos grupos, os indivíduos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e que os *locos* estão em equilíbrio de ligação, realizou-se a inferência Bayesiana. Para esse parâmetro, admitiu-se no modelo a existência de fluxo genético entre as amostras (admixture model), onde realizou-se 20 corridas para cada um dos possíveis *pool* gênicos 'K'

testados (adotando-se um intervalo de k1 a k10). A análise Bayesiana foi realizada com o programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Para os períodos de pré-análise (*burnining*) e desenvolvimento da MCMC (cadeia de Markov), adotou-se 100.000 e 1.000.000 de corridas, respectivamente. Para estimativa do número de *pools* gênicos que melhor representasse a distribuição da diversidade das populações utilizou-se a ferramenta *on line* STRUCTURE *Harvester* (Earl e vonHoldt, 2012) e para a construção do dendograma, utilizou-se o método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*).

## RESULTADOS

Foram observadas um total de 142 marcas (das quais 94% foram polimórficas), com um número médio de 12 marcas por marcador (Tabela 1). Os iniciadores DiCA3'RG e TriGTG3'YC geraram o menor e o maior número de marcas (8 e 20). O conteúdo de informações polimórficas (PIC) variou aproximadamente entre 0,08 a 0,23 para os marcadores TriGTG3'YC e TriCGA3'RC, respectivamente. O índice de Shannon (H') apresentou valores aproximados que variaram entre 0,13 e 0,41 para os marcadores (TriGTG3'YC e TriAGA3'RC). Os valores aproximados de Heterozigosidade esperada (He) e Heterozigosidade observada (Ho) variaram entre 0,09 (TriGTG3'YC) e 0,28 (TriCAC3'YC e TriAGA3'RC) (Tabela 1).

Tabela 1- Perfil de amplificação de três populações de *Calotropis procera* com base em doze marcadores *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). As populações Pop1, 2 e 3 estão localizadas nos municípios de Itororó-Ba, Itapetinga-Ba e Itambé-Ba, respectivamente.

Marcadores	Nº de fragmentos				Índice de Diversidade por Marcador			
	Total	M	P	PP (%)	PIC	H'	He	Ho
DiCA3'RG	8	2	6	75%	0,186	0,322	0,209	0,213
DiGA3'RC	12	0	12	100%	0,157	0,289	0,173	0,176
TriCAC3'YC	11	0	11	100%	0,217	0,410	0,276	0,281
TriCAC5'CY	13	0	13	100%	0,165	0,344	0,223	0,226
TriCAG3'RC	9	1	8	89%	0,149	0,281	0,187	0,190

TriGTG3'YC	20	1	19	95%	0,077	0,129	0,085	0,086
TriAAC3'RC	12	0	12	100%	0,169	0,337	0,217	0,221
TriAAG3'RC	13	0	13	100%	0,149	0,282	0,189	0,192
TriAGA3'RC	11	0	11	100%	0,229	0,414	0,276	0,281
TriCGA3'RC	9	2	7	78%	0,141	0,292	0,188	0,191
TriGAC3'RC	15	0	15	100%	0,126	0,250	0,156	0,159
TriGGA3'RC	9	1	8	89%	0,125	0,274	0,178	0,180
Nº Total	142	7	135	1126%	1,89	3,62	2,4	2,4
Média	11,83	0,58	11,25	94%	0,159 ± 0,039	0,29 ± 0,013	0,189 ± 0,009	0,192 ± 0,009
Índices Médio de Diversidade por população								
Pop1	11,83	5,75	6,08	51,39%	0,142 ± 0,061	0,270 ± 0,023	0,177 ± 0,016	0,179 ± 0,016
Pop2	11,83	5,42	6,42	54,27%	0,153 ± 0,071	0,282 ± 0,023	0,184 ± 0,016	0,187 ± 0,016
Pop3	11,83	3,67	8,17	69,06%	0,178 ± 0,065	0,319 ± 0,021	0,206 ± 0,015	0,209 ± 0,015

R: Purina (A/G); Y: Pirimidina (C/T); PP: Percentual de Polimorfismo; PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica; H': Índice de Shannon; He: Heterozigosidade esperada; Ho: Heterozigosidade observada. M: Monomorfismo; P: Polimorfismo.

Considerando a análise Bayesiana (baseado nos valores de Delta K) observou-se a estruturação em dois *pools* gênicos (com *score* de Delta K= 1107.09) e subestruturação em três *pools* gênicos (com *score* de Delta K= 100.31), como as composições mais prováveis para as três populações de *C. procera* estudadas (Figura 2.A). O histograma que ilustra o nível de estruturação em dois *pools* gênicos (Figura 2. B) revela na população de Itapetinga e Itambé a predominância do *pool* gênico representado pela cor verde, enquanto que a população de Itororó há uma predominância do *pool* gênico, representado pela cor vermelha.

Entretanto, o histograma que representa a subestruturação em três *pools* gênicos, embora não seja alterações significativas para a população de Itororó, ocorre nítida separação na composição gênica das populações de Itambé, em azul e, Itapetinga em verde, ocorrendo mistura de *pool* gênico alguns indivíduos (Figura 2.C).

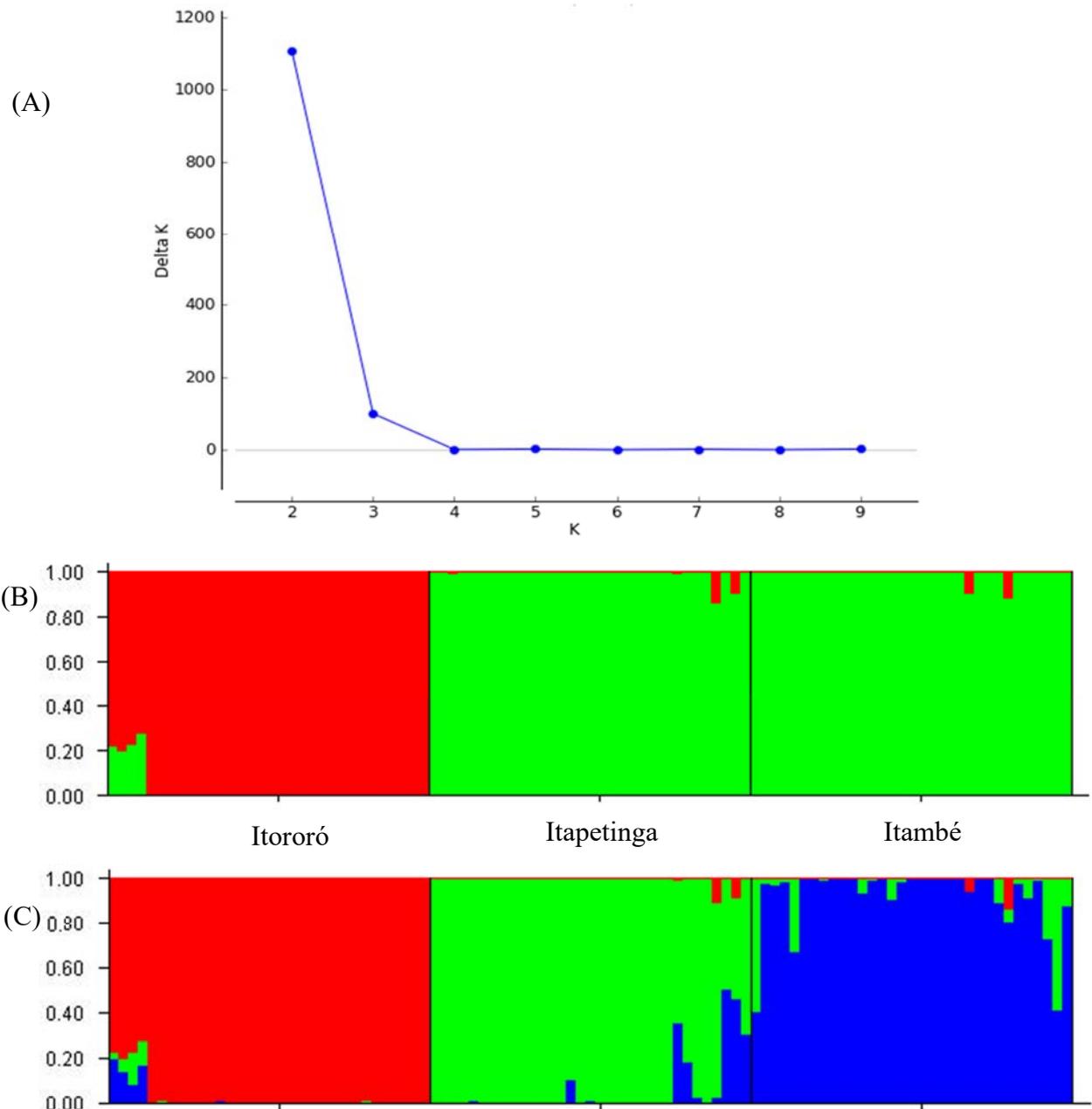


Figura 2: Histogramas de prováveis pools gênicos obtidos de acordo com o método descrito por Evanno et al. (2006), a partir de marcadores ISSR para as populações de *Calotropis procera*. (A) Número mais provável de pools gênicos (K) estimado a partir de 99 indivíduos de *C. procera*; (B) distribuição da subestruturação em dois *pools* gênicos; (C) distribuição de três *pools* gênicos.

A avaliação par a par entre as diferentes populações, obtidas a partir da Análise de Variância Molecular (AMOVA), indicou maior distância genética entre as Pop1 e 3, com  $F_{st} = 0,497$  e Pop1 e 2, com  $F_{st} = 0,493$  e menor distância entre as Pop2 e 3, com  $F_{st} = 0,226$ ,

respectivamente (Tabela 2). Os resultados que apresentaram o valor de  $Phit > 0,25$  indicam estruturação genética para as populações (Hartl & Clark, 2010). Ao analisar o perfil de variabilidade molecular inter e intrapopulacional, foi possível verificar que 58% ( $p_{rand} < 0,01$ ) da variação ocorre dentro das populações e 42% ( $p_{rand} < 0,01$ ) representa as diferenças entre as populações (Tabela 3).

Tabela 2: Matriz representativa dos valores de estruturação ( $Phit$ ) estimado a partir da Análise Molecular de Variância (AMOVA) entre as diferentes regiões de coleta de *C. procera*.

	Pop1	Pop2	Pop3
Pop1	0,000	0,001	0,001
Pop2	0,493	0,000	0,001
Pop3	0,497	0,226	0,000

Tabela 3: Análise Molecular de Variância (AMOVA) e estimativa de fluxo gênico ( $Nm$ ) em populações de *C. procera*.

Fontes de Variação G1	GL	SQ	QM	Est. Var.	Variância (%)	Fst	P	Nm
Entre Pop.	2	1045,091	522,545	15,210	42%		0,001	0,719
Dentro Pop.	96	1978,152	20,606	20,606	58%		0,001	
Total	98	3023,242		35,816	100%			

GL: Grau de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrados médios; Est. Var.: Estatística de Variância; Nm: fluxo gênico.

Na análise de coordenadas principais (PcoA), pode-se observar que as populações de Itapetinga e Itambé, Ba se encontram mais próximas geneticamente, compartilhando características entre si, enquanto que a população de Itororó, Ba encontra-se isolada das demais (Figura 3). Os resultados obtidos por meio das análises de coordenadas principais (PcoA) corroboram com a hipótese de subestruturação em três *pools* gênicos, como demonstrado na análise Bayesiana (Figura 2).

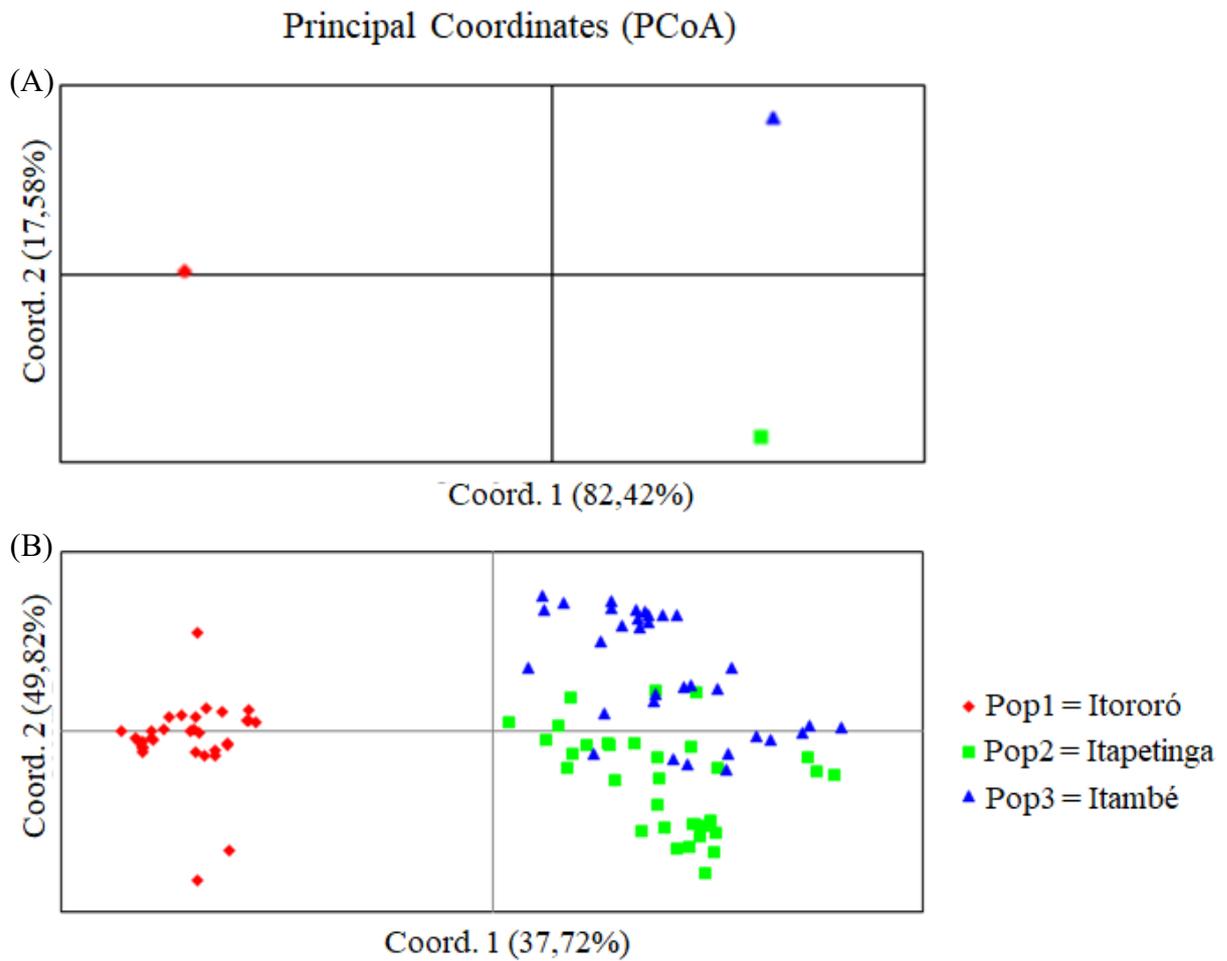


Figura 3: Análise de coordenadas principal (PCoA) de três populações de *C. procera* Ait. R. Br. Vermelho: Pop1; verde: Pop2; azul: Pop 3.

O método UPGMA representou a dissimilaridade dos indivíduos “inter e intrapopulacional”, possibilitando a separação das populações, juntamente com seus respectivos pontos de conexão e estimativa de abrangência da diversidade genética entre os genótipos. Onde o dendograma apresentou o nível total de dissimilaridade em aproximadamente 82 %, o que permitiu a formação de dois grupos (Figura 4).

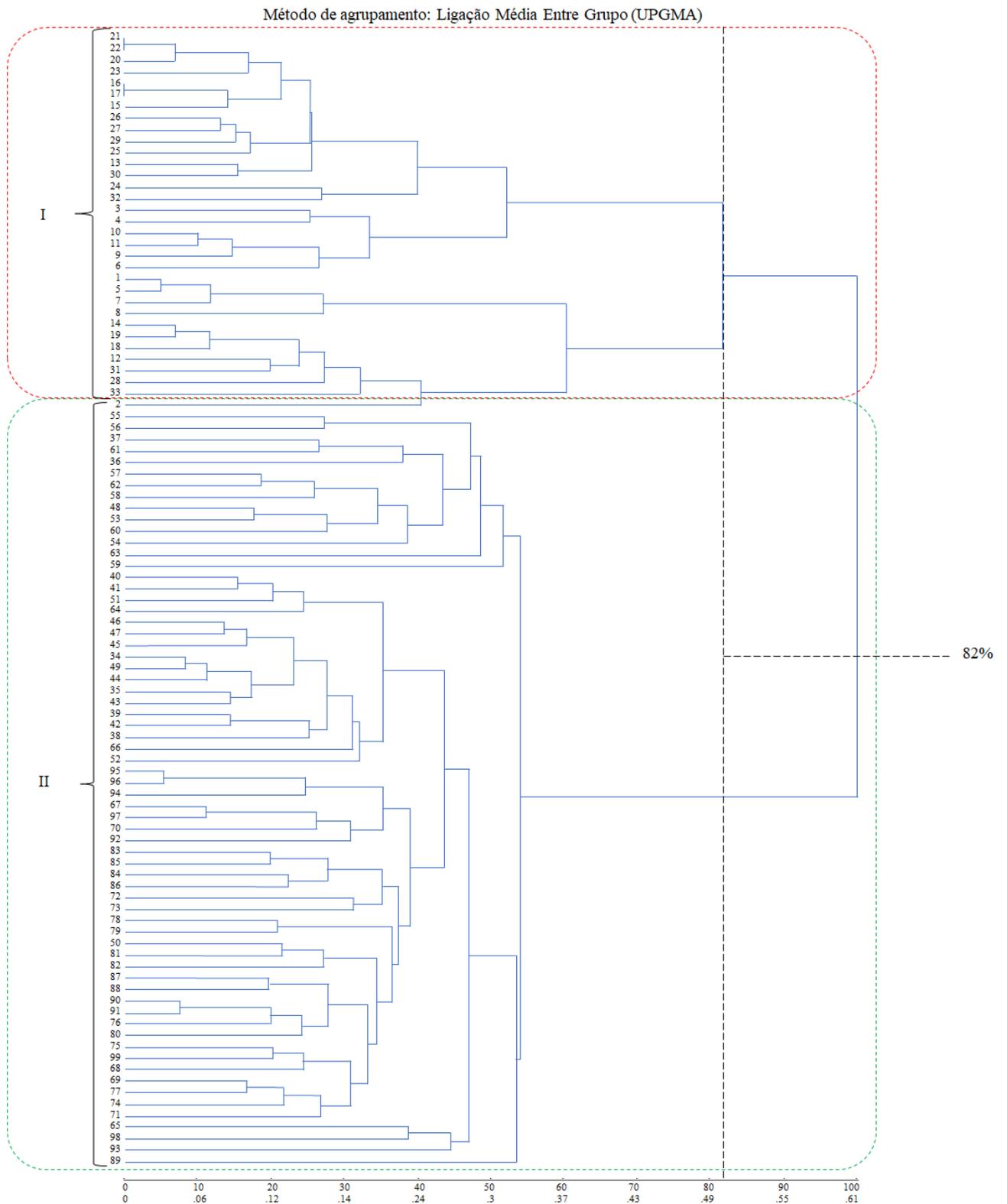


Figura 4: Análise da diversidade genética pelo método de agrupamento UPGMA, em 3 populações de *C. procerus* a partir de marcador tipo ISSR. \*Pop1: Itororó; Pop2: Itapetinga; Pop3: Itambé.

## DISCUSSÃO

O alto percentual de polimorfismo encontrado nas populações de *Calotropis procera* analisadas com a utilização de marcadores ISSR, confirmam a eficiência do marcador na detecção de polimorfismo e na sua aplicabilidade em estudos de variabilidade genética das populações. O sucesso do marcador também foi evidenciado por Soares et al. (2016), ao obter 100% de polimorfismo utilizando 15 marcadores em dez populações naturais de mangaba no estado de Sergipe. Shahnawaz et al. (2011) atestaram a eficiência de oito marcadores ISSR na detecção de polimorfismo de vinte e duas populações de *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. No total, foram encontrados a média de 5,5 marcas polimórficas e um percentual de polimorfismo de 84,61% (Shahnawaz et al., 2011).

A diversidade entre as populações apresentou-se baixa. O valor apontado pelo índice de Shannon, indicou baixa diversidade interpopulacional, com média de  $H' = 0,29$ . De acordo com Sánchez (2008) o índice de Shannon baseia-se na riqueza alélica e na segregação dos alelos na população para estimar a diversidade genética. Quanto mais próximos de zero for o valor, mais baixa será a diversidade. Devido à baixa diversidade apresentada, a comparação desse nível de diversidade apresentada entre as três populações estudadas, não demonstrou diferenças significativas para os índices de heterozigosidades avaliados. Dessa forma, os resultados sugerem que a população de Itambé (Pop3) apresenta maior variabilidade em termos de números de alelos e maior variação genética apresentada pela frequência total de heterozigotos na população. Vale ressaltar que todas as populações estudadas estão situadas em áreas antropizadas, onde a paisagem natural foi substituída por pastos e estradas. Os resultados de  $H_e$  e  $H_o$  indicam que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A estrutura genética de populações refere-se à forma como a variabilidade genética está distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie (Sebbenn, 2005). Neste contexto, conhecer como os alelos estão distribuídos no espaço e no tempo,

contribui para presumir quais os fenômenos resultantes dos processos evolutivos como: mutação, migração, seleção e deriva genética estão em atuação com maior intensidade em uma dada população (Cruz et al., 2011).

O indicativo de baixo fluxo gênico encontrados entre as populações de Itororó e Itapetinga ( $H_e = 0,17$  e  $0,18$ ) podem ser justificados pelo método de reprodução (autógama) (Sobrinho et al., 2013) da espécie ou pelo alto grau de complexidade dos seus botões florais, limitando-a a um único polinizador, as abelhas do Gênero *Xylocopa* (Lemus-Jiménez e Ramírez, 2003). A disposição dos ambientes de coleta próximo a centros urbanos, também pode ter limitado a troca de genes entre as populações por agentes polinizadores. Uma vez que os indivíduos das populações de Itororó estavam localizados próximos à fragmento de mata, enquanto os da população de Itapetinga foram coletados em área de pastagem.

A abundância de indivíduos de *Calotropis procera* nestes ambientes ocorre por consequência da rápida adaptação aliada com potencial de dispersão anemocórica de suas sementes. O modelo atual de desenvolvimento tem transformado áreas de vegetação natural para a implementação agrícola, industrial e urbana (Franklin 1993, Sala et al, 2000). A substituição de habitats naturais por ecossistemas modificados, como pastagens, campos agrícolas e rodovias, implicam em impactos negativos que originam condições ambientais diferentes em seu entorno (Franklin 1993, Sala et al, 2000). Dentre estes impactos, pode-se citar, a supressão da vegetação nativa, perda de biodiversidade e favorecimento para invasão por espécies exóticas (Resende e Coelho, 2015).

A fragmentação de habitats para o desenvolvimento agrícola, industrial e urbano, tem transformado ambientes naturais em áreas propícias a invasão de espécies exóticas. A rápida adaptação de *C. procera*, aliada com potencial de dispersão anemocórica de suas sementes, contribui para o desenvolvimento da espécie em uma amplitude de ambientes fragmentados. Esses fatores comprometem o fluxo gênico entre as populações. O sistema reprodutivo tem

grande influência em como a variabilidade genética é distribuída dentro e entre populações de plantas, desempenhando um papel fundamental na determinação dos padrões espaciais e temporais de diversidade (Silva, 2016).

O compartilhamento de características entre as populações de Itapetinga e Itambé, pode ter ocorrido devido ao potencial anemocórico da espécie (Souto et al., 2008; Lorenzi e Matos, 2002). Deve-se considerar, que os indivíduos das populações de Itapetinga e Itambé, estão localizados ao longo da via de acesso que liga os ambientes. Portanto, a dispersão das sementes pode ter sido potencializada pelo tráfego de automóveis que transitam entre os locais.

O agrupamento pelo o método UPGMA corroborou aos resultados da diversidade e estruturação genética entre os genótipos e as populações. Assim como os resultados gerados pela AMOVA, PCoA e inferência Bayesiana. Ao analisar a diversidade genética entre genótipos de *Calotropis procera*, Almeida et al. (2017) observaram a formação de três grupos com 33% de dissimilaridade total, corroborando ao resultado obtido no presente estudo.

Por ser uma planta invasora, seus processos reprodutivos e suas interações ecológicas estão sendo alteradas por consequência do novo ambiente no qual está inserida. (Bredow, 2009; Sobrinho et al., 2013) Dentre as possíveis modificações que ocorrem nesses organismos, pode-se citar a estratégia de produção maciça de sementes, autocompatibilidade, autogamia, rápida passagem da fase vegetativa para a reprodutiva, floração e frutificação contínua, síndrome de dispersão abiótica anemocoria e polinização por melitofilia (Baker, 1974; Bredow, 2009; Sobrinho et al., 2013). Estas estratégias conciliadas ao alto potencial de rebrota, tolerância a ambientes com pouca pluviosidade e baixas exigências de nutrientes no solo (Souto et al., 2008), facilitam o processo de invasão com adaptação revelando o potencial da espécie como pioneira e estrategista.

Embora os índices de diversidade tenham apresentados baixos, a espécie encontra-se em equilíbrio ecológico, uma vez que a heterozigosidade observada, apresentou maior do que

a esperada, cujo resultado foi obtido tanto para cada indicador de forma isolada, quanto para as populações. O estudo preliminar de diversidade genética, pode subsidiar ações de manejo da espécie, voltado para a conservação do ambiente com sua exploração comercial, de forma a proteger a flora silvestre, uma vez que a espécie além de exótica, possuía característica de fácil dispersão.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pela concessão da bolsa de estudo para mestranda CS Dias. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UESB pela concessão da bolsa de estudo para o Doutorando LHT Santos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). A FAPESB pelas bolsas de iniciação científica concedidas as graduandas JC Lima e TO Soares.

## REFERÊNCIAS

- Almeida IVB, Ramos JPC, Dutra WF, Bruno RLA and Alves EU. (2017). Genetic diversity among *Calotropis procera* (Aiton) WT Aiton genotypes according to seed physiological quality. *Revista Caatinga*, 30(4), 912-919. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252017v30n411rc>
- Bredow EA and Wisniewski C. (2009). Potencial de dispersão de *Tecoma stans* e atributos químicos de alguns solos do Paraná. *Revista Cerne* 15:27-34.
- Costa JC. (2010). Utilização de Marcadores ISSR na Caracterização de Cultivares. Dissertação Mestrado. Universidade Federal Rural De Pernambuco, Brasil. Disponível em [<http://lira.pro.br/>

- Costa RG, Medeiros NA and Alves AR. (2009). Perspectivas de utilização da Flor-de-Seda (*Calotropis procera*) na produção animal. *Caatinga*. 22(1): 01-09.
- Cruz CD, Ferreira FM and Pessoni LA. (2011). Biometria aplicada ao estudo da genética da diversidade. Viçosa: Independente. 620 p.
- Baker HG. (1974). The evolution of weeds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 5: 1-24.
- Cruz CD. (2013). GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*, 35(3): 271-276.
- Dias CS, Santos LHT, Lima JC, Soares ABL et al. (2018). Comparação de protocolos para extração de DNA genômico de *Calotropis procera* Ait. R. Br. (Apocynaceae: Asclepiadoideae). *Multi-Science Journal*, 1(13), 277-281.
- Earl DA, YonHoldt BM (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4: 359–361.
- Fang DQ, Roose ML, Krueger RR and Federice CT. (1997). Fingerprinting trifoliolate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and intersimple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 211–219.
- Féral JP. (2002). How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268: 121-145.
- Fleishman E, Launer AE and Switky KR. (2001). Rules and exceptions in conservation genetics: Genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. *Biol. Conserv.* 98: 45-53.
- Franklin JF. (1993). Preserving biodiversity: species, ecosystems, or landscapes? *Ecological Applications*, 3: 202-205.
- Hartl DL and CLARK AG. Princípios de genética de populações. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 659 p.

- Lemus-Jiménez LJ and Ramírez N. (2003). Polinizacion y polinizadores en la vegetacion de la planicie costera de paraguana, estado falcon, venezuela. *Acta Científica Venezolana*, 54, 97-114.
- Liu LW, Zhao LP, Gong YQ, Wang MX et al. (2008). DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. *Sci. Hortic.* 116(3), 240-7.
- Peakall R and Smouse PE. (2012) GenALEX 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research-na update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
- Reddy MP, Sarla N and Siddiq EA. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1): 9-17.
- Resende EN and Coelho HA. (2015). Environmental impacts resulting from road construction and its consequences in civil liability. *Revista do mestrado em direito*, Brasília, 9(2): 155-180.
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow, E et al. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287: 1770-1774. DOI: 10.1126/science.287.5459.1770
- Sánchez CFB. (2008). Diversidade entre e dentro populações simuladas sob deriva genética. Viçosa, Minas Gerais.
- Santos FR, Fonseca CG, Souza EC, Borba EL et al. (2009). Diversidade Genética. In: Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais. (eds) Gláucia Moreira Drummond, Cássio Soares Martins, Magda Belo Horizonte: *Fundação Biodiversitas*.
- Sennblad B and Bremer B. (2002). Classification of Apocynaceae s.l. According to a New Approach Combining Linnaean and Phylogenetic Taxonomy. *Systematic Biology*, 5(3): 389–409.
- Sílvia RZ. (2016). Lista comentada de espécies exóticas invasoras no estado de Santa Catarina: espécies que ameaçam a diversidade biológica. *Fundação do Meio Ambiente (FATMA)*, 88.

- Soares ANR, Vitória MF, Nascimento ALS, Ledo AS, Rabbani ARC and Silva AVC. (2016). Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 15 (3), 1-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038624>
- Sobrinho MS, Tabatinga GM, Machado IC and Lopes AV. (2013). Reproductive phenological pattern of *Calotropis procera* (Apocynaceae), an invasive species in Brazil: annual in native areas; continuous in invaded areas of caatinga. *Acta Botanica Brasilica*, 27(2), 456-459. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062013000200018>
- Souto PC, Sales SCV, Souto JS, Santos RV and Sousa AA. (2008). Biometrics of Fruits and Number of Seeds of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br in the Semi-Arid of Paraíba. *Green Magazine*. 3(1): 108-113.
- Ulhôa N, Fernandes GW and Almeida-Cortez J. (2007). As cidades e suas perdas. Uma estranha na paisagem: planta com múltiplas aplicações em sua área de origem e séria ameaça a regiões invadidas. *Ciência Hoje*, 41(241): 70-72.
- Vijayan K. (2005). Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Mulberry Genome Analysis. *Int. J. Trop. Insect. Sci.* 10(2): 79-86.
- Zietkiewicz E, Rafalski A and Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2): 176–183.
- Zolet ACT, Turchetto C, Zanella CM and Bassaio G. (2017). Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações. *Sociedade Brasileira de Genética*. Disponível em [[https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e\\_book\\_marcadores\\_moleculares\\_sbg\\_2017\\_final.pdf](https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e_book_marcadores_moleculares_sbg_2017_final.pdf)]. Acesso em: 14 de agosto de 2018.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

### Material suplementar 1: Localização geográfica dos representantes de *Calotropis procera* presentes nos municípios de Itororó, Itapetinga e Firmino Alves, Bahia, Brasil.

Município, Ba	Pop.	N	Informação Georreferenciada			
			Latitude	Longitude	Latitude	Longitude
Itororó	1	33	15°6'43.71"S	40°2'10.44"W	15°8'00.48"S	40°2'32.34"W
			15°6'30.30"S	40°1'6.53"W	15°7'52.26"S	40°2'16.26"W
			15°6'31.92"S	40°0'54.93"W	15°7'50.04"S	40°2'37.20"W
			15°6'17.94"S	40°0'32.30"W	15°7'49.14"S	40°2'35.13"W
			15°6'56.76"S	40°0'32.21"W	15°7'51.60"S	40°2'33.25"W
			15°6'07.32"S	40°0'31.92"W	15°7'45.95"S	40°2'40.70"W
			15°6'08.52"S	40°0'35.95"W	15°7'36.62"S	40°2'16.98"W
			15°6'10.56"S	40°0'36.85"W	15°7'34.50"S	40°2'42.61"W
			15°6'25.44"S	40°0'31.23"W	15°7'34.80"S	40°2'42.42"W
			15°6'49.80"S	40°2'11.40"W	15°7'32.58"S	40°2'50.45"W
			15°7'02.40"S	40°2'26.93"W	15°6'41.70"S	40°3'0.68"W
			15°7'04.26"S	40°2'26.49"W	15°8'09.84"S	40°2'34.29"W
			15°7'04.92"S	40°2'32.26"W	15°8'17.34"S	40°2'36.86"W
			15°7'11.22"S	40°2'49.84"W	15°8'21.96"S	40°2'31.58"W
			15°8'09.78"S	40°2'34.51"W	15°8'31.92"S	40°2'24.28"W
			15°8'09.77"S	40°2'31.56"W	15°8'33.84"S	40°2'26.71"W
			Itapetinga	2	33	15°14'59.7"S
15°14'58.2"S	040°11'36.6"W	15°15'27.1"S				040°15'10.5"W
15°14'56.7"S	040°12'02.4"W	15°15'26.1"S				040°15'15.5"W
15°14'57.5"S	040°12'09.5"W	15°15'23.0"S				040°15'29.6"W
15°14'57.5"S	040°12'16.2"W	15°15'18.0"S				040°15'52.2"W
15°14'57.8"S	040°12'22.3"W	15°15'16.8"S				040°15'57.5"W
15°15'00.1"S	040°12'36.8"W	15°15'14.8"S				040°16'05.9"W
15°15'01.3"S	040°12'40.4"W	15°15'12.8"S	040°16'09.8"W			
			15°15'04.9"S	040°12'46.6"W	15°15'00.4"S	040°16'29.0"W

			15°15'32.7"S	040°13'17.9"W	15°14'45.4"S	040°16'51.9"W
			15°15'37.3"S	040°13'26.2"W	15°15'26.6"S	040°18'28.0"W
			15°15'37.5"S	040°13'27.9"W	15°15'29.2"S	040°16'28.6"W
			15°15'40.7"S	040°13'40.6"W	15°15'29.0"S	040°16'31.2"W
			15°15'41.1"S	040°13'44.0"W	15°15'26.4"S	040°16'33.0"W
			15°15'41.0"S	040°14'08.0"W	15°15'25.6"S	040°16'36.6"W
			15°15'40.8"S	040°14'24.3"W	15°15'23.2"S	040°16'34.6"W
			15°15'28.7"S	040°15'00.4"W		
			15°15'52.5"S	040°36'18.1"W	15°13'55.9"S	040°38'01.9"W
			15°15'46.9"S	040°36'34.4"W	15°13'53.5"S	040°38'00.2"W
			15°15'28.8"S	040°36'55.8"W	15°13'53.9"S	040°38'02.3"W
			15°15'19.9"S	040°37'06.2"W	15°13'54.7"S	040°38'03.8"W
			15°15'20.4"S	040°37'02.6"W	15°13'33.0"S	040°38'26.2"W
			15°15'21.4"S	040°37'04.3"W	15°13'33.9"S	040°38'23.3"W
			15°15'21.4"S	040°37'06.5"W	15°13'47.8"S	040°38'15.4"W
			15°14'57.5"S	040°37'39.7"W	15°13'49.6"S	040°38'16.3"W
Itambé	3	33	15°14'41.0"S	040°37'48.6"W	15°13'50.6"S	040°38'14.0"W
			15°14'31.5"S	040°37'50.1"W	15°13'52.2"S	040°38'12.2"W
			15°14'03.0"S	040°37'53.7"W	15°13'50.8"S	040°38'11.0"W
			15°14'05.3"S	040°37'51.7"W	15°13'49.7"S	040°38'12.4"W
			15°14'02.9"S	040°37'48.2"W	15°14'07.6"S	040°37'53.5"W
			15°14'02.5"S	040°37'45.1"W	15°14'07.1"S	040°37'53.1"W
			15°14'00.9"S	040°37'46.7"W	15°15'47.0"S	040°35'33.0"W
			15°13'57.7"S	040°37'52.7"W	15°16'12.0"S	040°35'09.0"W
			15°13'56.8"S	040°37'54.4"W		

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos por meio das análises comparativas entre as imagens obtidas a partir das eletroforeses, bem como os das médias, desvios, estimativas espectrométricas e dos padrões de amplificação com uso de iniciador ISSR, atestam para diferença na eficiência dos protocolos de extração para obtenção do DNA genômico de *Calotropis procera*

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) podem auxiliar nas estratégias aplicadas ao manejo e conservação da espécie, visto que todos os iniciadores caracterizados neste estudo, apresentaram padrões de amplificação classificados como ideais e, portanto, são úteis para apoiar estudos genéticos para a espécie *Calotropis procera*.

O estudo de diversidade genética contribuiu com o conhecimento genético-molecular de *C. procera*, o que pode auxiliar nas estratégias aplicadas ao controle do crescimento populacional da espécie.

## REFERÊNCIAS

- ABBASSI, K.; ATAY-KADIRI, Z.; GHAOUT, S. Biological effects of alkaloids extracted from three plants of Moroccan arid areas on the desert locust. **Physiological Entomology**, v. 28, n. 3, p. 232-236, 2003.
- ABO-SEREIH, N. A.; EL-GHAMERY, A. A.; AEL-KAWOKGY, T. M.; SOFY, A. R.; FIKRY, A. E. Application of ISSR analysis for identification of lactic acid bacteria strains isolated from Egyptians milk products. **Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 204-213, 2016.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 617-31 2008.
- AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v. 132, n. 4, p. 113-139, 1992.
- ALANSI, S.; TARROUM, M.; AL-QURAINY, F.; KHAN, S.; NADEEM, M. Use of ISSR markers to assess the genetic diversity in wild medicinal *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. collected from different regions of Saudi Arabia. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 5, p. 942-947, 2016.
- ALI, T. A.; ALI, S. I. Pollination biology of *Calotropis procera* subsp. *Hamiltonii* (Asclepiadaceae). **Phyton**, v. 29, p. 175-188, (1989).
- ALMEIDA-PEREIRA, C. S.; SILVA, A. V. C.; ALVES, R. P.; FEITOSA-ALCANTARA, R. B.; ARRIGONI-BLANK M. F.; ALVARES-CARVALHO S. V.; COSTA, T. S.; WHITE, L. A. S.; PINTO, V. S.; SAMPAIO, T. S.; BLANK, A. F. Genetic diversity of native populations of *Croton tetradenius* Baill. using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1-12, 2017.
- ANDRADE, I. S. **Caracterização citogenética molecular e estudo da variabilidade genética por marcadores ISSR e COI na espécie *Lonchorhina aurita* (Chiroptera: Phyllostomidae)**. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

ANDRADE, M. V. M. **Aspectos fenológicos, produtivo e qualitativo da Flor de Seda. Areia, PB.** 82 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 2005.

APG IV - Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p. 1-20, 2016

ARGGARWAL, R.; KAUR, K.; SURI, M.; BAGAI, U. Anthelmintic potential of *Calotropis procera*, *Azadirachta indica* and *Punica granatum* against *Gastrothylax indicus*. **Journal of Parasit Diseases**, v. 40, n. 4, p. 1230–1238, 2016.

BANDEIRA, G. P.; RAMOS, M. V. **Caracterização bioquímica parcial do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. e efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larval do mosquito transmissor da dengue.** 118 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2006.

BASSO, J. P.; FALEIRO, F. G.; OLIVEIRA, J. S.; GUIMARÃES, T. G.; BRAGA, M. F.; FONSECA, K. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; LIMA NETO, F. P. Variabilidade genética de cultivares e híbridos elite de mangueira com base em marcadores moleculares. **Agrotrópica**, v. 30, n. 1, p. 49-56, 2018.

BEGUM, N.; SHARMA, B.; PANDEY, R. S. *Calotropis procera* and *Annona squamosa*: Potential Alternatives to Chemical Pesticides. **British Journal of Applied Science & Technology**, v. 3, n. 2, p. 254-267, 2013.

BEKHIT, M. M. M.; EL- SHAWAF, I. I. S.; HASSAN, A. M.; EL-SAIED, F. M.; MASOUD, I. M. **Distâncias genéticas entre três genótipos Ushaar (*Calotropis procera* (Ait) f.) medidos pelas técnicas de RAPD e ISSR.** 2008. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/272885526\\_Genetic\\_distances\\_between\\_three\\_Ushaar\\_Calotropis\\_procera\\_Ait\\_f\\_genotypes\\_as\\_measured\\_by\\_RAPD\\_and\\_ISSR\\_techniques](https://www.researchgate.net/publication/272885526_Genetic_distances_between_three_Ushaar_Calotropis_procera_Ait_f_genotypes_as_measured_by_RAPD_and_ISSR_techniques)> Acesso em: 29 de ago. 2018.

BFG – The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BRANDES, D. *Calotropis procera* on Fuerteventura. Germany, Technical University Braunschweig. 2005. Disponível em: <[https://www.zobodat.at/pdf/Brandes-Dietmar\\_47\\_2005\\_0001-0007.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/Brandes-Dietmar_47_2005_0001-0007.pdf)> Acesso em: 04 de ago. 2018.

BROWN, R. On the Asclepiadeae, a natural order of plants separated from the Apocynae of Jussieu. **Memoirs of the Wernerian Natural-History Society**, v. 1, p. 12-78, 1810.

CAMPANILLI, M.; SCHAFFER, W. B. **Mata Atlântica: manual de adequação ambiental**. Brasília: MMA/SBF, p. 96, 2010.

CARMO, T. V. B.; MARTINS, L. S. S.; MUSSER, R. S.; SILVA, M. M. S.; SANTOS, J. P. O. Genetic Diversity in Accessions of *Passiflora cincinnata* Mast. Based on Morphoagronomic Descriptors and Molecular Markers. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 1, p. 68-77, 2017.

SHAHI, M., HANAFI-BOJD, A. A.; IRANSHAHI, M.; VATANDOOST, H.; HANAFI-BOJD, M. Y. Larvicidal efficacy of latex and extract of *Calotropis procera* (Gentianales: Asclepiadaceae) against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 47, p. 185-188, 2010.

MOURSY, L. E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga haemorrhoidalis fallen*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, n. 27, v. 2, p. 505-514. 1997.

CARVALHO JÚNIOR, S. B.; FURTADO, D. A.; SILVA, V.; DANTAS, R. T.; LIMA, I. S. P.; LIMA, V. L. A. Produção e avaliação bromatológica de espécies forrageiras irrigadas com água salina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 10, p. 1045-1051, 2010.

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

COELHO, M. P. G. **Avaliação do potencial das fibras de *Ceiba pentandra* (Kapok) e *Calotropis procea* como adsorventes de petróleo**. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica. 2015.

HINDI, S. S. Z. Characteristics of Some Natural Fibrous Assemblies for Efficient Oil Spill Cleanup. **International Journal of Science and Engineering Investigation**, v. 2, n. 16, p. 82-96, 2013.

KAREEM, S. O.; AKPAN, I.; OJO, O. P. Antimicrobial activities of *Calotropis procera* on selected pathogenic microorganisms. **African Journal of Biomedical Research**, v. 11, p. 105-110, 2008.

JAIN, S. C.; SHARMA, R.; JAIN, R.; SHARMA, R. A. Antimicrobial activity of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 67, n. 3, p. 275-277.

HASSAN, S. W.; BILBIS, F. L.; LADAN, M. J.; UMAR, R. A.; DANGOGGO, S. M.; SAIDU, Y.; ABUBAKAR, M. K.; FARUK, U. Z. Evaluation of Antifungal Activity and Phytochemical Analysis of Leaves, Roots and Stem Barks Extracts of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 2624-2629, 2006.

NENAAH, G. E. Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1255-1262, 2013.

LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Antimicrobial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 23-32, 1995.

VELMURUGAN, S.; VIJI, T. V.; BABU, M. M.; PUNITHA, M. J.; CITARASU, T. Antimicrobial effect of *Calotropis procera* active principles against aquatic microbial pathogens isolated from shrimp and fishes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 812-817, 2012.

CLÍMACO, C. S. S. **Variação populacional de *Alitta succinea* (Leuckart,1847) com base nas paragnatas e marcadores moleculares ISSR, ao longo da Costa brasileira**. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

CLIMATE-DATA. Dados Climáticos para Cidades Mundiais. **Clima: Itapetinga**. 2018. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/bahia/itapetinga-1071/>> Acesso em: 16 de ago. 2018.

CLIMATE-DATA. Dados Climáticos para Cidades Mundiais. **Clima: Itororó**. 2018. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/bahia/itororo-43286/>> Acesso em: 16 de ago. 2018.

CLIMATE-DATA. Dados Climáticos para Cidades Mundiais. **Clima: Itambé**. 2018. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/bahia/itambe-13136/>> Acesso em: 16 de ago 2018.

COMPÊNDIO ONLINE GERSON LUIZ LOPES – Laboratório de Manejo Florestal. **Rauvolfia sellowii Müll. Arg. Casca-d’anta**. 2018. Disponível em: <<https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/17461-2/>> Acesso em: 20 de ago. 2018.

COSTA, D. F.; VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

COSTA, J. C. **Utilização de Marcadores ISSR na Caracterização de Cultivares**. 17 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural De Pernambuco, 2010.

COSTA, R. G.; MEDEIROS, A. N.; ALVES, A. R. Perspectivas de utilização da Flor-de-Seda (*Calotropis procera*) na produção animal. **Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 01-09, 2009.

DEMEKE, T.; JENKINS, R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 1977-1990, 2010.

EL-BAKRY, A. A.; HAMMAD, I. A.; RAFAT, F. A. Polymorphism in *Calotropis procera*: preliminary genetic variation in plants from different phytogeographical regions of Egypt. **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, v. 25, n. 4, p. 471-477, 2014.

ENDRESS, M. E. Apocynaceae: Brown and now. **Telopea**, v. 10, p. 525–541, 2004.

ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A revised classification of the Apocynaceae *s. l.* **The Botanical Review**, v. 66, n. 1, p. 1-56, 2000.

ENDRESS, M. E.; LIEDE-SCHUMANN, S.; MEVE, U. An updated classification for Apocynaceae. **Phytotaxa**, v. 159, n. 3, p. 175-194, 2014.

ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press: Cambridge, England, 1994.

ESAU, K. **Anatomia das Plantas com Sementes**. Edgard Blücher. Cap. 13: Estruturas Secretoras, p. 125 – 134, 1974.

FABRICANTE, J. R.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. *Plantas exóticas e exóticas invasoras da Caatinga: Calotropis procera (Aiton) W.T.Aiton.* 2013 Disponível em: <<http://jrfabricante.wix.com/invasoras>>. Acesso em: 20 de ago. de 2018.

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

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L.; KRUEGER, R. R.; FEDERICE, C. T. Fingerprinting trifoliolate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and intersimple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 211–219, 1997.

FÉRAL, J. P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 268, p. 121-145, 2002.

FERREIRA, M. B. Distrito Federal e Goiás sob ameaça de invasora: *Calotropis procera* (Ait). **Revista Cerrado**, v. 5, n. 21, p. 20-22, 1973.

FERRREIRA, M. B.; GOMES, V. *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. uma invasora a ser estudada e controlada no estado de Minas Gerais. **Oreades**, v. 5, p. 64-74, 1974.

FREITAS, C. D. T. **Proteínas do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e seus efeitos sobre pragas agrícolas**. 118 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 2006.

GALAL, T. M.; FARAHAT, E. A.; EL-MIDANY, M. M.; HASSAN, L. M. Effect of temperature, salinity, light and time of dehiscence on seed germination and a seedling morphology of *Calotropis procera* from urban habitats. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 15, p. 1275-1282, 2015.

GALLEGO-OLEA, R. S.; BORGES, M. O. R.; BORGES, A. C. R.; FREIRE, S. M. F.; SILVEIRA, L. M. S., VILEGAS, W. et al. Flavonoides de *Calotropis procera* R. Br. (Asclepiadaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, p. 29-33, 2008.

GARCEZ, B. S., CÂMARA, C. S., & VASCONCELOS, V. R. Utilização da flor de seda (*Calotropis procera*) e do mata-pasto (*Senna obtusifolia*) na alimentação de ruminantes. **Revista eletrônica Nutritime**, v. 11, n. 3, p. 3500-3507, 2014.

GOMES, S. O.; MENDES, R. F. M.; LIMA, P. S. C. **Determinação da temperatura de anelamento com marcadores ISSR em acessos de Pinhão-manso**. 2012. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/79027/1/911.pdf>> Acesso em: 30 de ago. 2018.

GRATIVOL, C.; LIRA-MEDEIROS, C. F.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. V. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 7, p. 4245–4256, 2010.

GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 3, n. 253, p. 24-33, 2009.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K., **Molecular Systematics**. 2nd. ed. Sunderland: Sinauer, 1996.

HUTCHINSON, J. Apocynales. In The families of flowering plants. **London, Macmillan & Companu**, p. 279-282, 1926.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Panorama de Itororó, Bahia**. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ba/itororo/panorama>> Acesso em: 16 de ago. 2018.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Panorama de Itapetinga, Bahia**. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ba/itapetinga/panorama>> Acesso em: 16 de ago. 2018.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Panorama de Itambé, Bahia**. 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ba/itambé/panorama>> Acesso em: 16 de ago. 2018.

INSTITUTO HÓRUS - Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental. **The Nature Conservancy**, [www.institutohorus.org.br/download/fichas/calotropis\\_procera.htm/](http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/calotropis_procera.htm/)> Acesso em: 16 ago. 2018.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. Plant systematics: A phylogenetic approach. **Harvard Papers in Botany**, v.5, p. 1-51, 1999.

KHAN, A. Q.; MALIK, A. Asteroids from *Calotropis procera*, **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2859-2861, 1989.

KISSMANN, K. G.; GHOTH, D. **Plants Infestantes e Nocivas**. Tomo II. Editora BASF - São Paulo, 1999.

KOCH, I.; RAPINI, A.; SIMÕES, A. O.; KINOSHITA, L. S.; SPINA, A. P.; CASTELLO, A. C. D. **Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB80340>> Acesso em: 16 de ago. 2018.

KUNZE, H. Structure and function in asclepiad pollination. **Plant Systematics and Evolution**, v. 176, p. 227-253, 1991.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p. 174-186, 1976.

LARHSINI, M., BOUSAD, M., LAZREK, J. M., AMAROUCH, H. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 68, p. 371-73, 1997.

LÁZARO, S. F., FONSECA, L. D., FERNANDES, R. C., TOLENTINO, J. S., MARTINS, E. R., DUARTE, E. R. Efeito do extrato aquoso do algodão de seda (*Calotropis procera* Aiton) sobre a eficiência reprodutiva do carrapato bovino. **Revista brasileira plantas medicinais**, v. 14, n. 2, p. 302-305, 2012.

LITTLE, E. L.; WOODBURY, R. O.; WADSWORTH, F. H. Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. **Agriculture Handbook**, v. 2, n. 449, p. 1-1038, 1974.

LIU, L. W.; ZHAO, L. P.; GONG, Y. Q.; WANG, M. X.; CHEN, L. M., Y, J. L.; JIN-LAN, W. Y.; YU, F. M.; WANG, L. Z. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. **Scientia Horticulturae**, v. 116, n. 3, p. 240-7, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2º ed. Instituto Plantarum, 2002.

MELO, M. M.; VAZ, F. A.; GONÇALVES, L. C.; SATURNINO, H. M. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait. e sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção animal**, v. 2, n. 1, p. 15-20, 2001.

MELO, M.; VAZ, M A.; GONÇALVES, C. A.; SATURNINO, M. H. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait. **Revista Brasileira de Saúde Produtiva**, v. 1, p. 15-20, 2001.

MELO, M.; VAZ, M A.; GONÇALVES, C. A.; SATURNINO, M. H. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, p. 10, 2005.

MORCELLE, S. R., CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia**, v. 75, p. 480-493, 2004.

MOREIRA FILHO, E. C., VIANA, B. L. (2007). **Flor de seda: considerações gerais**. Disponível em: <<http://www.cca.ufpb.br/lavouraxerofila/pdf/fs.pdf>> Acesso em 28 de ago. 2018.

MURIIRA, N. G.; MUCHUGI, A.; YU, A.; XU, J.; LIU, A. Genetic Diversity Analysis Reveals Genetic Differentiation and Strong Population Structure in *Calotropis* Plants. **Scientific Reports**, v. 8, n. 7832, p. 1-10, 2018.

NOGUEIRA, J. **Variabilidade genética de *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 (Hymenoptera: Apidae), espécie ameaçada de extinção: subsídios para sua conservação**. 66 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2009.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. Dissertação (Mestrado) Universidade de Aveiro, 2010.

OLIVEIRA, V. M. Estimativas da biomassa de *Calotropis procera* (Ait) R. Br., e determinação de sua composição química nos municípios de Patos e Santa Luzia – PB. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Biologia, Universidade Federal da Paraíba, 2002.

OLIVEIRA-BENTO, S. R. S.; TORRES, S. B.; OLIVEIRA, F. N.; PAIVA, E. P.; BENTO, D. A. V. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Calotropis procera* Aiton (Apocynaceae). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, p. 1194-1205, 2013.

PETER, C. I.; JOHNSON, S. D. Doing the twist: a test of Darwin's cross-pollination hypothesis for pollinarium reconfiguration. **Biology Letters**, v. 2, p. 65-68, 2006.

PRIYA, T. A.; MANIMEKALAI, V.; RAVICHANDRAN, P. Intra Specific Genetic Diversity Studies on *Calotropis gigantea* (L) R. Br. - Using RAPD Markers. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 3, n. 4, p. 7-9, 2015.

RABELO, A. F. L. **Caracterização in vivo da resposta inflamatória aguda induzida por uma fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.** 117 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará, 2014.

SEI – Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. **Biomass: Médio Sua da Bahia.** Disponível em: <[https://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/cartogramas/pdf/carto\\_biomass.pdf](https://www.sei.ba.gov.br/site/geoambientais/cartogramas/pdf/carto_biomass.pdf)> Acesso em: 16 de ago 2018.

SILVA, A. P.; LADCHUMANANANDASIVAM, R.; EGITO, E. B. T.; NASCIMENTO, H. O.; SILVA, K. K. O. S.; SANTOS, A. R. L. Estudo da caracterização microestrutural da fibra *Calotropis procera* e sua potencial aplicação na remoção de hidrocarbonetos e derivados. In: 22º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. Natal, RN, Brasil, p. 8547-8551, 2016. Disponível em: <<http://www.metallum.com.br/22cbecimat/anais/PDF/404-080.pdf>> Acesso em: 10 de outubro de 2018.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**, Lavras. Ed UFLA., 2008.

RAMOS, M. V.; PEREIRE, D. A.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D.; CAVALHEIRO, M. G.; MATOS, M. P. V.; CARVALHO, A. F. F. U. Potential of laticifer fluids for inhibiting larvae

development of *Stegomyia (Aedes) aegypti*: Evidences for the involvement of proteolytic activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 805-8012, 2009.

RANGEL, E. S.; NASCIMENTO, M. T. Ocorrência de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae) como espécie invasora de restinga. **Acta Botânica Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 657-663, 2011.

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

RAPINI, A.; VAN DEN BERG, C.; LIEDE-SCHUMANN, S. **Diversification of Asclepiadoideae (Apocynaceae) in the New World**. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 94, p. 407-422. 2007. Disponível em: <<http://www.mobot.org/mobot/research/APWEB/>> Acesso em: 03 de Ago. 2018.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

ROCHA, A.; SALOMÃO, L. C. C.; SALOMÃO, T. M. F.; CRUZ, C. D.; SIQUEIRA, D. L. Genetic Diversity of 'Ubá' Mango Tree Using ISSR Markers. **Molecular Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 108-113, 2012.

SANTOS, F. R.; FONSECA, C. G.; SOUZA, E. C.; BORBA, E. L.; DERGAM, J. A.; LOVATO, M. B. Diversidade Genética. In: *Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no Estado de Minas Gerais*. (eds) Gláucia Moreira Drummond, Cássio Soares Martins, Magda Belo Horizonte: **Fundação Biodiversitas**, p. 624, 2009.

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S.; CARVALHO, F. M.; COSTA, J. L.; PÁDUA, J. G. ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, v. 49, p. 540-554, 2011.

SEI – Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. **Territórios de Identidade: Médio Sua da Bahia**. Disponível em: <[http://www.sei.ba.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2000&Itemid=284](http://www.sei.ba.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=2000&Itemid=284)> Acesso em: 16 de ago 2018.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M. N. (2006). An overview of molecular markers methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 59, n. 25, p. 2540-2568, 2006.

SENNBLAD, B.; BREMER, B. Classification of Apocynaceae s.l. according to a new approach combining Linnaean and phylogenetic taxonomy. **Systematic Biology**, v. 51, p. 389-409, 2002.

SHARMA, P.; SHARMA J. D. In vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 77–79, 2000.

SILVA JÚNIOR, V.; LIMA, J. M. G. M.; RODRIGUES, C. W. M. S.; BARBOSA, D. C. A. *Erythrina velutina* Willd. (leguminosae-papilionoideae) ocorrente em Caatinga e brejo de altitude de Pernambuco: biometria, embebição e germinação. **Revista Árvore**, v. 36, n. 2, p. 247-257, 2012.

SILVA, B. M.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; ARAUJO, V. A. A. C.; ROSSI, F. S.; OLIVEIRA, L. O.; CLARINDO, W. R. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 108-113, 2016.

SILVA, K. F. M. C.; SOUZA, C. M. P.; MOREAU, A. M. S. S.; FONTES, E. O.; CARVALHO JUNIOR, J. C. S. **Ambientes Pastoris na Bacia Hidrográfica do Rio Colônia: Fatores Sócio-Econômicos Determinantes e Evolução no Uso da Terra-Ba**. 2007. Disponível em: <[http://www.geomorfologia.ufv.br/simposio/simposio/trabalhos/trabalhos\\_completos/eixo3/050.pdf](http://www.geomorfologia.ufv.br/simposio/simposio/trabalhos/trabalhos_completos/eixo3/050.pdf)> Acesso em: 13 de ago. 2018.

SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F.; CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.

SILVA, T. S. S.; FREITAS, J. S.; SANTOS, E. S. L.; CARDOSO, T. S.; CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Croton linearifolius* Mull. Arg. como subsídio para estudos genéticos. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 10, 4-8, 2018.

SIMÕES, A. O.; ENDRESS, M. E.; CONTI, E. Systematic and character evolution of Tabernaemontaneae (Apocynaceae, Rauvolfioideae) based on molecular and morphological evidence. **Taxon**, v. 59, n. 3, p. 772-790, 2010.

- SOARES, A. N. R.; VITÓRIA, M. F.; NASCIMENTO, A. L. S.; LEDO, A. S.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A.V. C. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, p. 1-12, 2016.
- SOUTO, P. C.; SALES, S. C. V.; SOUTO, J. S.; SANTOS, R. V.; SOUSA, A. A. Biometria de Frutos e Número de Sementes de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br no Semi-Árido da Paraíba. **Revista Verde**, v. 3, p. 108-113, 2008.
- SYVANEN, A. C.; LANDEGREN, U.; ISAKSSON, A.; GYLLENSTEN, U.; BROOKS, A. Enthusiasm mixed with scepticism about single nucleotide polymorphism markers for dissecting complex disorders. **European Journal of Human Genetics**, v. 7, p. 98-101, 1999.
- TABATINGA FILHO, G. M. (2008). **Fenologia, biologia reprodutiva e ecologia da polinização de *Calotropis procera* Ait. R. Br. (Apocynaceae:Asclepiadoideae)**. Dissertação (Mestrado). Universidade federal de Pernambuco, 2008.
- TANIRA, M. O. M.; BASHIR, A. K.; DIBA, R.; GOODWIN, S.; WASFI, I. A.; BANNA, N. R. Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 201-205, 1994.
- TORRES, J. F.; BRAGA, A. P.; LIMA, G. F. DA C.; RANGEL, A. H. DO N.; LIMA JÚNIOR, D. M.; MACIEL, M. V.; OLIVEIRA, E. O. Utilização do feno de flor-de-seda (*Calotropis procera* Ait. R. Br) na alimentação de ovinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 1, p. 42-50, 2010.
- ULHÔA, N.; FERNANDES, G. W.; ALMEIDA-CORTEZ, J. As cidades e suas perdas. Uma estranha na paisagem: planta com múltiplas aplicações em sua área de origem e séria ameaça a regiões invadidas. **Ciência Hoje**, v. 41, n. 241, p. 70-72, 2007.
- VIANA, S. S.; SANTOS, J. U. M.; SIMÕES, A. O. Diversidade taxonômica de Apocynaceae na ilha do Marajó, PA, Brasil. **Rodriguésia**, v. 68, n. 2, p. 623-652, 2017.
- VICENTE, M. C.; GUZMÁN, F. A.; ENGELS, J.; RAMANATHA RAO, V. **Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germoplasma**. In: The Role of Biotechnology. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/biotech/docs/vicente.pdf>> Acesso em: 19 de ago. 2018.

- VIJAYAN, K. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Mulberry Genome Analysis. **International Journal of Industrial Entomology**, v. 10, n. 2, p. 79-86, 2005.
- ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory Efficacy of Extracts of Latex of *Calotropis procera* Against Different Mediators of Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 228-232, 2005.
- KUTA, F. A. Antifungal effect of *Calotropis procera* stem bark on *Epidermophyton floccosum* and *Trichophyton gypseum*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 13, p. 2116-2118, 2008.
- EL BADWI, S. M. A. **Toxicological studies on latex of medicinal plants: *Calotropis procera*, *Ficus elastica* and *Euphorbia abyssinica***. Tese (Doutorado) – Universidade de Khartoum, Khartoum, 1997.
- FREITAS, C. D. T. **Proteínas do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e seus efeitos sobre pragas agrícolas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORMES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.
- WANG, G.; MAHALINGAM R.; KNAP, H. T. (1998). (C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, n. 8, p. 1086-1096, 1998.
- WARRIER, P. K.; NAMBIAR, V. P. K.; RAMANHUTTY, C. (1994). *Calotropis gigantea*. **Indian Medicinal Plants**, v. 1, p. 341-345.
- PORTUGAL-COHEN, M.; ISH-SHALOM, E.; MALLON, R.; CORRAL, P.; MICHOUX, F.; MA'OR, Z. Apple of Sodom (*Calotropis procera*) Callus Extract, a Novel Skincare Active and Its Biological Activity in Skin Models When Combined with Dead Sea Water. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 8, p. 73-91, 2018.
- WYATT, R.; BROYLES, S. B.; LIPOW, S. R. Pollen-ovule ratios in milkweeds (Asclepiadaceae): an exception that probes the rule. **Systematic Botany**, v. 25, n. 2, p. 171-180, 2000.
- ZIETKIEWICZ E.; RAFALSKI A.; LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176–183, 1994.

ZOLTE, A. C. T.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; BASSAIO, G. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Sociedade Brasileira de Genética. 2017. Disponível em: <[https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e\\_book\\_marcadores\\_moleculares\\_sbg\\_2017\\_final.pdf](https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e_book_marcadores_moleculares_sbg_2017_final.pdf)> Acesso em: 16 de mar 2018.

## ANEXOS

### **ANEXO I: Apresentação das normas da revista escolhida para submissão do Capítulo II: REVISTA GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH**

#### **INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS:**

1. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, ISSN 1807-863X (*on-line*), é publicada pela Universidade Estadual de Maringá, na modalidade publicação contínua.
2. A revista publica artigos originais em todas as áreas relevantes de Ciências Biológicas, incluindo anatomia, bacteriologia, biologia molecular, bioquímica, botânica, citologia e biologia celular, comportamento animal, ecologia e limnologia, embriologia e histologia, morfofisiologia, genética, microbiologia, parasitologia e zoologia.
3. Os autores se obrigam a declarar a cessão de direitos autorais e que seu manuscrito é um trabalho original, e que não está sendo submetido, em parte ou no seu todo, à análise para publicação em outro meio de divulgação científica sob pena de exclusão. Esta declaração encontra-se disponível no endereço: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/about/submissions>.
4. Os dados, ideias, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso por parte do Conselho Editorial da revista.
5. Os relatos deverão basear-se nas técnicas mais avançadas e apropriadas à pesquisa. Quando apropriado, deverá ser atestado que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição.
6. Os artigos submetidos deverão ser em inglês.
7. Os artigos serão avaliados por, no mínimo, três consultores da área de conhecimento da pesquisa, de instituições de ensino e/ou pesquisa nacionais e estrangeiras, de comprovada produção científica. Após as devidas correções e possíveis sugestões, o artigo será aceito se tiver dois pareceres favoráveis e rejeitado quando dois pareceres forem desfavoráveis.

8. O conflito de interesses pode ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira. Conflitos de interesses podem ocorrer quando autores, revisores ou editores possuem interesses que podem influenciar na elaboração ou avaliação de manuscritos. Ao submeter o manuscrito, os autores são responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros ou de outra natureza que possam ter influenciado o trabalho. Os autores devem identificar no manuscrito todo o apoio financeiro obtido para a execução do trabalho e outras conexões pessoais referentes à realização do mesmo. O revisor deve informar aos editores quaisquer conflitos de interesse que poderiam influenciar sobre a análise do manuscrito, e deve declarar-se não qualificado para revisá-lo.

9. Os artigos deverão ser submetidos pela internet, acessando o **Portal ACTA**, no endereço <http://www.uem.br/acta>.

10. A revisão de língua estrangeira será de responsabilidade e custeada pelos autores dos artigos já aceitos para publicação, mediante comprovação emitida pelos revisores credenciados.

11. Estão listadas abaixo a formatação e outras convenções que deverão ser seguidas:

a) No processo de submissão, deverão ser inseridos os nomes completos dos autores (no máximo oito), número identificador (ID) do ORCID, seus endereços institucionais e o *e-mail* do autor indicado para correspondência. Mais de seis autores serão aceitos desde que devidamente justificado. Neste caso a contribuição de cada um dos autores deverá ser apresentada em uma declaração específica para esta finalidade. Nesta justificativa deve-se considerar os seguintes aspectos: participação na elaboração do projeto ou análise e interpretação dos dados; redação ou revisão crítica do artigo e aprovação da versão final a ser publicado.

b) Os artigos deverão ser subdivididos com os seguintes subtítulos: *Abstract*, *Keywords*, Introdução, Material e métodos, Resultados e/ou Discussão, Conclusão, Agradecimentos (opcional) e Referências. Esses itens deverão ser em caixa alta e em negrito e não deverão ser numerados.

c) O título, com no máximo vinte palavras, deverá ser preciso. Também deverá ser fornecido um título resumido com, no máximo, seis palavras que não estejam citadas no título.

d) O *Abstract* (200 a 300 palavras), deverá conter informações sucintas sobre o objetivo da pesquisa, os materiais experimentais, os métodos empregados, os resultados e a conclusão. Até

seis *keywords* (recomenda-se não utilizar as palavras do título) deverão ser acrescentadas ao final do *abstract*.

e) Os artigos deverão ter de 12 a 20 páginas digitadas, incluindo figuras, tabelas e referências. Deverão ser escritos em espaço 1,5 linhas e ter suas páginas e linhas numeradas. O trabalho deverá ser editado no *Word*, ou compatível, utilizando fonte *Times New Roman*, tamanho 12.

f) O trabalho deverá ser formatado em A4 e as margens inferior, superior, direita e esquerda deverão ser de 2,5 cm.

g) O arquivo contendo o trabalho que deverá ser anexado (transferido), durante a submissão, não poderá ultrapassar o tamanho de 5 MB, nem poderá conter qualquer tipo de identificação de autoria, inclusive na opção propriedades do *Word*.

h) Tabelas, figuras e gráficos deverão ser inseridos no texto, logo após a sua citação. As tabelas deverão ter no máximo 17 cm de largura. Os gráficos não deverão ter molduras externas, linhas internas ou mesmo cor de fundo. Para os gráficos de barra, usar padrões de preenchimento diferentes (horizontal, vertical, listras diagonais e múltiplos pontos).

i) As figuras (fotos, pranchas, mapas, desenhos ou esquemas) deverão ter o tamanho máximo de 17 x 23 cm, incluindo-se o espaço necessário para a legenda. O tipo de fonte utilizado deverá ser *Times New Roman*, tamanho 8 pt. Gráficos e figuras confeccionados em planilhas eletrônicas devem vir acompanhados do arquivo com a planilha original. Deve-se utilizar escala de barras para indicar tamanho, a qual deverá, sempre que possível, estar situada à esquerda da figura; o canto inferior direito deve ser reservado para o número da(s) figura(s).

j) As figuras digitalizadas deverão ter no mínimo 300 dpi de resolução, gravadas em formato jpg ou png. Não serão aceitas figuras que ultrapassem o tamanho estabelecido ou que apresentem qualidade gráfica ruim. Ilustrações em cores serão aceitas.

k) Deverá ser adotado o Sistema Internacional (SI) de medidas.

l) As equações deverão ser editadas utilizando o *Equation Built* do *Word*.

m) As variáveis deverão ser identificadas após a equação.

n) Artigos de revisão poderão ser publicados mediante convite do Conselho Editorial ou Editor-Chefe da Eduem.

**o)** A revista aceita um índice máximo de 5% de autocitações e, ainda, recomenda que oitenta por cento (80%) das referências bibliográficas sejam de artigos listados na base *ISI Web of Knowledge*, *Scopus* ou *SciELO* com menos de 10 anos. Recomenda-se dar preferência às citações de artigos internacionais. Não serão aceitas nas referências citações de monografias, dissertações e teses, anais, resumos, resumos expandidos, jornais, magazines, boletins técnicos e documentos eletrônicos.

**p)** As citações deverão seguir os exemplos abaixo, que se baseiam na norma da *American Psychological Association* (APA). **Para citação no texto**, usar o sobrenome e ano: Oleksiak (2008) ou (Oleksiak, 2008); **para dois autores**: Silva e Diniz Filho (2008) ou (Silva & Diniz, 2008); **para três a cinco autores** (1.<sup>a</sup> citação): Andrade, Santos, Oliveira, Cerqueira, e Meireles (2008) ou (Andrade, Santos, Oliveira, Cerqueira, & Meireles, 2008) e, nas citações subsequentes, Andrade et al. (2008) ou (Andrade et al., 2008); **para seis ou mais autores**, citar apenas o primeiro seguido de et al.: Cardozo et al. (2007) ou (Cardozo et al., 2007).

## MODELOS DE REFERÊNCIAS

Deverão ser organizadas em ordem alfabética, alinhamento justificado, conforme os exemplos seguintes, que se baseiam na norma da *American Psychological Association* (APA). Os títulos dos periódicos deverão ser completos e não abreviados e em itálico, sem o local de publicação. As referências deverão conter o DOI.

## ARTIGOS

### Um autor

Oleksiak, M. F. (2008). Changes in genexpression due to chronic exposure to environmental pollutants. *Aquatic Toxicology*, 90(3), 161-171. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.08.010

### Dois autores

Silva, M. M. F. P., & Diniz Filho, J. A. F. (2008). Extinction of mammalian populations in conservation units of the Brazilian Cerrado by inbreeding depression in stochastic environments. *Genetics and Molecular Biology*, 31(3), 800-803. DOI:10.1590/s1415-47572008000400030

**Até sete autores** (devem-se indicar todos os autores separados por vírgula, exceto o último que deve ser separado por vírgula seguido de &)

Santana, N. F., Thomaz, T. A., & Roberto, M. C. (2015). Relationship between bacterial density and abiotic factors at different sediment depths of lakes in the Upper Paraná River floodplain. *Acta Scientiarum. Biological Science*, 37(1), 1-8. doi:10.4025/actascibiolsci.v37i1.22240

**Oito ou mais autores** (devem-se indicar os seis primeiros, inserir reticências e acrescentar o último autor)

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., ... Pinto, E. (2007). Metabolites from algae With economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C – Toxicology and Pharmacology*, 146(102), 60-78. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.05.007

## LIVROS

Haynie, D. T. (2001). *Biological thermodynamics*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. DOI: 10.1017/cbo9780511754784

Foster, R. G., & Kreitzman, L. (2005). *Rhythms of life: the biological clocks that control the daily life of every living thing*. Yale, CT: Yale University Press.

Agostinho, A. A., Gomes, L. C., & Pelicice, F. M. (2007). Impactos dos represamentos. In A. A. Agostinho, L. C. Gomes, & F. M. Pelicice (Ed.), *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil* (p. 107-152). Maringá, PR: Eduem.

## **ANEXO II: Apresentação das normas da revista escolhida para submissão do Capítulo II: REVISTA GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH**

### **SUBMISSION GUIDELINES**

#### **STYLE AND FORMAT SUMMARY**

**File format:** Manuscript files can be in the following formats: DOC or DOCX. Microsoft Word documents should not be locked or protected.

**Length:** Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information. We encourage you to present and discuss your findings concisely.

**Font:** Use Times New Roman font and a font size 12.

**Headings:** Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.

**Layout:** Manuscript text should be double-spaced. Do not format text in multiple columns.

**Page and line numbers:** Include page numbers and line numbers in the manuscript file.

**Footnotes:** Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.

**Language:** Manuscripts must be submitted in English.

**Abbreviations:** Define abbreviations upon first appearance in the text. Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text. Keep abbreviations to a minimum.

**Equation:** We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor is acceptable.

Avoid using MathType or Equation Editor to insert single variables (e.g., “ $a^2 + b^2 = c^2$ ”), Greek or other symbols (e.g.,  $\beta$ ,  $\Delta$ , or ' [prime]), or mathematical operators (e.g.,  $\times$ ,  $\geq$ , or  $\pm$ ) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values.

Do not use MathType or Equation Editor for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Avoid “hybrid” inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.

**Nomenclature:** Use correct and established nomenclature wherever possible.

*Units of measurement:* Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value.

*Drugs:* Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).

*Species names:* Write in italics (e.g., *Homo sapiens*). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., *H. sapiens*).

*Genes, mutations, genotypes and alleles:* Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).

## **MANUSCRIPT ORGANIZATION**

Most manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below.

Title

Authors

Affiliations

Abstract

Introduction

Material and Methods

Results

Discussion

Acknowledgments

References

Supplementary material

Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal.

Please also note that the Results and Discussion can be combined into one Results/ Discussion section, and that a Conclusion section may be also included.

## **OTHER ELEMENTS**

Figure captions are inserted immediately after the first paragraph in which the figure is cited. Figure files are uploaded separately.

Tables are inserted immediately after the first paragraph in which they are cited.

Supporting information files are uploaded separately.

## PARTS OF A SUBMISSION

### TITLE

Include a full title and a short title for the manuscript.

TITLE	LENGTH	GUIDELINES	EXAMPLES
<b>Full title</b>	150 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field. It should not infer result information.	Haplotypes of <i>qGL3</i> and their roles in grain size regulation with <i>GS3</i> alleles in rice  Association of IL-18 polymorphisms with rheumatoid arthritis: a meta-analysis
<b>Running title</b>	60 characters	State the topic of the study	Haplotypes of <i>qGL3</i> and their regulatory roles with <i>GS3</i> IL-18 polymorphisms and rheumatoid arthritis

Titles should be written with capitalized letters only in the first word and species/gene names. Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

### AUTHOR LIST

#### Who belongs on the author list

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the authorship policy.

Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments.

#### Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system. On the title page, write author names in the following order:

Initials of the first and middle names

Last name (surname, family name)

Comma between each author except for the last two where “and” is used. There is no space between initials.

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country (no final periods).

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only.

Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

### **Corresponding author**

One corresponding author should be designated in the submission system as well as on the title page.

One corresponding author should be designated in the submission system. However, GMR allows the inclusion of one more corresponding author that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication.

Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

### **TITLE PAGE**

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

### **ABSTRACT**

The Abstract comes after the title page in the manuscript file and should be written as one single paragraph. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract of the paper should be succinct; it must not exceed 300 words. Authors should mention the techniques used without going into methodological detail and should summarize the most important results.

While the Abstract is conceptually divided into three sections (Background, Methodology/Principal Findings, and Conclusions/Significance), do not apply these distinct headings to the Abstract within the article file.

Do not include any citations. Avoid specialist abbreviations.

Key words or indexing terms (up to six) should be included. Each key word uses the first letter capitalized and is separated by semicolons.

## **TEXT**

### **Format**

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

INTRODUCTION, MATERIAL AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, and ACKNOWLEDGMENTS are considered to be Title 1 (all letters are capitalized).

Title 2, which is a subtitle under Title 1, uses only the first letter capitalized. Title 3, which is a subtitle under Title 2, is in the same format but italicized. All on a separate line.

Try to use abbreviations in the text sparingly. Write out abbreviations in full before the first time they are used in the text. Use the metric system for all measurements without periods (cm, mL, s). Define all symbols used in equations and formulas. Do not abbreviate the word “Figure” or “Table” in titles or text.

### **Introduction**

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

## **Material and Methods**

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced.

## **Results**

The Results section should provide details of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but details of experiments that are peripheral to the main thrust of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The section should be written in the past tense.

## **Discussion**

The Discussion should spell out the major conclusions of the work along with some explanation or speculation on the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done?

The Discussion should be concise and tightly argued.

The Results and Discussion may be combined into one section, if desired.

## **Acknowledgments**

All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph directly preceding the reference section. Authors of manuscripts submitted to GMR are requested to state the source of all funding that enabled the described research to be undertaken.

Those who contributed to the study but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the online submission system.

## **References**

The references should consist mainly of articles from indexed journals. References for techniques that are essential for understanding or repeating the methods should always be in easily accessible (indexed) journals.

References are listed at the end of the manuscript and listed in alphabetical order.

Do not include citations in abstracts.

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

References, under the heading “References”, should include only works referred to in; the text. References should be cited as follows: journal papers - names and initials of the first four authors (after that using et al.), year, journal title abbreviated according to PubMed or Web of Science, volume number, first and last page numbers; books - names of authors, year, full title, edition, publishers, address (city); articles published in symposia - names of authors, year, full title of book, name(s) of editor(s) in parentheses, publisher, address (city), first and last page numbers.

### **Formatting references**

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

Journal name abbreviations should be those found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases.

---

**SOURCE**

---

**FORMAT**

---

---

<b>Published articles</b>	<p>Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, et al. (2011). cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet. Mol. Res.</i>10: 1576-1588.</p>
<b>Accepted, unpublished articles</b>	<p>Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, et al. (2014). Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol. Immunol.</i> S0161- 5890(14)00313-7.</p> <p>Same as published articles, but substitute “In press” for page numbers or DOI.</p>
<b>Web sites or online articles</b>	<p>Huynen MMTE, Martens P and Hilderlink HBM (2005). The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health.</i> 1: 14. Available at [<a href="http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14">http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14</a>].</p>
<b>Books</b>	<p>Bates B (1992). <i>Bargaining for life: A social history of tuberculosis.</i> 1st edn. University of Pennsylvania Press, Philadelphia.</p>
<b>Book chapters</b>	<p>Hansen B (1991). New York City epidemics and history for the public. In: <i>AIDS and the historian</i> (Harden VA, Risse GB, eds.). National Institutes of Health, Bethesda.</p>
<b>Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)</b>	<p>Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, et al. (1991). Amino acid metabolism conflicts with protein diversity. Preprint. Available: arXiv:1403.3301v1. Accessed 17 March 2014.</p>
<b>Published media (print or online newspapers and magazine articles)</b>	<p>Fountain H (2014). For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. <i>The New York Times.</i> 29 Jan 2014. Available at [<a href="http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html">http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html</a>]. Accessed 17 March 2014.</p>
<b>New media (blogs, web sites, or other written works)</b>	<p>Allen L (2006). Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: <i>PLOS Blogs</i> [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 -. [about 2 screens]. Available at [<a href="http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/">http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/</a>].</p>

---

---

<b>Masters' theses or doctoral dissertations</b>	Wells A (1999). Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. Master's thesis. The University of Sheffield, Sheffield. Available at [ <a href="http://cuminCAD.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09">http://cuminCAD.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09</a> ].
<b>Databases and repositories (Figshare, arXiv)</b>	Roberts SB (2013). QPX Genome Browser Feature Tracks. Database: figshare [Internet]. Accessed at [ <a href="http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214">http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214</a> ].

---

The link below can be accessed to see how other references should appear.

### **Examples of reference style**

#### **Supplementary material**

Authors may use almost any description as the item name for a supplementary material file as long as it contains an “S” and number. For example, “Figure S1” and “Figure S2”, “Table S1” and “Table S2”, and so forth.

Supplementary material files are published exactly as provided, and are not copyedited.

#### **Supplementary material captions**

List Supplementary material captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title or a legend (for figures) as well.

#### **Example caption**

**Text S1.** Title/Legend is strongly recommended.

#### **In-text citations**

We require that you cite supplementary material in the manuscript text. If you cite supporting information in the text, citations need to be in numerical order.

#### **Figures and tables**

Tables and Figures are cited in capital letters, write out in full, not abbreviated, and following the order of citation in text (For ex.: Figure 1, Figure 2, Figure 3, and so on).

#### **Figures**

Illustrations/figures (photographs, drawings, diagrams, and charts) should each be in a single file, numbered in a consecutive series of Arabic numerals in the order in which they are cited in the text. Illustrations must be submitted as separate files. All illustrations must be supplied in TIFF (.tiff) format in either color or black and white. Images must be saved as separate,

stand-alone files. The image resolution should be 300-600 dpi. Do not embed images within the text file. Indicate each figure location within the text. Do not forget to send the legend in a separate page.

Cite figures in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file. If any of your figures is under copyright, please notify the journal office.

### **Figure captions**

Figure captions must be inserted in the text of the manuscript, immediately following the paragraph in which the figure is first cited (read order). Do not include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- A figure label with Arabic numerals. Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g., a figure citation of “Figure 1” must refer to a figure file named “GMR number-fl.tif”).
- A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

### **Tables**

Special care should be taken to ensure that all tables are properly formatted. Scientific symbols used should be in Symbol or Times New Roman. Tables should be numbered consecutively (with Arabic numerals) referred to by number in the text and designed to fit the column or page size of the journal. Use tables with cells to separate columns. Do not use spaces, tabs, or vertical lines. Left justify the title above the table. Indicate each table’s location within the manuscript.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., “Table 1”) and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

## **ADDITIONAL INFORMATION REQUESTED AT SUBMISSION**

### **Funding statement**

This section should describe sources of funding that have supported the study. Please include relevant grant numbers and the URL of any funder’s web site.

### **Conflicts of interest**

The corresponding author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the study.

Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.