

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterização Genética de Espécies de *Croton*
(Euphorbiaceae) Ocorrentes no Nordeste Brasileiro**

AMARO DE CASTRO LIRA NETO

Recife, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AMARO DE CASTRO LIRA NETO

**Caracterização Genética de Espécies de *Croton*
(Euphorbiaceae) Ocorrentes no Nordeste Brasileiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/UFPE como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia

Orientadora:

Prof^a Dra. Ana Maria Benko-Iseppon
UFPE/CCB/Departamento de Genética

Co-orientador:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
UFRPE/Departamento de Biologia

Recife, 2011

Lira-Neto, Amaro de Castro

Caracterização genética de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste brasileiro/ Amaro de Castro Lira Neto. – Recife: O Autor, 2011.

135 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko-Iseppon

Co-orientador: Reginaldo de Carvalho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2011.

Inclui bibliografia

- 1. Euphorbiaceae 2. Genética Vegetal 3. *Croton* (Botânica)**
I. Título.

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-204

ATA DE DEFESA DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos cinco dias do mês de março de dois mil e dez, às nove horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a Defesa de Tese apresentada pelo Doutorando **Amaro de Castro Lira Neto**, intitulada: "**Caracterização genética de espécies de *Croton* (Euphobiaceae) ocorrentes no Nordeste brasileiro**". A Banca Examinadora foi homologada em treze de janeiro de dois mil e dez, pela PROPESQ, tendo como membros titulares os Professores: **Ana Maria Benkjo Iseppon** (Orientador), Doutora em Ciências Naturais, pela Universidade de Viena, Áustria. **Neide Santos**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, **Maria Betânia Melo de Oliveira**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, **Luiza Suely Semen Martins**, Doutora em Botânica, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, **Leonardo Pessoa Félix**, Doutor em Botânica, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco; **Maria José de Souza Lopes**, Doutora em Citogenética Animal, pela Universidade de São Paulo e **Ana Christina Brasileiro Vidal**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, suplentes. A Prof^a. Ana Benko deu início à Sessão, agradeceu pela presença de todos, em seguida, convidou o doutorando para fazer exposição de sua tese, que efetuou em quarenta minutos. Continuando, a presidenta solicitou a Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr. Leonardo Félix (1º examinador), Dr.^a Luiza Suely Martins (2º examinador), Dr.^a Maria Betânia de Oliveira (3º examinador), Dr.^a Neide Santos (4º examinador), Dr.^a Ana Iseppon (5º examinador). Em seguida a presidenta fez uma análise e abordou a importância do trabalho desenvolvido pelo doutorando, expressou seus agradecimentos, solicitando aos convidados a gentileza de se retirarem do recinto por alguns minutos, a fim de proceder a avaliação. A Comissão Examinadora atribuiu a **Amaro de Castro Lira Neto** a seguinte menção: "**Aprovado**" por unanimidade. Face ao resultado o mesmo está apto a receber o grau de Doutor em Ciências Biológicas, Área **Biotecnologia**, pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e para constar, eu Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei a presente ata que também assinam os demais presentes. Recife 05 de março de 2010.

*Dedico este trabalho à minha
companheira, Mércia Maria Almeida
de Melo, e aos meus filhos, João de
Castro Lira Almeida Melo e Pedro
de Castro Lira Almeida Melo.*

Agradecimentos

Muitas pessoas contribuíram de forma efetiva para que eu pudesse chegar até aqui. Entretanto, nesta singela lista de agradecimentos, não terei espaço suficiente para lembrar de todas. Por isso, começo pedindo desculpas pelas eventuais ausências.

Gostaria de agradecer, de forma especial, à orientadora deste trabalho, Dra. **Ana Maria Benko Iseppon** pela oportunidade concedida, dando plenas condições para que o trabalho fosse realizado.

Agradeço também ao Dr. **Reginaldo de Carvalho**, co-orientador, pelo apoio e pelas importantes sugestões.

À todos que fazem ou fizeram parte do **Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal - LGBV** durante os 4 anos em que estive presente, em especial aos companheiros **Ebenézer Bernardes**, **Geyner Alves**, **Diego Valério** e **Santelmo Vasconcelos** pela amizade sincera, companheirismo e apoio em todos os momentos. Agradeço também à **Karla Santana**, **Ághata Maria de Oliveira** e **Cássia Gusmão** pela co-autoria nos trabalhos aqui descritos.

Aproveito a oportunidade para agradecer, de forma destacada, ao amigo **Diego Sotero**. Sua participação foi decisiva para a qualidade e finalização desta Tese, em todos os níveis.

Aos membros do laboratório de **Morfo-Taxonomia Vegetal-MTV** em especial professor **Marccus Alves** e aos pesquisadores **Bruno Amorim** e **Maria de Fátima Araújo** pelo aprendizado, apoio nas coletas e identificação das espécies.

À **Mércia Maria Almeida de Melo**, minha companheira, e **João de Castro Lira Ameida Melo** pelo apoio, amor e compreensão pelos momentos de ausência.

À **Maria Inez Nascimento Lira**, minha mãe, a quem devo simplesmente tudo.

À minha família e, em especial, à **Cassandra de Barros Correia de Moura**, **Cláudia Lira de Barros Correia**, **José Farias Gomes Filho** e **Marinete Lira de Barros**

Correia pelo amor, carinho, respeito, compreensão, dedicação, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

À **Universidade Federal de Pernambuco**, em especial aos professores do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - PPGCB** pelo belo trabalho que vem sendo feito para a formação de novos pesquisadores.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq**, à **FACEPE** (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco) e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**, pelo suporte dado à execução deste trabalho na forma de bolsas e auxílio financeiro.

Muito Obrigado!

Resumo

Croton L. é considerado um dos maiores e mais diversificados gêneros dentre as angiospermas com cerca de 1300 espécies. Apesar de sua representação na composição da flora nordestina, não há nenhum estudo que vise investigar a diversidade genética no grupo. O presente estudo objetivou analisar características genéticas distintivas entre espécies do gênero com ênfase naquelas do nordeste brasileiro, incluindo marcadores moleculares e citogenéticos. As informações citogenéticas geradas sobre dez populações de seis espécies de *Croton* são inéditas. Estas pertencem a cinco seções (*Argyroglossum*, *Astraea*, *Barhamia*, *Podostachys* e *Velamea*). Todas as espécies apresentaram $2n=20$, com exceção de *C. lobatus* com $2n=18$, *C. adenocalyx*, com $2n=40$. Foram observados cariótipos simétricos com cromossomos meta-submetacêntricos de tamanho similar. Constrições secundárias estão presentes em todas as espécies, com exceção de *C. lundianus*. A coloração com nitrato de prata em *C. adenocalyx*, *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* apresentou células com número máximo de quatro nucléolos ativos para a primeira espécie, enquanto nas demais o maior número chegou a dois. O bandeamento com DAPI/CMA₃ revelou baixo conteúdo de heterocromatina na maioria das espécies estudadas, com apenas um par CMA₃⁺/DAPI⁻. Exceções foram *Croton adenocalyx* (dois pares CMA₃⁺/DAPI⁻) e *C. lobatus*, com marcações CMA₃⁺/DAPI⁰ nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos do complemento. A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou quatro sítios de 45S em *C. adenocalyx* e dois em *C. lundianus*. Apesar de pertencerem a seções distintas, cinco das seis espécies aqui estudadas mostraram relativa conservação cariomorfológica, com exceção de *C. lobatus*. No presente trabalho também foi averiguado a eficiência dos marcadores DAF (DNA Amplification Fingerprinting) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) no acesso à variabilidade genética dos gêneros *Croton* e *Chamaesyce*, efetuando-se uma seleção de *primers* para aplicação em estudos filogenéticos e populacionais. Para tal, foram utilizados quatro indivíduos de três espécies de *Croton* L. (*C. heliotropiifolius*, *C. blanchetianus* e *C. pedicellatus*) e quatro de duas espécies de *Chamaesyce* (*C. hirta* e *C. thymifolia*). Considerando os 29 *primers* DAF aplicados para *Croton*, foram gerados 374 *loci*, onde 359 foram polimórficos. Já para *Chamaesyce*, dos 42 *primers* testados, 581 *loci* foram amplificados, sendo 494 polimórficos. A partir dos 17 *primers* ISSR testados para *Croton*, foram originados 327 *loci*, onde 317 apresentaram-se polimórficos. No que diz respeito ao gênero *Chamaesyce*, dos 15 oligonucleotídeos, 193 *loci* foram gerados, com 140 polimórficos. O elevado número de polimorfismos acessados evidenciou a eficiência das metodologias em inferir índices de variabilidade genética. Em todos os fenogramas gerados, os valores de *bootstrap* foram consistentes (acima de 80). Dados preliminares da aplicação de cinco *primers* de DAF e seis de ISSR em 40 acessos de 27 espécies de *Croton*, comparadas a representantes de *Jatropha* (3 spp.), usados como grupo-irmão, também são aqui disponibilizados. Foram gerados ao todo 394 marcadores polimórficos (208 para DAF e 186 para ISSR) usados para gerar uma árvore filogenética baseada em inferência Bayesiana onde muitas entidades taxonômicas apresentaram-se em posições politômicas, indicando a necessidade de agregação de dados adicionais para melhor embasamento da análise.

Palavras Chave: Euphorbiaceae, *Croton*, *Chamaesyce*, Citogenética, CMA DAPI, FISH, DAF, ISSR, inferência Bayesiana.

Abstract

Croton L. is among the largest and most diversified genera within the Angiosperms, with about 1300 species. Despite of its representation in the Brazilian northeastern flora, no previous evaluations regarding its genetic diversity was carried out. The present study aimed to analyze distinctive genetic features for this genus, including molecular and cytological markers. In the present study first cytogenetic inferences were carried out for ten populations out of six species from five *Croton* sections (*Argyroglossum*, *Astraea*, *Barhamia*, *Podostachys* and *Velamea*). All species presented $2n=20$, with exception of *C. lobatus* with $2n=18$ and *C. adenocalyx* with $2n=40$. The karyotypes were symmetric with meta- to submetacentric chromosomes of similar sizes. Secondary constrictions were observed in all species, except for *C. lundianus*. Silver nitrate staining in *C. adenocalyx*, *C. heliotropiifolius* and *C. blanchetianus* revealed a maximum of four nucleoli for the first and two for the remaining species. The DAPI/CMA₃ fluorochrome staining revealed a low heterochromatin content for most species that beared a single chromosome pair with a CMA₃⁺/DAPI⁰ segment. Exceptions were *Croton adenocalyx* ($2n=40$, with two pairs CMA₃⁺/DAPI⁰) and *C. lobatus* with pericentromeric CMA₃⁺/DAPI⁰ in all chromosomes of the complement. Fluorescent in situ hybridization (FISH) revealed four 45S sites in *C. adenocalyx* and two in *C. lundianus*. Despite of their classification in distinct sections and their morphological diversity, the karyotype features were conserved for five of the here analyzed species, with exception of *C. lobatus*. In the scope of the present work protocols for the use of DAF (DNA Amplification Fingerprinting) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) were tested aiming to access the genetic variability of the genera *Croton* and *Chamaesyce*, with a previous primer selection for future phylogenetic and populational approaches. For this purpose we used four accessions of three *Croton* species (*C. heliotropiifolius*, *C. blanchetianus* e *C. pedicellatus*) and four accessions of two *Chamaesyce* species (*C. hirta* e *C. thymifolia*). Considering the DAF approach 29 primers were tested generating 374 loci and 359 polymorphisms for *Croton* while for *Chamaesyce* 42 primers were tested revealing 581 loci and 494 polymorphisms. Concerning the ISSR inference 17 primers were tested for *Croton*, with 327 loci and 317 polymorphisms, while for *Chamaesyce* 15 oligonucleotides generated 193 from which 140 were polymorphic. For both approaches and considering both groups the generated phenograms were consistent with the expected relationships, presenting consistent bootstrap values (above 80). In the present work preliminary data are also presented regarding the evaluation of 40 accessions from 27 *Croton* species with five DAF and six ISSR primers, and using three *Jatropha* species as sister group. This approach permitted the generation of 394 markers with 208 DAF and 186 ISSR polymorphic bands. A phylogenetic tree based on Bayesian inference was generated revealing the presence of various polytomic branches, indicating the need of additional markers for a better understanding if this complex taxonomic group.

Key words: Euphorbiaceae, *Croton*, *Chamaesyce*, Cytogenetics, CMA₃ DAPI, FISH, DAF, ISSR, Molecular Markers.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	13
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Considerações sobre a família Euphorbiaceae e o gênero <i>Croton</i>	15
2.1.1 A família Euphorbiaceae	15
2.1.2 O Gênero <i>Croton</i>	15
2.1.3 Importância Econômica	16
2.2. Estudos Genéticos em Euphorbiaceae e o no gênero <i>Croton</i>	17
2.2.1 Citogenética	17
2.2.1.1 Números cromossômicos	17
2.2.1.2 Bandeamento cromossômico	20
2.2.1.3 Citogenética Molecular	21
2.2.2. Marcadores Moleculares e Análise de sequência de DNA	22
2.2.2.1 Marcadores DAF e ISSR	23
2.2.2.2 Estudos Evolutivos em Euphorbiaceae	23
2.3. Referências Bibliográficas	25
CAPÍTULO 1	
Diversity and Uses of the Genus <i>Croton</i> (Euphorbiaceae) in Northeastern Brazil	32
(Capítulo de Livro)	
CAPÍTULO 2	
Citogenética de seis espécies de <i>Croton</i> L. (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste do Brasil	67
(Artigo)	
CAPÍTULO 3	
Seleção de <i>primers</i> para avaliação de diversidade genética em dois gêneros de Euphorbiaceae (<i>Croton</i> L. e <i>Chamaesyce</i> Gray) com <i>fingerprinting</i> de DNA	89
(Artigo)	
CAPÍTULO 4	
Diversidade genética em espécies brasileiras de <i>Croton</i> (Euphorbiaceae) revelada por DAF (<i>DNA Amplification Fingerprinting</i>) e ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>)	114
(Resultados Preliminares)	
CONCLUSÕES	115
ANEXOS	124
Instruções do periódico <i>Genetics and Molecular Biology</i>	124
Instruções do periódico Revista Brasileira de Biociências	129

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1: Lista de espécies pertencentes ao gênero <i>Croton</i> estudadas cromossomicamente.	19
--	----

CAPÍTULO 01

Table 1: Classification of some representative genera of Euphorbiaceae <i>s.l.</i> occurring in Brazil and their current systematic position.	35
--	----

Table 2: Species of <i>Croton</i> L. occurring in northeastern Brazil, adapted from Pollito et al., (2004), Cordeiro and Carneiro-Torres (2006) and complemented with specimens from the herbaria ASE, HUEFS, IPA, JPB, NY, RB, PEUFR, TEPB and UFP.	38
---	----

Table 3: Revision of known popular uses (folkmedicine) and ethnopharmacological assays in <i>Croton</i> including species collected or observed in natural environment by our group in Brazilian Northeastern Region (indicated by “++” after species name). Legend for used plant parts: B: bark; E: entire plants; L: leaves; R: root; S: sap (or latex); X: extract.	45
--	----

Table 4: LC ₅₀ values of different <i>Croton</i> species against <i>Artemia salina</i> .	49
--	----

Table 5: Analytical evaluation and classification of <i>Croton</i> sequences deposited in GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), including DNA nucleotide sequences and protein (prot.) amino-acid sequences. Legend for abbreviations: NE: species that occur in Brazilian Northeastern region according to the present evaluation (listed in Table 2 and 3); Ph: species with indications from folkmedicine and pharmacological evaluations (listed in Table 3).	54
---	----

CAPÍTULO 02

Tabela 1: Relação de espécies de <i>Croton</i> analisadas informando seções, procedência e contagens cromossômicas previamente reportadas.	84
---	----

Tabela 2: Relação de espécies de <i>Croton</i> analisadas apresentando os principais dados citogenéticos obtidos no presente estudo.	85
---	----

CAPÍTULO 03

Tabela 1: Indivíduos utilizados no experimento da seleção de <i>primers</i> dos marcadores DAF e ISSR em <i>Croton</i> e <i>Chamaesyce</i> . Identificação das respectivas espécies dos gêneros estudados utilizadas, bem como a indicação dos locais de coleta e nome do coletor. Legenda das abreviações: PE – Pernambuco, SE – Sergipe, PNSI – Parque Nacional Serra de Itabaiana.	107
--	-----

Tabela 2: Relação dos 29 <i>primers</i> DAF utilizados no processo de seleção em <i>Croton</i> , com respectivas sequências, quantidade de bandas polimórficas entre os níveis inter e intraespecífico, bem como o percentual de Divergência genética (Dg). Destaque para o conjunto de <i>primers</i> que totalizaram 200 marcas polimórficas.	108
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 3: Relação dos 17 *primers* ISSR utilizados no processo de seleção em *Croton*, com respectivas sequências, quantidade de bandas polimórficas entre os níveis inter e intraespecífico, bem como o percentual de Divergência genética (Dg). Destaque para o conjunto de *primers* que totalizaram 200 marcas polimórficas.

109

Tabela 4: Relação dos 42 *primers* DAF utilizados no processo de seleção em *Chamaesyce*, com respectivas sequências, quantidade de bandas polimórficas entre os níveis inter e intraespecífico, bem como o percentual de Divergência genética (Dg). Destaque para o conjunto de *primers* que totalizaram 200 marcas polimórficas.

110

Tabela 5: Relação dos 15 *primers* ISSR utilizados no processo de seleção em *Chamaesyce*, com respectivas sequências, quantidade de bandas polimórficas entre os níveis inter e intra-específico, bem como o percentual de Divergência genética (Dg).

111

CAPÍTULO 04

Tabela 1: Indivíduos utilizados no experimento dos marcadores DAF e ISSR em *Croton*. Identificação das respectivas espécies do gênero estudado, bem como a indicação dos locais de coleta e nome do coletor. Todas as coletas sem indicação de país foram coletadas em território nacional. Legenda das Abreviações: PNSI = Parque Nacional da Serra de Itabaiana. AMBI: Coletor Ana Maria Benko-Iseppon e cols.; MFA: Maria de Fátima Araújo Lucena; LPF: Leonardo Pessoa Felix.

123

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 01

Figure 1: Brazilian Northeastern region and prevalent vegetation types. Adapted from IBGE (2000) with modifications 34

Figure 2: General aspects of some *Croton* species native from Brazilian Northeast. Habit (a) and aspects of the inflorescences of (b) *C. pedicellatus* (c) *C. lundianus* and (d) *C. sellowii*. 40

Figure 3: Micrographs of *Croton* taxa collected in Pernambuco state (Brazilian Northeastern region) after standard Giemsa staining. (a-b) Interphase nucleus and metaphase spread of *C. heliotropiifolius* ($2n=20$); (c) prometaphase chromosomes of *C. lobatus* ($2n=18$); karyotypes of *C. heliotropiifolius* (d); *C. aff. heliotropiifolius* ($2n=20$) (e) and *C. lobatus* (f). Bars in c for a-c and in f for d-f correspond to 10 μm . 51

CAPÍTULO 02

Figura 1: Coloração convencional com Giemsa (a-l) e com nitrato de prata (m-o) em cromossomos e núcleos interfásicos de *Croton*. (a-b) *Croton adenocalyx*; (c,d,m) *C. lundianus*; (e, f) *C. heliotropiifolius*; (g, h, n) *C. lobatus*; (i, j) *C. blanchetianus* e (k, l, o) *C. sellowii*. Em m detalhe de um núcleo com 4 nucléolos. Setas apontam constrições secundárias. Cabeças de seta destacam núcleos com dois, três ou quatro nucléolos. Barra em (o) exclusiva para as figuras m, n e o enquanto a barra em (h) refere-se às demais células, sendo ambas equivalentes a 5 μm . 86

Figura 2: Cromossomos de *Croton* após coração com DAPI (a, e, i, l, n, q); CMA₃ (b, f, j, m, o, r) e sobreposição CMA₃/DAPI (c, g, k, p, s). Em (d, h) marcação com a sonda de DNAr 45S (FISH). (a-d) *C. adenocalyx*; (e-h) *C. lundianus*; (i-k) *C. heliotropiifolius*; (l-m) *C. lobatus*; (n-p) *C. blanchetianus* e (q-s) *C. sellowii*. Em (n, o, p) as fotos exibem duas células em prometáfase e no detalhe uma intérfase. A barra corresponde a 5 μm 87

Figura 3: Representação idiogramática dos cariótipos das espécies de *Croton*. I. *C. adenocalyx*; II. *C. lundianus*; III. *C. heliotropiifolius*; IV. *C. lobatus*; V. *C. sellowii* e VI. *C. blanchetianus*. Esquema representativo da distribuição dos marcadores cromossômicos indicados, não considerando medições precisas da posição ou proporções do tamanho relativo dos braços. 88

CAPÍTULO 03

Figura 1: Fenogramas gerados a partir da análise das reações de DAF e ISSR pelo método de *Neighbor-Joining* no gênero *Croton*. A – Árvore gerada utilizando todos os *primers* DAF do experimento (29); B – Árvore gerada somente com os 14 *primers* DAF selecionados após análise dos níveis de polimorfismos; C – Fenograma oriundo a partir da utilização de todos os *primers* ISSR (17) e D – Árvore produzida utilizando somente os 7 *primers* selecionados após análises. CHT0201 – *C. heliotropiifolius*, CPD0204 – *C. pedicellatuspedicellatus*, CBT0201 e CBT0404 – *C. blanchetianus*. Números na base dos ramos dos fenogramas indicam valores de *bootstrap*. 112

LISTA DE FIGURAS

Figura 2: Fenogramas gerados a partir da análise das reações de DAF e ISSR em *Chamaesyce* pelo método de *Neighbor-Joining*. A – Árvore gerada utilizando todos os *primers* DAF do experimento (43); B – Árvore gerada somente com os 11 *primers* DAF selecionados após análise dos níveis de polimorfismos; C – Fenograma oriundo a partir da utilização de todos os *primers* ISSR (15). CH1UF2, CH1EP5 e CH1EP6 – *C. hirta*, População Campus UFPE e População Estrada dos Passarinhos, respectivamente CH2IB6 – *C. thymifolia*, população Ilha do Bananal. Números na base dos ramos dos fenogramas indicam valores de *bootstrap*.

113

CAPÍTULO 04

Figura 1: Fragmentos amplificados em *Croton* a partir da reação de DAF com o *primer* N-17, após eletroforese em gel de agarose, 1,8%. M: DNA padrão de 100 pb.

124

Figura 2: Fragmentos amplificados em *Croton* a partir da reação de ISSR com o *primer* 887, após eletroforese em gel de agarose, 1,8%. M: DNA padrão de 100 pb.

124

Figura 3: Análise Bayesiana a partir de marcadores DAF e ISSR em 40 indivíduos pertencentes a 21 espécies do gênero *Croton*. PE: Pernambuco; BA: Bahia; SE: Sergipe; CE: Ceará. Números na base do clado indicam valores de *bootstrap*. Espécies associadas às siglas indicativas das espécies encontram-se especificadas na Tabela 1.

125

1.0 INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae *s.l.*, com cerca de 300 gêneros e 7.500-9.000 espécies, é um dos grupos taxonômicos mais complexos e morfológicamente diversos entre as eudicotiledôneas (CRONQUIST, 1981; SOLTIS *et al.*, 2005; SIMPSON, 2006). De distribuição preferencial em ambientes tropicais e subtropicais, a família está representada no Brasil por cerca de 70 gêneros e 1.100 espécies (BARROSO, 1991; SOUZA e LORENZI, 2005). Dessas, cerca de 500 são encontradas na Região Nordeste (BARBOSA *et al.*, 1996).

Trata-se de um dos grupos com maior potencial para a descoberta de novas moléculas, especialmente óleos essenciais (MATOS, 1989), uma classe de compostos muito demandados no mercado de produtos naturais e de fármacos. Porém, qualquer projeto de bioprospecção necessita de subsídios para sua eficiente implantação, entre eles, estudos que propiciem um melhor conhecimento da flora nativa, no que tange à sua diversidade morfológica e genética, biologia reprodutiva e propagação (GARRITY e HUNTER-CEVERA, 1999; BENKO-ISEPPON e MORAWETZ, 2007).

Tais informações encontram-se ainda pouco amostradas para o gênero *Croton* especialmente no que se refere às espécies do Nordeste Brasileiro, a despeito de seu grande potencial e de sua corrente utilização por pequenas comunidades.

A grande variedade morfológica, que dificulta a taxonomia de alguns gêneros, além da diversidade de números e tamanhos cromossômicos, torna as Euphorbiaceae um grupo muito interessante em termos citogenéticos (PERRY, 1943). Um amplo conhecimento sobre número cromossômico, bandejamento, organização dos núcleos interfásicos e estudos de hibridização *in situ* apresentam-se como importantes ferramentas para estudos sistemáticos e evolutivos em angiospermas (RÖSER e MORAWETZ, 1994; BENKO-ISEPPON, 2001).

Dados citogenéticos referentes às Euphorbiaceae mostram que a maior parte das informações é proveniente de espécies que compõem as floras européias e norte-americanas, sendo a brasileira, e principalmente a nordestina, carente de dados. Além disso, a maioria dos estudos se concentra em determinações do número cromossômico, existindo poucas análises envolvendo caracterizações cariotípicas mais detalhadas, fato comum em muitos grupos de plantas tropicais (RAVEN, 1975; RÖSER e MORAWETZ, 1994). Igualmente, há uma carência de estudos com marcadores moleculares em espécies tropicais, com ênfase em espécies nativas (BENKO-ISEPPON, 2001).

O gênero *Croton* é considerado o segundo maior da família com cerca de 1300 espécies. No Brasil ocorrem 350 espécies, das quais 40 foram observadas no Estado de Pernambuco (CRAVEIRO, *et al.*, 1978; WEBSTER, 1994; LUCENA, 2000). Este grupo apresenta taxonomia

complexa devido ao elevado número de espécies e à grande diversidade morfológica de seus indivíduos. Essa complexidade tem dado margem a identificações errôneas de várias espécies reconhecidas como novas quando, na verdade, são variantes de espécies já descritas. Nesse sentido, estudos genéticos compostos por técnicas citogenéticas e marcadores moleculares apresentam-se como uma excelente ferramenta no auxílio da elucidação da história evolutiva desse grupo (MACIEL *et al.*, 2002).

O presente estudo visou analisar características genéticas distintivas entre espécies do gênero *Croton*, com ênfase naquelas do nordeste brasileiro, incluindo marcadores moleculares e citogenéticos, avaliando a diversidade e a distribuição destes marcadores nos representantes do gênero, comparativamente a grupos relacionados, de modo a auxiliar no entendimento das relações biosistemáticas do grupo.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações sobre a família Euphorbiaceae e o gênero *Croton*

2.1.1 A família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae *s.l* é uma das mais representativas dentre as Angiospermas, ocorrendo predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, embora tenha representantes em todas as regiões do planeta, exceto nas regiões mais frias como o Ártico (HANS, 1973; BARROSO *et al.*, 1991; GONZALEZ, 1995). Diversos levantamentos florísticos confirmam a ampla distribuição das Euphorbiaceae em vários ecossistemas brasileiros, tais como cerrado, mata atlântica, caatinga e campos rupestres (CORDEIRO, 1993; HARLEY, 1995; FERRAZ, 1996; PAIVA Jr. *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2000).

Umas das principais características dessa família é a sua grande diversidade morfológica, apresentando plantas que podem ser latescentes ou não, de hábito variado, existindo árvores de grande porte, arvoretas, arbustos, subarbustos e ervas, incluindo espécies cactiformes, aquáticas e lianescentes (WEBSTER, 1987; JOLY, 1993; GONZALEZ, 1995). As folhas são alternas, simples ou compostas, em geral com estípulas. As folhas simples podem ter limbo inteiro ou lobado (*Dalechampia*, *Croton*, *Jatropha*, *Cnidoscolus*, *Manihot*, etc.). As compostas são de tri a quinquelfolioladas como em *Hevea*, *Piranhea* e *Joannesia* (BARROSO *et al.*, 1991). São plantas monóicas ou dióicas, com inflorescências racemosas, cimosas ou em ciátio. As flores são unissexuadas (eventualmente hermafroditas), podendo ocorrer vestígios do sexo oposto. O androceu é variável, apresentando de poucos a muitos estames, com filetes curtos ou longos, livres ou concrecidos e anteras ditecas ou monotecas. O gineceu típico é o tricarpelar, que constitui um ovário livre, trilocular, com estiletos livres ou parcialmente concrecidos, inteiros, bifidos, lobados ou laciniados no ápice (BARROSO *et al.*, 1991). Os frutos podem ser deiscentes ou indeiscentes, geralmente tricocas. As sementes podem ser globosas, ovóides, angulosas, plano-convexas, ou carenadas. São ricas em endosperma, muitas vezes oleaginoso (*Ricinus*, *Aleurites*), podendo ser providas de grande carúncula (*Croton*, *Ricinus*, *Jatropha*, etc.) ou arilo (*Chaetocarpos*, *Pera*) (BARROSO *et al.*, 1991; JOLY, 1993).

2.1.2 O Gênero *Croton*

Croton L. compreende o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae com cerca de 1.300 espécies. Sua distribuição é predominantemente neotropical (WEBSTER, 1994) sendo a

América do Sul, as Antilhas e o México importantes centros de diversidade para esse grupo (BURGER & HUFT, 1995). No Brasil, este gênero é representado por aproximadamente 350 espécies (BARROSO *et al.*, 1991) ocupando diferentes ambientes e tipos vegetacionais.

Na subfamília Crotonoideae esse grupo é reconhecido como o de taxonomia mais complexa por vários estudiosos (SECCO, 1992; CORDEIRO, 1993; WEBSTER, 1993;1994; LUCENA, 2009). Isso se deve não apenas ao elevado número de espécies, mas também à grande diversidade morfológica de seus indivíduos, dificultando a delimitação dos *taxa*, além de problemas de identificação e nomenclatura. Essa complexidade tem dado margem a identificações errôneas de várias espécies reconhecidas como novas quando, na verdade, são variantes de espécies já descritas.

O gênero é caracterizado por apresentar plantas latescentes ou não, com tricomas estrelados, lepidopos ou de outros tipos; folhas com ou sem glândulas; inflorescência racemosa, cimoso ou mais raramente paniculiforme; flores estaminadas em geral diperiantadas com estames livres e flexionados no botão, grãos de pólen globosos e elipsoidais, inaperturados e com elementos supratectais triangulares a arredondados, dispostos sobre uma rede de muros, constituída por columelas regulares, caracterizando o padrão de exina conhecido como “croton” (NOWICK, 1994; WEBSTER, 1994).

Os estudos existentes para o Nordeste abrangem principalmente a área fitoquímica (CRAVEIRO e SILVEIRA, 1982; MATOS, 1983; MONTE, *et al.*, 1988; SILVA, 1998), anatomia (NEPUCENO e OLIVEIRA, 1979) e levantamentos florísticos (ANDRADE-LIMA e LIMA, 1967; LUCENA, 1996; ALVES, 1998; SILVA, 1998; RODAL, *et al.*, 1999), onde o gênero é referido como altamente diversificado e bem representado em todos os ecossistemas.

2.1.3 Importância Econômica

Euphorbiaceae destaca-se como uma das famílias botânicas de maior importância econômica, tendo espécies aproveitadas para os mais diversos fins. A seringueira (*Hevea brasiliensis* M. Arg.) e outras espécies do gênero *Hevea* são fornecedoras de látex, usado na produção de borracha natural, sendo extensamente cultivadas em alguns trechos da floresta amazônica e das florestas do arquipélago malaio (JOLY, 1993; RIZZINI e MORS, 1995).

A mamona (*Ricinus communis* L.), nativa da África, é fonte do óleo de rícino, de fibras vegetais e de compostos químicos usados na medicina, além de outros óleos lubrificantes aplicados na aviação, bem como em propulsores de ônibus espaciais e foguetes (GONZALEZ, 1995; RIZZINI e MORS, 1995; STEVENS, 2001).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) é fonte primária de alimento (principalmente de amido), com ênfase em regiões tropicais, onde é consumida em larga escala, seja *in natura* ou em

forma de farinha (HEYWOOD, 1993; GONZALEZ, 1995; CARVALHO e GUERRA, 2002). Na produção madeireira destacam-se *Hura crepitans* L., cuja madeira é clara, de fácil corte, pouco resistente à água, porém muito utilizada em interiores ou na confecção de caixotes. Madeiras importantes também são encontradas no gênero *Hieronyma* (RIZZINI e MORS, 1995).

Algumas espécies de *Croton*, *Euphorbia*, *Phyllanthus* são utilizadas como plantas medicinais (LORENZI, 1982; JOLY, 1993; GONZALEZ, 1995; MACIEL, *et al.* 2002). Outras espécies movimentam grandes somas de dinheiro no mercado de plantas ornamentais, como a *Pointisetia* (*Euphorbia pulcherrima*) (STEVENS, 2001).

A importância econômica do gênero *Croton* é cada vez mais reconhecida, devido, principalmente, ao seu enorme potencial para a produção de óleos essenciais e diversos constituintes ativos como flavonóides, alcalóides e terpenóides. Várias de suas espécies são largamente utilizadas na medicina popular, dentre as quais algumas têm suas atividades terapêuticas confirmadas cientificamente. São exemplos de espécies usadas na medicina popular: *Croton tiglium* (contra câncer), *C. macrostahys* (vermífugo), *C. sellowii* (antibiótico), *C. cortesianos* (dermatites), *C. lineareis* (antitérmico), *C. sublyratus* (contra úlcera) e *C. penduliflorus* (purgante) (KUPCHAM, 1979; RIZK, 1987; RANDAU *et al.* 2002).

2.2. Estudos Genéticos em Euphorbiaceae e o no gênero *Croton*

2.2.1. Citogenética

2.2.1.1. Números cromossômicos

As Euphorbiaceae são de grande interesse citogenético devido à significativa diversidade de números ($2n=16$ a $2n=224$) e tamanhos cromossômicos encontrados (PERRY, 1943; SOONTORNCHAINAKSAENG e CHAIYASUT, 1999). Essa diversidade está muitas vezes associada à sua complexa e variada morfologia, tanto em termos reprodutivos quanto vegetativos (STEBBINS, 1971).

Listas de números cromossômicos de espécies ocorrentes no Brasil, incluindo plantas da família Euphorbiaceae, foram publicadas por diversos autores (GIBBS e INGRAM, 1982; PEDROSA *et al.*, 1999; GUSMÃO, 2000; PÔRTO, 2007).

Gusmão (2000) elaborou uma lista com os números cromossômicos mais frequentes para 90 gêneros, abrangendo todas as subfamílias e totalizando 927 espécies. Apesar da grande variação numérica encontrada, as subfamílias Phyllanthoideae, Crotonoideae e Acalyphoideae exibiram certo grau de prevalência dos números $n=13$, $n=11$ e $n=10$, respectivamente. O gênero *Euphorbia*

apresentou o maior número de espécies estudadas (306), chegando quase a um terço do total listado, exibindo $n=8$, 9, 10 e 14 como números haplóides mais frequentes. Segundo Perry (1943) $n=8$ pode ser considerado o número primitivo para a família com a evolução cromossômica se dando por disloidia descendente ($n=6$ e 7) ou, mais provavelmente, ascendente ($n=9$, 10 e 11).

Devido à grande importância econômica do gênero *Manihot*, vários estudos sobre a citogenética de espécies e, principalmente, variedades de *M. esculenta* (popularmente conhecida como macaxeira, mandioca ou aipim) têm sido publicados (PERRY, 1943; JENNINGS, 1963; UMANAH e HARTMAN, 1973; CARVALHO e GUERRA, 2002). Todas as espécies de *Manihot* analisadas até o momento apresentaram $2n=36$ ($n=18$). Essas espécies e variedades são consideradas, por muitos autores, como alopoliplóides originados a partir do número básico $x=9$ (PERRY, 1943; JENNINGS, 1963; UMANAH e HARTMAN, 1973). Por outro lado, Carvalho e Guerra (2002) sugerem que o estabelecimento de $2n=18$ possa ter ocorrido antes da diferenciação do gênero.

Por sua vez, Vanzela *et al.* (1997) estudaram oito espécies do gênero *Dalechampia* coletados nos Estados brasileiros do Paraná e de São Paulo, encontrando quatro números cromossômicos distintos $2n=36$, 46, 138 e 198, onde $2n=36$ ocorreu em *D. pentaphylla* Lam. e $2n=198$ em *D. stenosepala* Muell. Arg. Diferenças no número cromossômico de três populações de *D. stenosepala* (duas com $2n=46$ e uma com $2n=198$) sugerem que possam tratar-se de espécies distintas, embora os estudos morfológicos não evidenciem grandes diferenças entre elas.

A presença de cromossomos B foi observada em alguns gêneros da família Euphorbiaceae tais como *Phyllanthus*, *Joannesia*, *Alchornea*, *Euphorbia* e *Croton* (KRISHNAPPA e RASHME, 1980; SOONTORCHAINAKSAENG e CHAIYASUT, 1999; GUSMÃO, 2000). Segundo Stebbins (1971), os cromossomos B em geral não induzem qualquer efeito morfológico perceptível. Entretanto, fisiologicamente sua presença pode reduzir o vigor vegetativo e a fertilidade do pólen.

Como demonstrado na Tabela 1, a literatura citogenética revela que apenas cerca de 5% das espécies de *Croton* foram estudadas cromossomicamente. Apesar de apresentar os números $n=8$ e $n=32$ como menor e maior números haplóides encontrados, respectivamente, o gênero exibe $n=10$ como o mais frequente. Entretanto, menos da metade das seções pertencentes a esse grupo possuem espécies analisadas, sendo que algumas dessas possuem apenas um representante (*Astraea*, *Croton*, *Eremocarpus*, *Furcaria*, *Gynamblosis*, *Julocroton*, *Pilinophytum* e *Tigilium*). A seção *Drepadenium* exibiu $n=14$ cromossomos em todas as cinco espécies estudadas enquanto em *Velamea* (com oito espécies estudadas) os números variaram entre 9, 10 e 24.

Tabela 1: Lista de espécies pertencentes ao gênero *Croton* estudadas cromossomicamente. Dados obtidos em Soontornchainaksaeng e Chaivasut, 1999; Gusmão, 2000; Soontornchainaksaeng *et al.*, 2003; Croton Research Network, 2006^a; Pôrto, 2007. Legenda das abreviações: Gam.=Gametófito; Spor.=Esporófito; (^a)= referências obtidas nos artigos acima citados.

Taxon	Gam.	Spor	Autor
Seção Adenophyllum			
<i>C. ciliato-glanduliferus</i> Ortega	10	-	Seavey, 1975 ^a
<i>C. humilis</i> L.	10	-	Urbatsch <i>et al.</i> , 1975 ^a
Seção Argyrocroton			
<i>C. joufra</i> Roxb	10	-	Mehra e Hans, 1969 ^a ; Mehra, 1976 ^a
<i>C. laevigatus</i> Vahl	10	-	Bedi <i>et al.</i> , 1980 ^a
	11	-	Sarkar <i>et al.</i> , 1972 ^a
<i>C. roxburghii</i> Vahl	10	20	Mehra e Hans, 1969 ^a ; Mehra, 1976 ^a
<i>C. hutchinsonianus</i> Hosseus	10	20	Soontornchainaksaeng <i>et al.</i> , 2003
<i>C. poilanei</i> Gagnep.	10	20	Soontornchainaksaeng <i>et al.</i> , 2003
<i>C. robustus</i> Kurs.	10	20	Soontornchainaksaeng e Chaivasut, 1999
			Soontornchainaksaeng <i>et al.</i> , 2003
<i>C. cascarilloides</i> Raeusch.	10	20	Soontornchainaksaeng <i>et al.</i> , 2003
Seção Argyroglossum			
<i>C. blanchetianus</i> Baill.	-	20	Pôrto, 2007
Seção Astraea			
<i>C. lobatus</i> L.	9	-	Brunel e Laplace, 1977 ^a ; Miller e Webster, 1966 ^a ;
	-	18	Gusmão, 2000; Pôrto, 2007
Seção Barhamia			
<i>C. urticaefolius</i> Lam.	-	20	Pôrto, 2007
Seção Cascarilla			
<i>C. kongensis</i> Gagnep.	10	20	Soontornchainaksaeng <i>et al.</i> , 2003
<i>C. caudatus</i> Giesel.	10	20	Mehra e Hans, 1969 ^a ; Mehra, 1976 ^a
<i>C. lorentzii</i> Mull. Arg.	10	-	Bernadelo <i>et al.</i> , 1990 ^a
<i>C. bonplandianus</i> Baill.	8	-	Sanjappa, 1979 ^a
	10	-	Miller e Webster, 1966 ^a ; Datta, 1967 ^a
	10	20	Bir e Shidu, 1979 ^a
<i>C. pulegioides</i> Mull. Arg.	-	20	Pôrto, 2007
<i>C. persicaria</i> Baill.	10	-	Mehra, 1976 ^a
Seção Croton			
<i>C. aromaticus</i> L.	10	-	Kothari <i>et al.</i> , 1981 ^a
Seção Cyclostigma			
<i>C. ruizianus</i> (vel aff.) Mull. Arg.	32	64	Diers, 1961 ^a
<i>C. sarcopetalus</i> Mull. Arg.	32	-	Bernadelo <i>et al.</i> , 1990 ^a
<i>C. xalapensis</i> Kunth	Ca. 60	-	Miller e Webster, 1966 ^a
Seção Drepadenium			
<i>C. californicus</i> Mull. Arg.	14	-	Urbatsch <i>et al.</i> , 1975 ^a
<i>C. californicus</i> var. <i>tenius</i> (Wats.) Ferg.	14	-	Szweykowski, 1965 ^a
<i>C. dioicus</i> Cav.	14, 28	-	Urbatsch <i>et al.</i> , 1975 ^a
<i>C. punctatus</i> Jacq.	14	-	Bell, 1965 ^a
<i>C. texensis</i> (Kl.) Mull. Arg.	14, 28	28, 56	Urbatsch <i>et al.</i> , 1975 ^a
<i>C. wigginsii</i> L.C. Wheeler	14	-	Spellenberg, 1986 ^a
Seção Eremocarpus			
<i>C. setigerus</i> Hook.	10	20	Miller e Webster, 1966 ^a ; Heiser e Whitaker, 1948 ^a
Seção Furcaria			
<i>C. klotzschianus</i> Thwaites	10	-	Datta, 1967 ^a
	11	-	Sharma, 1970 ^a
	-	20	Kothari <i>et al.</i> , 1980 ^a

Tabela 1 (continuação)

Taxon	Gam.	Spor	Autor
Seção Geiseleria			
<i>C. glandulosus</i> L.	-	16	Perry, 1943 ^a
<i>C. palmeri</i> S. Wats.	-	16	Perry, 1943 ^a
<i>C. hirtus</i> L. Her.	8	16	Soontornchainaksaeng <i>et al.</i> , 2003
Seção Gynamblosis			
<i>C. monanthogynus</i> Michx.	10	-	Urbatsch <i>et al.</i> , 1975 ^a
	-	16	Perry, 1943 ^a
<i>C. pedicelatus</i> Kunth.	-	18	Pôrto, 2007
Seção Julocroton			
<i>C. subpannosus</i> Mull. Arg.	10	-	Di Fulvio, 1973 ^a
Seção Lamprocroton			
<i>C. alabamensis</i> E.A.Smith ex Chapman	16, 32	32	Farmer, 1962 ^a ; Farmer e Thomas 1969 ^a
<i>C. argentinus</i> Mull. Arg.	10	-	Di Fulvio, 1973 ^a
Seção Lasiogyne			
<i>C. jacobinensis</i> Baill.	-	20	Pôrto, 2007
<i>C. sonderianus</i> Mull. Arg.	-	20	Pôrto, 2007
Seção Pilinophytum			
<i>C. capitatus</i> var. <i>capitatus</i> Michx.	10	-	Urbatsch <i>et al.</i> , 1975 ^a
<i>C. capitatus</i> var. <i>lindheimeri</i> Michx. (Engelm. et A. Gray) Mull. Arg.	-	20	Lewis <i>et al.</i> , 1962 ^a
Seção Tiglium			
<i>C. tiglium</i> L.	10	20	Mehra e Hans, 1969 ^a ; Mehra, 1976 ^a
Seção Velamea			
<i>C. cortesianus</i> Kunth	10	-	Miller e Webster, 1966 ^a
<i>C. fruticosus</i> Torr.	ca. 24	-	Urbatsch <i>et al.</i> , 1975 ^a
<i>C. heliotropiifolius</i> (Kunth) Mull. Arg.	-	20	Gusmão, 2000
	-	40	Pôrto, 2007
<i>C. pottsii</i> (Kl.) Mull. Arg.	9	-	Urbatsch <i>et al.</i> , 1975 ^a
<i>C. pottsii</i> var. <i>pottsii</i> (Kl.) Mull. Arg.	20	-	Ward, 1983 ^a
<i>C. torreyanus</i> Mull. Arg.	10	-	Urbatsch <i>et al.</i> , 1975 ^a
<i>C. magdalenae</i> Millsp.	10	-	Urbatsch <i>et al.</i> , 1975 ^a
<i>C. aff. Rhamnifolius</i> (Kunth) Mull. Arg.	-	20	Gusmão, 2000
<i>C. semivestitus</i> Mull. Arg.	-	40	Pôrto, 2007
Seção não definida			
<i>C. kerri</i> Airy Shaw	10	20	Soontornchainaksaeng <i>et al.</i> , 2003
<i>C. roxburghii</i> Vahl N. P. Balakr	10	-	Mehra e Hans, 1969 ^a ; Mehra, 1976 ^a
<i>C. stellatopilosus</i> Ohba	10	20	Soontornchainaksaeng <i>et al.</i> , 2003
<i>C. thorelli</i> Gagnep.	10	20	Soontornchainaksaeng <i>et al.</i> , 2003

Apesar das espécies de *Croton* apresentarem importantes diferenças morfológicas, a maioria dentre as estudadas revelou certa conservação citológica com n=10 e cromossomos similares em tamanho e número. Soontornchainaksaeng e Chaiyasut (1999) propõem que essa diversidade fenotípica seja devida a diferenças moleculares que não são perceptíveis quando se estuda o complemento cromossômico.

2.2.1.2. Bandeamento cromossômico

Poucos estudos incluindo técnicas de bandeamento foram realizados na família, provavelmente devido ao pequeno tamanho dos cromossomos em várias espécies. A coloração com fluorocromos, o bandeamento C com Giemsa e a impregnação com nitrato de prata (AgNO₃) foram

utilizados por Carvalho e Guerra (2002) em 39 variedades de *Manihot esculenta* Crant. e outras oito espécies do gênero. Dessas, seis variedades de *M. esculenta*, bem como as espécies *M. dichotoma* e *M. caerulescens* foram estudadas com o bandeamento C e exibiram padrão similar com seis grandes blocos de heterocromatina bem corados e quatro blocos menores fracamente corados, em diferentes cromossomos. As espécies e variedades analisadas com nitrato de prata exibiram alguns dos cromossomos do complemento marcados, sem especificidade, dificultando a diferenciação das RONS. Entretanto, na variedade Najá de *M. esculenta* e em *M. diamantinensis*, pôde-se observar de um a seis nucléolos de diferentes tamanhos. O corante CMA₃ evidenciou marcações em oito cromossomos, sendo que em quatro destes, essa marcação coincidiu com as regiões correspondentes aos satélites cromossômicos, visualizadas com a coloração convencional. Já o DAPI gerou bandas positivas na região intersticial de um a dois pequenos pares de cromossomos.

Vosa e Bassi (1991) aplicaram os corantes fluorescentes quinacrina e Hoechst 33258 em espécies de *Euphorbia*, indicando que as fracas bandas produzidas correspondiam às regiões organizadoras de nucléolos. Em *Hevea brasiliensis* os resultados da análise com os fluorocromos CMA₃ e DAPI indicaram que sua heterocromatina não apresentava predomínio de pares de bases AT ou GC em sua composição (LEITCH *et al.*, 1998).

Gusmão (2000) teve dificuldades em estudar *Croton lobatus*, *C. rhamnifolius* e *C. aff. rhamnifolius* com o bandeamento C. Entretanto, a coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI, evidenciaram um par de cromossomos portando bandas CMA₃⁺/DAPI^{neutras} pericentroméricas em *C. rhamnifolius* e *C. aff. rhamnifolius* e subterminais em *C. lobatus*. Por sua vez, a impregnação com nitrato de prata evidenciou uma quantidade máxima de dois nucléolos por núcleo em *C. lobatus* e *C. rhamnifolius*.

Em *Ricinus communis* o bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI apresentou heterocromatina abundante e rica em guanina-citosina (GC) na forma de grandes blocos CMA positivos (CMA⁺⁺) em cinco pares, além de pequenos blocos na região pericentromérica de todos os braços cromossômicos. Por sua vez, a impregnação com AgNO₃ evidenciou de um a quatorze nucléolos por núcleo interfásico para a espécie (VASCONCELOS, 2008).

2.2.1.3. Citogenética Molecular

Frente à escassez de estudos que envolvam a citogenética molecular em Euphorbiaceae, merecem destaque os trabalhos realizados por Leitch *et al.* (1998) e Carvalho e Guerra (2002), nos quais foram realizadas análises envolvendo hibridização *in situ* fluorescente (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*). Em *Hevea brasiliensis*, o uso da sonda pTa71 (de 9 kb, extraída de trigo, correspondente aos sítios de DNAr 18S-5.8S-25S e espaçadores intergênicos) revelou quatro sítios

de hibridização correspondentes às RONS ativas visualizadas em dois pares cromossômicos. Um marcador adicional, no braço longo de um cromossomo metacêntrico, foi revelado com o uso da sonda pXVI (349 bp, correspondente ao sítio para DNAr 5S de beterraba). A sonda de DNA telomérico de *Arabidopsis thaliana* – com a sequência (TTTAGGG)_n – hibridizou em todas as porções terminais dos cromossomos (LEITCH *et al*, 1998).

Outro estudo realizado por Carvalho e Guerra (2002) incluiu análises das variedades BGM 449, BGM 16, Aipim abacate e Aipim de *M. esculenta* e a espécie *M. dichotoma*. Nesse estudo foram observados seis sítios de DNAr 45S, sendo quatro maiores e dois menores, em todas as espécies. Esses dados estiveram de acordo com os resultados obtidos com a impregnação por nitrato de prata, realizada previamente.

Vasconcelos (2008) observou quatro grandes sítios de DNAr 45S, associados às bandas CMA⁺⁺ dos satélites nos braços longos dos pares A e D em *Ricinus communis*. Em algumas células foram detectados de um a três outros pares contendo pequenos sinais de DNAr 45S co-localizados com partes das bandas CMA⁺, estando um deles, inclusive, na banda pericentromérica CMA⁺ do braço curto do par B. Esse par também exibiu um sítio de DNAr 5S associado à região mais distal do bloco CMA⁺⁺ no braço longo.

2.2.2 Marcadores Moleculares e análise de sequências de DNA

A evolução das técnicas moleculares, aliada ao aumento de sua precisão, tem permitido o acesso de forma segura e esclarecedora ao genótipo e à variabilidade genética de um número cada vez maior de plantas. Essas investigações têm promovido um notável avanço no entendimento do comportamento fenotípico desses organismos, o que tem facilitado sua manipulação tanto no sentido de auxiliar a produção de novas cultivares, como na compreensão das tendências evolutivas de diferentes grupos taxonômicos (FREITAS e BERED, 2003).

Contudo, o mais importante, do ponto de vista da genética da conservação, é o fato de que diferentes marcadores moleculares podem ter taxas de evolução diferentes, de modo que, através de uma escolha criteriosa desses marcadores, pode-se estudar desde problemas de identificação de indivíduos, até a identificação de espécies crípticas ou formulação de hipóteses filogenéticas em grupos supra-específicos (SOLÉ-CAVA, 2001).

2.2.2.1 Marcadores DAF e ISSR

A técnica de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) é baseada na aplicação de primers arbitrários, tendo, portanto uma estreita relação com o RAPD (*Random Amplified Polymorphic*). No entanto, há uma distinção fundamental entre essas técnicas que é a concentração do DNA-molde utilizado. Enquanto na RAPD utiliza-se em média 25 ng, na reação de DAF a concentração ideal está entre 0,1-1,0 ng, conferindo uma maior especificidade e reprodutibilidade. Por sua vez, a concentração dos primers é muito maior nesta última do que no RAPD, motivo pelo qual muitos autores consideram o *Fingerprinting* de DNA uma técnica mais segura, justamente devido à reprodutibilidade. Ambas as metodologias foram publicadas quase simultaneamente, destacando-se, portanto que o DAF (CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1991) não é uma variação ou adaptação da técnica de RAPD descrita por Williams *et al.* (1990).

Os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) compreendem sequências curtas de nucleotídeos repetidas na mesma ordem, cujo nível de polimorfismo produzido é devido à variação no número de unidades de repetição em um determinado locus (MORGANTE e OLIVIERI, 1993). Marcadores SSR são obtidos com o uso de *primers* que flanqueiam regiões contendo os microssatélites. Os *primers* para SSR são desenhados a partir do sequenciamento de fragmentos de DNA, obtidos de bibliotecas genômicas, onde os últimos foram previamente localizados (MILLACH, 1999).

Zietjemicz *et al.* (1994) desenvolveram um tipo de marcador baseado em SSR, os ISSR ou *Inter Simple Sequence Repeats*. Este marcador contorna a problemática da informação prévia das sequências que flanqueiam o microssatélite. O método proporciona alta reprodutibilidade dos resultados e gera níveis abundantes de polimorfismo em muitos sistemas (LIU e WENDEL, 2001).

O ISSR é considerado um marcador semi-arbitrário, ampliado por PCR na presença de oligonucleotídeos complementares para o microssatélite designado, podendo cada primer ser ancorado no final 3' ou 5' em geral com padrões de repetição de 1 a 4 bases de purina e/ou pirimidina (PATZACK, 2001; SOUZA *et al.*, 2005). As sequências-alvo dos ISSR são abundantes ao longo do genoma de eucariontes e evoluem rapidamente (FANG e ROOSE, 1997; ESSELMAN *et al.*, 1999).

2.2.2.2 Estudos Evolutivos em Euphorbiaceae

O uso de marcadores moleculares têm auxiliado no estudo filogenético de alguns gêneros de Euphorbiaceae. Em *Macaranga*, um gênero conhecido pelo mirmecofitismo de suas espécies, a

análise de ITS (espaçadores transcritos internos do DNA ribossomal) combinada com MP-PCR (PCR iniciada por microssatélites) e RAPD revelou um agrupamento das espécies mirmecofíticas na seção *Pachystemon*, sugerindo uma recente radiação desta característica no gênero (BLATTNER *et al.*, 2001).

Em *Mercuriales*, o estudo de sítios ITS sugeriu uma origem monofilética para o gênero com dois clados intragenéricos principais: um composto por árvores com rizomas e outro formado por espécies do Mediterrâneo Ocidental. Estes dados estão de acordo com a classificação taxonômica para o gênero (KRÄHENBÜHL *et al.*, 2002). Em mandioca (*M. esculenta*) a técnica de RAPD tem sido usada para caracterizar geneticamente vários cultivares (NASSAR *et al.*, 1998a; 1998b; COLOMBO *et al.*, 1998; 2000a; 2000b). Por sua vez, Olsen (2004) através da análise de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e de SSR (*Simple Sequence Repeat*) sugeriu que as 20 variedades de *M. esculenta* estudadas surgiram de múltiplas hibridizações da subespécie *flabellifolia*, originária do sul da Amazônia.

A análise filogenética mais recente para *Croton*, realizada por Berry *et al.* (2005a), utilizando dados moleculares das regiões ITS, do DNA nuclear ribossômico, e do fragmento trnL-F, do DNA plastidial, demonstrou que o gênero, como circunscrito por Webster (1993), não compõe um táxon monofilético. Segundo Berry *et al.* (2005a,b), *Croton* torna-se um grupo monofilético com a inclusão de *Moacroton* Croizat, um pequeno gênero endêmico de Cuba, e a exclusão de *Croton* seção *Astraea* (Klotzsch) Baill., sugerindo o restabelecimento do gênero *Astraea* Klotzsch. Além disso, um novo gênero monoespecífico recentemente descrito para a tribo *Crotoneae*, *Brasiliocroton* P.E. Berry & Cordeiro, aparece nessas análises como grupo irmão de *Croton*, do qual difere principalmente por apresentar os estames eretos no botão floral (os quais em *Croton* são sempre encurvados), parecendo constituir a única sinapomorfia morfológica deste gigantesco gênero. Além da recircunscrição do gênero, essas análises filogenéticas, sobretudo aquela reportada por Berry *et al.* (2005a), mostraram a necessidade de uma reavaliação da classificação infragenérica de *Croton*, uma vez que as seções apresentadas por Webster (1993) não se mostraram monofiléticas em sua maioria.

2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M.V. **Checklist das espécies de Euphorbiaceae Juss. ocorrentes no semi-árido pernambucano, Brasil.** Acta Bot. Bras. 12 (3): 485-495, 1998.
- BARBOSA, M.R.V.; MAYO, S.J.; CASTRO, A.A.J.F.; FREITAS, G.L.; PEREIRA, M.S.; GADELHA-NETO, P.C.; MOREIRA, H.M. **Checklist preliminar das Angiospermas. In: Sampaio, EVSB, Mayo, SJ e Barbosa, MRV (eds.) Pesquisa botânica nordestina: progresso e perspectivas.** SBB, Recife. pp. 253-414, 1996.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** UFV, Viçosa, 2: pp. 377, 1991.
- BENKO-ISEPPON, A.M. **Estudos moleculares e citogenéticos no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas.** Embrapa Documentos, v. 56: 327-332, 2001.
- BENKO-ISEPPON A.M.; MORAWETZ, W. Brazilian Northeastern Region: Flora & Biotreasures from Nine Ecosystems. 6th EUROPEAN COLLOQUIUM OF ETHNOPHARMACOLOGY. In: Schröder E (Ed): New trends in Ethnobotany and Ethnopharmacology. **Annals** of the European Society of Ethnopharmacology, Germany. Pp. 9-14, 2007.
- BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; VAN, E.E.B.; RIINA, R. **Molecular phylogenetics of the giants genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu strictu) using *ITS* and *trnL-trn-F* DNA sequence data.** Amer J Bot 92(8):1520-1534, 2005a.
- BERRY, P.E.; CORDEIRO, I.; WIEDENHOEFT, A.C.; VITTORINO-CRUZ, M.A.; LIMA, L.R. **Brasiliocroton, a new crotonoid genus of Euphorbiaceae s.s. from eastern Brazil.** Syst. Bot. 30(2):357-365, 2005b.
- BLATTNER, F.R.; WEISING, K.; BÄNFER, G.; MASCHWITZ, U.; FIALA, B. **Molecular Analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Maracanga* species (Euphorbiaceae).** Molecular Phylogenetics and Evolution, 19 (3): 331-344, 2001.
- BURGER, W.; HUFT, M. **Flora costaricensis. Family 113 Euphorbiaceae.** Fieldiana Botany, 36, pp.180, 1995.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. **DNA Amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers.** BioTechnology, 9: 553-557, 1991.

- CARVALHO, R.; GUERRA, M.S. **Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (Cassava) and eight related Species.** Hereditas, 136: 159-168, 2002.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T.L.; CHARRIER, A. **Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers.** Genetic and Molecular Biology, 21(1): 105-113, 1998.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. **Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers.** Genetic and Molecular Biology, 23(1): 189-199, 2000a.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. **Genetic relatedness between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M. flabellifolia* and *M. peruviana* based on both RAPD and AFLP markers.** Genetic and Molecular Biology, 23(2): 417-423, 2000b.
- CORDEIRO, I. **Revisão Taxonômica de *Julocroton* Mart. (Euphorbiaceae).** São Paulo-SP, Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado, 1993
- CRAVEIRO, A.A.; SILVEIRA, E.R. **Atividade microbiológica de dipertenos isolados de *Croton sonderianus* Mull. Arg.** Ciência e Cultura, São Paulo, 34(7): 787, supl. S.n., Res. Da 34ª Reunião da SBPC, 1992.
- CRAVEIRO, A.A.; SILVEIRA, E.R.; MATOS, F.J.; ALENCAR, J.W. **Essential and fatty oils of *Croton sonderianus*.** Revista Latinoamericana de Química, 9, 98-99, 1978.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** Columbia University Press, New York, 1981.
- Croton Research Network (2006). ***Croton* chromosome counts.** Disponível em: <<http://www.botany.wisc.edu/croton/pages/Croton%20Chromosome%20table.html>>, acesso em: novembro, 2009.
- ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D.J.; WINDUSS, J.L.; WOLFE, A.D. **Clonal diversity in the rare *Calamagostis porter* ssp. *Insperrata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers.** Molecular Edinburgh, 8: 443-451p, 1999.
- FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. **Identification of closely related citrus cultivars with intersimple sequence repeat markers.** Theoretical and Applied Genetics, 95: 408-417p. 1997, 1997.
- FERRAZ, E.M.N. **Variação florístico-vegetacional na região do Vale do Pajeú, Pernambuco.** Acta Bot. Bras. 10(2): 415, 1996.

- FREITAS, L.B.; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, pp 463, 2003.
- GARRITY, G.M.; HUNTER-CEVERA, J. **Bioprospecting in the developing world**. Curr. Opin. Microbiology. 2: 236-240, 1999.
- GIBBS, P.E.; INGRAM, R. **Chromosome numbers of some Brazilian flowering plants**. Notes RBG Edinb. 40(2): 399-407, 1982.
- GONZALEZ, G.L. **La guia de incato de los arboles y arbustos de la Peninsula Iberica**. Madrid, 6th edn., 4, pp 686-691, 1995.
- GUSMÃO C.L.S. **Citogenética da família Euphorbiaceae no nordeste brasileiro**. Recife-PE, Universidade Federal de Pernambuco, Dissertação de Mestrado 2000.
- HANS, A.S. **Chromosomal conspectus of the Euphorbiaceae**. Taxon 22 (5/6): 591-636, 1973.
- HARLEY, R.M. Introduction. In: STANNARD, BL (ed.) **Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil**. Royal Botanic Garden: Kew. 1995, pp.1-42.
- HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the World**. Oxford University Press: New York. 1993, pp. 336.
- HIZUME, M.; SATO, S.; TANAKA, A. **A highly reproducible method for nucleolus organizing regions staining in plants**. Stain Technol., 55: 87-90, 1980.
- JENNINGS, D.L. **Variation in pollen and ovule fertility in varieties of cassava and the effect of interspecific crossing on fertility**. Euphytica, 12: 69-76, 1963.
- JOLY, A.B. **Botânica. Introdução à taxonomia vegetal**. 11th edn. Nacional: São Paulo, 1993, pp. 777.
- KRÄHENBÜHL, M.; YUAN, Y-M.; KÜPFER, P. **Chromosome and breeding system evolution of the genus *Mercurialis* (Euphorbiaceae): implications of ITS molecular phylogeny**. Plant Syst. Evol, 234: 155-169, 2002.
- KRISHNAPPA, D.G.; RASHME, R.V. **In IOPB chromosome numbers reports LXVIII**. Taxon 29: 536-537, 1980.
- KUPCHAN, S.M.; UCHIDA, I.; BRANFMAN, A.R.; DAILEY, R.C. Jr.; FEI, B.Y. **Antileukemic principles isolated from euphorbiaceae plants**. Science, 191: 571-572, 1979.
- LEITCH, A.R.; YOONG-LIM, K.; LEITCH, I.J.; O'NEILL, M.; CHYE, M.; LOW, F. **Molecular cytogenetic studies in rubber, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (Euphorbiaceae)**. Genome, 41: 464-467, 1998.

- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa: São Paulo, 1982, pp.425.
- LIU, B.; WENDEL, J.F. **Intersimple sequence repeats (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton**. *Molecular Ecology Notes*, 1: 205–208p, 2001.
- LUCENA M.F.A. **Levantamento taxonômico da família Euphorbiaceae Juss. nos brejos de altitude de Pernambuco**. Recife-PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Monografia, 1996.
- LUCENA M.F.A. **Estudos taxonômicos do gênero *Croton* L. (Crotonidae - Euphorbiaceae) nas zonas do litoral e da mata do Estado de Pernambuco -Brasil**. Recife-PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dissertação, 2000.
- LUCENA M.F.A. **Diversidade de Euphorbiaceae (s.l.) no Nordeste do Brasil**. Universidade Federal de Pernambuco/PPGBV/CCB/UFPE, Tese de Doutorado, 2009, 197 p.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, Jr. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. *Quim. Nova*, 25(3) 429-438, 2002.
- MATOS, J.F.A. Efeitos psicotróficos de plantas brasileiras. Parte I: aspectos antropológicos. *Ciência e Cultura*. São Paulo, 35(4): 433, 1983.
- MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais - Guia de Seleção e Emprego de Plantas Medicinais do Nordeste do Brasil**. Fortaleza, IOCE, vol. 2, 1989.
- MILLACH, S.C.K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina-PE: Editora Embrapa Semi-árido/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.
- MONTE, F.J.Q.; DANTAS, E.M.G.; BRAZ, R.F. **New dipertenoids from *Croton argyrophylloides***. *Phytochemistry*, 27(10): 3209-3212, 1988.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. **PCR-amplified microsattelites as markers in plant genetics**. *The Plant J.* 3:175-182, 1993.
- NASSAR, N.M.A.; VIEIRA, M.A.; VIEIRA, C.; GRATTAPAGLIA, D. **A molecular and embryonic study of apomixis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)**. *Euphytica* 00: 1-5, 1998a.
- NASSAR, N.M.A.; VIEIRA, M.A.; VIEIRA, C.; GRATTAPAGLIA, D. **Molecular and embryonic evidence of apomixis in cassava interspecific hybrids (*Manihot* spp.)**. *Can. J. Plant Sci.* 78: 349-352, 1998b.

- NEPUCENO, V.A.; OLIVEIRA, M.L. **Estudo anatômico de folhas do gênero *Croton* L. – *C. jacobinensis* Baill e *C. sonderianus* Müll.** Arg. Brasil Floresta, 39 (9): 37-42, 1979.
- NOWICK, J.W.A. **A palynological study of Crotonidae (Euphorbiaceae).** Ann. Miss. Bot. Garden 81: 245-269, 1994.
- OLSEN, K.M. **SNPs, SSRs and inferences on cassava's origins.** Plant Molecular Biology 56: 517-536, 2004.
- PAIVA Jr, I.M.; SILVA, S.I.; ARAÚJO, E.L. Ocorrência e distribuição de Euphorbiaceae na Zona da Mata de Pernambuco In: XXIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, **Anais**, p.114, 2000.
- PATZAK, J. **Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.).** Euphytica, 121: 9–18p, 2001.
- PEDROSA, A.; GITAÍ, J.; SILVA, A.E.B.; FELIX, L.P.; GUERRA, M.S. **Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco - 5.** Acta Bot. Bras., 13(1): 49-60, 1999.
- PERRY, B.A. **Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae.** Amer. J. Bot. 30: 527-543, 1943.
- PÔRTO, N.A. **Citotaxonomia de espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae: Crotonoideae) ocorrentes no Nordeste do Brasil.** Areia-PB, Universidade Federal da Paraíba/PPGA, Dissertação, 2007.
- RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S.; DIMECH, G.S.; WANDERLEY, A.G. **Avaliação preliminary farmacológica (antiespasmódica e antiulcerogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides*.** Revista Lecta, Bragança Paulista 20(1), 61-67, 2002.
- RAVEN, P.H. **The bases of Angiosperm phylogeny: cytology.** Ann. Miss. Bot. Gard. 62: 724-764, 1975.
- RIZK, A.F.M. **The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae.** Botanical Journal of the Linnean Society 94: 293-326, 1987.
- RIZZINI, C.T.; MORS, W. **Botânica econômica brasileira.** (2nd ed.) Âmbito Cultural, Rio de Janeiro-RJ. 1995, pp. 248.
- RODAL, M.J.N.; NASCIMENTO, L.M.; MELO, A.L. **Composição florística de um trecho de vegetação arbustiva caducifólia no município de Ibimirim, PE, Brasil.** Acta Bot. Bras. 13(1): 15-28, 1999.

- RÖSER, M.; MORAWETZ, W. **Karyology and cytogenetics**. Progr. In Bot., 55: 334-343, 1994.
- SANTOS-FILHO, F.S.; SALES, M.F.; LUCENA, M.F.A. Levantamento preliminar da família Euphorbiaceae Juss. do Parque Estadual Zoobotânico na cidade de Teresina, Piauí, Brasil. In: XXIII REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA. **Anais**, p. 90, 2000.
- SECCO, R.S. **Notas sobre as lianas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae)**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Botânica. Pará, 8(2): 265-281, 1992.
- SILVA, S.I. **Euphorbiaceae da caatinga: distribuição de espécies e potencial oleaginoso**. Acta Bot. Bras. 12 (3): 334, 1998.
- SIMPSON, M. **Plant Systematics**. Elsevier Academic Press, New York, 2006.
- SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; CHAIYASUT, K. **Cytogenetic nvestigation of some Euphorbiaceae in Thailand**. Cytologia, 64: 229-234, 1999.
- SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; CHANTARANOTHAI, P.; SENAKUN, C. **Genetic diversity of *Croton* L. (Euphorbiaceae) in Thailand**. Cytologia, 68(4): 379-382, 2003.
- SOLÉ-CAVA, A.M. **Biodiversidade molecular e genética da conservação**. In: Mاتيoli SR (Ed) **Biologia molecular e Evolução**. Holos, Ribeirão Preto-SP, pp172-192, 2001.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; ENDRESS, P.K.; CHASE, M.W. **Phylogeny and evolution of angiosperms**. Sinauer Associates, Sunderland. 370 pp, 2005.
- SOUZA, V.Q.; PEREIRA, A.S.; KOPP, M.M.; COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; LUZ, V.K.; OLIVEIRA, A.C. **Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos**. Bragantia, 64(4): 569-575p, 2005.
- SOUZA, V.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática. Guia Ilustrado das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo-SP ,Instituto Plantarum, 2005.
- STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Edward Arnold, London, pp. 216, 1971.
- STEVENS, P.F. **Angiosperm Phylogeny**, 2001. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Euphorbiaceae>>. Acesso em: agosto, 2005.
- UMANAH, E.E.; HARTMAN, R.W. **Chromosome numbers and karyotypes of some *Manihot* species**. J. Am. Soc. Hort. Sci., 98: 272-274, 1973.
- VANZELA, A.L.L.; RUAS, P.M.; MARIN-MORALES, M.A. **Karyotype studies of some species of *Dalechampia* Plum. (Euphorbiaceae)**. Bot. Jour. of the Linn. Soc. 125: 25-33, 1997.

- VASCONCELOS, S.S.J. **Distribuição da heterocromatina e dos sítios de DNAr 5S e 45S em mamoma (*Ricinus communis* L.), uma importante espécie para o biodisel.** Monografia, UFPE, Recife –PE, 63, 2008.
- VOSA, C.G.; BASSI, P. **Chromosome studies in the Southern African flora. 95-102: The basic karyotype of eight species of succulent *Euphorbia* L.** Caryologia 44: 27-33, 1991.
- WEBSTER, G.L. **A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae).** Taxon, Vol. 42, 793-823, 1993.
- WEBSTER, G.L. **Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae.** Ann. Miss. Bot. Gard. 81: 33-144, 1994.
- WEISING, K.; NYBON, K.; WOLFF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi.** Boca Raton, CRS Press, 1995.
- WILLAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI J.A.; TINGEY, S.V. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535p, 1990.
- ZIETJIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification.** Genomics, 20: 176-183, 1994.

CAPÍTULO 1

Diversity and Uses of the Genus *Croton* (Euphorbiaceae) in Northeastern Brazil

(Chapter 9)

Alves, M.; Araújo, M.F.L.; Gusmão, C.L.S.;
Lira-Neto, A.C.; Carvalho, R.; Benko-Iseppon, A.M.

In: Thangadurai, D. et al. (Eds.)

Biodiversity and Conservation of Medicinal and Aromatic Plants

New Delhi, Regency Publications (in press)

Accepted in June/2008.

Diversity and Uses of the Genus *Croton* (Euphorbiaceae) in Northeastern Brazil

Marccus Alves⁽¹⁾, Maria de Fátima L. Araújo⁽¹⁾, Cássia L. S. Gusmão⁽²⁾, Amaro de Castro Lira Neto⁽³⁾,
Reginaldo de Carvalho⁽⁴⁾ & Ana Maria Benko-Iseppon^(2,5)

⁽¹⁾Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Botany Department, Plant Morpho-Taxonomy Laboratory, Recife, PE, Brazil.

⁽²⁾Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Genetics Department, Plant Genetics and Biotechnology Laboratory, Recife, PE, Brazil.

⁽³⁾Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Genomics Laboratory, Recife, PE, Brazil.

⁽⁴⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Biology Department, Genetics, Recife, PE, Brazil.

Corresponding Author: UFPE/CCB/Genetica, LGB-Vegetal, Av. Moraes Rego, 1235 CDU. 50.670-420, Recife, PE, Brazil. E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

Introduction and Background

Angiosperms are by far the largest group of plants and the most important from an ecological standpoint, being extremely important for land life, since they provide primary organic matter and also deliver the main resources for human populations. The Northeastern Brazilian region presents high floristic diversity, being composed by nine ecosystems with prevalence of the semi-arid (*Caatinga*) vegetation.

The Brazilian semi-arid zone comprises about 60% of the Northeast region, occupying an area of ca. 1,000,000 km², distributed over ten Brazilian federative states (Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia and northern Minas Gerais). Some of the vegetation types found in the region occur within the established limits of the semi-arid zone (Fig. 1).

The Brazilian Northeast region includes more types of vegetation than any other Brazilian region. In addition to the *Caatinga* one can find in this region also the Atlantic Rainforest, seasonal forests and inland mountain forests, shore dunes and coast vegetation (*Restingas*), mangroves, savannah-like vegetation (*Cerrados*) and specialized highland rocky savannas (*Campos Rupestres*). Moreover, researchers have observed that the *Caatinga* vegetation is highly diverse, with many endemic species (Harley 1996, Giuliatti et al. 2002).

Archeological finds indicate that the Brazilian Northeastern region has been occupied in different intensity levels since more than 4,000 years (FUMDHAM 1998). Local populations are the poorest of the country; a large dependence of natural resources is given, with emphasis on plants for various purposes, including food and phytomedicine. Regions of higher dependence on natural resources and extractions activity are accompanied by visible loss of biodiversity in the fragile dry ecosystems due to the unsustainable extraction of natural resources.

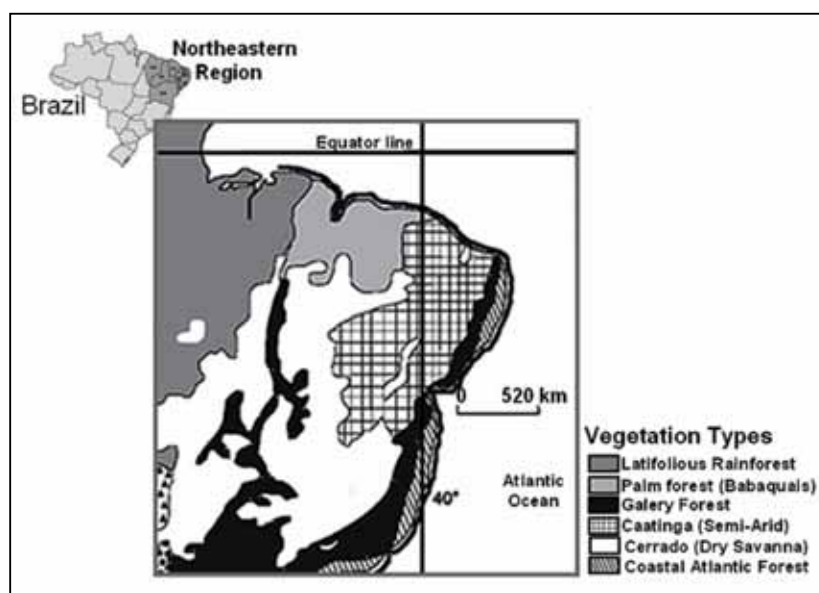


Figure 1. Brazilian Northeastern region and prevalent vegetation types. Adapted from IBGE (2000) with modifications.

The genus *Croton* L. (Euphorbiaceae) includes around 1,300 species, being widespread in tropical regions of the Old and New Worlds. Several species are known for their traditional use as medicinal plants in tropical regions, including many different applications as cancer treatment, constipation, diabetes, digestive problems, dysentery, external wounds, fever, hypercholesterolemia, hypertension, inflammation, intestinal worms, malaria, pain, ulcers and weight-loss, among others (Salatino et al. 2007).

Compounds observed in this group include proanthocyanidins and/or alkaloids. The latter may be taspine or some of several benzylisoquinoline-like compounds. Diterpenes are very common in *Croton*, corresponding to clerodanes, cembranoid, halimanes, kauranes, labdanes, phorbol esters, trachylobanes and sarcopetalanes. Some species are aromatic due to the possession of volatile oils. Representatives of new classes of compounds (phenylbutanoids, glutarimide alkaloids, sarcopetalane diterpenes) have been isolated from *Croton* species. While laticifers have been described in *Croton* species, so far there are no anatomical studies about secretory structures of volatile oil (Rizk 1987, Salatino et al. 2007).

In Brazil approximately 400 *Croton* names are cited, with the greatest concentration in the northeastern region (Pollito et al. 2004), particularly in the *Caatinga* biome. Of this total, 300 are considered endemic to the country (Pollito et al. 2004). Despite the diversity and potential economic importance of Brazilian *Croton* species, most available studies are focused on taxa from other geographical regions, exposing the urgent need of investments in research (especially including taxonomy, ecology, genetics, phytochemistry and ethnobotany), product development, as well as for *in situ* and *ex situ* conservation of these important plants.

This chapter brings an overview of available knowledge on *Croton*, especially in Brazilian Northeastern region, including new observations regarding morphology, distribution and genetic diversity.

The Euphorbiaceae Family and Its Taxonomic Delimitation

The family Euphorbiaceae *s.l.*, with about 300 genera and 7,500-9,000 species, is one of the most complex and morphologically diverse taxonomic groups among the Eudicotyledonae (Cronquist 1981, Soltis et al. 2005, Simpson 2006). Currently, the family is positioned within

Eurosidae I, in the order Malpighiales, without clear definition of relationships to the most phylogenetically affiliated groups (www.mobot.org).

Possibly, the families with the greatest evolutionary affinity are Rafflesiaceae and Picrodendraceae (Davis et al. 2007). However, Euphorbiaceae *s.l.*, in classification systems before the current proposals, was related to Buxaceae and Pandaceae, in the order Euphorbiales (subclass Rosidae) sensu Cronquist (Cronquist 1981).

The knowledge of secondary compounds and of the molecular biological features are strongly emphasized as indispensable tools in the interpretation of evolutionary relationships among the subfamilies of Euphorbiaceae *s.l.* (Esser et al. 1997, Davis et al. 2007). Currently, with a basis in molecular and morphological indicators, some modifications in the composition and internal organization of the family have been proposed (Wurdack et al. 2005, Kathriarachchi et al. 2006). The artificiality of the family had already been indicated by Radcliff-Smith (1987) and Meeuse (1990), which has since been confirmed. Some genera were segregated, subsequently constituting new families, which has created some reservations as to their acceptance by the scientific community (Table 1).

Table 1. Classification of some representative genera of Euphorbiaceae *s.l.* occurring in Brazil and their current systematic position.

Family	Subfamily	Genera
Phyllanthaceae		<i>Phyllanthus</i> , <i>Richeria</i>
Peraceae		<i>Pera</i> , <i>Pogonophora</i>
	Acalyphoideae	<i>Acalypha</i> , <i>Alchornea</i> , <i>Aparisthmium</i> , <i>Bernardia</i> , <i>Chaetocarpus</i> , <i>Dalechampia</i> , <i>Ditaxis</i> , <i>Romanoa</i> , <i>Tragia</i>
Euphorbiaceae <i>s.s.</i>	Crotonoideae	<i>Cnidoscolus</i> , <i>Croton</i> , <i>Jatropha</i> , <i>Manihot</i> , <i>Pausandra</i> , <i>Ricinus</i>
	Euphorbioideae	<i>Actinostemon</i> , <i>Algernonia</i> , <i>Chamaesyce</i> , <i>Euphorbia</i> , <i>Mabea</i> , <i>Poinsettia</i> , <i>Sapium</i> , <i>Sebastiania</i> , <i>Stillingia</i>

Among the genera with neotropical representatives, *Phyllanthus* and *Richeria* are currently placed in the Phyllanthaceae Martyn., while *Pera* and *Pogonophora* were transferred to Peraceae (Baill.) Klotz. Most of the genera were maintained in Euphorbiaceae *s.s.*, despite the continued consensus in the non-monophyly of the family. These alterations, made available on APG online (www.mobot.org), are based on several recent molecular studies and the strong morphological variability observed in these taxa in relation to the other members of Euphorbiaceae *s.s.* Euphorbiaceae *s.s.* is organized in four subfamilies: Cheilosoideae (endemic to southeast Asia), Acalyphoideae, Crotonoideae and Euphorbioideae.

Morphological Characterization of Euphorbiaceae *s.l.*

Representatives of the family Euphorbiaceae *s.l.* demonstrate a great morphological variability (Cronquist 1981, Souza and Lorenzi 2005, Simpson 2006). Concerning habit, it is possible to find woody plants (trees to subshrubs) to herbs (herbs or vines). Representatives are generally terrestrial, existing few records of aquatic taxa (fixed or floating). In general, they are monoecious or dioecious. The current taxonomic controversy regarding family circumscription reflects the

diversity of types and forms of morphological structures. This variability can be observed as much in the vegetative characters as in the reproductive ones. The leaves are generally alternate (rarely opposite) and can be compound or simple (entire or lobed).

The occurrence of articulated and non-articulated laticifer canals is common in the family, but restricted to some genera (Metcalf and Chalk 1950). The coloration of the latex can vary from translucent, milky-white, greenish-cream, yellowish, orangish-yellow or even reddish. The shape of the starch grains is peculiar and can be used as a taxonomic character. The typology of trichomes is widely used in the taxonomy of the family as much at the generic level as at the infrageneric level (Webster et al. 1996). However, it can produce equivocal interpretations.

Extrafloral and floral nectaries are widely spread in several genera of the family, such as for example *Cnidoscolus*, *Croton*, *Sapium* and *Stillingia*. In general, extrafloral nectaries are found on the stipules, leaf margins, at the base of the leaf blade or even along the petiole (Mueller Argoviensis 1873, Webster 1994). The floral nectaries are often related in the literature as 'nectariferous disc'. Freitas et al. (2001) and Santos et al. (2005) indicated the production of nectar by these structures. They can be continuous or lobed and the coloration varying from white to orangish-cream.

Inflorescences can be spikes, racemes, dichasia, umbels, or even pseudanthia. Pseudanthia are found in *Dalechampia* and in some representatives of Euphorbioideae, where they are called cyathia. The perianth can be absent or single or double-whorled. The floral parts, in general, are not very showy.

The androecium can have only one stamen (*Euphorbia* and *Chamaesyce*, for example), two to four stamens as in *Sebastiania*, *Pera* and *Phyllanthus*, diplostemonous (in some species of *Croton*) or even pluristemonous as in *Ricinus*. A gynoecium formed by a superior, trilocular ovary and with uniovulate locules is present in most genera. The biovulate groups in part are currently placed in the Phyllanthaceae.

Fruits are easily recognized in the family: generally dry, tricocular capsules, known as schizocarps (Barroso et al. 1999). They can be ornamented or smooth. The seeds have, in general, a caruncle or fleshy aril, which sometimes are showy and related with either myrmecochory or ornithochory (Webster 1994, 2004, Griz and Machado 2001, Leal et al. 2007). Several genera have oily seeds (*Ricinus* and *Jatropha* among others) which have even come to be used in local industry.

Euphorbiaceae s.l. in Brazil

With a wide geographic distribution, especially in the tropics, representatives of the Euphorbiaceae s.l. occur in nearly all the vegetative formations of the Neotropics. In the New World 105 genera are reported (of which 65 are endemic) and about 1,800 species (Webster 2004). In Brazil, about 1,000 species distributed in 70 genera have been cataloged (Souza and Lorenzi, 2005).

In this new systematic context of the family, the northeast region of Brazil is home to the three families mentioned previously – Euphorbiaceae s.s., Peraceae and Phyllanthaceae. In the semi-arid region of Brazil, Euphorbiaceae s.l. is considered one of the families with the greatest species richness, being estimated at about 200 species distributed among 30 genera. *Acalypha*, *Chamaesyce*, *Cnidoscolus*, *Croton*, *Euphorbia*, *Jatropha*, *Manihot* and *Sebastiania* are those with the greatest number of representatives.

In Brazil, *Croton* is undeniably the largest genus, being reported in *Caatingas*, *Campos Rupestres*, *Campos Sulinos*, *Cerrados*, Amazon Rainforest, Atlantic Rainforest, *Campos de Altitude* and *Restingas* (Pollito et al. 2004, Souza and Lorenzi 2005). *Jatropha*, *Croton*, *Cnidoscolus* and *Manihot* are genera more commonly associated with the *Caatinga* landscape. They are characteristically shrubs to small trees. Meanwhile, *Alchornea*, *Algernonia*, *Hevea*, *Hura*, *Pera* and *Pogonophora*, among others form a group of medium to large trees which are strongly associated with moist forests. Some taxa for their part are common in rocky environments (*Chamaesyce*, *Sapium* and *Stillingia*) and aquatic ones (*Caperonia*). Species of *Romanoa*, *Dalechampia* and *Tragia* are exclusively vines.

Adaptive convergence is well known in species of the genus *Euphorbia*, especially those of African origin and some of the Brazilian semi-arid regions. In these species the stem is generally leafless and strongly succulent, resulting in a peculiar cactiform appearance. Some representatives of Euphorbiaceae *s.l.* occupy the ecological niche of pioneer plants (*Chamaesyce*, *Euphorbia*, *Phyllanthus*). Additionally, pencil-cactus (*Euphorbia tirucalli*), a species naturalized in Brazil, has a wide distribution in the *Caatingas*. Some species in several genera have restricted distributions, characterizing micro-endemisms, with many examples in the Cadeia do Espinhaço (states of Minas Gerais and Bahia).

Ecological Considerations Regarding the Family

Euphorbiaceae *s.l.* also offers a wide contingent of trophic interactions (Armbruster and Baldwin 2003). Several pollination syndromes have already been reported. Nevertheless confirmed cases of melittophily are more abundant than the others (Machado and Lopes 2004).

Dispersal mechanisms of the diaspores (endo- and exozoochorous and explosive dehiscence) are sophisticated and directly related to the diversity of colors and textures found in the seeds (Webster 1994). The extrafloral nectaries with various shapes and sizes are commonly found on the leaves and petioles and together with the secondary metabolites (latex and cyanogenic compounds) play an important role in the anti-herbivory strategies known in the family.

The ability to cause irritation of some representatives of the family is commonly known by the local communities, especially in northeastern Brazil. Among the resulting complications, partial or total blindness can occur in addition to cutaneous or subcutaneous lesions (Salatino et al. 2007). Among the species with the greatest allergenic response in man, the most common are found in the genera *Cnidosculus*, *Dalechampia*, *Sapium* and *Tragia*. The toxic effects can be felt after contact with urticating trichomes or latex.

The Genus *Croton* L.: Morphological Diversity, Richness and Conservation of the Species of Northeastern Brazil

Croton L., according to the classification of Euphorbiaceae *s.l.* proposed by Webster (1994) and Govaerts et al. (2000), is placed in the tribe Crotoneae and subfamily Crotonoideae. Wurdack et al. (2005), suggested that there is no support for the monophyly for either the subfamily or the tribes established by Webster (1993). According to Webster (1994), Wurdack et al. (2005) and Berry et al. (2005a) the genera most related to *Croton* are *Jatropha* and *Paracroton*. However, recent studies (Berry et al. 2005a), using combined molecular analyses, have demonstrated the weak support for monophyly of *Croton* as defined by Webster (1993).

Despite easy characterization in relation to the other genera of Euphorbiaceae *s.l.*, *Croton* has a low number of morphological synapomorphies. The principal character used for recognizing the genus is the inflexed orientation of the filament apex of the stamens in bud. In recently conducted cladistic analyses, some groups traditionally inserted in the genus *Croton* could be elevated to the level of independent but related genera. According to Berry et al. (2005a), *Croton* sects. *Astraea* and *Brasiliocroton* form distinct and monophyletic groups.

Such evidence strengthens the many genera segregated or synonymized with *Croton* in recent years (Radcliffe-Smith 2001), among them *Julocroton*. Currently, despite unclear limits and the difficulty in understanding relationships among groups, there are 40 sections recognized by Webster (1993) for the genus. In spite of the classification suggested by the author, the limits among some groups are very unclear, complicating the adequate positioning of many taxa in the genus. Of the sections accepted for *Croton* by Webster (1993), 20 of them are represented in northeastern Brazil. The most common are *C.* sect. *Cyclostygma* Griseb., *C.* sect. *Barhamia* (Klotzsch) Baill. and *C.* sect. *Velamea* Baill., *C.* sect. *Argyroglossum* Baill., *C.* sect. *Julocroton* (Mart.) G.L. Webster, *C.* sect. *Astraea* (Klotzsch) Baill. and *C.* sect. *Geiseleria* (Klotzsch) Baill. About 40 species which occur in the region have a doubtful position among the existing sections.

According to Frodin (2004), *Croton* is considered as one of about 55 ‘giant genera’ of Angiosperms which comprise more than 500 species each. It is estimated that *Croton* contains 1,200 to 1,300 taxa, common in secondary vegetation and with a predominantly neotropical distribution (Webster 1994, Govaerts et al. 2000, Berry et al. 2005a). South America, the Caribbean, and Mexico are important centers of species diversity of the genus (Burger And Huft, 1995).

In Brazil, there are estimated to be approximately 400 taxa distributed in different vegetation types, with the greatest concentration in the northeastern region (Lima and Pirani 2003, Pollito et al. 2004), particularly in the *Caatinga* biome. Of this total, 300 are considered endemic to the country (Pollito et al. 2004). There is not yet any exact compilation of distribution data for the species of the genus in the Northeast region. Cordeiro and Carneiro-Torres (2006) listed 52 species for the region. In Table 2, almost 70 known species are listed for the region. Meanwhile, about 100 species are estimated to occur.

Table 2. Species of *Croton* L. occurring in northeastern Brazil, adapted from Pollito et al. (2004), Cordeiro and Carneiro-Torres (2006) and complemented with specimens from the herbaria ASE, IPA, EAC, G, HST, HUEFS, K, M, MAC, MOSS, JPB, NY, P, PEUFR, RB, TEPB, UFP and UFRN.

<i>Croton acradenius</i> Pax & K. Hoffm.	<i>Croton lobatus</i> L.
<i>Croton adamantinus</i> Müll. Arg.	<i>Croton luetzelburgii</i> Pax & K. Hoffm.
<i>Croton adenocalyx</i> Baill.	<i>Croton lundianus</i> (Didr.) Müll. Arg.
<i>Croton adenodontus</i> (Müll. Arg.) Müll. Arg.	<i>Croton macrobothrys</i> Baill.
<i>Croton agoensis</i> Baill.	<i>Croton mucronifolius</i> Müll. Arg.
<i>Croton alagoensis</i> Müll. Arg.	<i>Croton muscicapa</i> Müll. Arg.
<i>Croton anisodontus</i> Müll. Arg.	<i>Croton myrsinites</i> Baill.
<i>Croton antisiphiliticus</i> Mart.	<i>Croton nepetifolius</i> Baill.
<i>Croton araripensis</i> Croizat	<i>Croton noronhae</i> Baill.
<i>Croton argyroglossus</i> Baill.	<i>Croton nummularius</i> Baill.
<i>Croton argyrophylloides</i> Müll. Arg.	<i>Croton odoratus</i> Ridl.
<i>Croton astraetus</i> Baill.	<i>Croton oliganthus</i> Müll. Arg.
<i>Croton atrorufus</i> Müll. Arg.	<i>Croton paludosus</i> Müll. Arg.
<i>Croton betaceus</i> Baill.	<i>Croton parodianus</i> Croizat
<i>Croton betulaster</i> Müll. Arg.	<i>Croton parvulus</i> Müll. Arg.
<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	<i>Croton pedicellatus</i> Kunth
<i>Croton cajucara</i> Benth.	<i>Croton piauiensis</i> Müll. Arg.
<i>Croton campestris</i> A. St.-Hil.	<i>Croton piptocalyx</i> Müll. Arg.
<i>Croton cearensis</i> Baill.	<i>Croton polyandrus</i> Spreng.
<i>Croton celtidifolius</i> Baill.	<i>Croton praetervisus</i> Müll. Arg. (= <i>Astraea</i>
<i>Croton cordiifolius</i> Baill.	<i>praetervisa</i> (Müll. Arg.) P.E. Berry)
<i>Croton desertorum</i> Müll. Arg.	<i>Croton pulegioides</i> Baill.
<i>Croton echioides</i> Baill.	<i>Croton pycnophyllus</i> Salzm. ex Schldl.
<i>Croton eichleri</i> Müll. Arg.	<i>Croton radlkoferi</i> Pax & K. Hoffm.
<i>Croton eremophilus</i> Müll. Arg.	<i>Croton regelianus</i> Müll. Arg.
<i>Croton erythroxylodes</i> Baill.	<i>Croton rhamnifolioides</i> Pax & K. Hoffm.
<i>Croton floribundus</i> Spreng.	<i>Croton rudolphianus</i> Müll. Arg.
<i>Croton fuscescens</i> Spreng.	

<i>Croton gardneri</i> Müll. Arg.	<i>Croton salzmännii</i> (Baill.) G. Webster
<i>Croton gardnerianus</i> Baill.	<i>Croton schultesii</i> Müll. Arg.
<i>Croton glandulosodentatus</i> Pax & K. Hoff.	<i>Croton sellowii</i> Baill.
<i>Croton glandulosus</i> L.	<i>Croton seminudus</i> Müll. Arg.
<i>Croton glutinosus</i> Müll. Arg.	<i>Croton siderophyllus</i> Baill.
<i>Croton gnaphaloides</i> Schrad.	<i>Croton sincorensis</i> Mart. ex Müll. Arg.
<i>Croton grewioides</i> Baill.	<i>Croton tartonraira</i> Müll. Arg.
<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	<i>Croton tenuifolius</i> Pax & K. Hoffm.
<i>Croton hemiargyreus</i> Müll. Arg.	<i>Croton tetradenius</i> Baill.
<i>Croton hirtus</i> L'Hér.	<i>Croton timandroides</i> (Didr.) Müll. Arg.
<i>Croton horridulus</i> (Baill.) Muell. Arg.	<i>Croton triangularis</i> Müll. Arg.
<i>Croton hypoleucus</i> Schltdl.	<i>Croton tridentatus</i> Mart. ex Müll. Arg.
<i>Croton jacobinensis</i> Baill.	<i>Croton triqueter</i> Lam.
<i>Croton japirensis</i> Müll. Arg.	<i>Croton urticifolius</i> Lam.
<i>Croton klotzschii</i> (Didr.) Baill.	<i>Croton urucurana</i> Baill.
<i>Croton laceratoglandulosus</i> Caruzo & Cordeiro	<i>Croton velutinus</i> Baill.
<i>Croton lachnocladus</i> Müll. Arg.	<i>Croton verbenifolius</i> Müll. Arg.
<i>Croton linearifolius</i> Müll. Arg.	<i>Croton zehneri</i> Pax & K. Hoffm.

Knowledge of the distribution of species of *Croton* in Brazil has been broadened by taxonomic revisions and regional floras (Sá-Haiad 1987, Smith et al. 1988, Oliveira et al. 1989, Cordeiro 1990, 1994, 1995, Secco 1992, Alves 1994, Soares-Filho 2000, Secco and Cordeiro 2002, Lima and Pirani 2003, Caruzo 2005, Lima et al. 2004, among others), however a complete understanding is challenged by the diversity of the genus in the country. In regard to the Northeast region there are still only a few studies which contribute to mapping the distribution of the genus (Lucena 2001, Alves 1998, Silva 1998, Webster et al. 1998, Carneiro-Torres et al. 2002, Lima et al. 2004, Sátiro 2004, Gomes 2006). The vegetation types found in the Northeast region can be organized into two large groups depending on the availability of water, humidity, and structure of the landscape. As a result, some species of *Croton* are more or less restricted in distribution. The regions with less humidity, a drier climate and a scrubland landscape support the following vegetation types: *Caatinga*, *Campos Rupestres*, *Cerrado* and some fragments of *Carrasco*. In this case, the largest area is occupied by *Caatingas* in its various forms and types. In the more humid regions, with a milder climate and forested landscapes, are found the following vegetation types: Atlantic Rainforest, *Restingas*, mangrove swamps and palm groves. In this case, the largest area is occupied by lowland Atlantic Rainforest.

The greatest diversity of species of *Croton* in the Northeast region can be found in scrubland habitats, especially *Caatinga* and *Cerrado*. In the mangrove swamps and palm groves, the species diversity of *Croton* is low. The available records indicate that the species are most commonly found in humid regions with some anthropogenic disturbance.

In the Northeast region, some taxa are distinguished as being limited to the *Caatinga* biome. Some have a restricted distribution, such as *Croton mucronifolius*, *C. pulegioides* and *C. siderophyllus*. Meanwhile, *Croton argyroglossus* [= *C. micans* Müll. Arg.], *C. blanchetianus* [= *C. sonderianus* Baill.], *C. heliotropiifolius* [= *C. casarettoanus* Müll. Arg.], *C. conduplicatus* Kunth, *C. rhamnifolius* H.B.K., *C. moritibensis* Baill.), *C. rhamnifolioides* and *C. argyrophylloides* Müll. Arg.[= *C. tricolor* Müll. Arg.] are widely distributed in the biome. *Croton betulaster*, *C. glutinosus*, *C. macrocalyx*, *C. muscicapa* and *C. velutinus* are common to *Campos Rupestres*, especially those situated along the limits of the Cadeia do Espinhaço. *Croton adenodontus*, *C. atrorufus*, *C. betaceus*, *C. cajucara*, *C. gardneri* and *C. timandroides* can be found in patches of *Cerrado* in the

states of Bahia and Piauí. *Croton adenocalyx*, *C. campestris*, *C. fuscescens* [= *Julocroton fuscescens* (Spreng.) Baill.], *C. grewoides*, *C. huetzelburgii*, *C. lundianus* (Fig. 2c), *C. pedicellatus* (Figs. 2a-b), *C. pulegioides*, *C. radlkoferi*, *C. schultesii*, *C. triqueter* [= *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr.] and *C. urticifolius* are species which occur in more than one vegetation formation, and are generally treated as having a wide geographic distribution. Nevertheless, some of these species are restricted or occur preferentially in areas of contact with different biomes. *Croton urucurana* is particularly interesting because of its disjunct distribution between Atlantic Rainforest and Amazon Rainforest. Some tree species are restricted to the Atlantic Rainforest dominion – *Croton floribundus* and *C. jacobinensis*. *Croton sellowii*, *C. polyandrus* and *C. klotzschii* are endemic species to areas of sandy, coastal *Restingas* or coastal rock outcrops. *Croton lobatus*, *C. glandulosus* and *C. hirtus* are some species frequently associated, in the Northeast region, to ruderal areas which have suffered from some compromise from human action. *Croton pyahuii* (Pax and K. Hoffm.) M.F.A. Lucena & M. Alves [basionym, *Julocroton paniculatus* Pax & K. Hoffm.] is one new combination published here. The species is known only from northern Piauí state. The species of *Croton* can be recognized by their habit (herbs, shrubs, trees or even vines). When latex occurs, it is transparent, cream to reddish.



Figure 2. General aspects of some *Croton* species native from Brazilian Northeast. Habit (a) and aspects of the inflorescences of (b) *C. pedicellatus* (c) *C. lundianus* and (d) *C. sellowii*.

The leaves are simple, alternate, and in general with stipules. Sometimes the phyllotaxy is subopposite to opposite near the bifurcation of branches and inflorescences. This can be seen in *Croton fuscescens*, *C. glandulosus*, *C. hirtus*, *C. lundianus*, *C. rhamnifolius* and *C. sellowii* (Figure 1d). Extrafloral nectaries along the margin and the base of leaves or even along the petioles are common. The stipules can be solitary or in pairs in each node and vary from inconspicuous to leafy or glandular. Metcalfe and Chalk (1950), Inandar and Gangandhara (1977), Sastry and Kannabiran (1994), Webster et al. (1996) and Lucena and Sales (2006) point out that the trichomes can be simple (glandular or not) or branched (stellate, lepidote, fasciculate, multiradiate or dendritic). In

Croton hirtus, *C. musicarpa* and *C. urucurana*, among others, it is common to see ants collecting the secretion produced from glands in the stipules, the glandular trichomes or the extrafloral nectaries.

The basic inflorescence is racemose, varying from spiciform to paniculiform, with the staminate flowers in the distal portion and pistillate flowers in the proximal portion. In the cymose pattern, the inflorescence is formed by a principle axis constituted by several cymules of flowers of one or two sexes, distributed along its length. The staminate flowers in *Croton* are double-whorled, rarely single-whorled, pentamerous, imbricate or valvate, and generally greenish. The presence of a 5-lobed, glandular disc at the base of the stamens is common. The pistillate flowers are single-whorled, rarely double-whorled, actinomorphic or zygomorphic. The styles are in multiples of three, free or more rarely fused into a column as in *Croton blanchetianus*. They can be bifid or multifid, with generally decurrent stigmas, white in young flowers and rust-colored in mature flowers. The fruits vary from schizocarps to septi-loculicidal capsules. The seeds are oily, carunculate and with a dark to dusky, generally spotted testa.

Species of *Croton* have a floral morphology characteristic of plants related with melittophyly syndrome. In studies performed in areas of *Caatinga*, Machado and Lopes (2004) confirmed the occurrence of the syndrome among the studied species, adding also the occurrence of anemophyly. Freitas et al. (2001) and Pires et al. (2004) also cited melittophyly as a syndrome of species of *Croton*. As for seed dispersal, despite scarce studies of the genus, barochory is associated with *Croton* (Griz and Machado 2001) as the primary dispersal syndrome. However, the presence of a developed caruncle in most species indicates that after liberation from the fruit, the seeds are dispersed by ants. Leal et al. (2007) reported some myrmecochorous species of the genus in areas of *Caatinga*. Of about 400 species of *Croton* recorded in Brazil, many of them have generated considerable interest by their chemical and pharmacological properties which are bioactive in a number of ways, from antimalarial, anticarcinogenic, antihelminthic, and insecticidal. Among their principle bioactive compounds, of particular interest are alkaloids of the tetrahydroprotoberbinic, benzyloquinolinic and aporfinic types (Farnsworth et al. 1969, Craveiro et al. 1978, 1981, Monte et al. 1988, Rizk 1987, Chai et al. 1993, Pereira et al. 1999, Martins et al. 2000, Palmeira Junior et al. 2005, Araújo-Junior et al. 2005, Lima et al. 2006, Salatino et al. 2007).

Despite this, there is little available information in the literature on chemical and pharmaceutical aspects of Brazilian species (Salatino et al. 2007). Among the species studied some also occur in the Northeast region: *C. betulaster*, *C. brasiliensis*, *C. cajucara*, *C. celtidifolius*, *C. heliotropiifolius*, *C. lobatus*, *C. luetzelburgii*, *C. muscicapa*, *C. nepetaefolius*, *C. sellowii*, *C. sonderianus*, *C. urucurana* and *C. zehntneri*. In northeastern Brazil *C. cajucara*, *C. campestris*, *C. heliotropiifolius*, *C. grewioides*, *C. rhamnifolioides*, *C. sellowii* and *C. zehntneri*, among others, are used popularly as stress-relievers, natural insecticides, antispasmodics, purgatives, anti-inflammatories and antibiotics (Rizk 1987, Randau et al. 2002, Vila-Verde et al. 2005, Maciel et al. 2007).

The latex of some species is widely used in Amazonia by indigenous communities (Pollito et al. 2004, Webster 2004) for the treatment of illnesses by their anti-inflammatory and healing actions such as those of *Croton cajucara*, *C. urucurana* and *C. palanostigma*. *Croton blanchetianus* is widely used for timber and for firewood and fences in the rural regions of the Northeast. This species, as a result of being a pioneer species in *Caatinga* areas, rapidly propagates itself in abandoned fields. The parallel loss of biodiversity in diverse, fragile ecosystems by the unsustainable extraction of natural resources is obvious. The high number of endemic species in Brazil reveals the great diversity of the region, creating at the same time a worrisome scene for the preservation of natural habitats. These facts demonstrate the urgent need for enforcement of laws for the protection of national biomes and the need to expand the existing system of conservation areas (Pimentel and Vanucci 2000, Castelletti et al. 2003, Pollito et al. 2004).

According to the data reported by Pollito et al. (Pollito et al. 2004), the great diversity of species of *Croton* occurs in the *Cerrado* biome, which occupies 21% of the national territory. For

the Atlantic Rainforest, the same authors also reported on the significant number of taxa, especially in the states of Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro and São Paulo. The Amazon Rainforest for its part has particularly few species. Opposite to that, our current research shows about 30% of all species of *Croton* cataloged for the country occur in the Northeast region, despite this area occupying less than 20% of the Brazilian territory. It is worth pointing out that of the species present, about 40 of them can be considered micro-endemics or at least very restricted and poorly known. The *Caatinga* and its associated vegetational types are especially vulnerable as a result of the long history of human disturbance. In other regions, conservation plans already underway have generated a number of efforts in the fight for the preservation of the Atlantic Rainforest, the *Cerrado* and the Amazon Rainforest with the implementation of conservation units. Areas of *Restinga* in northeastern Brazil have been strongly altered in recent decades by building speculation. This pressure compromises the conservation of species endemic to these environments, such as for example, *Croton klotzschii* and *C. sellowii*. Another important example is *Croton noronhae*, endemic to the oceanic island of Fernando de Noronha. Despite occurring in a conservation area, the area experiences great tourist pressure which could compromise the preservation of the species. The expansion of the Brazilian territory makes any effective enforcement of adopted conservation laws even more difficult. In this way, conservation areas are fundamental to the maintenance of biodiversity.

However, only a small portion of the species of *Croton* is present in environmental preservation areas. This situation, together with the widespread use of some species by local communities, leaves many species vulnerable to extinction in the short and medium term. Data indicate that the extraction of wood, bark, latex, fruits and honey is intense in about 40 species of *Croton* found in scrubland environments of Brazil (Pollito et al. 2004). Another problem is the small number of programs to catalog and share information about the biodiversity found in conservation units and areas considered priorities for conservation. This complicates attempts to characterize the conservation status of each taxon. Due to the wide morphological variation, the large number of species cited for the Brazilian flora and the paucity of specimens in local collections, the delimitation of species boundaries in *Croton* is difficult. Available knowledge is still scarce and attempts have to be directed at better understanding the species and where they occur. Research must encompass morphological studies as well as ecological, ethnobotanical, chemical, cytogenetic and molecular ones to clarify the evolutionary relationships among representatives and the biogeography of the genus. Therefore, combined efforts will produce a greater understanding of this important taxon and allow better conservation policies and better management of useful species.

Economic Uses and Potencial of Representatives of Euphorbiaceae s.l.

Euphorbiaceae s.l. is one of the best examples among Angiosperms as to the diversity of potential uses. The importance of some of its representatives, in formal and informal sectors of Brazilian society, is undeniable. Of particular importance are uses for food – manioc (*Manihot esculenta*), as an energy source – castor-bean (*Ricinus communis*), *pinhão* (*Jatropha curcas*) and Brazilian rubber (*Hevea brasiliensis*), for timber – *assacu* (*Hura crepitans*), for phytotherapy – *quebra-pedra* (*Phyllanthus niruri*) and *velames* (*Croton* spp.), for horticulture – crown-of-thorns (*Euphorbia milli*), pencil-cactus (*Euphorbia tirucalli*), bird-cactus (*Pedilanthus tithymaloides*), for the elaboration of religious rituals (*Jatropha gossypifolia*), in addition to the creation of hedges and wood as is the case with *marmeleiro* (*Croton blanchetianus*). The diversity of secondary compounds in representatives of the family has attracted a great deal of scientific attention in the search for compounds that can be used in the pharmaceutical and cosmetic industries (Farnsworth et al. 1969, Calvin 1987, Rizk 1987, Silva 1998). Table 3 brings a general overview of *Croton* uses in folk medicine and confirmations from pharmacological essays, including evaluations carried out in Brazilian Northeastern region as well as in other regions. Considering the form of use in most cases

tea is produced from fresh or dry leaves, as well as from bark for internal and external use, root infusions are also frequently applied for external use (Table 3).

Regarding the main species used for folk medicine in Brazil, the species *C. cajucara*, *C. nepetifolius*, *C. heliotropiifolius*, *C. rhamnifolioides* and *C. blanchetianus* deserve special mentioning, due to the use of bark and/or leaves for tea used as analgesic or anti-inflammatory purposes (Table 3).

Most pharmacological essays have confirmed information from *Croton* traditional uses, in many cases confirming activities against inflammation, stomach and skin wounding, hypertension and analgesic, as well as against oxidative processes (Salatino et al. 2007, Morais et al. 2006, Randau et al. 2002). Most previous evaluations (Table 3) evaluated the pharmacological potential of essential oil extracts, as well as bark extracts (or its fractions). Essential oils are organic volatile substances, responsible for the fragrance typical of many plants (Morais et al. 2006), with a wide diversity of aromas especially in the leaves of all species.

Essential oil extracted from *C. nepetifolius*, *C. blanchetianus* (= *C. sonderianus*), *C. zehntneri* and *C. celtidifolius* presented antinociceptive activity (Oliveira et al. 2001, Abdon et al. 2002, Santos et al. 2005a, DalBó et al. 2006, Nardi et al. 2006), mainly attributed to the presence of proanthocyanidin (DalBó et al. 2006). Essential oil of *C. argyrophylloides*, *C. nepetaefolius* and *C. zehntneri* presented stark antioxidant activity probably due to presence of α -pinene, cariphilene and 1.8-cineole in *C. argyrophylloides*, methyleugenol, α -terpineol and 1.8-cineole in *C. nepetaefolius*, and anethole in *C. zehntneri* (Abdon et al. 2002, Morais et al. 2006).

Extracts of *C. zambesicus* and *C. roxburghii* as well as essential oil of *C. zehntneri*, *C. sonderianus* (= *C. blanchetianus*), *C. citratus* and *C. argyrophylloides* presented antibacterial activity (Bertine et al. 2005, Panda et al. 2010, Reuben et al. 2010). The antibacterial activity of bark and leaf alcoholic extracts of *C. roxburghii* against enteric pathogens (causative agents of diarrhea and urinary tract infection) justifies its scientific use (Panda et al. 2010).

The red latex of *C. urucurana* and other *Croton* species (e.g. *C. lechleri*, *C. palanostigma* and *C. draconoides*) are known for their regenerative potential, being widely used for wound healing. This latex is often named “dragon’s blood” (*sangue de dragão*, *sangre de drago* or *sangre de grado*) due to its blood-like appearance. The sap of *C. lechleri* presented other medicinal uses as antiulcerative and healing, which is attributed to its taspine content, presenting also antibacterial activity against *Helicobacter pylori* (Jones 2003, Ortiz et al. 2003).

Several *Croton* species native from Malaria endemic areas in American and African continents were popularly used as antimalarial agents (Prozesky et al. 2001, Salatino et al. 2007, Mariath et al. 2009). Antiplasmodial activity was demonstrated in Swiss albino mice for root extracts of *C. zambesicus*. However, extracts produced physical signs of acute toxicity such as writhing, gasping, palpitation, decreased respiratory rate, body limb and death (Okokon e Nwafor 2009). 8,9-Secokaurane diterpenes from *C. kongensis* have shown *in vitro* antimalarial and antimycobacterial activities against *Plasmodium falciparum* (K1, multiresistent) and *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, respectively (Thontan et al. 2003).

Some substances have been recognized in association to the known effects of *Croton*, as diterpenes including trans-dehydrocrotonin (DCTN), crotonin (CTN), as well as alkaloids (taspine) and proanthocyanidins. A DCTN found in *C. cajucara* is one of the most studied substances, with confirmed anti-inflammatory, antinociceptive, antihypertensive, antitumoral and hypoglycemic activity. DCTN (Grynberg et al. 1999, Poersch et al. 2007), anethole (Chainy et al. 2000) and taspine (Chen et al. 1994) are supposed to be responsible for most anti cancer activity, considering evidences from different evaluations.

Plants of the genus *Croton* are also known for their irritant and cocarcinogenic effects attributed mainly to their phorbol diterpenes esters content (Siegler 1994, Maciel et al. 2000). The seed oil from *C. tiglium* can elicit epithelial tumor in mice treated with subcarcinogenic amounts of carcinogenic hydrocarbons. Chronic use of the small amounts of croton oil applied to the skin of mice, after a latent period of eight to 10 weeks, resulted in papillomas and later in carcinomas without the aid of a small dose of carcinogenic hydrocarbons. Additionally, the response to croton

oil was much greater, and the latent period was shorter when the mice had been previously treated with a subcarcinogenic amount of carcinogenic hydrocarbons (Boutwell et al. 1957).

Croton oil may act as a stimulant for the induction of inflammatory models, especially in models of skin and mucosal inflammation, including animal models of hemorrhoids, pleuritis, ear edema and uveitis (Wang et al. 2002). The main irritant component, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), has been used as a standard irritant drug in mice ear to cause edema (Hecker 1977) and as a standard tumor promoter in mice in experimental cancer research (Wang et al. 2002).

Cases of acute, chronic and fatal hepatitis were reported in the Amazonian region and other Brazilian regions for patients who made use of *C. cajucara* to lose weight and reduce cholesterol (Rodrigues et al. 2010). Wistar rats treated for 56 days with 0.1 ml/100 g b.w. of *C. cajucara* leaves extract through gavage presented hepatocellular necrosis, similar to acute hepatitis, in a dose-dependent manner (Graim et al. 2008).

Cytotoxic activities against normal or carcinogenic cell lines were identified after different evaluations for diverse *Croton* species. The dichloromethane extract obtained from leaves of *C. zambesicus* presented *in vitro* cytotoxicity against HeLa cells (human cervix carcinoma cells). This activity was attributed to a trachylobane diterpene (Block et al. 2002). Other diterpenes from *C. zambesicus* were cytotoxic on HeLa cells, HL-60 (human promyelocytic leukemia) and WI-38 (human lung fibroblast) (Block et al. 2004).

Brine shrimp lethality test (BST) was applied for screening of toxic activity in *Croton* species (Table 4). Extracts with LC₅₀ values higher than 1000 mg/L (µg/mL) in the BST were considered inactive (Montanher et al. 2002, Costa et al. 2008). LC₅₀ was defined as the concentration needed to cause death in half of the tested brine shrimp within 24 h (Lee et al. 1999). Methanol extract from *C. moritibensis* (= *C. heliotropiifolius*) presented LC₅₀ = 31 µg/mL (David et al. 2007) and essential oil from leaves of *C. zehntneri* presented LC₅₀ = 31 µg/mL (Costa et al. 2008), being both considered active in BST test. *C. celtidifolius* presented contrasting results for different extracts: ethanolic bark extract was considered inactive whereas ethanolic leaves extract was active (Montanher et al. 2002).

Table 3. Revision of known popular uses (folkmedicine) and ethnopharmacological assays in *Croton* including species collected or observed in natural environment by our group in Brazilian Northeastern Region (indicated by “++” after species name). Legend for used plant parts: B: bark; E: entire plants; L: leaves; R: root; S: sap (or latex); X: extract.

Species	Popular use		Ethnopharmacology	
	Plant part	Plant preparation and place (when given) → popular use	Substance evaluated (when given) →	Pharmacological indication
<i>C. antispythiliticus</i> Mart. ⁺⁺	R	Gynecological infections (Tresvenzol et al. 2006)	-	
	L	Green leaves → anti-tumor; Dry leaves → wound healing (external use); stimulating, sudorific (increasing sweat), anti-rheumatic, diuretic and against syphilis (Corrêa 1926)	-	
<i>C. arboreous</i> Millsp.	L	Leaves → Anti-inflammatory (Salatino et al. 2007)	-	
<i>C. argyrophylloloides</i> Muell. Arg. ⁺⁺	-	-	Essential oil → antibacterial (Bertine et al. 2005); Essential oil → antioxidant (Morais et al. 2006); Different parts (Ceará State) → larvicidal (against <i>Aedes aegypti</i>) (Lima et al. 2006)	
<i>C. blanchetianus</i> Baill. (= <i>C. sonderianus</i> Muell. Arg.) ⁺⁺	E	Entire plants (external use); Northeast of Brazil → Scabies and as haemostatic (Agra et al. 2007)	Leaf essential oil (city of Caucaia, Ceará state) → Antinociceptive (Santos et al. 2005a); Essential oil → antibacterial (Bertine et al. 2005); Different parts (Ceará state) → larvicidal (against <i>Aedes aegypti</i>), (Lima et al. 2006); Gastroprotective (Monteiro et al. 2007)	
<i>C. cajucara</i> Benth. ⁺⁺	L	Tea from the leaves → swelling, belly pain (Franco and Barros 2006)		
	R	Decoction of the roots (used as bath); Northeastern Brazil → External ulcer, eczemas and syphilis (Agra et al. 2007)	Bark extract (CTN) → Antiulcerogenic (Hiruma-Lima et al. 2002, Albino de Almeida et al. 2003), Linalool (leaves essential oil) → Antileishmanial activity (Rosa et al. 2003); Bark oil (Taspine) → citotoxic (Chen et al. 1994)	
	L	Leaves (Amazonian region) → Stomach pain, hepatic problems and malaria (Di Stasi and Hiruma-Lima 2002) Leaves (Northeast of Brazil) → Rheumatism and appendicitis (Agra et al. 2007) Leaves infusion (Amazonas state) → against hepatitis (Di Stasi and Hiruma-Lima 2002) Leaves infusion (Amazonas state) → weight loss (Maciel et al. 2000)	Stem bark essential oil (Benfica, Paraíba state) → Gastroprotective (Paula et al. 2006); DCTN → Hypoglycemic (Silva et al. 2001); antioestrogenic (Luna-Costa et al. 1999); antitumoral, (Grynberg et al. 1999); antimutagenic (in vitro) (Poersch et al. 2007); Cardiovascular effects (hypotensive and bradycardic effects) (Silva et al. 2005); DCTN → Anti-inflammatory, antinociceptive (Carvalho et al. 1996, Salatino et al. 2007); antilipidemic (Salatino et al. 2007); Hypoglycemic (Barbosa-Filho et al. 2005); Semi-synthetic crotonin → antiulcerogenic (Albino de Almeida et al. 2003); Leaf extract → Free radical scavenger (Tieppo et al. 2006).	

<i>C. campestris</i> A. St.-Hil. ⁺⁺	L, B R, L	Leaves or bark tea → Against pain, influenza and constipation (Franco and Barros 2006); Decoction of the roots and leaves (used as bath) (Northeast of Brazil) → External ulcer, eczemas and syphilis (Agra et al. 2007)	Compounds from bark → Molluscicidal (El Babili et al. 2006)
	L	Leaves → Diuretic, depurative, against syphilis (Corrêa 1926); Depurative, scrofulosis, venereal diseases, impinges, tumors, skin diseases, rheumatism, diarrhea, uterus wounding, arthritis (Santos et al. 2005b).	
<i>C. celtidifolius</i> Baill. ⁺⁺	L, B	Bark and leaf infusion → Anti-inflammatory (Nardi et al. 2003)	Bark extract fractions → Antinociceptive (DalBo et al. 2006, Nardi et al. 2006); Bark → Antioxidant and anti-inflammatory (Nardi et al. 2003, Salatino et al. 2007)
<i>C. citratus</i>	-	-	Essential oil → antibacterial (Bertine et al. 2005)
<i>C. cuneatus</i> Klotzsch	-	Anti-inflammatory, analgesic and to treat gastrointestinal disturbance (Suaréz et al. 2006)	Stem bark and leaf aqueous extract → Antinociceptive, anti-inflammatory (Suaréz et al. 2006); hypoglycaemic effect (Torrice et al. 2007)
<i>C. eleuteria</i>	-	Bronchitis, fever, malaria, digestive, hypertension (Salatino et al. 2007)	Wound healing (Salatino et al. 2007)
<i>C. flavens</i> L.	-	-	Compounds from leaf essential oil → anti-tumor (Sylvestre et al. 2006)
<i>C. floribundus</i> Spreng. ⁺⁺	B	Bark → against syphilis (Corrêa 1926)	-
<i>C. gossypifolius</i>	L	Leaves → antiulcerative (Corrêa 1926)	-
<i>C. hieronymi</i> Griseb.	L	Leaves; Trinidad and Tobago → Menstrual pain (Lans 2007)	Anticancer (Salatino et al. 2007)
<i>C. heliotropifolius</i> Kunth (= <i>C. rhamnifolius</i> H. B. K.) ⁺⁺	BX L	Bark aqueous extract (city of Floresta, Pernambuco state) → antispasmodic (Randau et al. 2002); Decoction of leaves; Northeast of Brazil → Intestinal pains, gripes, asthmas and bronchitis (Agra et al. 2007)	Aqueous bark extract → antispasmodic (myorelaxant activity) (Randau et al. 2002)
	E	Entire plants (external use); Northeast of Brazil → Scabies and as haemostatic (Agra et al. 2007); → Stomach pain, vomits, diarrhea, baths against fever (Randau et al. 2002)	
<i>C. heliotropifolius</i> Kunth (= <i>C. moritensis</i> Baill.) ⁺⁺	R, L	Decoction of the roots and leaves (used as bath); Northeast of Brazil → External ulcer, eczemas and syphilis (Agra et al. 2007)	Not antioxidant (David et al. 2007)
<i>C. kongensis</i> Gagnep.	-	dysmenorrhea (Salatino et al. 2007)	Diterpenes of leaves extract → Antimycobacterial, antimalarial (Thongtan et al. 2003)

<i>C. lechleri</i> Muell. Arg.	-	Sore throat, vaginal antiseptic, internal wound healing, ulcerative disorders, immunomodulatory (Williams 2001); Cicatrizing, anti-inflammatory (Lopes e Lopes et al. 2004); Anti-microbial, digestive disorders (Lopes e Lopes et al. 2004)	Anti-inflammatory, antidiarrheic, antimutagenic (antitumoral) (Salatino et al. 2007); Antidiarrheic (Jones 2003); Antiviral (Williams 2001); Wound healing (Salatino et al. 2007); Immunomodulatory (Williams 2001, Salatino et al. 2007); Antioxidant (Desmarchelier et al. 1997, Salatino et al. 2007), Root extract and aerial part → antiparasmodic (in vitro) (Weniger et al. 2004); Aerial parts → Anti-malarial (Salatino et al. 2007)
<i>C. lobatus</i> L. ⁺⁺	-	antiinflammatory; Cruz das Almas, Bahia (Rodrigues and Guedes 2006) Seeds and roots → purgative (Salatino et al. 2007)	-
<i>C. macrostachys</i> Hochst. ex A. Rich			
<i>C. malambo</i> Karst.	BX	Bark extract → Pain, rheumatism, inflammation, diarrhea, diabetes, ulcer gastric (Salatino et al. 2007)	Anti-inflammatory (Salatino et al. 2007)
<i>C. muscicapa</i> Muell. Arg. ⁺⁺	L	Leaves; Northeast of Brazil → Antiseptic (Agra et al. 2007)	-
<i>C. nepetifolius</i> Baill. ⁺⁺	-	Stomach, carminative and for the treatment of intestinal colic (Abdon et al. 2002)	Fresh leaves essential oil → Antinociceptive (Abdon et al. 2002); Essential oil → antioxidant (Moraes et al. 2006); Different parts (Ceará state) → larvicidal (<i>Aedes aegypti</i>), (Lima et al. 2006); Anti-inflammatory, antihypertensive, antispasmodic (Salatino et al. 2007)
<i>C. oblongifolius</i>	-	Fever (Salatino et al. 2007)	-
<i>C. palanostigma</i> Klotzsch	-	Intestinal inflammation, wound healing, gastric ulcer (Salatino et al. 2007)	Latex (red sap) → anticancer (Sandoval et al. 2002); Latex → antioxidant (Sandoval et al. 2006)
<i>C. pseudopulchellus</i> Pax			Anti-malarial (Prozesky et al. 2001)
<i>C. pulegioides</i> Baill. ⁺⁺	L	Decoction of leaves; Northeast of Brazil → Gripes, bronchitis and as expectorant (Agra et al. 2007)	-
<i>C. rhamniifoloides</i> Pax & K. Hoffm. ⁺⁺	BX	Bark aqueous extract (city of Floresta, Pernambuco state) → antispasmodic (Randau et al. 2002)	Aqueous bark extract → Antispasmodic (myorelaxing activity) (Randau et al. 2002)
<i>C. saccuinha</i> Croizat	-	Stomach pain and gastritis, vomits, diarrhea with bleeding, baths against fever (Randau et al. 2002)	
<i>C. schiedeana</i> Schltdl.	L	Leaves infusion (Amazonas state) → Malaria and hepatic problems (Di Stasi and Hiruma-Lima 2002)	Leaf and bark extract → Antinociceptive (Costa-Sousa et al. 2010)
<i>C. triqueter</i> Lam. ⁺⁺	X	Aqueous and ethanolic extracts → hypertension (Salatino et al. 2007)	Aerial part extract → antihypertensive (Guerrero et al. 2002, Salatino et al. 2007)
	L	Infusion or decoction of leaves; Northeast of Brazil → Diarrheas	-

and dysenteries (Agra et al. 2007)

<i>C. urticarana</i> Baill. ⁺⁺	S	Latex; Paraguai → Wound infections (Gurgel et al. 2005)	Red sap → Antidiarrheic, antioxidant (Gurgel et al. 2001); antifungal (Gurgel et al. 2005, Salatino et al. 2007)
	B	Bark tea (external use, city of Goiânia, Goiás state) → Cicatrizant (also against hemorrhoids and other wounding) (Tresvenzol et al. 2006)	Stem bark extract → antimicrobial (Peres et al. 1997)
<i>C. zambesicus</i> Muell. Arg.	LB	Leaves and stem bark decoction → antihypertensive, antimicrobial (urinary infections) and against malaria (Reuben et al. 2008)	Leaf extract → Anticancer (Salatino et al. 2007); antiulcerogenic (Okokon et al. 2010); antioxidant (Ofusori et al. 2007)
	R	Menstrual pain (Sudan); antimalarial and antidiabetic (Nigeria) (Okokon and Nwafor 2009)	Stem bark extract → Antimicrobial (Reuben et al. 2008, Reuben et al. 2010) Root ethanolic extract → Antiplasmodial (Okokon and Nwafor 2009); antimicrobial (Okokon and Nwafor 2010a); Antiinflammatory, analgesic, antipyretic (Okokon and Nwafor 2010b)
<i>C. zehntneri</i> Pax & K. Hoffm. ⁺⁺	-	Sedative, appetite-stimulating antianorexigen, gastro intestinal disturbance (Oliveira et al. 2001); Entire plants (external use);	Leaf essential oil (Viçosa, Minas Gerais state) → Antinociceptive (Oliveira et al. 2001); → Antiespasmotic, central depressive (Salatino et al. 2007); antioxidant (Morais et al. 2006); Leaf essential oil (Salitre, Ceara state) → Antibacterial (Costa et al. 2008); Different parts (Ceará state) → larvicidal (against <i>Aedes aegypti</i>) (Lima et al. 2006); Anethole → anti-carcinogenic (Chainy et al. 2000); Anethole and estragole → contraction of muscle fiber (Albuquerque et al. 1997)
	E	Northeast of Brazil → Scabies and as haemostatic (Agra et al. 2007)	

Table 4. LC₅₀ values of different *Croton* species against *Artemia salina*.

Taxon	Provenance	Parts used	LC ₅₀ (µg/mL)	Author
<i>C. celtidifolius</i> Baill.	Brazil	Bark essential oil	Inactive (>1000 ppm)	Montanher et al. 2002
<i>C. erythrochilus</i> Müll. Arg.	Brazil, Amazonia	Leaves essential oil	Active (676 ppm)	Mongelli et al. 1995
<i>C. floribundus</i> Spreng.	Brazil, Parana state, Maringá city	Latex	Active	Medina et al. 2009
		Dried leaves hexane extract	481,5 (Low lethality)	
		Dried leaves ethanol extract	230,7 (Low lethality)	
		Dried barks extract methanol	237,7 (Low lethality)	
		Kaurenoic acid	659,7 (Low lethality)	
<i>C. macrostachys</i> Hochst. ex Delile	Tanzania	Extract	Active (LC ₅₀ = 13,40 µg/mL)	Moshi et al. 2004
<i>C. moritibensis</i> Baill. (= <i>C. heliotropiifolius</i>)	Brazil, Caatinga vegetation, Northeastern region	Methanolic extract of aerial parts	Active (LC ₅₀ 31 µg/mL)	David et al. 2007
<i>C. palanostigma</i> klotzsch	Brazil, Northern region	Bark essential oil	Active (LC ₅₀ = 3,71 µg/mL)	Brasil et al. 2009
<i>C. scheffleri</i> Pax.	Tanzania	Methanolic root extract	Active (LC ₅₀ = 17,3 µg/mL)	Moshi et al. 2007
<i>C. tiglium</i> L.	Bangladesh	Leaves methanolic extract	Active (0,0924 ± 0,0617 mg/mL)	Rahmatullah et al. 2010
<i>C. tonkinensis</i> Gagnep	Vietnam, Hanoi	Diterpenoids	Active	Giang et al. 2005
<i>C. zehntneri</i> Pax. & K. Hoffm.	Brazil, Ceara state, City of Salitre	Leaves essential oil	Active (LC ₅₀ 100 µg/mL)	Costa et al. 2008

***Croton* Genetics**

The large morphological diversity, the capacity of growing in contrasting environments (in some cases under extreme agroclimatic conditions) and the large amount and types of compounds present in some species suggest that *Croton* bears considerable genetic diversity, with many important genes still uncovered for the science. Despite of that, few genetic studies have been carried out on *Croton* species. Therefore genetic information at chromosome and molecular levels are urgently needed to help the establishment of diversity and conservation centers, population minimal size, evolution, sustainable use and breeding of potentially useful species.

Chromosomal studies

Literature data reveal that less than 5% of the known species have been cytogenetically analyzed. Most of the studies are limited to chromosome counts, including species collected in North America (Urbatsch et al. 1975), Thailand (Soontorchainaksaeng and Chaiyasut 1999, Soontorchainaksaeng et al. 2003) and other regions with prevalence of India (revised by Berry 2006). No information is available regarding chromosome morphology and banding patterns as well as for Brazilian species. Considering the available data, haploid chromosome numbers normally range from $n=8$ to $n=32$, with exception of *C. xalapensis* (sect. *Cyclostigma*, subsect. *Xalapensis*) that presents $n=60$ ($2n=120$). By the other hand, most of the cytogenetically analyzed species exhibit $2n=20$ chromosomes, a common number within Euphorbiaceae (revised by Berry 2006). The actual knowledge of chromosome counts in *Croton* is preliminary, since counts include one or few representatives of most sections, with many sections bearing a single species studied (e.g. *Astrea*, *Croton*, *Eremocarpus*, *Furcaria*, *Gynamblosis*, *Julocroton*, *Tigilium* and *Pilinophytum*). The most known sections are *Drepadenium* and *Velamea* with five to eight studied species, respectively. All *Drepadenium* species presented $n=14$ chromosomes, while in *Velamea* haploid numbers ranged from 9, 10 to 24, with prevalence of $n=10$ (Soontorchainaksaeng and Chaiyasut 1999, Soontorchainaksaeng et al. 2003, Berry 2006). Despite the few available counts Urbatsch et al. (1975) suggested $x=10$ as the base primary chromosome number for the genus, while other numbers observed ($x=7$, 8 and 9) can be considered secondary chromosome numbers. Considering that some groups bear a conservation regarding chromosome numbers, Soontornchainaksaeng e Chaiyasut (1999) suggested that most of the genus diversity may be confined to point mutations at the molecular level, with similar karyotypes in species with $2n=20$.

Recent evaluations (Figs. 3a-f) made by our group uncovered chromosome numbers for three *Croton* species collected in the state of Pernambuco (Brazilian Northeastern region), including *C. heliotropiifolius* (Kunth) Muell. Arg. with $2n=20$ (Figs. 3b,d), *C. aff. heliotropiifolius* (Kunth) Muell. Arg. with $2n=20$ (Fig. 3e) and *C. lobatus* L. with $2n=18$ (Figs. 3c,f). Regarding chromosome morphology *Croton* aff. *heliotropiifolius* beard a symmetric karyotype diverging from the remaining taxa that presented asymmetric karyotypes regarding both centromere position and chromosome sizes (Figs. 3d-f). Analyzing two populations of *C. heliotropiifolius* striking differences regarding karyotype morphology were detected and confirmed after new collections and repetitions (Figs. 3d-e). Both populations occurred in the city of Buique (Pernambuco state) with similar morphological features. Both taxa presented $2n=20$ but after karyotype evaluation, striking differences regarding chromosome sizes [*C. heliotropiifolius* with chromosomes from 2.05 to 3.93 μm while *C. aff. heliotropiifolius*

presented 1.71-1.09 μm]. Probably small chromosomes are prevalent for the genus, as also observed in *C. lobatus* with chromosomes sizes ranging from 1.90 to 0.92 μm . Fluorochrome staining (Lira-Neto et al, in prep.) for *C. lobatus* revealed pericentric CMA₃⁺/DAPI^{neutral} (chromomycyn A3 positive and Diamidyn-8-phenilindol neutral) regions in the pericentromeric regions of all chromosome pairs. By the other hand, the same staining method applied to *C. heliotropiifolius* revealed only two subterminal CMA₃⁺/DAPI⁺ sites in a single chromosome pair. In all these results suggest the prevalence of GC-rich repetitive DNA for the genus, with contrasting distribution among both analyzed species. Our results indicate that at least in Brazilian Northeast high levels of diversity in chromosome morphology and banding patterns is given, opposite to the supposed karyotype conservation observed in Thailand populations, as suggested by Soontornchainaksaeng e Chaiyasut (1999).

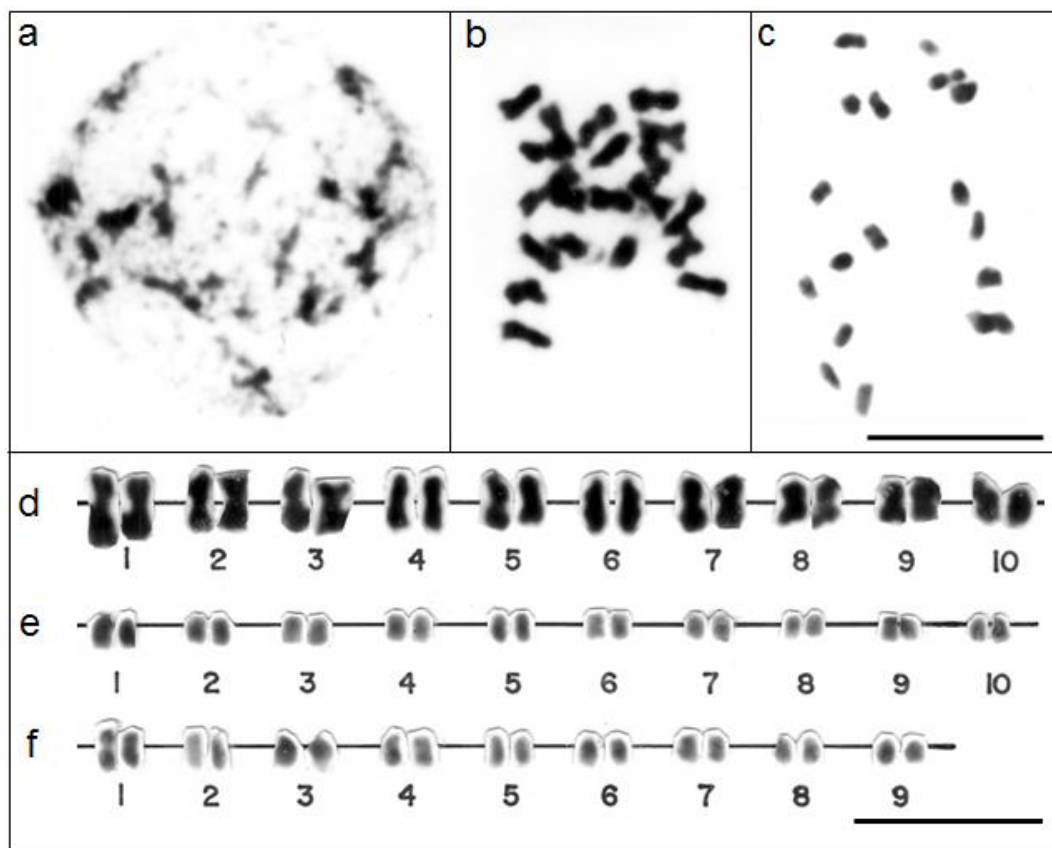


Figure 3. Micrographs of *Croton* taxa collected in Pernambuco state (Brazilian Northeastern region) after standard Giemsa staining. (a-b) Interphase nucleus and metaphase spread of *C. heliotropiifolius* (2n=20); (c) prometaphase chromosomes of *C. lobatus* (2n=18); karyotypes of *C. heliotropiifolius* (d); *C. aff. heliotropiifolius* (2n=20) (e) and *C. lobatus* (f). Bars in c for a-c and in f for d-f correspond to 10 μm .

Molecular Evaluations

Molecular evaluations including *Croton* species have contributed to the understanding of its evolutionary history and evaluation of relationships among sections and lower taxonomic levels (Ginzburg 1992, Berry et al. 2005a, b, Van et al. 2006). Using ITS (Internal Transcribed Spacers) and *trnL*-Fs (conserved region of chloroplast DNA) sequences Berry et al. (2005a) analyzed 78 *Croton* species, including 29 of the 40 sections defined by Webster (1993), as well as representatives of the genera *Moacroton*, *Brasiliocroton*, *Jatropha*, *Sagotia*, *Paracroton*, *Acidocroton*, *Ophellantha*, *Crotonopsis*, *Eremocarpus* and *Julocroton*. Both sequences resulted in similar taxa grouping and after combination were able to separate different taxa. Most species of *Croton* appeared as a monophyletic group, recognized as a sister group of *Brasiliocroton*, a genus recently described by Berry et al. (2005b). Regarding infrageneric delimitation, both representatives of the section *Astraeae* (*C. lobatus* and *C. praetervisa*) grouped together with *Acidocroton* and *Ophellantha*, composing a separate clade from the remaining *Croton* and *Brasiliocroton*. These results, together with other morphologically and cytologically (n=9) divergent features lead to the isolation of this section from the genus. On the other hand, the controversial sections *Crotonopsis*, *Eremocarpus* and *Julocroton* grouped together with the remaining species of *Croton*, confirming their classification within this genus.

Remaining *Croton* representatives grouped together in a branch including one small (*C. texensis*, *C. alabamensis*, *C. olivaceus* and *Moacroton lanceolatus*) and three large subgroups. The small group included *C. texensis*, *C. alabamensis*, *C. olivaceus* and *Moacroton lanceolatus*. The genus *Moacroton* includes only six species restricted to Cuba and its taxonomic position has been an object of controversy. The remaining two large clades included exclusively Neotropical representatives; the first including the subsections *Palanostigma* and *Cyclostigma* (sect. *Cyclostigma*) and the second with the sections *Velamea*, *Cascarilla* and the subsection *Xalapensis* (sect. *Cyclostigma*). The observed clades suggest that section *Cyclostigma* is not a natural group, while the second clade is better supported when including sections *Drepadenium* and *Eluteria*.

The position of the clade including all 21 Old World species leads to the conclusion that the *Croton* genus originated in the New World, with posterior colonization of the paleotropics. However, the study included no species from Africa or Madagascar (Berry et al. 2005b). Based on the results of Berry et al. (2005a) for *C. alabamensis* (sect. *Lamprocroton*), *C. olivaceus* (sect. *Corylocroton*) and *Moacroton*, which formed an isolated clade from the remaining *Croton* species, van Ee et al. (2006) compared both *C. alabamensis* (*C. alabamensis* and *C. texensis*) varieties with 13 other *Croton* species, three *Moacroton* species and one *Brasiliocroton* species using ITS and *trnL*-Fs sequences. The *C. alabamensis* varieties were also analyzed by AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). The results were similar to those observed by Berry et al. Berry et al. (2005a) with *Moacroton* representatives grouping together with *C. alabamensis* and the *Corylocroton* grouping in a clade isolated from the remaining *Croton* species. Future evaluations with a larger number of representatives (especially of the sections *Lamprocroton* and *Corylocroton*) are necessary to better infer the relationship of this group to the remaining species of the genus. AFLP data generated by Ginzburg (1992) on *Croton alabamensis* confirmed that populations from Alabama and Texas are different varieties. On the other hand, the

diversity index does not support the theory of recent long-distance dispersal, as expected and also does not indicate which variety could be the ancestor.

***Croton* Sequences on Genetic Databases**

After a search of GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the 'taxbrowser' tool and after specific evaluation of nucleotide and protein sequences, as well as elimination of some redundancies, we observed the existence of 442 *Croton* DNA sequences in GenBank. Of these, 41 have been translated to amino acid sequences and are also present in the protein data-bank. From the 442 DNA sequences (Table 5, 'DNA' column), 248 have been amplified from chloroplast DNA, 192 from ribosomal DNA (for ITS diversity evaluation) and 14 from mitochondrial DNA. Only three sequences have been analyzed for their pharmacological potential. Considering protein sequences (Table 5, 'Prot' column), all have been derived from DNA sequences using bioinformatic translation tools and most of them have been generated for phylogenetic studies. From the 74 protein sequences available, 30 were amplified from mitochondrial DNA and 41 from chloroplast DNA and only three of them were from expression assays. All protein sequences identified are redundant with the original DNA sequences in DNA database (Table 5, 'DNA' column). This means that no original protein evaluation (directly generated by sequencing amino acids) are available in public databases, though it can be presumed that some exist and are the object of pharmacological patenting without identification of the source species.

The three sequences generated using expression assays (cDNA cloning and sequencing) deserve special mention. One of them is an isomerase (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase) with 467 amino acids from leaves of *Croton stellatopilosus* identified by a group from Thailand. Reductoisomerases are important in oxidative processes and protein synthesis. The recognized *Croton* sequence seems to be unique in eukaryotes, and is deposited by the authors (Sitthithaworn, W. and Sankawa, U. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Thailand) at the Uniprot database (<http://beta.uniprot.org/uniprot/>) under the accession number 431156. The second DNA sequence has been sequenced and analyzed in Japan by Kojima et al. (2000) and was identified as a geranyl-geranyl diphosphate synthase (GGPPS) with 368 amino acids. This enzyme supplies the essential acyclic precursor geranylgeranyl diphosphate (GGPP) for the biosynthesis of a structurally diverse group of compounds including diterpenes. Another sequence generated by the same group, a copalyl diphosphate synthase with 829 amino acids is also a diterpene precursor. Only 11 species from the 106 species native from the Brazilian Northeastern region (Table 2) are included in Table 5, most of them from widely distributed species and only three of them known for their economic potential (Table 3).

Table 5. Analytical evaluation and classification of *Croton* sequences deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), including DNA nucleotide sequences and protein (prot.) amino-acid sequences. Legend for abbreviations: NE: species that occur in Brazilian Northeastern region according to the present evaluation (listed in Table 2 and 3); Ph: species with indications from folkmedicine and pharmacological evaluations (listed in Table 3).

<i>Croton</i> Species	DNA	Prot.	NE	Ph	<i>Croton</i> Species	DNA	Prot.	NE	Ph
<i>C. abutiloides</i> Kunth	<u>2</u>	0			<i>C. lundellii</i> Standl.	<u>9</u>	3		
<i>C. adpersus</i> Benth.	<u>1</u>	0			<i>C. cf. lundellii</i> Standl.	10	2		
<i>C. alabamensis</i> E.A. Sm. ex Chapm.					<i>C. maestrense</i> Alain	<u>4</u>	2		
<i>var. alabamensis</i>	36	10			<i>C. malambo</i> H. Karst.	<u>2</u>	0		X
<i>var. texensis</i> Ginzburg.	<u>22</u>	2			<i>C. martinianus</i> V.W. Steinn.	<u>2</u>	0		
<i>C. alagoensis</i> Müll. Arg.	<u>1</u>	0	X		<i>C. matourensis</i> Aubl.	<u>2</u>	0		
<i>C. antisiphiliticus</i> Mart.	<u>2</u>	0	X	X	<i>C. megalodendron</i> Müll. Arg.	<u>2</u>	0		
<i>C. argenteus</i> L.	<u>2</u>	0			<i>C. megistocarpus</i> G. Ramirez, J. Angel & Poveda	<u>8</u>	2		
<i>C. argyranthemus</i> Michx.	<u>2</u>	0		X	<i>C. menyharthii</i> Pax	<u>1</u>	1		
<i>C. beetlei</i> Croizat	<u>6</u>	0			<i>C. mexicanus</i> Müll. Arg.	12	2		
<i>C. betulinus</i> Vahl	<u>2</u>	0			<i>C. micans</i> Sw.	<u>2</u>	0		X
<i>C. billbergianus</i> Müll. Arg.	<u>4</u>	2			<i>C. michauxii</i> G.L. Webster	<u>1</u>	0		
<i>C. bixoides</i> Vahl	<u>2</u>	0			<i>C. microtiglium</i> Burkill.	<u>2</u>	0		
<i>C. bonplandianus</i> Baill.	<u>2</u>	0			<i>C. montevidensis</i> Spreng.	<u>2</u>	0		
<i>C. bracteatus</i> Lam.	<u>2</u>	0			<i>C. nephrophyllus</i> Urb. & Ekman.	<u>2</u>	0		
<i>C. bredemeyeri</i> Müll. Arg.	<u>2</u>	0			<i>C. niveus</i> Griseb.	<u>8</u>	2		
<i>C. cajucara</i> Benth.	<u>2</u>	0	X	X	<i>C. noronhae</i> Baill.	<u>4</u>	1		X
<i>C. californicus</i> Müll. Arg.	<u>2</u>	0		X	<i>C. nubigenus</i> G.L. Webster	<u>6</u>	2		
<i>C. capitatus</i> Michx.	<u>2</u>	0			<i>C. oerstedianus</i> Müll. Arg.	<u>5</u>	0		
<i>C. caracasanus</i> Pittier	<u>4</u>	2			<i>C. olivaceus</i> Müll. Arg.	<u>2</u>	1		
<i>C. cascarilloides</i> Geiseler	<u>2</u>	0			<i>C. cf. olivaceus</i>	<u>1</u>	0		
<i>C. caudatus</i> Geiseler	<u>2</u>	0			<i>C. ovalifolius</i> Vahl	<u>2</u>	0		
<i>C. chilensis</i> Müll. Arg.	<u>2</u>	0			<i>C. pachypodus</i> G.L. Webster	<u>5</u>	0		
<i>C. ciliatoglandulifer</i> Ortega	<u>2</u>	0			<i>C. paludosus</i> Müll. Arg.	<u>1</u>	0		
<i>C. conduplicatus</i> Kunth	<u>3</u>	0	X		<i>C. piptocalyx</i> Müll. Arg.	<u>6</u>	2		X
<i>C. coriaceus</i> Kunth	<u>4</u>	0			<i>C. poecilanthus</i> Urb.	<u>4</u>	1		
<i>C. coriifolius</i> Airy Shaw	<u>2</u>	0			<i>C. poilanei</i> Gagnep.	<u>2</u>	0		
<i>C. corinthius</i> Poveda, G. Ramirez & J. Angel	<u>6</u>	1			<i>C. punctatus</i> Retz.	<u>6</u>	1		
<i>C. corylifolius</i> Griseb.	<u>10</u>	0			<i>C. pungens</i> Jacq.	<u>2</u>	0		
<i>C. craspedotrichus</i> Griseb.	<u>2</u>	0			<i>C. quercetorum</i> Croizat	<u>1</u>	0		
<i>C. crassifolius</i> Griseb.	<u>2</u>	0			<i>C. repens</i> Schlttdl.	<u>2</u>	0		
<i>C. crocodilorum</i> Leandri	<u>2</u>	0			<i>C. ripensis</i> Kaneh. & Hatus.	<u>2</u>	0		
<i>C. cuneatus</i> Klotzsch	<u>2</u>	0			<i>C. roraimensis</i> Croizat	<u>4</u>	1		
<i>C. daphniphyllum</i> Radcl.-Sm.	<u>4</u>	1			<i>C. roxburghii</i> Balakr.	<u>2</u>	0		
<i>C. dioicus</i> Roxb.	<u>2</u>	0			<i>C. ruizianus</i> Müll. Arg.	<u>2</u>	0		
<i>C. discolor</i> C. Wright ex Griseb.	<u>4</u>	2			<i>C. sampatik</i> Müll. Arg.	<u>6</u>	2		
<i>C. draco</i> Schlttdl. & Cham.	<u>6</u>	2			<i>C. sapiiflorus</i> Croizat	<u>2</u>	0		
<i>C. ekmanii</i> Urb.	<u>1</u>	1			<i>C. schiedeana</i> Schlttdl.	<u>2</u>	0		X
<i>C. elegans</i> Kunth	<u>6</u>	0			<i>C. setiger</i> Hook.	<u>8</u>	3		
<i>C. elliottii</i> Chapm.	<u>2</u>	0			<i>C. socotranus</i> Balf. f.	<u>2</u>	0		
<i>C. flavens</i> L.	<u>1</u>	0			<i>C. speciosus</i> Müll. Arg.	<u>2</u>	0		
<i>C. flavens</i> L. <i>var. rigidus</i> Müll. Arg.	<u>1</u>	0			<i>C. stellatopilosus</i> H. Ohba	<u>1*</u>	1*		
<i>C. floccosus</i> B.A. Sm.	<u>2</u>	0			<i>C. suaveolens</i> Torr.	<u>2*</u>	0		
<i>C. glandulosus</i> L.	<u>2</u>	0	X		<i>C. sublyratus</i> Kurz	<u>2</u>	2*		

<i>C. gossypifolius</i> Vahl	<u>4</u>	0		X	<i>C. subpannosus</i> Muell. Arg. ex Griseb.	<u>2</u>	0	
<i>C. gratissimus</i> Burch.	<u>2</u>	0			<i>C. cf. tessmannii</i> Tipaz 1163	<u>2</u>	0	
<i>C. grewifolius</i> Müll. Arg.	<u>2</u>	0			<i>C. tiarensis</i> P.E. Berry & R. Riina	<u>2</u>	0	
<i>C. guayanensis</i> Aubl.	<u>2</u>	0			<i>C. tonduzii</i> Pax	<u>2</u>	0	
<i>C. heliotropiifolius</i> Kunth	<u>1</u>	0	X	X	<i>C. tricolor</i> Müll. Arg.	<u>4</u>	1	
<i>C. heteranthus</i> Aug. D.C.	<u>2</u>	0			<i>C. trigonocarpus</i> Griseb.	<u>1</u>	1	
<i>C. hoffmannii</i> Müll. Arg.	<u>4</u>	1			<i>C. trinitatis</i> Millsp.	<u>2</u>	0	
<i>C. huberi</i> Steyerl.	<u>2</u>	0			<i>C. triqueter</i> Lam.	<u>2</u>	0	
<i>C. hutchinsonianus</i> Hosseus	<u>2</u>	0			<i>C. varelae</i> V.W. Steinn.	<u>2</u>	0	
<i>C. impressus</i> Urb.	<u>6</u>	2			<i>C. verapazensis</i> Donn. Sm.	<u>1</u>	0	
<i>C. insularis</i> Baill.	<u>6</u>	3			<i>C. verreauxii</i> Baill.	<u>2</u>	0	
<i>C. jimenezii</i> Standl. & Valerio	<u>4</u>	2			<i>C. wilsonii</i> Griseb.	<u>2</u>	0	
<i>C. kerrii</i> Airy Shaw	<u>2</u>	0			<i>C. yecorensis</i> V.W. Steinm. & Fleger	<u>2</u>	0	
<i>C. klotzschianus</i> Müll. Arg.	<u>2</u>	0	X		<i>C. ynesae</i> Croizat	<u>1</u>	0	
<i>C. kongensis</i> Gagnep.	<u>2</u>	0		X	<i>C. yucatanensis</i> Lundell.	<u>5</u>	2	
<i>C. laceratoglandulosus</i> Caruzo & Cordeiro	<u>2</u>	0	X		<i>C. zambesicus</i> Muell. Arg.	<u>6</u>	1	X
<i>C. lachynocarpus</i> Benth.	<u>2</u>	0			<i>Croton</i> sp. 654	<u>1</u>	0	
<i>C. laurinus</i> Sw.	<u>4</u>	1			<i>Croton</i> sp. Berry 7618	<u>2</u>	0	
<i>C. lechleri</i> Müll. Arg.	<u>2</u>	0		X	<i>Croton</i> sp. Diaz Camilo 6567	<u>1</u>	0	
<i>C. leonensis</i> Hatch.	<u>5</u>	0			<i>Croton</i> sp. Gonzalez 398	<u>4</u>	0	
<i>C. leptostachyus</i> Kunth	<u>2</u>	0			<i>Croton</i> sp. Neill 11163	<u>1</u>	0	
<i>C. lucidus</i> L.	<u>7</u>	2			<i>Croton</i> sp. Qiu 94027	<u>1</u>	1	
No. of taxa	No. of taxa	Total no. of			Total no. of	No. Brazilian	Phytomedical	
with DNA	with	DNA			Protein	Northeastern Taxa	Taxa	
sequences	protein	Sequences			Sequences	in Genbank	in Genbank	
	sequences							
132	41	501			85	11	11	

Considering the known and potential importance of *Croton*, this number of deposited sequences is far below what one might expect. On the one hand, this means that few public research centers (mainly universities) are working on *Croton* genomic and molecular biology. On the other hand this may bring one to the conclusion that a larger number of sequences is deposited in private data banks, and that these have been generated by private enterprises.

Final Considerations and Perspectives

The present work is intended to give an insight into the diversity, abundance and importance of *Croton* from different points of view, leading to some important conclusions that we wish to summarize as follows:

1. Several species of *Croton* are distributed in Brazil, with higher diversity and endemism in the Northeast region with 71 species recorded by our evaluations.
2. Regarding field observations, some species are quite diverse within and among natural populations.
3. The relationship among species as well as infrageneric classification regarding species of the Brazilian Northeast is the object of controversy. There are urgent needs for an evaluation of additional features for phylogenetic reconstruction, generation of additional molecular data, confirmation of homology of some morphological features within the genus, and more study of species from dry environments.
4. Few ecological evaluations have been carried out in the genus, and the Brazilian Northeast is an almost unknown territory for this kind of approach.
5. Among all vegetation types in Brazil, the *Caatinga* is one of the most fragile and has the fewest conservation units. This scenario is even worse if one considers that many *Croton* species are collected and used by local population for different purposes, leading to a great danger of extinction and loss of diversity in the near future.
6. The range of potential pharmacological uses of compounds of *Croton* is invaluable. Besides that, many different aromas detected during field observations are also potentially useful for cosmetic, cleaning and other purposes.
7. No information is available for the cultivation and propagation of Neotropical *Croton* species. This knowledge would be very important to support reforestation, sustainable management and future establishment of germplasm banks.
8. Cytogenetic studies have been mostly restricted to chromosome counts of non-Brazilian species. Our preliminary studies of chromosome morphology and banding with fluorochromes among other observations, revealed that a large diversity of chromosome morphology may exist, including chromosome sizes and the distribution of repetitive GC-rich satellite sequences.
9. Most known *Croton* DNA and protein sequences have been generated for phylogenetic purposes (chloroplast, mitochondrial or ribosomal DNA) with only three pharmacological important sequences deposited in public data banks.

Altogether the present data and the critical review presented here show how scarce knowledge on many aspects of *Croton* biology is as well as the potential of this natural resource for more research programs and product development. We are now establishing a working group on taxonomy, genetics and folkmedicine on *Croton* species, but much more interdisciplinary work is needed. Conservation planning and genetic banks including *in vivo* (plants and seeds) and *in vitro* conserved species would be important for the successful development of a research network. Also partnerships with the private sector at national and international levels would be desirable. Our group is open for this enterprise!

Acknowledgements

We thank our colleagues Prof. Dr. Wilfried Morawetz (in memoriam) for interesting discussions and valuable insights into the importance and diversity of *Croton* species. We are grateful to Scott Heald for critical revision of the text and to Claudete Marques da Silva for technical support. This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil.

References

- [FUMDHAM] Fundação Museu do Homem Americano 1998. Parque Nacional Serra da Capivara. FUMDHAM/ FNMA/ ASMOCO, Alínea Publicações Editora, Teresina, Brazil.
- [IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://mapas.ibge.gov.br/vegetacao>, release date 2000, cited 24/december/2008.
- Abdon, A.P. and J.H. Leal-Cardoso, N.A. Coelho-de-Souza, S.M. Morais and C.F. Santos. 2002. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. Braz. J. Med. Biol. Res. 35: 1215-1219.
- Agra, M.F. and P.F. França, and J.M. Barbosa-Filho. 2007. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Braz. J. Pharmacogn. 17: 114-140.
- Albino de Almeida, A.B. and P.S. Melo, C.A. Hiruma-Lima, J.S. Gracioso, L. Carli, D.S. Nunes, M. Haun, and A.R.M.S. Brito. 2003. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. Eu. J. Pharmacol. 472:205-212.
- Albuquerque, A.A.C. and A.L. Sorenson, and J.H. Leal-Cardoso. 1995. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. J. Ethnopharmacol. 49: 41-49.
- Alves, M. 1994. Notas sobre algumas espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) do Brasil. Fontqueria 39: 45-47.
- Alves, M. 1998. Checklist das espécies de Euphorbiaceae Juss. ocorrentes no semi-árido pernambucano, Brasil. Acta Bot. Bras. 12: 485-495.
- Araújo-Júnior, V. and M.S. da Silva, E.V.L. da Cunha, M.F. Agra, P. F. Athayde-Filho, I.J.C. Vieira, R. Braz-Filho, and J.M. Barbosa-Filho. 2005. Muscicapines, a new class of guaiane-type sesquiterpene alkaloids from *Croton muscicapa*. J. Braz. Chem. Soc. 16: 553-557.
- Armbruster, W.S. and B.G. Baldwin. Pollination and evolution of euphorb vines in Madagascar. pp. 391-393. In: S Goodman, J Benstead [eds.] 2003. *The Natural History of Madagascar*, University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Barbosa-Filho, J.M. and T.H.C. Vasconcelos, A.A. Alencar, L.M. Batista, R.A.G. Oliveira, D.N. Guedes, H.S. Falcão, M.D. Moura, M.F.F.M. Diniz, and J. Modesto-Filho. 2005. Plants and their active constituents from South, Central and North America with hypoglycemic activity. Braz. J. Pharmacogn. 15: 392-413.
- Barroso, G.M. and M.P. Morim, A.L. Peixoto, and C.L.F. Ichaso. 1999. *Frutos e Sementes: morfologia aplicada à sistemática de Dicotiledôneas*, Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

- Berry, P.E. and A.L. Hipp, K.J. Wurdack, B. van Ee, and R. Riina. 2005a. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. *Am. J. Bot.* 92: 1520-1534.
- Berry, P.E. and I. Cordeiro, A.C. Wiedenhoef, M.A. Vitorino-Cruz, and L.R. Lima. 2005b. *Brasiliocroton*, a New Crotonoid Genus of Euphorbiaceae s.s. from Eastern Brazil. *Syst. Bot.* 30: 357-365.
- Berry, P.E. *Croton* Research Network. <http://www.botany.wisc.edu/croton> release date 06/January/2006, cited 03/November/2010.
- Bertini, L.M. and A.F. Pereira, C.L.L. Oliveira, E.A. Menezes, S.M. Morais, F.A. Cunha, and E.S.B. Cavalcanti. 2005. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma* 17: 80-83.
- Block, S. and C. Baccelli, B. Tinant, L. Van Meervelt, R. Rozenberg, J.L. Habib Jiwan, G. Llabres, M.C. De Pauw-Gillet and J. Quetin-Leclercq 2004. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry* 65(8): 1165-1171.
- Block, S. and C. Stevigny, M.C. De Pauw-Gillet, E. de Hoffmann, G. Llabres, V. Adjakidje and J. Quetin-Leclercq 2002. ent-trachyloban-3 β -ol, a new cytotoxic diterpene from *Croton zambesicus*. *Planta. Med.* 68(7): 647-649.
- Boutwell, R.K. and D. Bosch and H.P. Rusch. 1957. On the role of croton oil in tumor formation. *Cancer. Res.* 17(1): 71-75.
- Brasil, D.S.B. and A.H. Muller, G.M.S.P. Guilhon, C.N. Alves, E.H.A. Andrade, J.K.R. Silva and J.G.S. Maia. 2009. Essential Oil Composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 20(6): 1188-1192.
- Burger, W. and M. Huft. 1995. Flora Costaricensis. Family 113: Euphorbiaceae. *Fieldiana Bot.* 36: 1-180.
- Cai, Y. and Z.P. Chen, and J.D. Phillipson. 1993. Diterpenes from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 32: 755-760.
- Calvin, M. 1987. Fuel oils from euphorbs and other plants. *Bot. J. Linn. Soc* 94: 97-110.
- Carneiro-Torres, D.S. and F. França, and I. Cordeiro. 2002. A família Euphorbiaceae na flora de inselbergs da região de Milagres, Bahia, Brasil. *Bolm. Bot. USP* 20: 31-47.
- Caruzo, M. 2005. Estudo taxonômico e biogeográfico do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Master Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Carvalho, J.C. and M.F. Silva, M.A. Maciel, A.C. Pinto, D.S. Nunes, R.M. Lima, and S.J. Sarti. 1996. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. *Planta Med.* 62: 402-404.
- Castelletti, C.H.M. and A.M.M. Santos, M. Tabarelli, and J.M.C. Silva. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. pp. 719-734. *In*: IR Leal, M Tabarelli, JMC Silva, *et al.* [eds.] 2003. *Ecologia e conservação da Caatinga*. Ed. Universitária-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.
- Chainy, G.B.N. and S.K. Manna, M.M. Chaturvedi, and B.B. Aggarwal. 2000. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF- κ B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. *Oncogene* 19: 2943-2950.
- Chen, Z. and Y. Cai, and J.D. Phillipson. 1994. Studies on the anti-tumor, antibacterial and wound healing properties of dragon's blood. *Planta Med.* 60: 541-545.
- Cordeiro, I. 1990. Aspectos taxonômicos e distribuição geográfica de *Julocroton* Mart. (Euphorbiaceae). *Acta Bot. Bras.* 4: 83-90.

- Cordeiro, I. 1994. *Revisão taxonômica de Julocroton Mart. (Euphorbiaceae)*, PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Cordeiro, I. and D. Carneiro-Torres. Euphorbiaceae. pp. 71-74. In: MRV Barbosa, C. Sothers, S. Mayo, C.F.L. Gamarra Rojas and A.C. Mesquita. [eds.] 2006. Checklist das plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, Brazil.
- Cordeiro, I. Euphorbiaceae. pp. 300-317. In: Stannard B [ed.] 1995. Flora of the Pico das Almas, Bahia, Kew Gardens, Surrey, United Kingdom.
- Corrêa, M.P. 1926. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, Brazil.
- Costa, J.G.M. and F.F.G. Rodrigues, E.C. Angélico, C.K.B. Pereira, E.O. Souza, G.F.R. Caldas, M.R. Silva, Nara K. A. Santos, M.L. Mota and P.F. Santos. 2008. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). Rev. Bras. Farmacogn. 18(4): 583-586.
- Costa-e-Sousa, R.H. and J.W.S. Silveira, W.S. Cortes, S. Monteath, A. Echevarria, M.A.M. Maciel, E.A. Costa, P.M. Galdino, F.F. Rocha and F.A. Vanderlinde. 2010. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico das folhas e galhos de *Croton sacaquinha* CROIZAT (Euphorbiaceae). Revista Universitária Rural, Série. Ciências da Vida. Seropédica, RJ, EDUR 30(1): 00-00.
- Craveiro, A.A. and F.J. Matos, and J.W. Alencar. 1978. Essential and fatty oils of *Croton sonderianus*. Rev. Latinoam. Quim. 9: 95-97.
- Craveiro, A.A. and J.W. Alencar, A.S. Rodrigues, C.H.S. Andrade, F.J.A. Matos, and M.I.L. Machado. 1981. Volatile constituents of Brazilian Euphorbiaceae: Genus *Croton*. J. Nat. Prod. 44: 602-608.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, USA.
- DalBo, S. and S. Jurgensen, H. Horst, D.N. Soethe, A.R.S. Santos, M.G. Pizzolatti, and R.M. Ribeiro-do-Valle. 2006. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: evidence for a role of the dopaminergic system. Pharmacol. Biochem. Behav. 85: 317-323.
- David, J.P. and M. Meira, J.M. David, H.N. Brandão, A. Branco, M.F. Agra, M.R.V. Barbosa, L.P. Queiroz, and A.M. Giulietti. 2007. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian *Caatinga* plants. Fitoterapia 78: 215-218.
- Davis, C.C. and M. Latvis, D.L. Nickrent, K. J. Wurdack and D.A. Baum. 2007. Floral gigantism in Rafflesiaceae. Science 315:1812.
- Desmarchelier, C. and F.W. Schaus, J. Coussio, and G. Cicca. 1997. Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* on the production of active oxygen radicals. J. Ethnopharmacol. 58: 103-108.
- Di Stasi, L.C. and C.A. Hiruma-Lima, and C. Akiko. 2002. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil.
- El Babili, F. and N. Fabre, and C. Moulis. 2006. Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. Fitoterapia 77: 384-387.
- Esser, H. and P.C. van Welzen, and T. Djarwaningsih,. 1997. A Phylogenetic Classification of the Malesian Hippomaneae (Euphorbiaceae). Syst. Bot. 22: 617-628.
- Farnsworth, N. and R.N. Blomster, W.M. Messmer, J.C. King, G.J. Persinos, and J.D. Wilkes. 1969. A phytochemical and biological review of the genus *Croton*. Lloydia 32: 1-28.

- Franco, E.A.P. and R.F.M. Barros. 2006. Uso e diversidade de plantas medicinais no quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8(3): 78-88.
- Freitas, L. and G. Bernardello, L. Galetto, and A.A.S. Paoli. 2001. Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 136: 267-277.
- Frodin, D. 2004. History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53: 753-776.
- Giang, P.M. and P.T. Son, Y. Hamada and H. Otsuka. 2005. Cytotoxic Diterpenoids from Vietnamese Medicinal Plant *Croton tonkinensis* GAGNEP. *Chem. Pharm. Bull.* 53(3): 296-300.
- Ginzburg, S. 1992. A new disjunct variety of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae) from Texas. *Sida* 15: 41-52.
- Giulietti, A.M. and R.M. Harley, L.P. Queiroz, M.R.V. Barboza, A.L. Bocage Neta, and M.A. Figueiredo. Espécies endêmicas da caatinga. pp. 103-118. *In*: EVSB Sampaio, AM Giulietti, J. Virginio, C.F.L. Gamarra-Rojas [eds.] 2002. *Vegetação & Flora da Caatinga*. Associação Plantas do Nordeste, Recife, Brazil.
- Gomes, A. 2006. Revisão das espécies sul-americanas de *Croton* L. *subgen. Croton* sect. *Argyroglossum* Baill. (*Crotonoideae-Euphorbiaceae*), PhD Thesis, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.
- Govaerts, R. and D.G. Frodin, and A. Radcliffe-Smith. 2000. World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae), v.2, Kew Gardens, Surrey, United Kingdom.
- Graim, J.F.S. and G.J.L. Filho, M.V.H. Brito and L.T.M.B. Matos. 2008. Histologic evaluation of rats' liver after *Croton cajucara* Benth (sacaca) administration. *Acta Cir. Bras.* 23(2): 130-134.
- Griz, L.M.S. and I.C.S. Machado. 2001. Fruiting phenology and seed dispersal syndromes in caatinga, a tropical dry forest in the northeast of Brazil. *J. Trop. Ecol.* 17: 303-321.
- Grynberg, N.F. and A. Echevarria, J.E. Lima, S.G.S.R. Pamplona, A.C. Pinto, and M.A.M. Maciel. 1999. Anti-tumor activity of two 19-nor-clerodane diterpenes: *trans*-dehydrocrotonin and *trans*-crotonin from *Croton cajucara*. *Planta Med.* 65: 687-689.
- Guerrero, M.F. and P. Puebla, R. Carron, M.L. Martin, L. Arteaga, and L. San Román. 2002. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 80: 37-42.
- Gurgel, L.A. and J.J.C. Sidrim, D.T. Martins, V. Cechinel-Filho, and V.S. Rao. 2005. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *J. Ethnopharmacol.* 97: 409-412.
- Gurgel, L.A. and R.M. Silva, F.A. Santos, D.T. Martins, P.O. Mattos and V.S. Rao. 2001. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. *Phytother. Res.* 15: 319-322.
- Gusmão, C.L.S. 2000. Citogenética da família Euphorbiaceae do nordeste brasileiro. Master Dissertation, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.
- Harley, R.M. 1996. Examples of endemism and phytogeographical elements in the caatinga flora, pp. 219-227. *In*: Anais da Reunião Especial da SBPC, Feira de Santana, Brazil.
- Hecher, E. 1977. New toxic, irritant and cocarcinogenic diterpene esters from Euphorbiaceae and from Thymelaeaceae. *Pure and Appl. Chem.* 49:1423-1431.
- Hiruma-Lima, C.A. and W. Toma, J.S. Gracioso, A.B.A. Almeida, L.M. Batista, L. Magri, A.C.B. Paula, F.R. Soares, D.S. Nunes, and A.R.M.S. Brito. 2002. Natural *trans*-crotonin: the antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 452-456.

- Inandar, J. and M. Gangadhara. 1977. Studies of the trichomes of some Euphorbiaceae. Repert. Spec. Nov. Regni. Veg. 88: 103-111.
- Jones, K. 2003. Review of the Sangre de Drago (*Croton lechleri*) – A South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: Traditional uses to clinical research. J. Altern. Complem. Med. 9: 877-896.
- Kathriarachchi, H. and R. Samuel, P. Hoffmann, J. Mlinarec, K.J Wurdack, H. Ralimanana, T.F. Stuessy and M.W. Chase. 2006. Phylogenetics of the tribe Phyllanthae (Phyllanthaceae; Euphorbiaceae *Sensu Lato*) based on nrITS and plastid matK DNA sequence data. Am. J. Bot. 93: 637-655.
- Kojima, N. and W. Sitthithaworn, E. Viroonchatapan, D.Y. Suh, N. Iwanami, T. Hayashi, and U. Sankaw. 2000. Geranylgeranyl Diphosphate Synthases from *Scoparia dulcis* and *Croton rotonsublyratus*. cDNA Cloning, Functional Expression, and Conversion to a Farnesyl Diphosphate Synthase. Chem. Pharm. Bull. 48: 1101-1103.
- Lans, C. 2007. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. J. Ethnobiol. Ethnomed. 3:13.
- Leal, I.R. and R. Wirth, and M. Tabarelli. 2007. Seed dispersal by ants in the semi-arid Caatinga of northeast Brazil. Ann. Bot. 99: 885-894.
- Lee, T. and Y. Chen and H. Chou. 1999. Toxicity Assay of Cyanobacterial Strains Using *Artemia salina* in Comparison with the Mouse Bioassay. Acta Zoologica Taiwanica 10(1): 01-08.
- Lima, L.R. and I. Cordeiro, and J.R. Pirani. 2004. Flora de Grão Mogol, Minas Gerais: *Croton* (Euphorbiaceae). Bolm. Bot. USP 22: 109-131.
- Lima, L.R. and J.R. Pirani. 2003. O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. Bolm Bot. USP 21: 299-344.
- Lima, M.G.A. and I.C.C. Maia, B.D. Sousa, S.M. Moraes, and S.M. Freitas. 2006. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. Rev. I. Med. Trop. 48: 211-214.
- Lopes e Lopes, M.I. and J. Saffi, S. Echeverrigaray, J.A.P. Henriques and M. Salvador. 2004. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. J. Ethnopharmacol. 95: 437-445.
- Lucena, M.F.A. 2001. Estudos taxonômicos do gênero *Croton* L. (Crotonoideae - Euphorbiaceae) nas zonas do litoral e da mata do estado de Pernambuco – Brasil, Master Dissertation, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.
- Lucena, M.F.A. and M.F. Sales. 2006. Tricomas Foliares em Espécies de *Croton* L. Rodriguésia 57: 11-25.
- Luna-Costa, A.M. and J.C.R. Silva, A.R. Campos, V.S. Rao, M.A. Maciel, and A.C. Pinto. 1999. Antioestrogenic effect of *trans*-dehydrocrotonin, a *nor*-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth in rats. Phytother. Res. 13: 689-691.
- Machado, I. and A. Lopes. 2004. Floral Traits and Pollination Systems in the Caatinga, a Brazilian Tropical Dry Forest. Ann. Bot. 94: 365-376.
- Maciel, M.A. and A.C. Pinto, A.C. Arruda, S.G. Pamplona, F.A. Vanderlinde, A.J. Lapa, A. Echevarria, N.F. Grynberg, I.M. Colus, R.A. Farias, A.M. Luna Costa and V.S. Rao. 2000. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. J. Ethnopharmacol 70(1): 41-55.
- Maciel, M.A.M. and J.R. Martins, A.C. Pinto, C.R. Kaiser, A. Esteves-Souza, and A. Echevarria. 2007. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their

- cytotoxic effects against Ehrlich carcinoma and human K562 leukemia cells. J. Braz. Chem. Soc. 18: 391-396.
- Mariath, I.R. and H.S. Falcão, J.M. Barbosa-Filho, L.C.F. Sousa, A.C.A. Tomaz, L.M. Batista, M.F.F.M. Diniz, P.F. Athayde-Filho, J.F. Tavares, M.S. Silva, and E.V.L. Cunha. 2009. Plants of the American continent with antimalarial activity. Braz. J. Pharmacogn. 19: 158-192.
- Martins, A.P. and L.R. Salgueiro, M.J. Gonçalves, R. Vila, F. Tomi, T. Adzet and J. Casanova. 2000. Antimicrobial activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stelulifer*, an endemic species from S. Tome and Principe. Planta. Med. 66: 647-50.
- Medina, J.M. and J.L.B. Peixoto, A.A. Silva, S.K. Haraguchi, D.L.M. Falavigna, M.L.M. Zamuner, M.H. Sarragiotto and G.J. Vidotti. 2009. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. Rev. Bras. Farmacogn. 19(1B): 207-211.
- Meeuse, A. 1990. The Euphorbiaceae Auct. Plur.: an unnatural taxon, Eburon, Delf, Netherlands.
- Metcalf, C. and L. Chalk. 1950. Anatomy of the Dicotyledones. Euphorbiaceae, v.2. Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.
- Mongelli, E. and C. Desmarchelier, A. Giulietti, J. Coussio and G. Ciccia 1995. Bioactivity of certain medicinal latexes used by the Ese'ejas. J. Ethnopharmacol 47(3): 159-163.
- Montanher, A.B.P. and M.G. Pizzolatti and I.M.C. Brighente. 2002. An Application of the Brine Shrimp Bioassay for General Screening of Brazilian Medicinal Plants. Acta Farm. Bonaerense 21(3): 175-178.
- Monte, F.J.Q. and E.M.G. Dantas, and R. Braz-F. 1988. New dipertenoids from *Croton argyrophylloides*. Phytochemistry 27: 3209-3212.
- Monteiro, M.V. and A.K.R.M. Leite, L.M. Bertini, S.M. Morais, and D.C.S. Nunes-Pinheiro. 2007. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. J. Ethnopharmacol. 111(2): 378-82.
- Morais, E.S. Cavalcanti, L.M. Bertini, C.L. Oliveira, J.R. Rodriguez and J.H. Cardozo. 2006. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 22(1): 161-4.
- Mueller Argoviensis, J. Euphorbiaceae. Eucrotoneae, 11:1-752. In: CFP Von Martius [ed.] 1873. Flora brasiliensis, Botanisches Garten, Munich, Germany.
- Nardi, G.M. and R. Felippi, S. Dalbó, M.G. Pizzolatti, and R.M. Ribeiro-do-Valle. 2003. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. Phytomedicine 10: 176-184.
- Nardi, G.M. and S. Dalbó, F.D. Monache, M.G. Pizzolatti, and R.M. Ribeiro-do-Valle. 2006. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). J. Ethnopharmacol. 107: 73-78.
- Ofusori, D.A. and O.P. Oluwayinka, A.E. Adelakun, K. S.T., K.A. Oluyemi, O.A. Adesanya, K.O. Ajeigbe and A.O. Ayoka. 2007. Evaluation of the effect of ethanolic extract of *Croton zambesicus* on the testes of Swiss albino mice. Afr. J. Biotechnol. 6(21): 2434-2438.
- Okokon, J.E. and P.A. Nwafor. 2009. Antiplasmodial activity of root extract and fractions of *Croton zambesicus*. J. Ethnopharmacol. 121(1): 74-78.
- Okokon, J.E. and P.A. Nwafor. 2010. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of ethanolic root extract of *Croton zambesicus*. Pak. J. Pharm. Sci. 23(4): 385-392.

- Okokon, J.E. and P.A. Nwafor. 2010. Antimicrobial activity of root extract and crude fractions of *Croton zambesicus*. Pak. J. Pharm. Sci. 23(1): 114-118.
- Okokon, J.E. and U.F. Umoh, J.A. Udobang and E.I. Etim. 2010. Antiulcerogenic activity of ethanolic leaf extract of *Croton zambesicus*. Afr. J. Biomed. Res. 13(2): 119-123.
- Oliveira, A.C. and J.H. Leal-Cardoso, C.F. Santos, S.M. Morais, and A.N. Coelho-de-Souza. 2001. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. Braz. J. Med. Biol. Res. 34(11): 1471-1474.
- Oliveira, A.S. and L. Senna, and M.V.S. Alves. 1989. Estudos taxonômicos sobre a família Euphorbiaceae Juss. III- *Croton urticaefolius* Lam. Sellowia 4: 17-38.
- Ortiz, J.H.T. and R.C. Mendonza, E.J.P. Cadenas and J.A. Olano. 2003. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. Rev. Med. Hered. 14(2): 81-88.
- Palmeira-Jr, S.F. and L.M. Conserva, and E.R. Silveira. 2005. Two clerodane diterpenes and flavonoids from *Croton brasiliensis*. J. Braz. Chem. Soc. 16: 1420-1424.
- Panda, S. and S. Dutta and A. Bastia. 2010. Antibacterial activity of *Croton roxburghii* balak. against the enteric pathogens. J. Adv. Pharm. Tech. Res. 1(4): 419-422.
- Paula, A.C.B. and W. Toma, J.S. Gracioso, C.A. Hiruma-Lima, E.M. Carneiro, and A.R.M.S. Brito. 2006. The gastroprotective effect of essential oil of *Croton cajucara* is different in normal rats than malnourished rats. Br. J. Nutr. 96: 310-315.
- Pereira, A.S. and A.C.F. Amaral, R.A. Barnes, J.N. Cardoso and F.R. Aquino-Neto. 1999. Identification of isoquinoline alkaloids in crude extracts by high temperature gas chromatography-mass spectrometry. Phytochem. Anal 10: 254-258.
- Peres, M.T. and F. Delle Monache, A.B. Cruz, M.G. Pizzolatti, and R.A. Yunes. 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). J. Ethnopharmacol. 56: 223- 226.
- Pimentel, M. and L. Vannucci. 2000. Lista Vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais-Brasil. Fundação Biodiversitas e Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
- Pires, M.M.Y. and L.A. Souza, and Y. Terada. 2004. Biologia Floral de *Croton urucurana* Baill. (Euphorbiaceae) ocorrente em vegetação ripária da Ilha Porto Rico, Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. Acta. Sci. Biol. Sci. 26: 209-215.
- Poersch, A. and F.V. dos Santos, M.A.M. Maciel, J.K.P. Câmara, T.N.C. Dantas, and I.M.S. Cólus. 2007. Protective effect of DCTN (trans-dehydrocrotonin) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents in vitro. Mutat. Res. – Gen. Tox. En. 629: 14-23.
- Pollito, P.A.Z. and M. Tomazello, and H.E. Takashiba. 2004. Contribuição ao conhecimento do status de conservação das espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Brasil. Nat. Conserv. 2: 42-55.
- Prozesky, E.A. and J.J.M. Meyer, and A.I. Louw. 2001. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected South African plants. J. Ethnopharmacol. 76: 239-245.
- Radcliffe-Smith, A. 1987. Segregate families from the Euphorbiaceae. Bot. J. Linn. Soc. 94: 47-66.
- Radcliffe-Smith, A. 2001. Genera Euphorbiacearum. Kew Gardens, Surrey, United Kingdom.
- Rahmatullah, M. and S.M.I. Sadeak, S.C. Bachar, M.T. Hossain, A. Montaha, N. Jahan, M.H. Chowdhury, R. Jahan, D. Nasrin, M. Rahman and S. Rahman. 2010. Brine Shrimp

- Toxicity Study of Different Bangladeshi Medicinal Plants. Adv. in Nat. Appl. Sci. 4(2): 163-173.
- Randau, K.P. and H.S. Xavier, G.S. Dimech, and A.G. Wanderley. 2002. Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespasmódica e antiulcerogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. Rev. Lecta. 20: 61-68.
- Reuben, K.D. and F.I. Abdulrahman, J.C. Akan and S.B. Aji. 2010. Comparison of the chemical constituents and in-vitro antibacterial efficacies of the extracts of *Croton zambesicus* Muell ARG. stem-bark. J. Med. Plants Res. 4(19): 2009-2015.
- Reuben, K.D. and F.I. Abdulrahman, J.C. Akan, H. Usman, O.A. Sodipo and G.O. Egwu. 2008. Phytochemical Screening and In Vitro Antimicrobial Investigation of the Methanolic Extract of *Croton zambesicus*. Eur. J. Sci. Res. 23(1): 134-140.
- Rizk, A. 1987. The chemical constituents of economic plants of the Euphorbiaceae. Bot. J. Linn. Soc. 94: 293-396.
- Rodrigues, A.C.C. and M.L.S. Guedes. 2006. Utilização de plantas medicinais no povoado Sapucaia, Cruz das Almas – BA. Rev. Bras. Plantas Med. 8:1-7.
- Rosa, M.S.S. and R.R. Mendonça-Filho, H.R. Bizzo, I.A. Rodrigues, R.M.A. Soares, T. Souto-Padron, C.S. Alviano, and A.H.C.S. Lopes. 2003. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 1895-1901.
- Sá-Haiad, B. 1987. Taxonomia e morfologia das espécies do gênero *Croton* L. seção *Croton*, subseção *Lasiogyne* (Klotzsch) Müll.Arg., série *Gonocladium* (Baill.) Müll.Arg. ocorrentes em restingas do estado do Rio de Janeiro. Master Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
- Salatino, A. and M.L.F. Salatino, and G. Negri. 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). J. Braz. Chem. Soc. 18: 11-33.
- Sandoval, M. and N.N. Okuhama, M. Clark, F. Angeles, J. Lao, S. Bustamante, and M. Miller. 2002. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. J. Ethnopharmacol. 80: 121-129.
- Sandoval, M. and S. Ayala, R. Oré, A. Loli, O. Huamán, R. Valdivieso, and E. Béjar. 2006. Capacidad antioxidante de la sangre de grado (*Croton palanostigma*) sobre la mucosa gástrica, en animales de experimentación. An. Fac. Med. Lima 67: 199-205.
- Santos, F.A. and F.A. Jeferson, C.C. Santos, E.R. Silveira, and V.S.N. Rao. 2005a. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. Life Sci. 77: 2953-2963.
- Santos, P.M.L. and J. Schripsema, and R.M. Kuster. 2005b. Flavonóides *O*-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). Braz. J. Pharmacogn. 15: 321-325.
- Sastry, A. and B. Kannabiran. 1994. Structure and distribution of foliar hairs in the tribe Crotoneae (Euphorbiaceae). Adv. Plant. Sci. 7: 84-90.
- Sátiro, L.N. and N. Roque. 2008. A Família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio Rio São Francisco, BA, Brasil. Acta. Bot. Bras. 22: 99-111.
- Secco, R. 1992. Notas sobre as lianas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae). Bolm. Mus. Paraen. Emílio Goeldi, Ser. Bot, 8: 265–281.
- Secco, R. and I. Cordeiro. 2002. Notas sobre a primeira ocorrência de *Croton urucurana* Baill. (sangra-d'água) na Amazônia brasileira. Bolm. Mus. Paraen. Emílio. Goeldi, Ser. Bot. 18: 195-201.

- Seigler, D.S. 1994. Phytochemistry and Systematics of the Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 81:380-401.
- Silva, R.M. and F.A. Oliveira, K.M. Cunha, J.L. Maia, M.A.M. Maciel, A.C. Pinto, N.R.F. Nascimento, F.A. Santos, and V.S.N. Rao. 2005. Cardiovascular effects of *trans*-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. *Vasc. Pharmacol.* 43: 11-18.
- Silva, R.M. and F.A. Santos, V.S. Rao, M.A. Maciel, and A.C. Pinto. 2001. Blood glucose and triglyceride-lowering effect of *trans*-dehydrocrotonin, a diterpene from *croton cajucara* Benth in rats. *Diabetes Obes. Metab.* 3: 452-456.
- Silva, S. 1998. Euphorbiaceae da Caatinga: Distribuição de espécies e Potencial Oleaginoso. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Simpson, M. 2006. *Plant Systematics*, Elsevier Academic Press, New York, USA.
- Smith, L.B. and R.J. Downs, and R.M. Klein. *Euphorbiaceae*. pp. 62-137. In: R Reitz [ed.] 1988. *Flora ilustrada catarinense*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Brazil.
- Soares-Filho, F. 2000. Levantamento Taxonômico da família Euphorbiaceae no Parque Estadual de Teresina-PI, Brasil, Master Dissertation, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.
- Soltis, D.E. and P.S. Soltis, P.K. Endress, and M.N Chase. 2005. *Phylogeny and evolution of angiosperms*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Soontornchainaksaeng, P. and K. Chaiyasut. 1999. Cytogenetic Investigation of some Euphorbiaceae in Thailand. *Cytologia* 64: 229-234.
- Soontornchainaksaeng, P. and P. Chantaranothai, and C. Senakun. 2003. Genetic diversity of *Croton* L. (Euphorbiaceae) in Thailand. *Cytologia* 68: 379-382.
- Souza, V. and H. Lorenzi. 2008. *Botânica Sistemática. Guia Ilustrado das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*, Instituto Plantarum, São Paulo, Brazil.
- Suarez, A.I. and Z. Blanco, R.S. Compagnone, M.M. Salazar-Bookaman, V. Zapata, and C. Alvarado. 2006. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 105: 99-101.
- Sylvestre, M. and A. Pichette, A. Longtin, F. Nagau, and J. Legault. 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J. Ethnopharmacol.* 103: 99-102.
- Thongtan, J. and P. Kittakoop, N. Ruangrunsi, J. Saenboonrueng, and Y. Thebtaranonth. 2003. New antimycobacterial and antimalarial 8,9-secokaurane diterpenes from *Croton kongensis*. *J. Nat. Prod.* 66: 868-870.
- Tieppo, M. and M. Porawski, M. Salvador, A.J. Moreira, P.S. Collado, J. Gonzáles-Gallego. and N.P. Marroni. 2006. *Croton cajucara* BENTH. Leaf Extract Scavenges the Stable Free Radical DPPH and Protects Against Oxidative Stress Induced by Paraquat. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 161-165.
- Torrico, F. and M. Cepeda, G. Guerrero, F. Melendez, Z. Blanco, D.J. Canelón, B. Diaz, R.S. Compagnone, and A.I. Suarez. 2007. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Braz. J. Pharmacogn.* 17: 166-169.
- Tresvenzol, L.M. and J.R. Paula, A.F. Ricardo, H.D. Ferreira, and D.T. Zatta. 2006. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. *Rev. Eletrôn. Farm.* 3: 22-28.
- Urbatsch, L.E. and J.D. Bacon, R.L. Hartman, M.C Johnston, T.J. Watson, and GL. Webster. 1975. Chromosome Numbers for North American Euphorbiaceae. *Am. J. Bot.* 62: 494-500.

- van Ee, B.W. and N. Jelinski, P.E. Berry, and A.L. Hipp. 2006. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. *Mol. Ecol.* 15: 2735-2751.
- Vila-Verde, G.M. and H.D. Ferreira, M.H. Rezende, and J.R. Paula. 2005. Estudo farmacognóstico das folhas do anis-do-cerrado, *Croton* aff. *zehntneri* Pax & K. Hoff. Coletado em Serranópolis, Goiás. *Rev. Eletrôn. Farm.* 2: 232-235.
- Wang, X. and M. Lan, H.P. Wu, Y.Q. Shi, J. Lu, J. Ding, K.C. Wu, J.P. Jin and D.M. Fan. 2002. Direct effect of *Croton* oil on intestinal epithelial cells and colonic smooth muscle cells. *World J. Gastroenterol.* 8(1): 103-107.
- Webster, G. 1993. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42: 793-823.
- Webster, G. 1994. Systematics of the Euphorbiaceae. *Ann. MO. Bot. Gard.* 81:144.
- Webster, G. Euphorbiaceae. pp.146-150 In: N Smith, SA Mori, A Henderson, D.W. Stevenson and S.V. Heald. [eds.] 2004. Flowering plants of the Neotropics. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Webster, G.L. and A. Laurenio, M.F.A. Lucena, and M.F. Sales. Euphorbiaceae. pp. 62-66. In: MF Sales, SJ Mayo, MJN Rodal [eds.] 1998. *Plantas Vasculares das Florestas Serranas de Pernambuco: Checklist da Flora Ameaçada dos Brejos de Altitude de Pernambuco*, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.
- Webster, G.L. and M.J. del Arco-Aguilar, and B.A. Smith. 1996. Systematic distribution of foliar trichome types in *Croton* (Euphorbiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 121: 41-57.
- Weniger, B. and L. Lagnika, C. Vonthron-Sénécheau, T. Adjibimey, J. Gbenou, M. Moudachirou, R. Brun, R. Anton, and A. Sanni. 2004. Evaluation of ethnobotanically selected Benin medicinal plants for their *in vitro* antiplasmodial activity. *J. Ethnopharmacol.* 90: 279-284.
- Williams, J.E. 2001. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. *Altern. Med. Rev.* 6: 567-579.
- Wurdack, K.J. and P. Hoffmann, and M.W. Chase. 2005. Molecular phylogeny analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae s.s.) using plastid *rbcL* and *trnL-F* sequences. *Am. J. Bot.* 92: 1397-1420.

CAPÍTULO 2

Citogenética de seis espécies de *Croton* L. (Euphobiaceae) ocorrentes no Nordeste do Brasil

A ser submetido ao periódico

Genetics and Molecular Biology

Ribeirão-Preto, SP, Brasil

ISSN 1415-4757

Citogenética de seis espécies de *Croton* L. (Euphobiaceae) do Nordeste do Brasil

Lira Neto, A.C.⁽¹⁾; Gusmão, C.L.S.⁽²⁾; Oliveira, A. M.⁽¹⁾; Carvalho, R.⁽³⁾; Brasileiro-Vidal, A.C.⁽¹⁾ e Benko-Iseppon, A.M.⁽¹⁾

- (1) Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, CCB, Depto. de Genética, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-420, Recife – PE. Email: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br
- (2) Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Unidade Acadêmica de Serra Talhada – UAST, Fazenda Saco, s/n. Caixa Postal 063. Serra Talhada – PE.
- (3) Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Depto. de Biologia, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/no, Dois Irmãos, 2171-900, Recife – PE.

Resumo

Embora o gênero *Croton* apresente seu centro de diversidade no nordeste brasileiro, poucas são ainda as informações sobre a sua diversidade genética na região. O presente estudo traz informações citogenéticas inéditas sobre dez populações de seis espécies de *Croton* classificadas em cinco seções (*Argyroglossum*, *Astraea*, *Barhamia*, *Podostachys* e *Velamea*), incluindo três contagens cromossômicas inéditas: *C. lundianus* e *C. sellowii* (ambas com $2n=20$) e *C. adenocalyx* (com $2n=40$). As demais espécies apresentaram $2n=20$, sendo que apenas *C. lobatus* diferiu, com $2n=18$. Todas as espécies apresentaram cariótipo simétrico com cromossomos meta- ou submetacêntricos de tamanho similar. Constrições secundárias foram observadas em todas as espécies, com exceção de *C. lundianus*. A coloração com nitrato de prata em *C. heliotropiifolius*, *C. adenocalyx* e *C. blanchetianus* apresentou células com número máximo de quatro nucléolos ativos para a primeira espécie, e dois para as demais. O bandeamento com DAPI/CMA₃ revelou baixo conteúdo de heterocromatina na maioria das espécies estudadas, com apenas um par CMA₃⁺/DAPI⁻. Exceções foram *Croton adenocalyx* (dois pares CMA₃⁺/DAPI⁻) e *C. lobatus*, com marcações CMA₃⁺/DAPI⁰ nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos do complemento. A hibridização *in situ* fluorescente evidenciou quatro sítios de 45S em *C. adenocalyx* e dois em *C. lundianus*. Apesar de pertencerem a seções distintas e possuírem grandes diferenças morfológicas, cinco das seis espécies aqui estudadas mostraram relativa conservação cariomorfológica, com exceção de *C. lobatus*.

Palavras chave: Evolução cromossômica, poliploidia, número básico, Crotonoideae.

Introdução

O gênero *Croton* L. é um dos maiores da família Euphorbiaceae com cerca de 1.300 espécies descritas (Govaerts *et al.*, 2001) divididas em 40 seções (Webster, 1993). No Brasil são estimadas em torno de 350 espécies distribuídas em diferentes vegetações, com uma grande concentração na região nordeste, particularmente na caatinga (Lima & Pirani, 2003; Pollito *et al.*, 2004). Desse total, cerca de 300 são consideradas endêmicas do país (Pollito *et al.*, 2004). Não existem dados exatos a respeito da representatividade do gênero no nordeste, entretanto, Cordeiro e Carneiro-Torres (2006) listaram 52 espécies.

Do ponto de vista ecológico, *Croton* aparece como um importante elemento do componente lenhoso em diferentes formações vegetacionais do Brasil, não apenas em relação ao número de espécies, mas também em ocupação espacial. Algumas espécies como *Croton blanchetianus* Baill. e *C. heliotropiifolius* Kunth. formam grandes populações que abrangem extensas áreas, principalmente no domínio da caatinga. Em alguns levantamentos fitossociológicos realizados no semi-árido nordestino, as espécies de *Croton* são frequentemente citadas entre as de maior densidade (Araújo *et al.*, 1998; Figueirêdo *et al.*, 2000).

Perry (1943) chamou a atenção para a diversidade de número e tamanho cromossômico dentro da família Euphorbiaceae, o que a torna muito interessante em termos citogenéticos. Tendo em vista os problemas de ordem taxonômica gerados devido ao grande número de espécies, variações morfológicas e de hábitos encontradas nesse grupo, informações sobre o número cromossômico, bandeamento, organização do núcleo interfásico e estudos de hibridização *in situ* podem servir como importante ferramenta para inferências sistemáticas e evolutivas (Röser e Morawetz, 1994).

Entretanto, esses dados ainda são escassos para a maioria dos grupos de angiospermas tropicais.

Em *Croton* este panorama ainda é mais difícil. Em relação ao tamanho do gênero, o número de espécies estudadas é muito pequeno. Além disso, as informações existentes referem-se quase que exclusivamente a registros de número cromossômico, não havendo publicações com outras abordagens citogenéticas. Os dados disponíveis apresentam $n=8$ e $n=32$ como sendo o menor e o maior número haplóide encontrado, respectivamente, onde $n=10$ é o mais frequente. Em relação à distribuição desses estudos, menos da metade das seções possuem espécies analisadas e algumas dessas possuem apenas um representante (*Astraea*, *Croton*, *Eremocarpus*, *Furcaria*, *Gynamblosis*, *Julocroton*, *Pilinophytum* e *Tigilium*). A seção *Drepadenium* exibiu $n=14$ cromossomos em todas as cinco espécies estudadas enquanto que em oito espécies estudadas da seção *Velamea*, os números variaram entre $n=9$, 10 e 24 (Gusmão, 2000; Pôrto, 2007; Goldblatt e Johnson, 2008).

Apesar da grande diversidade morfológica desse gênero em todos os níveis estudados e a pequena amostra de representantes analisados citogeneticamente, certo grau de conservação citológica com $n=10$ foi observado, com cromossomos similares em tamanho e morfologia. Soontorchainaksaeng e Chaiyasut (1999) propuseram que essa diversidade fenotípica seja atribuída a diferenças moleculares que não são perceptíveis quando se estuda apenas o complemento cromossômico.

Visando suprir a grande carência de dados cariomorfológicos adicionais o presente estudo visou fornecer informações citogenéticas para algumas espécies de *Croton* ocorrentes no nordeste brasileiro, incluindo análises convencionais (tipo de núcleo interfásico, comportamento de condensação, tamanho, número e estrutura dos cromossomos), bem como dados inéditos para o gênero obtidos através da coloração

com AgNO_3 , fluorocromos (CMA_3 e DAPI) e localização de sítios de DNAr 45S, inferindo sobre a diversidade e distribuição destes marcadores cromossômicos nos representantes do gênero, comparativamente a grupos relacionados.

Materiais e Métodos

As espécies estudadas foram coletadas nos estados de Pernambuco, Sergipe e Bahia, sendo mantidos na casa de vegetação do Departamento de Genética da UFPE. A tabela 1 apresenta a lista de populações e espécies estudadas, incluindo a seção pertencente, a procedência, o nome do coletor, o número cromossômico encontrado e números anteriormente reportados. A identificação taxonômica foi feita pela Dra. Maria de Fátima Lucena do Laboratório de Morfo-Taxonomia Vegetal da UFPE. As exsicatas desse material encontram-se depositadas no herbário UFP – Geraldo Mariz/UFPE (Recife, Brasil). Para as seções, seguiu-se o proposto por Webster (1993).

As análises citogenéticas foram realizadas em células obtidas a partir do meristema apical de pontas de raízes coletadas de indivíduos em crescimento. Para a obtenção de metáfases mitóticas seguiu-se pré-tratamento em 8-hidroxiquinoleína (8HQ) a 2 mM por período de 18 a 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi fixado em Carnoy (solução de etanol: ácido acético, 3:1) e estocado em *freezer* (-20°C). A coloração convencional com Giemsa seguiu a metodologia descrita por Benko-Iseppon e Morawetz (2000). Na preparação de lâminas para a coloração com os fluorocromos CMA_3 e DAPI e para a técnica de FISH, as pontas de raízes foram digeridas enzimaticamente por quatro horas a 37°C em uma solução de celulase 2% (Onozuka) e pectinase 20% (Sigma).

Para a coloração com nitrato de prata, foi utilizada a metodologia descrita por Vieira *et al.* (1990). Após o pré-tratamento, as raízes foram fixadas em etanol, ácido acético glacial e formaldeído (18:1:1, v/v/v) por 4 h à temperatura ambiente. Após lavagem em água destilada, as mesmas foram incubadas em solução aquosa de AgNO_3 20% a 60°C por pelo menos 12 h. Após a remoção de resíduos da prata, a coloração foi revelada com solução de hidroquinona 1% e formaldeído 10% (1:1, w/v) por 5 min. O esmagamento das pontas de raízes ocorreu com ácido acético 45% e uma gota de carmim acético 1%, para auxiliar na visualização sob microscopia óptica convencional. Em seguida, as lâminas foram congeladas em nitrogênio líquido, mergulhadas em etanol absoluto por 4 min, secas e montadas com *Entellan*.

Antes da aplicação dos corantes CMA₃ e DAPI, as lâminas foram envelhecidas por 3-4 dias à temperatura ambiente. A coloração com esses fluorocromos seguiu o descrito por Schweizer & Ambros (1994), sendo as lâminas coradas com CMA₃ (0,5 mg/mL, 1 h) e DAPI (2 µg/mL, 30 min), montadas em tampão McIlvaine-glicerol (1:1) e estocadas em câmara escura, por três dias. Após analisadas e fotografadas as melhores células, algumas dessas lâminas foram descoradas em etanol: ácido acético (3:1, v:v) por 30 min e depois em etanol absoluto por 1 h e estocadas a -20 °C para serem utilizadas na FISH.

Na técnica de FISH utilizou-se a sonda pTa71, contendo a unidade de repetição de DNAr 18S-5,8S-26S, oriunda de *Triticum aestivum* (Gerlach e Bedbrook, 1979). A mesma foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche), através de *nick translation*. A sonda de DNAr 5S (pTa794) foi marcada pela reação em cadeia da polimerase e hibridizada de acordo com Heslop-Harrison *et al.* (1992). A desnaturação das sondas, os banhos pós-hibridização e a detecção foram efetuados de acordo com Heslop-Harrison

et al. (1991), exceto pela lavagem de estringência que foi realizada em 0,1x SSC a 42°C.

As melhores células obtidas com análise convencional e com nitrato de prata foram fotografadas com uma câmera digital Olympus SP350, em fotomicroscópio Leica DMLB. Os cromossomos foram medidos com o programa UTHSCSA ImageTool 3.0, a fim de obter uma média para os maiores e os menores cromossomos bem como do complemento diplóide total das espécies analisadas. Para a documentação fotográfica da coloração com os fluorocromos CMA₃/DAPI e da FISH, imagens das melhores células foram capturadas em um microscópio de epifluorescência Leica DMLB, com uma câmera Leica DFC340 FX, utilizando o programa Leica CW4000.

A representação idiogramática apresentada foi gerada a partir de uma estimativa dos tamanhos dos cromossomos e braços, com a posição relativa dos marcadores representados (bandas e sinais de FISH).

Resultados

Os resultados obtidos encontram-se compilados nas Tabelas 1 e 2, estando ilustrados nas Figuras 1, 2 e 3.

Em relação ao número cromossômico, apenas as espécies *C. adenocalyx* e *C. lobatus* apresentaram números diplóides diferente de 2n=20, com 2n=40 e 2n=18, respectivamente (Tab.1). Para todas as espécies observou-se cariótipo simétrico com cromossomos meta-submetacêntricos de tamanho similar e difícil distinção individual. O padrão de condensação observado foi o proximal para todas as espécies (Figs. 1b, f, j) e os núcleos interfásicos apresentaram-se semi-reticulados (Figs. 1a, c, e, i, k). Contudo, em *C. lobatus*, observaram-se cromocentros maiores que nas outras espécies (Fig. 1g).

Apesar de nem sempre evidentes, constrições secundárias foram observadas em todas as espécies (como indicado nas Figs. 1b, 1f, 1h, 1j, 1l e 3), com exceção de *C. lundianus* (Fig. 1d e 3II). Sua localização mostrou-se variável ao longo do braço cromossômico. Em *C. adenocalyx* a forte distensão do único satélite observado aliado ao posicionamento proximal, dificultou inicialmente a contagem cromossômica dando a equivocada impressão de que o complemento cromossômico fosse composto por 41 ou 42 cromossomos (Fig. 1b).

Quanto à coloração com nitrato de prata, foram feitas contagens de nucléolos em 1.456 células de *C. heliotropiifolius*, 232 de *C. blanchetianus* e 563 de *C. adenocalyx*. A primeira e a segunda possuem células com número máximo de dois nucléolos e *C. adenocalyx* apresentou duas células com três e uma com quatro nucléolos (Fig. 1m-o e Tab. 2). Em todas as contagens, o número de núcleos com apenas um nucléolo foi superior às outras variantes.

O bandeamento com DAPI/CMA₃ revelou padrões similares entre algumas das espécies estudadas (Tab. 2). *Croton adenocalyx* (Figs. 2a-c e 3I) e *C. sellowii* (Figs. 2 q-r e 3V) apresentaram bandas CMA₃⁺/DAPI⁻ proximais em um par cromossômico que coincidiram em localização com suas constrições secundárias indicando, assim, a sua provável marcação. Adicionalmente, *C. adenocalyx* (2n=40) apresentou uma segunda marcação também CMA₃⁺/DAPI⁻ só que, dessa vez, em posição subterminal. Uma única banda CMA₃⁺/DAPI⁻ subterminal marcando o par de satélites também foi o padrão encontrado para *C. blanchetianus* (Figs. 2n-p e 3VI) e *C. heliotropiifolius* (Figs. 2i-k e 3III). Entretanto, nessa última espécie pôde-se observar claramente um heteromorfismo quanto ao tamanho e à intensidade da marcação. Estas podem ser definidas como CMA₃⁰/DAPI⁻ e CMA₃⁺⁺/DAPI⁻ (Fig. 2i-j e 3III). Uma banda CMA₃⁺/DAPI⁻ subterminal também foi observada em *C. lundianus* (Figs. 2e-g e 3II). Por sua vez, *C.*

lobatus (Figs. 2l-m e 3IV) não mostrou nenhuma similaridade com o restante do grupo, exibindo marcações $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^0$ na região pericentromérica de todos os cromossomos do complemento.

A hibridização *in situ* revelou quatro sítios de 45S em *C. adenocalyx* (Figs. 2d e 3I) com sinal menor que as marcações CMA_3 positivas (Figs. 2b-c e 3I) e 2 sítios em *C. lundianus* com tamanho e intensidade de sinal similar às marcações CMA_3^+ (Figs. 2f-g e 3II).

Discussão

O presente estudo traz informações citogenéticas para seis espécies pertencentes a cinco seções do gênero *Croton*, coletadas de dez populações naturais da região nordeste do Brasil. Destas, apenas três foram estudadas anteriormente, apresentando dados oriundos de análise convencional, como número e morfologia dos cromossomos, padrão de condensação e tipo de núcleos interfásicos. Além disso, estes são os primeiros dados obtidos com técnicas diferenciais (coloração com AgNO_3 , CMA_3/DAPI) e hibridização molecular (FISH) para o gênero.

Os números cromossômicos encontrados para *C. adenocalyx*, *C. lundianus* e *C. sellowii* são os primeiros registros para essas espécies. Por sua vez, para *C. blanchetianus* e *C. lobatus* existem contagens prévias (Brunel e Laplace, 1977; Pôrto, 2007) que foram confirmadas no presente estudo. A única população de *C. heliotropiifolius* antes estudada (Pôrto, 2007) exibiu cariótipo composto por $2n=40$ cromossomos, divergindo dos dados encontrados nas quatro populações analisadas no presente trabalho, todas com $2n=20$. O referido autor também relatou $2n=40$ como a primeira ocorrência em *C. semivestitus* o qual pertence à mesma seção de *C.*

heliotropiifolius (Velamea). Além dessas, a outra espécie no gênero a exibir conjunto cromossômico composto por $2n=40$ cromossomos foi *C. adenocalyx*, aqui estudada pela primeira vez.

A predominância do cariótipo composto por $2n=2x=20$ cromossomos aqui encontrada reflete certa tendência para o gênero, onde cerca de 60% dos representantes estudados compartilham esse número diplóide. Entretanto, menos de cinco por cento das espécies descritas taxonomicamente apresentam algum registro de número haplóide ou diplóide o que torna difícil a inferência sobre um número básico para o grupo.

Em Euphorbiaceae, o número básico $x=10$ é comum nas subfamílias Acalyphoidea e Crotonoidae podendo ser bastante derivado já que $x=7$ e $x=13$ parecem ser os mais primitivos dentro da família (Hans, 1973). Em *Croton*, entretanto, considerando-se a grande variação numérica, com cariótipos diferentes daqueles de base $n=10$, provavelmente originados por disploidia, surgiu a hipótese que $x=10$ seja o número básico primário, com $x=7, 8, 9$ figurando como os principais números básicos secundários (Urbatsch *et al.*, 1975).

A morfologia cromossômica para as espécies analisadas foi predominantemente metacêntrica e submetacêntrica, com cariótipos simétricos. Outros autores encontraram esta mesma predominância quando analisaram os cariótipos de algumas Euphorbiaceae dos gêneros *Ricinus* (Paris *et al.*, 1978), *Dalechampia* (Vanzela *et al.*, 1997) e *Manihot* (Carvalho, 1999). Entretanto, Vosa e Bassi (1991) encontraram uma predominância de cromossomos acrocêntricos e metacêntricos em oito espécies de *Euphorbia* oriundas do sudeste da África. Por sua vez, *C. pedicellatus* exibiu cariótipo bimodal com um par cromossômico bem maior que os demais (Pôrto, 2007).

A estrutura dos núcleos interfásicos do tipo semi-reticulado e o padrão de condensação do tipo proximal foram observados em todas as espécies com pequenas

variações. Este padrão também tem sido relatado em outros crótons e gêneros da família que possuem espécies com cromossomos pequenos (Gusmão, 2000, Carvalho e Guerra, 2002, Pôrto, 2007).

Os estudos com fluorocromos base específicos em Euphorbiaceae têm revelado uma heterocromatina predominantemente rica em pares de base GC. Entretanto, quanto ao número de blocos CMA₃ encontrados, os resultados têm sido variados. Gusmão (2000) encontrou marcações CMA₃⁺/DAPI⁻ subterminais em dois, três ou quatro pares cromossômicos em *Jatropha*, dois em *Chamaesyce*, um e três em *Cnidosculus*, bem como em um par em *Euphorbia insulana*. Admitiu-se que essas marcações corresponderiam às RONS nessas espécies. Vosa e Bassi (1991) aplicaram os corantes fluorescentes quinacrina e Hoechst 33258 em espécies de *Euphorbia*, indicando que as fracas bandas produzidas correspondiam às regiões organizadoras de nucléolos.

De forma geral, as bandas encontradas corresponderam em localização e tamanho à constrição secundária presente em um único par cromossômico. Exceção a este pressuposto foi encontrada em *C. lobatus* que apresentou bandas CMA₃⁺/DAPI⁰ na região pericentromérica de todos os cromossomos, indicando uma grande quantidade de heterocromatina constitutiva (HC) rica em pares de bases GC. Resultado similar foi encontrado em *Euphorbia heterophylla* que apresentou regiões CMA₃⁺ pericentroméricas em alguns cromossomos do complemento (Gusmão, 2000). Por sua vez, em *C. heliotropiifolius* as bandas CMA₃⁺ se mostraram claramente heteromórficas apresentando um tamanho maior que as bandas observadas nas outras espécies em um dos cromossomos e uma marcação de brilho quase neutro em seu correspondente. Este resultado indica a ocorrência de algum tipo de rearranjo cromossômico, como translocação, amplificação ou deleção, resultando na modificação do sítio de DNA

ribossomal em um dos homólogos acompanhada ou não de redução do tamanho do sítio no cromossomo correspondente.

O fato de *C. adenocalyx* possuir dois pares cromossômicos com marcações $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$ se deve à sua provável condição poliplóide (4x). Além dessa espécie, existem registros de apenas outras duas no gênero com $2n=40$, *C. heliotropiifolius* e *C. semivestitus*, todas com análises realizadas em apenas uma população (Pôrto, 2007). Na primeira, observaram-se dois pares satelitados divergindo do presente trabalho que estudou quatro populações com $2n=20$ e apenas um par de satélites. Estudos posteriores incluindo novas populações de *C. adenocalyx* e *C. semivestitus* podem encontrar resultados similares, principalmente se não se limitarem apenas à coloração convencional. Segundo Raven (1975) a poliploidia constitui-se em um fenômeno comum dentre as angiospermas, estimando-se que 47% delas sejam de origem poliplóide.

As duas espécies submetidas à hibridização *in situ* com a sonda de DNAr 45S apresentaram o número de sinais correspondente ao número de bandas geradas com o CMA_3 . Resultados similares foram observados em outras euforbiáceas como em *Hevea brasiliensis* (seringueira), onde foram revelados quatro sítios de hibridização de DNAr 45S correspondentes às RONS localizadas nas contrações secundárias de dois pares cromossômicos e evidenciadas com fluorocromo CMA_3 (Leitch, *et al.*, 1998). Nas espécies *Manihot esculenta* e *M. dichotoma* (Carvalho e Guerra, 2002) foram observados seis sítios de DNAr 45S, quatro maiores e dois menores. Esses sinais corresponderam a quatro das oito marcações CMA_3^+ que por sua vez, coincidem com os satélites cromossômicos observados na coloração convencional.

O número de RONS ativas observadas na coloração com nitrato de prata em *C. heliotropiifolius*, *C. blanchetianus* e *C. adenocalyx* coincidiu com os resultados obtidos

com o CMA₃ indicando a presença de dois, dois e quatro organizadores, respectivamente. Em *C. adenocalyx* esse resultado também está de acordo com as marcações obtidas com a FISH. Nessa espécie a baixa frequência de células com três (0,35%) e quatro (0,17%) nucléolos indica uma rápida fusão dos nucléolos durante a interfase, sendo necessárias contagens de um número elevado de células para que sejam registrados.

Apesar de pertencerem a seções distintas e possuírem grandes diferenças morfológicas, cinco das seis espécies aqui estudadas mostraram um bom nível de similaridade quanto aos dados citogenéticos. Em plantas, tem-se observado que grandes mudanças na morfologia podem ocorrer, mesmo com relativamente poucas alterações genéticas detectáveis, o que se deve a uma maior plasticidade em seu padrão de morfogênese, em relação a outros organismos (Gottlieb, 1984).

Por sua vez, *Croton lobatus* divergiu das outras espécies em quase todos os aspectos aqui analisados. Esses resultados, apesar de preliminares, podem estar de acordo com a proposta de Berry *et al.* (2005) que sugeriu a elevação da seção *Astraea*, a qual essa espécie pertence, à condição de gênero. Essa sugestão se baseia nos resultados obtidos com estudos filogenéticos de espécies de *Croton*, e de outros gêneros tidos como correlatos, através de sequências de ITS e DNA plastidial. A publicação citada posicionou os dois representantes dessa seção fora do grande clado formado para o gênero. Estudos citogenéticos como os aqui reportados em outros representantes dessa seção, bem como para as seções ainda não estudadas, certamente contribuirão na resolução dessa e de outras questões taxonômicas relativas ao grupo.

Referências Bibliográficas

- Araújo FS, Sampaio EVSB, Rodal, MJN and Figueiredo MA (1998) Organização comunitária do componente lenhoso de três áreas de carrasco em Novo Oriente – CE. Ver Bras Biol 58:85-95.
- Benko-Iseppon AM, Morawetz W (2000) Viburnales: cytological features and a new circumscription. Taxon 49: 5-16.
- Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, VAN EB and Riina R (2005) Molecular phylogenetics of the giants genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu strictu) using *ITS* and *trnL-trn-F* DNA sequence data. Amer J Bot 92(8):1520-1534.
- Brunel JF, Laplace A (1977) In IOPB chromosome number reports LVIII. Taxon 26: 557-565.
- Carvalho R (1999) Citogenética de *Manihot esculenta* Crantz e oito espécies afins. Master's thesis, MBV/UFPE, Recife, PE.
- Carvalho R and Guerra M (2002) Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (Cassava) and eight related Species. Hereditas, 136: 159-168.
- Cordeiro, I and Carneiro-Torres, D (2006) Euphorbiaceae. In: M. Barbosa *et al.*, (eds.) Checklist das plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas. MMA, Brasília. pp. 71-74.
- Figueirêdo LS, Rodal MJN and Melo AL (2000) Florística e fitossociologia de uma área de vegetação arbustiva espinhosa no município de Buíque. Naturalia 25: 205-224.
- Gerlach WL, Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucleic Acids Research 7:869-1885.
- Goldblatt P and Johnson DE (2008) *Index to Plant Chromosome Numbers*. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1979-2008. Disponível em: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>. Acesso em 22 de setembro de 2008.

- Gottlieb LD (1984) Genetics and morphological evolution in plants. *The American Naturalist* 123:681-709.
- Govaerts R, Frodin, DG and Radcliffe-Smith A (2001) *Croton*: In world Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae 2, with Pandaceae. Royal Botanic Gardens Kew, London, pp 417-536.
- Gusmão CLS (2000) Citogenética da família Euphorbiaceae no nordeste brasileiro, PE. Master's thesis, PPGG/UFPE, Recife, PE.
- Hans AS (1973). Chromosomal conspectus of the Euphorbiaceae. *Taxon* 22 (5/6): 591-636.
- Heslop-Harrison JS, Schwazarcher T, Ananthawat-Jónsson K, Leitch AR and Shi M (1991) *In situ* hybridization with automated chromosome desnaturation. *Technique*, 3: 109-115.
- Heslop-Harrison JS, Harrison GE, Leitch IJ (1992) Reprobing of DNA: DNA *in situ* hybridization preparations. *Trends in Genetics* 8:372-373.
- Leitch AR, Lim KY, Leitch, IJ O'Neill M, Cheye M, Low F (1998) Molecular cytogenetic studies in rubber, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). *Genome* 41:464-467.
- Lima LR and Pirani JR (2003) O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. *Bolm Bot USP* 21:299-344.
- Paris HS, Shifriss O, Jelenkovic G (1978) Idiogram of *Ricinus communis*. *Journal of Heredity* 69:191-196.
- Perry BA (1943) Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. *Amer J Bot* 30:527-543.
- Pollito PAZ, Tomazello M, Takashiba HE (2004) Contribuição ao conhecimento do status de conservação das espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Brasil. *Natureza e Conservação* 2:42-55.

- Pôrto NA (2007) Citotaxonomia de espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae: Crotonoideae) ocorrentes no Nordeste do Brasil. Master's thesis PPGA/UFPB, Areia, PB.
- Raven PH (1975) The bases of Angiosperm phylogeny: cytology. *Ann Miss Bot Gard* 62: 724-764.
- Röser M and Morawetz W (1994) Karyology and cytogenetics. *Progr In Bot* 55:334-343.
- Schweizer D and Ambros PF (1994) Chromosome Banding, In: GOSDEN, J. R. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*. Humana Press: Totowa 29:97-112.
- Soontornchainaksaeng P and Chaiyasut K (1999) Cytogenetic investigation of some Euphorbiaceae in Thailand. *Cytologia* 64: 229-234.
- Urbatsch LE, Bacon JD, Hartman RL, Johnston MC, Watson-Jr TJ and Webster GL (1975) Chromosome numbers for North American Euphorbiaceae. *Am J Bot* 62: 494-500.
- Vanzela ALL, Ruas PM and Marin-Morales MA (1997) Karyotype studies of some species of *Dalechampia* Plum. (Euphorbiaceae). *Bot Jour of the Linn Soc* 125: 25-33.
- Vosa CG and Bassi P (1991) Chromosome studies in the Southern African flora. 95-102. The basic karyotype of eight species of succulent *Euphorbia* L. *Caryologia* 44: 27-33.
- Webster GL (1993) A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42:793-823.

Tabela 1: Relação de espécies de *Croton* analisadas informando seções, procedência e contagens cromossômicas previamente reportadas.

Espécie	Seção	Local de Coleta e Coletores	Estudos Prévios (literatura)			
			(2n)	n	2n	Autor/Ano
<i>Croton adenocalyx</i> Baill.	<i>Barhamia</i>	Sergipe, Porto da Folha; M.F.A. Lucena	40	-	-	-
<i>Croton blanchetianus</i> Baill. <i>Argyroglossum</i>		Pernambuco, Mirandiba, Vertentes; M.F.A. Lucena	20	-	20	Pôrto, 2007
		Pernambuco, Mirandiba, Faz. Tigre; M.F.A. Lucena	20			
		Pernambuco, Mirandiba, Faz. Baixa Grande; M.F.A. Lucena	20			
<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth <i>Velamea</i>		Sergipe, Porto da Folha; M.F.A. Lucena	20	-	40	Pôrto, 2007
		Bahia, Senhor do Bonfim; L.P. Felix 11720	20			
		Pernambuco, Buíque; C.L.S. Gusmão 10.08.04.99	20			
		Pernambuco, Petrolina; C.L.S. Gusmão 04.23.02.99	18	9	-	Brunel e Laplace, 1977 Pôrto, 2007
<i>Croton lundianus</i> Müll.	<i>Podostachys</i>	Sergipe, Itabaiana, Parque Nacional da Serra de Itabaiana, Subida da Serra; M.F.A. Lucena	20	-	-	-
<i>Croton sellowii</i> Baill.	<i>Argyroglossum</i>	Sergipe, Itabaiana, Parque Nacional da Serra de Itabaiana, Riacho dos Coqueiros; M.F.A. Lucena	20	-	-	-

Tabela 2: Relação de espécies de *Croton* analisadas apresentando os principais dados citogenéticos obtidos no presente estudo.

Espécie	(2n)	Nível de ploidia	Tamanhos max. e Min. em µm	Morfologia cromossômica predominante	Número de pares de satélitos	Número max. de núcleolos com AgNO ₃	Padrão CMA ₃ /DAPI	Marcação com sonda DNAr 45S
<i>Croton adenocalyx</i> Baill.	40	4x	1,8 – 1,03	M; SM	1	4 (0,17%)*	CMA ₃ ⁺ /DAPI ⁺ subterminal em 1 par de cromossomos e proximal em outro par	4 marcações pequenas
<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	20	2x	1,54 – 1,17	M; SM	1	2 (30,6%)*	CMA ₃ ⁺ /DAPI ⁺ subterminal em 1 par de cromossomos	-
<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth.	20	2x	3,93 – 2,05	M; SM	1	2 (25,7%)*	CMA ₃ ⁺⁺⁺ /DAPI ⁻ - CMA ₃ ⁰ /DAPI ⁺ subterminal em 1 par de cromossomos com polimorfismo na marcação	-
<i>Croton lobatus</i> L.	18	2x	1,9 – 0,92	M; SM	-	-	CMA ₃ ⁺ /DAPI ⁰ pericentromérica em todos os cromossomos	-
<i>Croton lundianus</i> Müll.	20	2x	3,06 – 1,36	M; SM	-	-	CMA ₃ ⁺ /DAPI ⁺ subterminal em 1 par de cromossomos	2 marcações similares às bandas CMA ₃ ⁺
<i>Croton sellowii</i> Baill.	20	2x	2,21 – 1,43	M; SM	-	-	CMA ₃ ⁺ /DAPI ⁺ proximal em 1 par de cromossomos	-

*Corresponde à frequência de células com o número máximo de núcleolos.

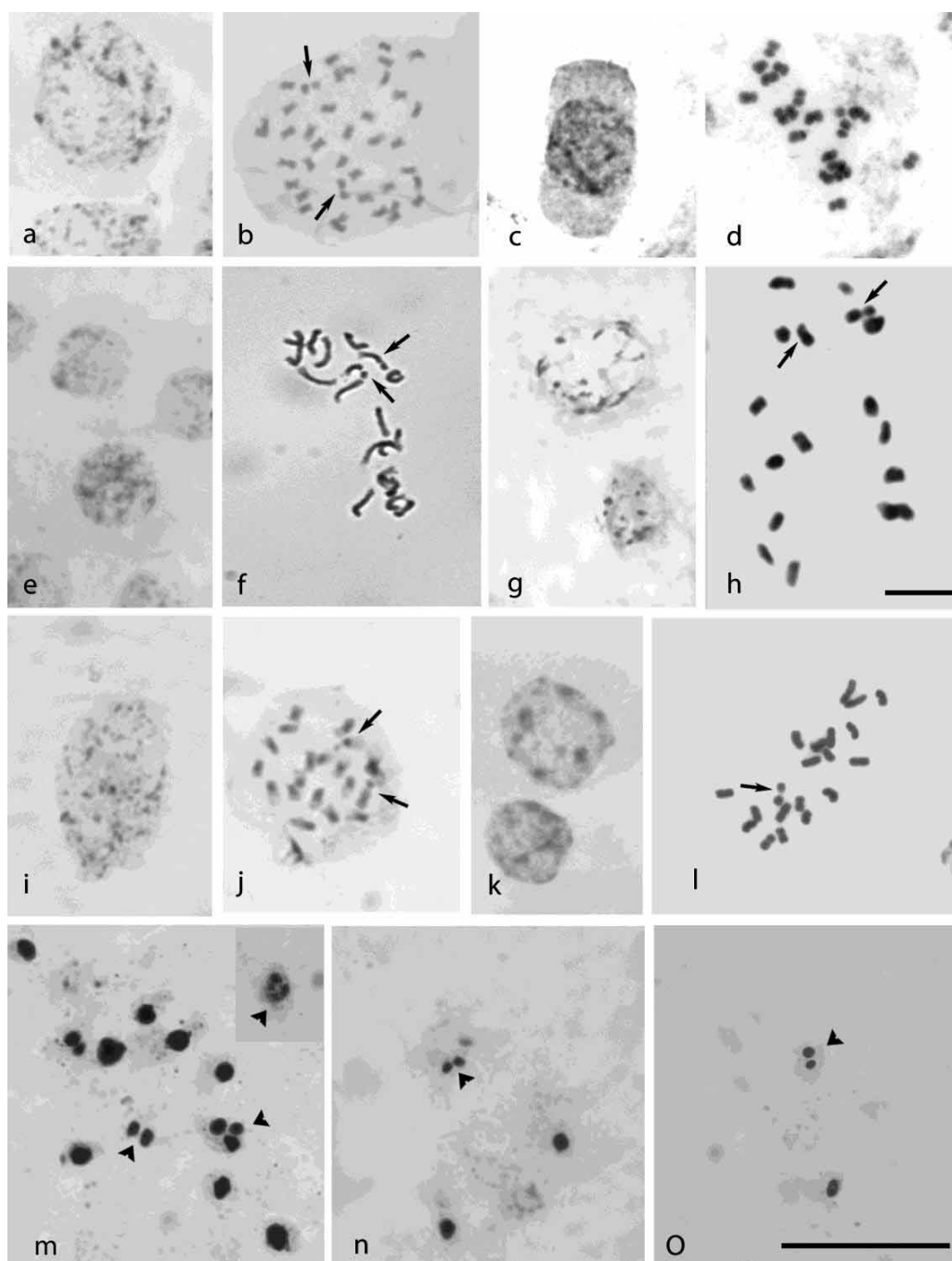


Figura 1: Coloração convencional com Giemsa (**a-l**) e com nitrato de prata (**m-o**) em cromossomos e núcleos interfásicos de *Croton*. (**a-b**) *Croton adenocalyx*, $2n=40$; (**c, d, m**) *C. lundianus*, $2n=20$; (**e, f**) *C. heliotropiifolius*, $2n=20$; (**g, h, n**) *C. lobatus*, $2n=18$; (**i, j**) *C. blanchetianus*, $2n=20$ e (**k, l, o**) *C. sellowii*, $2n=20$. As setas apontam constrições secundárias. Em **m** as cabeças de seta indicam núcleos com dois, três e quatro (detalhe) nucléolos. Em **n** e **o** são destacados apenas núcleos com dois nucléolos. A barra em (**o**) exclusiva para as figuras **m, n** e **o** enquanto a barra em (**h**) refere-se às demais células, sendo ambas equivalentes a 5 μm .

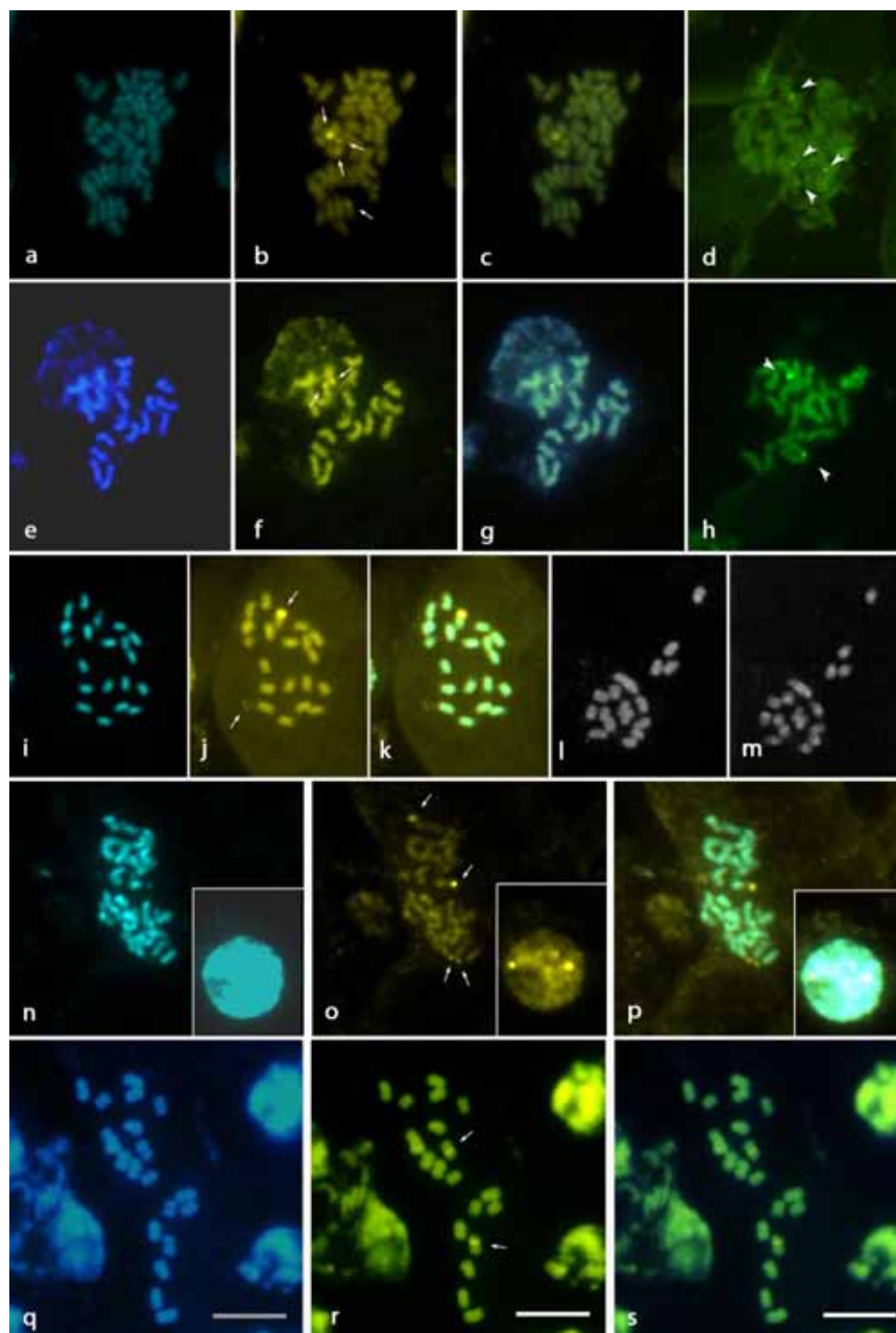


Figura 2: Cromossomos de *Croton* após coração com DAPI (a, e, i, l, n, q); CMA (b, f, j, m, o, r) e sobreposição CMA/DAPI (c, g, k, p, s). Em (d, h) marcação com a sonda de DNAr 45S (FISH). (a-d) *C. adenocalyx*; (e-h) *C. lundianus*; (i-k) *C. heliotropiifolius*; (l-m) *C. lobatus*; (n-p) *C. blanchetianus* e (q-s) *C. sellowii*. As setas destacam as bandas CMA positivas e as cabeças de seta, as marcações 45S. Em (n, o, p) as fotos exibem duas células em prometáfase e no detalhe uma intérfase. A barra corresponde a 5 μ m.

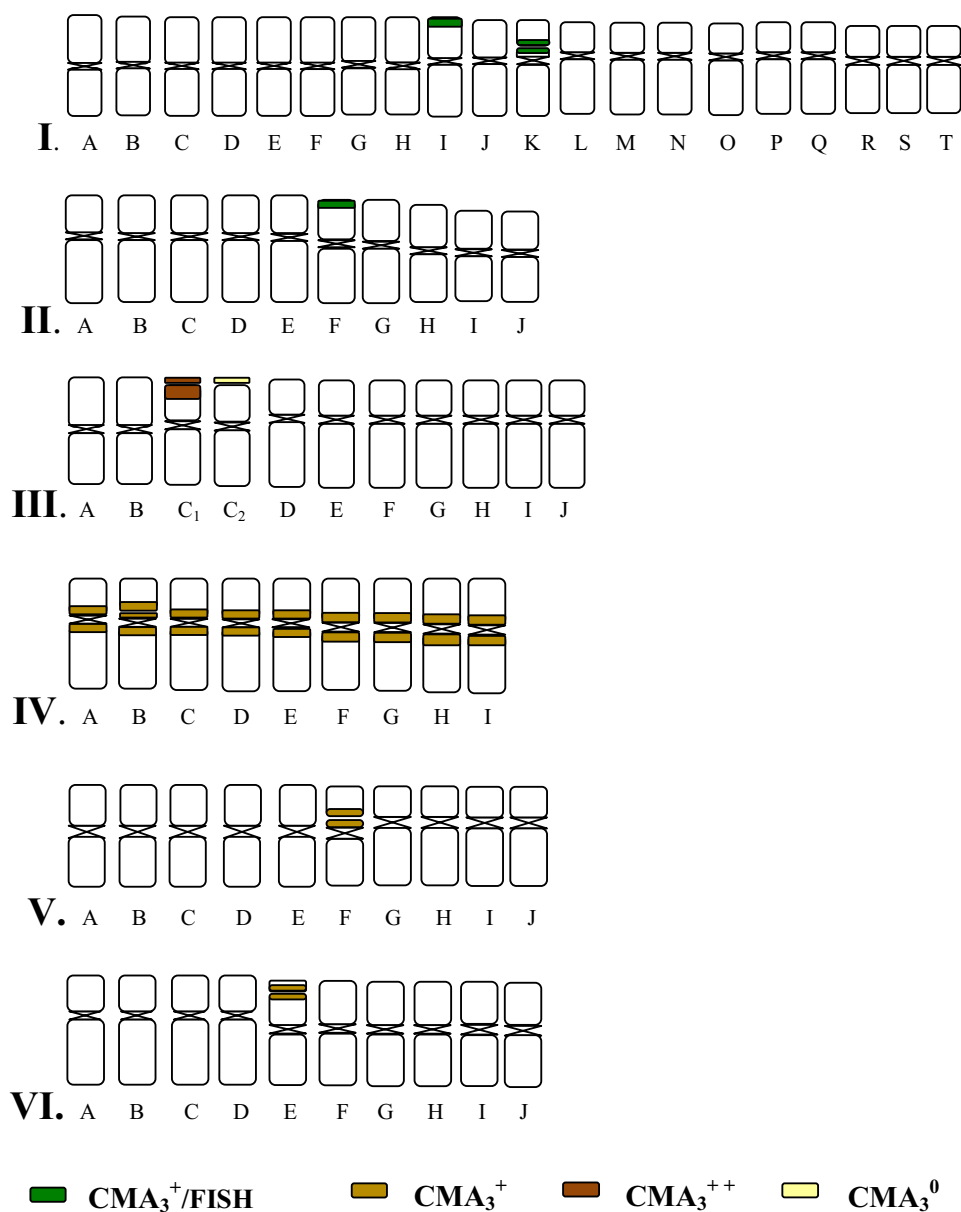


Figura 3: Representação idiogramática dos cariótipos das espécies de *Croton*. **I.** *C. adenocalyx*; **II.** *C. lundianus*; **III.** *C. heliotropiifolius*; **IV.** *C. lobatus*; **V.** *C. sellowii* e **VI.** *C. blanchetianus*. Esquema representativo da distribuição dos marcadores cromossômicos indicados, não considerando medições precisas da posição ou proporções do tamanho relativo dos braços.

CAPÍTULO 3

Seleção de *primers* para de DAF e ISSR para a avaliação de diversidade genética em dois gêneros de Euphorbiaceae (*Croton* L. e *Chamaesyce* Gray) com *fingerprinting* de DNA

A ser submetido ao periódico

Revista Brasileira de Biociências
(*Brazilian Journal of Bioscience*)

Porto Alegre, RS, Brasil

eISSN 1980-4849

Seleção de *primers* de DAF e ISSR para a avaliação de diversidade genética em dois gêneros de Euphorbiaceae (*Croton* L. e *Chamaesyce* Gray) com *fingerprinting* de DNA

Amaro Castro Lira Neto⁽¹⁾; Diego Sotero de Barros Pinangé⁽¹⁾; Karla Camila Barbosa Santana⁽¹⁾; Reginaldo de Carvalho⁽²⁾; Marccus Vinicius Alves⁽¹⁾ e Ana Maria Benko-Iseppon⁽¹⁾.

RESUMO - Os gêneros *Croton* e *Chamaesyce* (Euphorbiaceae) apresentam significativa diversidade nas regiões tropicais do planeta, com espécies na maioria dos ecossistemas do Nordeste Brasileiro, várias delas com importância fitoterápica e ecológica. O presente estudo investigou a eficiência dos marcadores DAF (DNA Amplification Fingerprinting) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) no acesso à variabilidade genética dos gêneros *Croton* e *Chamaesyce*, efetuando uma seleção de *primers* para aplicação em estudos filogenéticos e populacionais. Para tal, foram utilizados quatro indivíduos de três espécies de *Croton* L. (*C. heliotropiifolius*, *C. blanchetianus* e *C. pedicellatus*) e quatro de duas espécies de *Chamaesyce* (*C. hirta* e *C. thymifolia*). Considerando os 29 *primers* DAF aplicados para *Croton*, foram gerados 374 *loci*, onde 359 foram polimórficos, apresentando um índice de divergência genética global (Dg) de 95%. Já para *Chamaesyce*, dos 42 *primers* testados, 581 *loci* foram amplificados, sendo 494 polimórficos (85% de Dg global). A partir dos 17 *primers* ISSR testados para *Croton*, foram originados 327 *loci*, onde 317 apresentaram-se polimórficos (Dg global de 96%). No que diz respeito ao gênero *Chamaesyce*, dos 15 oligonucleotídeos, 193 *loci* foram gerados, com 140 polimórficos (Dg global de 72%). O elevado número de polimorfismos encontrados evidenciou a eficiência das metodologias em inferir índices de variabilidade genética. Em todos os fenogramas gerados, os valores de *bootstrap* foram consistentes (acima de 80). Observou-se, ainda, uma coerência na topologia dos táxons em ambos os grupos, uma vez que houve uma separação interespecífica e um agrupamento intra-específico com boa sustentação. Os dados obtidos demonstraram a consistência dos marcadores em inferir diversidade genética nos gêneros estudados, mostrando seu potencial para análises incluindo maior número de amostras em nível intra e interespecífico.

Palavras-chave: Variabilidade genética, Marcadores moleculares, Flora do Nordeste Brasileiro, Floresta Atlântica, DAF, ISSR.

⁽¹⁾Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, CCB, Genética e Botânica, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-420, Recife –PE, Brasil. Email: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

⁽²⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Biologia, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/no, Dois Irmãos, 52171-900, Recife –PE, Brasil.

Primer selection for evaluation of the genetic diversity in two Euphorbiaceae genera (*Croton* L. and *Chamaesyce* Gray) using DNA fingerprinting

ABSTRACT - Euphorbiaceae is a family represented by 222 genera and about 5970 species. The genera *Croton* and *Chamaesyce* present significant diversity in tropical regions, with representatives in most ecosystems in the Brazilian Northeast, many of them with important roles as phytotherapeutics and also ecologically. This study investigated the efficiency of DAF (DNA *Amplification Fingerprinting*) and ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) markers to access the genetic variability of *Croton* and *Chamaesyce*, including a primer selection for phylogenetic and population evaluations. For this purpose samples from four individuals of three *Croton* species (*C. heliotropiifolius*, *C. blanchetianus* and *C. pedicellatus*) and four individuals of two *Chamaesyce* species (*C. hirta* and *C. thymifolia*) were used. Considering the 29 DAF primers used for *Croton*, a total of 359 polymorphic bands were generated, with a global index of genetic divergence (Dg) of 95%. Regarding *Chamaesyce*, 42 primers were tested, resulting in 581 amplified *loci*, from which 494 were polymorphic (global Dg 85%). The high number of polymorphisms obtained demonstrated the efficiency of both methods to infer genetic variability in both groups. In all phenograms generated, the bootstrap values were consistent (above 80). A coherency in the topology of taxa in both groups was observed, since inter and intra-specific groups were separated with good support. The acquired data demonstrated the consistency of the markers to infer genetic diversity in the genera studied, showing its potential for further evaluations including a higher number of samples at the intra and inter-specific levels.

Keywords: Genetic variability, molecular markers, Brazilian Northeastern flora, Atlantic Rainforest, DAF, ISSR.

⁽¹⁾Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, CCB, Genética e Botânica, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-420, Recife –PE, Brasil. Email: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

⁽²⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Biologia, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/no, Dois Irmãos, 52171-900, Recife –PE, Brasil.

INTRODUÇÃO

Euphorbiaceae apresenta grande riqueza taxonômica e endemismos na região nordeste do Brasil. O gênero *Croton* L. é considerado um dos maiores e mais diversificados dentre as angiospermas com cerca de 1300 espécies. Apesar da maior parte de seus representantes se concentrarem nas Américas, o gênero também ocorre na África, na Ásia e na Oceania. Nas Américas, apresenta uma distribuição exclusivamente tropical, sendo registrado desde o sudeste dos Estados Unidos até a Argentina, com os principais centros de diversidade no Brasil, no México e nas Antilhas (Govaerts *et al.*, 2001).

O gênero *Chamaesyce* Gray, por sua vez, destaca-se pela presença de espécies pioneiras e bioindicadoras de ambientes degradados, ocorrendo em fragmentos urbanos e periurbanos. As plantas deste gênero, em geral, possuem grande plasticidade quanto a seus mecanismos de adaptação a ambientes impactados, tratando-se de um grupo de ampla ocorrência (Erasmus *et al.*, 2004), o que desperta o interesse de pesquisadores para o entendimento dos processos ecológicos, genéticos e biossistemáticos do grupo.

O elevado número de espécies e a destacada variabilidade morfológica e de hábitos encontrada nesses grupos estão entre os fatores que os tornam taxonomicamente complexos, gerando sérios problemas de nomenclatura e tipificação. Adicionalmente, outra dificuldade para estudos dos gêneros citados, decorre da má delimitação dos grupos infragenéricos. Apesar de sua diversidade e importância, o estudo mais recente e aceito sobre a classificação infragenérica em *Croton* foi elaborado por Webster (1993), que reconheceu 40 seções.

O acesso à diversidade genética via marcadores moleculares de DNA associados a sofisticadas ferramentas computacionais têm contribuído significativamente para o entendimento dos processos históricos (bióticos e abióticos) que modulam a diversificação intra-específica da biota, especificamente a diversidade populacional (Templeton, 1998; Avise 1994, 2000; Posada e Crandall 2001; Ali *et al.*, 2004).

Segundo Faith (1992) e Vane-Wright *et al.* (1991), a diversidade filogenética compõe o índice da biodiversidade que mensura a amplitude dos caminhos evolutivos que conectam os táxons, onde estudos de variabilidade podem indicar centros de diversidade, origem e dispersão. Neste particular, inferências moleculares podem ser importantes na identificação de tais centros e de tendências de dispersão, tratando-se de ferramentas primordiais na reconstrução filogenética dos grupos. Para os gêneros em questão, os estudos de filogenia molecular, incluindo *fingerprinting* de DNA, ainda são escassos, havendo necessidade de uma maior amostragem principalmente incluindo espécies do novo mundo, região proposta como centro de diversificação do grupo (Berry, *et al.*, 2005, Van, *et al.*, 2006).

Em relação aos marcadores de *fingerprinting* utilizados no presente trabalho, a metodologia de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) tem demonstrado eficiência em estudos de diversidade genética, com prévia utilização para avaliar a variabilidade genética em populações de *Ricinus communis* L., revelando um elevado número de polimorfismos, já em nível de seleção de *primers*, fato confirmado na posterior análise de variabilidade de populações subespontâneas (Oliveira, 2004).

Os marcadores do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) são gerados a partir de primers ancorados em regiões com padrões repetitivos, abundantes ao longo do genoma de eucariontes, as quais evoluem rapidamente devido ao seu caráter preferencialmente não-codificante (Fang e Roose, 1997; Esselman *et al.*, 1999). Esses marcadores têm sido utilizados em diversos estudos para análise de variabilidade entre linhas híbridas de plantas cultivadas, em híbridos naturais e na detecção da variabilidade genética de populações (Wolfe e Randle 2001; Souza *et al.*, 2005; Woods *et al.*, 2005; Slotta e Potter, 2006).

O objetivo da presente investigação foi investigar a eficiência dos marcadores moleculares DAF e ISSR no acesso à variabilidade genética em representantes da família Euphorbiaceae (*Croton* e *Chamaesyce*), além da seleção qualitativa de *primers* candidatos para

análises futuras envolvendo um maior espectro amostral de indivíduos e espécies destes gêneros, subsidiando e revelando os níveis de diversidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do Material Biológico

Membros de quatro populações de três espécies do gênero *Croton* [*C. heliotropiifolius* Kunth (CHT0201), *C. blanchetianus* Baill (CBT0201 e CBT0404) e *C. pedicellatus* Kunth (CPD0204)] foram coletados nos Municípios de Mirandiba – PE, Porto do Folha –SE e no Riacho dos Coqueiros, no Parque Nacional Serra de Itabaiana – SE (Tab. 1). Representantes de *Chamaesyce hirta* (L.) Millsp. (CH1) e *Chamaesyce thymifolia* (L.) Millsp. (CH2) foram coletados em fragmentos de mata atlântica na cidade de Recife, localizados no entorno da Reserva Ecológica de Dois Irmãos, em áreas ruderais (Ilha do Bananal, Estrada dos Passarinhos) e do campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), totalizando quatro indivíduos distribuídos em três populações (Tabela 1). Em relação aos indivíduos de *Croton*, todo material coletado foi transportado para a casa de vegetação do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco) onde foram mantidas sob cultivo. Para os indivíduos pertencentes às espécies de *Chamaesyce*, foram coletadas coletadas *in loco* e acondicionadas diretamente a -20°C para subsequente extração de DNA.

Extração do DNA Genômico

Folhas jovens, frescas e livres de patógenos foram coletadas para extração do DNA genômico. O isolamento foi realizado conforme o protocolo descrito por Weising *et al.* (2004), com modificações relacionadas à proporção do material vegetal fresco utilizado (aprox. 1g) para um volume de 15mL de tampão de extração, além da inclusão de uma única lavagem em

clorofórmio/álcool isoamílico (CIA). A quantificação do DNA foi efetuada pelo método comparativo em gel de agarose a 1,2% utilizando-se diferentes concentrações de λ -DNA como referencial.

Geração de Marcadores Moleculares

A geração de marcadores DAF seguiu a metodologia descrita por Caetano-Anollés *et al.* (1991) com as modificações introduzidas por Winter *et al.* (2000) e Benko-Iseppon *et al.* (2003), bem como com modificações adicionais conforme descrito a seguir. A reação foi composta por 0,5 ng de DNA, 1,5 μ L 10x PCR buffer, 2,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de dNTP-mix (LGC), 20 μ M de *primers* (decâmeros ou 15-meros, degenerados ou não; Tab. 2 e 4) e 0,2 μ L (concentração final de 1 U) de ‘*Taq* DNA polimerase’, ajustando-se o volume final da reação para 15 μ L.

A reação de amplificação ocorreu em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradiente com 2 min. de desnaturação inicial a 95°C, seguidos de 40 ciclos compostos de três etapas: desnaturação de 15 seg a 95°C; anelamento de 1 min. a 35°C e alongamento de 2 min. a 72°C. Ao final dos 40 ciclos a reação foi completada com um alongamento final de 2 min. a 72°C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,8%), corados com brometo de etídio (5 μ L/100 mL de gel), visualizados e fotografados sob luz ultravioleta com câmera digital Sony Cybershot W5 (zoom óptico de 3.0 Megapixel).

As reações de ISSR seguiram a metodologia descrita por Bornet e Branchard (2001), com modificações segundo Amorim (2009). O volume total da reação consistiu de 20 μ L com reagentes distribuídos da seguinte forma: Concentração final de 5 ng do DNA genômico para *Croton* e 10 ng para *Chamaesyce*, 10x buffer (2 μ L), 25mM $MgCl_2$ (2 μ L), 10mM dNTP-mix (1,5 μ L), 50 pmol de *primer* (1 μ L) e 5 U *Taq* DNA polimerase (0,15 μ L). As condições dos ciclos de PCR foram: desnaturação a 94°C por 4 min.; 35 ciclos a 94°C por 30 s; anelamento a

52°C e 52,8°C (dependendo do *primer* utilizado) por 45 s; 72°C por 2 min. e extensão final de 7 min. a 72°C (Tab. 3 e 5), com produtos separados e documentados a partir de gel de agarose como descrito anteriormente.

Seleção de Primers

Para a seleção qualitativa dos *primers* foram utilizadas amostras de DNA de quatro indivíduos, procedentes do banco de DNA que foi antecipadamente montado em ambos os grupos. Primeiramente, para *Croton*, o experimento de DAF foi montado da seguinte maneira: CHT0201 – amostra 1, CPD0204 – amostra 2, CBT0201 – amostra 3 e CBT0404 – amostra 4. Para o experimento de ISSR, apenas a ordem amostral foi modificada: CHT0201 – amostra 1, CBT0201 – amostra 2 e CBT0404 – amostra 3 e CPD0204 – amostra 4. Em *Chamaesyce*, para ambas as metodologias, três indivíduos de *Chamaesyce hirta* oriundas de duas populações (Campus UFPE - CH1UF2 e Estrada dos Passarinhos - CH1EP5 e CH1EP6) foram utilizados, ao passo que um espécime de *Chamaesyce thymifolia* da população referente à Ilha do Bananal completou o experimento. Foram utilizados 29 e 17 decâmeros para seleção de DAF e ISSR, respectivamente, em *Croton*. Por sua vez, na seleção realizada no gênero *Chamaesyce*, 42 e 15 decâmeros para DAF e ISSR foram testados respectivamente. Embora haja diferença no número de *primers* testados nos dois grupos analisados, muitos deles foram compartilhados nos experimentos propostos. As sequências (5'-3') encontram-se listadas nas Tab. 2 e 3, para *Croton* e 4 e 5 para *Chamaesyce*.

Análise dos polimorfismos

Analisou-se a capacidade dos *primers* testados em acessar a variabilidade genética dos indivíduos (Tabelas 2, 3, 4 e 5) nos níveis inter e intraespecífico, gerando assim percentuais de polimorfismos por *primer* de acordo com Nei (1972) nos dois grupos de análise. Assim, os géis,

depois de fotografados, foram analisados pelo critério visual de presença e ausência de bandas (fragmentos de DNA) para cada tamanho (peso molecular) encontrado nos distintos iniciadores, gerando matrizes binárias para análise fenética.

A partir das matrizes de similaridade, foram calculados os índices percentuais de divergência genética (Dg%) para cada metodologia nos dois grupos de indivíduos de acordo com a divisão do número total de *loci* variantes (Ntlv) gerados, em relação ao número total de *loci* disponíveis (Ntl). Diante destes resultados, levou-se primeiramente em consideração o número de polimorfismos que, somados, fosse superior ou igual a 200 bandas polimórficas. Em seguida, observou-se a correlação positiva entre o número de polimorfismos gerados com seu respectivo percentual em relação ao total de *loci* amplificados (Dg%).

Dados duvidosos ou bandas fracas foram designados como dados faltantes (*missing data*). As matrizes geradas (DAF e ISSR) para averiguação da variabilidade foram alinhadas e analisadas pelo método *Neighbor-Joining* (NJ, com *bootstrap* de 1.000 replicações) ajustando-se os parâmetros para *complete deletion* e *p-distance*, através do programa MEGA 4.1. Para cada categoria de marcador (DAF e ISSR), dois fenogramas foram produzidos em *Croton* e para metodologia de DAF em *Chamaesyce*. Primeiramente, aquele oriundo das matrizes com todos os *primers* empregados para averiguar a eficiência da metodologia e, posteriormente, um segundo a partir da análise dos produtos dos oligonucleotídeos mais informativos para cada marcador. Todavia, para o experimento de ISSR em *Chamaesyce*, como nos 15 iniciadores testados não houve um polimorfismo superior a 200 marcas, somente o fenograma com todos os *primers* foi gerado.

RESULTADOS

Dos 29 *primers* randômicos DAF testados em *Croton*, foram geradas 374 marcas, onde 359 foram polimórficas, apresentando um índice de divergência genética global (Dg) de 95%. Dos 17 *primers* de ISSR testados, foram originados 327 *loci*, com 317 polimórficos em escala global (Dg global de 96%). Assim, percebeu-se uma equivalência dos marcadores na detecção da variabilidade genética nos indivíduos analisados.

Em *Chamaesyce*, dos 42 *primers* DAF, 581 fragmentos de DNA foram gerados e destes, 494 foram polimórficos, revelando um índice de divergência genética global de 85%. No entanto, os 15 iniciadores para ISSR testados geraram 193 *loci* dos quais 140 mostraram-se divergentes, expondo um Dg global de 72%.

Os *primers*, de um modo geral, apresentaram elevados valores percentuais de Dg nas duas metodologias, quando somente os dados percentuais de divergência foram levados em consideração (Tab. 2, 3, 4 e 5).

Para o DAF, observou-se que, de acordo com os critérios utilizados para ordenar os *primers*, o que obteve a maior correlação positiva entre o número de *loci* e o Dg em *Croton* foi OPJ13, apresentando 18 bandas polimórficas com Dg de 100%. O *primer* OPI-16, por sua vez, originou cinco *loci* polimórficos com Dg de 83% revelando os menores valores observados em *Croton*. Os *primers* que apresentaram maiores e menores valores em número de polimorfismo em *Chamaesyce* foram: OPK-14 com 22 *loci* gerados e Dg de 95% e R460-9 com seis *loci* monomórficos gerados e nenhum índice de Divergência genética.

O mesmo raciocínio empregado para o marcador ISSR revelou que o *primer* 855 apresentou 33 *loci* polimórficos com 96% de divergência nos indivíduos pertencentes ao gênero *Croton*, enquanto que o iniciador 852 apresentou somente cinco *loci* polimórficos com 71% de divergência. Em *Chamaesyce* o *primer* 855 também apresentou maior polimorfismo entre os testados, embora com um menor número de marcas geradas (18) com Divergência genética de

100% dos *loci* gerados. O decâmero 864 apresentou menores valores de *loci* e de divergência (13 e 0% respectivamente).

Em todos os fenogramas gerados, os valores de *bootstrap* indicaram agrupamentos consistentes (valores acima de 80; Figs. 1 e 2). Adicionalmente, foi observada uma separação interespecífica e um agrupamento intra-específico em todo o universo amostral analisado. Os indivíduos da espécie *C. blanchetianus* agruparam-se em todas as esferas analíticas (DAF e ISSR). Na metodologia de DAF, a espécie *C. heliotropiifolius* ocupou um ramo mais basal enquanto que no marcador do tipo ISSR esta se mostrou em um ramo mais próximo da espécie *C. pedicellatus*. Entretanto no caso da análise de DAF desta última espécie houve maior correlação com *C. blanchetianus*. Do mesmo modo, para *Chamaesyce*, em todos fenogramas gerados, a espécie *C. thymifolia* ocupou um ramo mais basal, havendo neste caso também um agrupamento intra-específico e intra-populacional, ao lado de uma separação interespecífica, com boa sustentação, nas duas metodologias.

DISCUSSÃO

O elevado número de *loci* polimórficos acessados nas espécies amostradas dos gêneros estudados evidenciou a eficiência da metodologia de DAF em inferir índices de variabilidade genética nos indivíduos analisados. Este fato também foi observado no trabalho realizado por Simon *et al.* (2007), onde foram geradas 212 marcas polimórficas em acessos de *Vigna*, revelando uma elevada consistência na estimativa da diversidade genética dos diferentes acessos. Outro trabalho relevante com *fingerprinting* foi conduzido por Morden & Gregoritz (2005) que utilizaram a metodologia de RAPD associada ao sequenciamento da região de ITS do DNAr. Estes autores investigaram a filogenia de duas populações de *Chamaesyce skottsbergii* var. *skottsbergii* encontrando 340 *loci* polimórficos (numa taxa de 20-46 *loci* por *primer*) tanto intra como interpopulacional. Os dados obtidos apresentam congruência com o

presente trabalho, onde 329 e 494 bandas polimórficas foram geradas em *Croton* e *Chamaesyce*.

O marcador ISSR também se mostrou, ao longo dos estudos, relevante na detecção da diversidade genética em plantas. Vijayan *et al.* (2004) analisaram cinco espécies de amora (*Morus* sp.) da Ásia utilizando 15 *primers*, o que permitiu a obtenção de 150 fragmentos polimórficos. Pinangé (2009) e Cruz (2009), analisando respectivamente indivíduos das espécies *Xylopia frutescens* (Annonaceae) e *Miconia prasina* (Melastomataceae), aplicaram cinco *primers* de ISSR e evidenciaram elevados números de polimorfismos (126 e 71 respectivamente). Este marcador mostrou-se bem superior também no presente experimento visto que 324 e 140 bandas polimórficas foram geradas, o que foi suportado pelos trabalhos anteriores. Nas duas metodologias (DAF e ISSR), portanto, percebeu-se que os indivíduos de *Croton* mostraram-se significativamente mais variáveis (em níveis de Dg global) quando comparados aos dados de *Chamaesyce*, indicando possivelmente, que tal grupo apresente maiores níveis de variabilidade genética.

Em relação aos *primers* testados que foram compartilhados em ambos os gêneros para as duas metodologias, percebeu-se que elevados níveis de variabilidade genética foram produzidos, havendo muitas vezes concordância destes em inferir diversidade nos dois grupos. Para o DAF, nos indivíduos de *Croton*, foi observado que os oligonucleotídeos que alcançaram maiores e menores valores percentuais de divergência foram OPJ-13 e OPI-16, respectivamente. Comparativamente, em *Chamaesyce*, o primeiro iniciador citado obteve um menor número de *loci* gerados (12), apesar de apresentar um Dg elevado (100%), enquanto que o segundo se mostrou bastante divergente com 17 *loci* gerados e Dg de 100%. Apesar de ser considerado o menor em *Croton*, OPI-16 ainda demonstrou um grande potencial de variabilidade (83%), confirmando as afirmações acima. Para o ISSR, nos indivíduos de *Croton* e *Chamaesyce*, o *primer* 855 demonstrou o maior valor de Dg global, bem como maior número

de fragmentos amplificados em ambos os táxons. Portanto, esses iniciadores, possivelmente, são bastante polimórficos para Euphorbiaceae o que pode direcionar seu uso em estudos futuros com outros gêneros desta família.

A seleção prévia de oligonucleotídeos configura-se como uma etapa crucial antes do início de análises de similaridade e variabilidade genética de espécies vegetais, onde diversos acessos devem ser analisados após esta etapa. Para exemplificar tal importância, investigando a diversidade genética no gênero *Vigna*, Simon (2002) realizou estudo análogo selecionando 262 *primers* com a metodologia de DAF e 25 pares na metodologia de SMTS. Analogamente ao presente trabalho, foram selecionados quatro acessos de duas espécies (*V. angularis* e *V. unguiculata*) onde foram geradas 2.967 bandas polimórficas. Destas, 2.779 foram referentes à metodologia de DAF. Estes dados demonstram a importância da seleção de *primers*, potencializando a obtenção um elevado número de polimorfismos a partir de um número menor de reações, assim como os dados apresentados no presente estudo, que apresentam considerável benefício para análises com maior número de populações e espécies de *Croton* e *Chamaesyce*. Vale ressaltar ainda que esta análise possibilitou não só a seleção daqueles potencialmente polimórficos, mas também um estudo qualitativo de como os oligos atuam no genoma. Esta classificação de *primers* é bastante interessante em casos onde o polimorfismo é extremo. Portanto, quanto maior o número de iniciadores testados, melhor direcionada e mais significativa será a análise de *fingerprinting*.

No que concerne aos critérios utilizados para seleção dos *primers*, as correlações citadas parecem garantir uma boa sustentação quando os *primers* selecionados foram aplicados. Amorim *et al.* (2006), utilizando a mesma metodologia aplicada no presente trabalho (DAF), encontrou 90 bandas polimórficas para acessos de *Vigna*, obtendo uma boa separação e sustentação na topologia dos dendrogramas. Telles *et al.* (2001) por sua vez, afirma que para se ter uma boa robustez estatística, deve-se alcançar um mínimo de 60 *loci* polimórficos. Assim de

acordo com o número de fragmentos gerados, há previsão de boa sustentação analítica quando aplicados os iniciadores selecionados no presente trabalho.

Mediante os resultados fenéticos obtidos, observou-se que houve uma coerência na topologia dos táxons, uma vez que os indivíduos pertencentes à mesma espécie (*C. blanchetianus* – CBT) agruparam-se com valores ótimos de *bootstrap*. Foi demonstrado, portanto, que tanto nos níveis de variabilidade quanto fenéticos os marcadores provaram ser informativos. Adicionalmente, no presente trabalho, houve uma maior sustentação nos valores de *bootstrap* principalmente em relação aos dados referentes ao DAF (*bootstrap* igual a 100). Os dois fenogramas gerados para cada marcador revelaram que tanto a técnica quanto os *primers* selecionados mostraram-se promissores para análises futuras no referido grupo.

Em *Chamaesyce*, os resultados mostraram-se coerentes com os de *Croton*, visto que, foram reveladas topologias esperadas em relação aos níveis analisados no fenograma. Foi observado também agrupamento intra-populacional e separação nos níveis inter-populacional e inter-específico, mesmo no de ISSR onde, mesmo revelando um valor inferior ao objetivo pré-estabelecido (200), a consistência foi significativa.

Os dados obtidos apontam para a eficiência das metodologias de DAF e ISSR na caracterização de populações e espécies estudadas. Por se tratar de um estudo preliminar, visando avaliar preliminarmente a eficiência destes marcadores, faz-se necessária sua continuidade em abordagens mais avançadas, incluindo, não só um maior número de espécies e populações dos grupos aqui analisados, como também em outros representantes da família Euphorbiaceae.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília) pela concessão de bolsas e auxílio financeiro. À FACEPE (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco, Recife) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) agradecemos pela concessão de bolsa de doutorado. À pesquisadora M.F. Lucena, agradecemos pelo suporte dado à execução deste trabalho, com ênfase na identificação das espécies analisadas do gênero *Croton*.

REFERÊNCIAS

- ALI, B.A.; HUANG, T.H.; QIN, D.N.; WANG, X.M. 2004. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Rev F Biol*, 14: 443–453.
- ALVES, M.V. 1998. Checklist das espécies de Euphorbiaceae Juss. ocorrentes no semi-árido pernambucano, Brasil. *Acta Bot Bras*, 12 (3): 485-495.
- AMORIM, L.L.B.; ONOFRE, A.V.C.; CARVALHO, R.; BENKO-ISEPPON, A.M. 2006. Identificação de parentais contrastantes para mapeamento genético no feijão-caupi usando marcador molecular DAF (DNA Amplification fingerprinting). *Anais CONAC – Congresso Nacional do Feijão-Caupi, Embrapa – PI, Teresina*, 6.
- AVISE, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. *Chapman and Hall*, London.
- AVISE, J.C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. *Harvard University Press*. Cambridge, Massachusetts.
- BENKO-ISEPPON, A.M.; WINTER, P.; HÜTTEL, B.; STAGGINUS, C.; MÜHLBAUER, F.; KAHL, G. 2003. Markers closely linked to *Fusarium* resistance genes in chickpea show homology to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosome 5 and 1. *Theo Appl Gen*, 103: 379-286.
- BENKO-ISEPPON, A.M.; WINTER, P.; HÜTTEL, B.; STAGGINUS, C.; MÜHLBAUER, F.; KAHL, G. 2001. Pathogen-related sequences around *Fusarium* race 4 resistance locus in chickpea detected by DNA amplification fingerprinting (DAF). *Theo Appl Gen*, 107: 379-386p.
- BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; VAN, E.E.B.; RIINA, R. 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. *Am J Bot*, 92(9): 1520-1534a.

- BORNET, B.; BRANCHARD, M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Mol Bio. Rep*, 19: 209-215.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology*, 9: 553–557.
- CRUZ, G.A.S. 2009. Diversidade genética populacional nas espécies pioneiras *Cyperus ligularis* L., *C. odoratus* L. (Cyperaceae) e *Miconia prasina* (Sw.) DC. (Melastomataceae) ocorrentes em remanescentes da Floresta Atlântica de Pernambuco detectada pelos marcadores moleculares DAF e ISSR. *Dissertação de Mestrado*, PPGG/UFPE, Recife, PE.
- ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D.J.; WINDUSS, J.L.; WOLFE, A.D. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagostis porter* ssp. *Inspersata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol Edin*, 8: 443-451.
- FAITH, D.P.; 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Cons*, 61: 1–10.
- FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theo App Gen*, 95: 408-417.
- GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. 2001. Croton: In world Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae 2, with Pandaceae. *Royal Botanic Gardens Kew*, London, pp 417-536.
- GUSMÃO, C.L.S. 2000. Citogenética da família Euphorbiaceae no nordeste brasileiro, PE. *Dissertação de Mestrado*, PPGG/UFPE, Recife, PE.
- LUCENA, M.F.A. 1996. Levantamento taxonômico da família Euphorbiaceae Juss. nos brejos de altitude de Pernambuco. *Monografia*, UFRPE, 114p.
- MATOS, J.F.A. 1983. Efeitos psicotróficos de plantas brasileiras. Parte I: aspectos antropológicos. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 35(4): 433.
- MONTE, F.J.Q.; DANTAS, E.M.G.; BRAZ, R.F. 1988. New dipertenoids from *Croton argyrophylloides*. *Phytochemistry*, 27(10): 3209-3212.
- MORDEN, C.W.; GREGORITZA, M. 2005. Population variation and phylogeny in the endangered *Chamaesyce skottsbergii* (Euphorbiaceae) based on RAPD and ITS analyses. *Cons. Gen.* 6: 969–979.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am Nat*, 106: 283-292.
- NEPUCENO, V.A.; OLIVEIRA, M.L. 1979. Estudo anatômico de folhas do gênero *Croton* L. – *C. jacobinensis* Baill e *C. sonderianus* Müll. *Arg. Brasil Floresta*, 39(9): 37-42.

- OLIVEIRA, M.S. 2004. Variabilidade genética em populações de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) pela metodologia de DAF (DNA *Amplification Fingerprinting*) *Dissertação de Mestrado*, PPGG/UFPE, Recife, PE.
- PINANGÉ, D.S.B. 2009. Análise da diversidade genética populacional nas espécies *Chamaesyce hirta* L., *Chamaesyce thymifolia* Millsp. (Euphorbiaceae) e *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae) através de *Fingerprinting* de DNA em fragmentos da Floresta Atlântica de Pernambuco. *Dissertação de Mestrado*, PPGG/UFPE, Recife, PE.
- PÔRTO, N.A. 2007. Citotaxonomia de espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae: Crotonoideae) ocorrentes no Nordeste do Brasil. *Dissertação de Mestrado*, PPGA/UFPB, Areia, PB.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *T Ecol Evol*, 16: 37–45.
- RODAL, M.J.N.; NASCIMENTO, L.M.; MELO, A.L. 1999. Composição florística de um trecho de vegetação arbustiva caducifolia no município de Ibimirim, PE, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, 13(1): 15-28.
- SILVA, S.I. 1998. Euphorbiaceae da caatinga: distribuição de espécies e potencial oleaginoso. *Acta Bot Bras*, 12 (3): 334
- SIMON, M.V.; RESENDE, L.V.; WINTER, P.; KAHL, G.; BENKO-ISEPPON, A.M. 2007. Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna Savi* germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting. *Genome*, 50(6): 538-547.
- SIMON, M.V. 2002. Caracterização Genética de Acessos de *Vigna Savi* (Fabaceae) com Marcadores de DNA. *Dissertação de Mestrado*, UFPE, Recife-PE, 62.
- SLOTTA, T.A.B.; POTTER, D.M. 2006. Genetic variation within and between *Iliamma corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. *Bot J Linnean Soc*, 151:345-354.
- SOUZA, V.Q.; PEREIRA, A.S.; KOPP, M.M.; COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; LUZ, V.K.; OLIVEIRA, A.C. 2005. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. *Bragantia*, 64(4): 569-575.
- TELLES, M.P.C.; MONTEIRO, M.S.R.; RODRIGUES, F.M.; SOARES, T.N.; RESENDE, L.V.; AMARAL, A.G.; MARRA, P.R. 2001. Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de *locos* necessários para a estabilidade da divergência estimada. *Ciênc Anim Bras* 2(2): 87-95.
- TEMPLETON, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol Ecol*, 7: 381–397.

- VAN, E.E.B.; JELINSKI, N.; BERRY, P.E.; HIPPI, A.L. 2006. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. *Molecular Ecology*, 15:2735–2751.
- VANE-WRIGHT, R.I.; HUMPHRIES, C.J.; WILLIAMS, P.H. 1991. What to protect? Systematics and the agony of choice. *Biol Cons*, 55:235–254.
- VJAYAN, K.; SRIVASTAVA, P.P.; AWASTHI, A.K. 2004. Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers. *Genome*, 47: 439-448.
- WEBSTER, G.L. 1993. A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon*, 42:793-823.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. 2004. DNA fingerprinting in plants. *CRC Press*, Boca Raton, USA. 322.
- WINTER, P.; BENKO-ISEPPON, A.M.; HÜTTEL, B.; RATNAPARKHE, M.; TULLU, A.; SONNANTE, G.; PFAFF, T.; TEKEOGLU, M.; SANTRA, D.; SANT, V.J.; RAJESH, P.N.; KAHL, G.; MUEHLBAUER, F.J. 2000. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. *Theor Appl Gen*, 101:1155-1163.
- WOLFE, A.D.; RANDLE, C.P. 2001. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. *Syst Bot*, 26(1):120-130.
- WOODS, K.; HILU, K.W.; WIESERMA, J.H.; BORSCH, T. 2005. Pattern of variation and systematic of *Nymphaea odorata*: I. evidence from morphology and inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Syst Bot*, 30:471-480.

Tabela 01: Indivíduos utilizados no experimento da seleção de *primers* dos marcadores DAF e ISSR em *Croton* e *Chamaesyce*. Identificação das respectivas espécies, bem como a indicação dos locais de coleta e nome do coletor. Legenda das abreviações: PE – Pernambuco, SE – Sergipe, PNSI – Parque Nacional Serra de Itabaiana

Identificação	Espécie	Local	Coletor
CHT0201	<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth.	Vertentes - Mirandiba-PE	M.F.A.Lucena
CPD0204	<i>Croton pedicellatus</i> Kunth.	Riacho dos Coqueiros-PNSI-SE	M.F.A.Lucena
CBT0201	<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	Vertentes - Mirandiba-PE	M.F.A.Lucena
CBT0404	<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	Porto do Folha-SE	M.F.A.Lucena
CH1UF2	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Mills.	Campus (UFPE) – Recife – PE	D.S.B.Pinangé
CH1EP5	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Mills.	Estrada dos Passarinhos – Recife – PE	D.S.B.Pinangé
CH1EP6	<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Mills.	Estrada dos Passarinhos – Recife – PE	D.S.B.Pinangé
CH2IB6	<i>Chamaesyce thymifolia</i> (L.) Mills.	Ilha do Bananal – Recife – PE	D.S.B.Pinangé

Tabela 02: Relação dos 29 *primers* DAF utilizados no processo de seleção em *Croton*, com respectivas sequências, quantidade de bandas polimórficas entre os níveis inter e intraespecífico, bem como o percentual de Divergência genética (Dg). Destaque para o conjunto de *primers* que totalizaram 200 marcas polimórficas.

Primer	Sequência	Polimorfismo por níveis			
		Interespecífico	Intraespecífico	Total	%Dg
OPI-13	CCACACTACC	18	06	18	100
A-11	CAATCGCCGT	17	03	17	94,44
N-04	GACCGACCCA	17	03	17	94,44
N-17	CATTGGGGAG	17	04	17	100
N-16	AAGCGACCTG	14	11	16	94,12
OPK-14	CCCGCTACAC	15	04	16	100
Q-17	GAAGCCCTTG	15	03	15	93,75
OPK-4	CCGCCCAAAC	15	05	15	100
15-13	AGGTCTTGGGTAAGG	14	04	14	82,35
15-16	GAACCTACGGTACGG	11	05	13	86,67
U-13	GGCTGGTTCC	12	02	13	100
OPE-6	AAGACCCCTC	12	08	13	100
15-8	TGCGTGCTTGTTAAT	12	05	12	80
P-03	CTGATACGCC	09	03	12	80
U-15	ACGGGCCAGT	11	09	12	100
OPN-5	ACTGAACGCC	12	02	12	100
A-12	TCGGCGATAG	11	08	11	100
A-19	CAAACGTCGG	10	02	11	100
A-10	GTGATCGCAG	10	03	10	90,91
OPN-11	TCGCCGCAAA	10	02	10	90,91
15-16A	GAACCTACGGTGAAG	09	0	9	75
15-16D	GAACCTACGGTAAGG	07	02	8	100
A-17	GACCGCTTGT	08	01	8	100
P-08	ACATCGCCCA	08	02	8	80
OPN-6	GAGACGKK	08	0	8	80
OPL-5	ACGCAGGCAC	08	02	8	88,89
R169-9	CGTCGTTACC	07	02	7	58,33
OPN-7	GTCCATGCCA	07	0	7	87,5
OPI-16	CCACACTACC	05	01	5	83,33
Total		329	102	359	

Tabela 03: Relação dos 17 *primers* ISSR utilizados no processo de seleção em *Croton*, com respectivas sequências, quantidade de bandas polimórficas entre os níveis inter e intraespecífico, bem como o percentual de Divergência genética (Dg). Destaque para o conjunto de *primers* que totalizaram 200 marcas polimórficas.

Primer	Sequência	Polimorfismo por níveis			
		Interespecífico	Intraespecífico	Total	% Dg
855	(AC) ₈ YT	32	18	33	96
808	(AG) ₈ C	29	20	29	100
878	(GGAT) ₄	25	0	28	89
818	(CA) ₈ G	26	09	26	100
887	DVD(TC) ₇	25	0	25	100
860	(TG) ₈ RA	22	06	22	100
811	(AC) ₈ YG	22	09	22	100
846	(CA) ₈ RT	20	04	21	95
827	(AC) ₈ G	17	10	19	89
853	(TC) ₇ TCRT	19	11	19	100
858	(TG) ₈ RT	16	08	16	100
830	(TG) ₈ G	14	08	14	100
864	(ATG) ₅	13	04	13	100
856	(AC) ₈ YA	12	09	12	100
828	(TG) ₈ A	11	07	11	100
844	(CT) ₈ RC	09	04	10	90
852	(TC) ₈ RA	05	03	07	71
Total		317	130	327	

Tabela 04: Relação dos 42 *primers* DAF utilizados no processo de seleção em *Chamaesyce*, com respectivas sequências, quantidade de bandas polimórficas entre os níveis inter e intraespecífico, bem como o percentual de Divergência genética (Dg). Destaque para o conjunto de *primers* que totalizaram 200 marcas polimórficas.

Primer	Sequência	Polimorfismos por níveis				
		Interespecífico	Intraespecífico	Loci polimórficos	Total de loci	%Dg
OPK-14	CCCGCTACAC	21	14	21	22	95%
OPI-1	ACCTGGACAC	20	7	20	23	87%
OPN-6	GAGACGCACA	19	9	19	21	90%
15_12	AGGTCTTGGGTAGGC	19	11	19	22	86%
U03-1	CTATGCCGAC	19	13	19	22	86%
OPN-5	ACTGAACGCC	19	9	19	25	76%
R160-5	GTCCTCAACG	18	13	18	18	100%
OPN-11	TCGCCGCAAA	18	16	18	19	95%
OPK-4	CCGCCCAAAC	18	5	18	19	95%
N-16	AAGCGACCTG	18	8	18	23	78%
OPI-16	TCTCCGCCCT	17	9	17	17	100%
OPL-5	ACGCAGGCAC	17	12	17	24	71%
G-12	CAGCTCACGA	14	3	14	14	100%
A-12	TCGGCGATAG	14	6	14	15	93%
N-17	CATTGGGGAG	14	5	14	20	70%
P15-1	GGAAGCCAAC	13	6	13	14	93%
OPJ-13	CCACACTACC	12	4	12	12	100%
R160-9	CGTCGTTACC	12	8	12	13	92%
OPA-4	AATCGGGCTG	12	9	12	13	92%
DIII	GCGATAGCAGA	12	10	12	13	92%
R370-9	CGCACTCGTC	12	5	12	13	92%
15-13	AGGTCTTGGGTAAGG	11	7	11	12	92%
R470-10	GACCGACACG	10	5	10	10	100%
OPJ-16	TCTCCGCCCT	10	3	10	10	100%
A-03	AGTCAGCCAC	10	10	10	11	91%
A-11	CAATCGCCGT	10	4	10	11	91%
OPE-6	AAGACCCCTC	10	6	10	13	77%
Q-17	GAAGCCCTTG	10	5	10	15	67%
OPK-2	GTCTCCGCAA	9	5	9	9	100%
R260-10	GACCGACACG	9	6	9	10	90%
H-03	AGACGTCCAC	9	8	9	12	75%
H-18	GAATCGGCCA	8	2	8	10	80%
N-04	GACCGACCCA	8	1	8	19	42%
G-18	GGACTGCAGA	7	5	7	7	100%
A-18	AGGTGACCGT	7	5	7	7	100%
OPD-7	TTGGCACGGG	5	3	5	5	100%
E-12	TTATCGCCCC	5	5	5	5	100%
OPG-5	CTGAGACGGA	5	4	5	7	71%
AIV	GCGAAAGCCAA	5	5	5	8	63%
OPI-5	TGTTCCACGG	4	3	4	7	57%
OPM-6X	CTGGGCAACT	3	1	3	4	75%
OPL-14	GTGACAGGCT	1	0	1	1	100%
R460-2	GCAGGATACG	0	6	0	6	0%
Total		494	281	494	581	

Tabela 05: Relação dos 15 *primers* ISSR utilizados no processo de seleção em *Chamaesyce*, com respectivas sequências, quantidade de bandas polimórficas entre os níveis inter e intra-específico, bem como o percentual de Divergência genética (Dg).

Primer	Sequência	Polimorfismos por níveis				
Nome	5' → 3'	Interespecífico	Intraespecífico	Loci polimórficos	Total de loci	%Dg
855	(AC) ₈ YT	18	13	18	18	100%
844	(CT) ₈ RC	17	11	17	18	94%
818	(CA) ₈ G	16	11	16	18	89%
878	(GGAT) ₄	15	7	15	18	83%
827	(AC) ₈ G	13	6	13	17	76%
808	(AG) ₈ C	10	1	10	12	83%
860	(TG) ₈ RA	9	1	9	9	100%
858	(TG) ₈ RT	8	3	8	9	89%
811	(AC) ₈ YG	8	3	8	11	73%
846	(CA) ₈ RT	7	3	7	7	100%
828	(TG) ₈ A	7	4	7	7	100%
887	DVD(TC) ₇	7	5	7	10	70%
830	(TG) ₈ G	5	3	5	8	63%
856	(AC) ₈ YA	0	6	0	18	0%
864	(ATG) ₅	0	2	0	13	0%
Total		140	79	140	193	

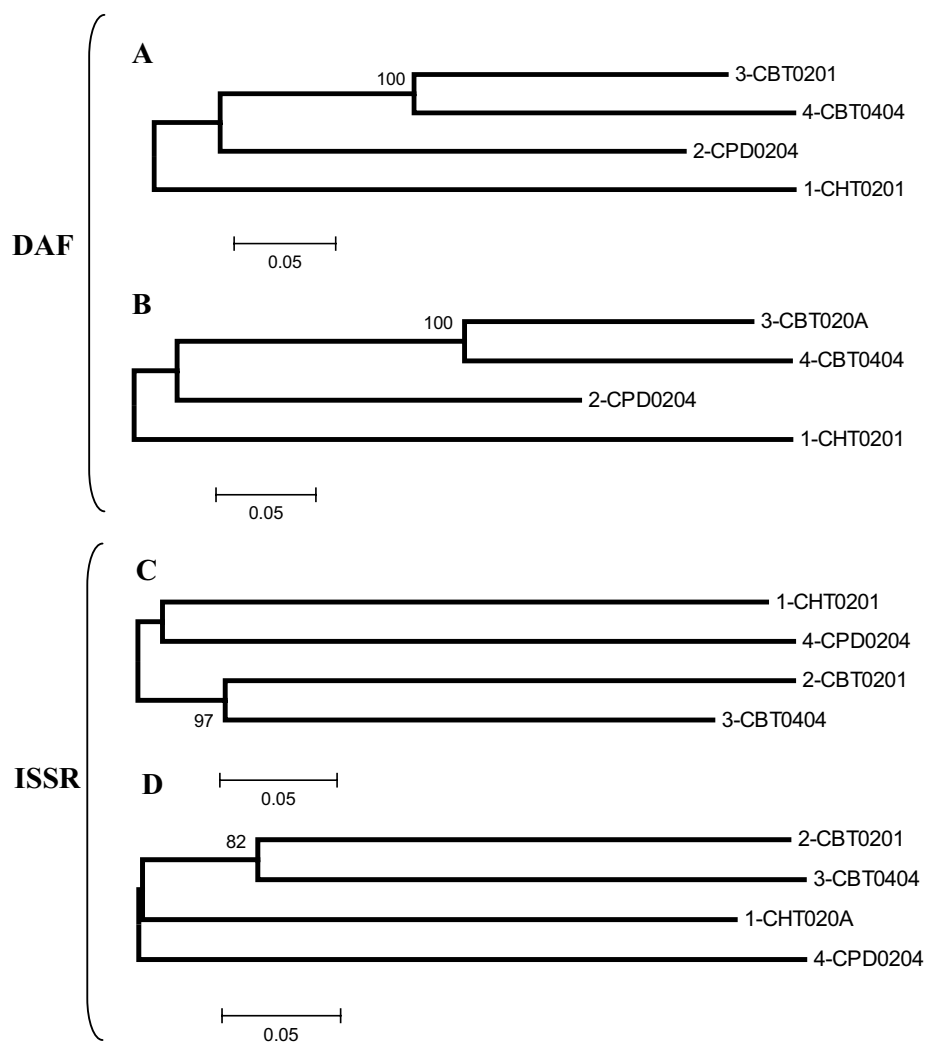


Figura 01: Fenogramas gerados a partir da análise das reações de DAF e ISSR pelo método de *Neighbor-Joining* no gênero *Croton*. A – Árvore gerada utilizando todos os *primers* DAF do experimento (29); B – Árvore gerada somente com os 14 *primers* DAF selecionados após análise dos níveis de polimorfismos; C – Fenograma oriundo a partir da utilização de todos os *primers* ISSR (17) e D – Árvore produzida utilizando somente os 7 *primers* selecionados após análises. CHT0201 – *C. heliotropifolius*, CPD0204 – *C. pedicellatuspedicellatus*, CBT0201 e CBT0404 – *C. blanchetianus*. Números na base dos ramos dos fenogramas indicam valores de *bootstrap*.

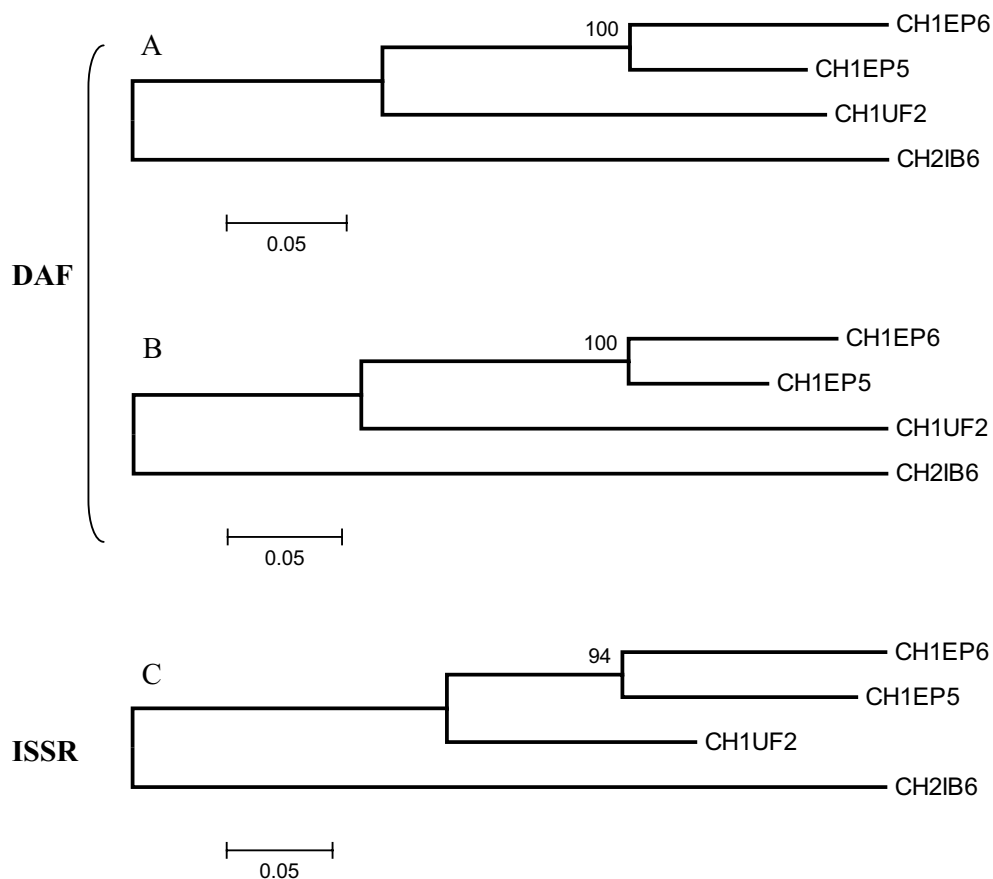


Figura 02: Fenogramas gerados a partir da análise das reações de DAF e ISSR em *Chamaesyce* pelo método de *Neighbor-Joining*. A – Árvore gerada utilizando todos os *primers* DAF do experimento (43); B – Árvore gerada somente com os 11 *primers* DAF selecionados após análise dos níveis de polimorfismos; C – Fenograma oriundo a partir da utilização de todos os *primers* ISSR (15). CH1UF2, CH1EP5 e CH1EP6 – *C. hirta*, População Campus UFPE e População Estrada dos Passarinhos, respectivamente CH2IB6 – *C. thymifolia*, população Ilha do Bananal. Números na base dos ramos dos fenogramas indicam valores de *bootstrap*.

CAPÍTULO 4

Resultados Preliminares

Diversidade genética em espécies brasileiras de *Croton* (Euphorbiaceae) revelada por DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Genetic Diversity in Brazilian *Croton* (Euphorbiaceae) species revealed by DAF (DNA Amplification Fingerprinting) and ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Diversidade genética em espécies brasileiras de *Croton* (Euphorbiaceae) revelada por DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Autores

Amaro Castro Lira Neto⁽¹⁾; Diego Sotero de Barros Pinangé⁽¹⁾; Maria de Fátima Araújo Lucena⁽¹⁾; Leonardo Pessoa Felix⁽²⁾ e Ana Maria Benko-Iseppon⁽¹⁾

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética e de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Campus Areia, Areia, PB, Brasil.

Título resumido:

Genetic Diversity in Brazilian *Croton*

Resumo

O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) inclui cerca de 1.300 espécies, apresentando distribuição pantropical, com expressiva diversidade no domínio Mata Atlântica, onde ocupa áreas costeiras, rupestres e semi-áridas. Análises de fingerprinting de DNA como as geradas pelos marcadores DAF e ISSR são úteis na geração de polimorfismos em nível intra e interespecífico, os quais são muito informativos em análises de diversidade genética. No presente trabalho cinco *primers* de DAF e seis de ISSR foram testados em 40 indivíduos de 27 acessos de 27 espécies de *Croton*, comparadas a representantes de *Jatropha* (3 spp.) usados como grupo-irmão. Foram gerados ao todo 394 marcadores, dentre os quais foram identificados polimorfismos (208 para DAF e 186 para ISSR) incluídos na matriz de dados para a geração de uma árvore filogenética baseada em inferência Bayesiana e máxima verossimilhança. Apesar do grande número de loci polimórficos e da presença de alguns clados em nível intraespecífico, muitas entidades taxonômicas apresentaram-se em posições politômicas, indicando a necessidade de agregação de dados adicionais para melhor embasamento da análise. Apesar da reconhecida variabilidade morfológica do gênero, os resultados obtidos foram surpreendentes, uma vez que decorreram de elevadas taxas de divergência genética, ao contrário do que ocorre com a maioria das angiospermas nativas previamente analisadas por métodos semelhantes.

Palavras chave: *Croton*, *Jatropha*, Marcadores Moleculares, Mata Atlântica.

Introdução

O gênero *Croton* L. é o segundo maior e mais diverso da família Euphorbiaceae s.s. e pertence à subfamília Crotonoideae, que consiste de cerca de 2400 espécies agrupadas em 67 gêneros e 12 tribos (WEBSTER 1994). Segundo Lima e Pirani (2008) *Croton* conta com mais da metade das espécies da subfamília (cerca de 1.300), que apresentam distribuição pantropical, seguido, em representividade, por *Jatropha* (± 185 espécies) e *Manihot* (± 100 espécies). Os autores enfatizam que *Croton* é um bom exemplo de “gênero problema” – grande e taxonomicamente complexo, sendo por isso negligenciado pelos taxonomistas, em favor de gêneros menores e mais claramente delimitados. Para muitos botânicos e ecólogos este grupo tem sido uma incógnita taxonômica.

Burger e Huft (1995) postularam que a considerável variação no tamanho e forma das folhas, pubescência, inflorescência e morfologia floral são os fatores que podem tornar a circunscrição taxonômica de espécies bastante difícil. Alguns dos caracteres que contribuem para a diversidade de *Croton* oferecem oportunidades promissoras de pesquisa quando acoplados a estudos filogenéticos que incluem, por exemplo, um rico arranjo de nectários extraflorais que desenvolvem um papel importante na interação com formigas (JOSE e INAMDAR 1989).

Uma análise filogenética realizada por Berry *et al.* (2005), utilizando dados moleculares das regiões ITS do DNA nuclear ribossomal e do fragmento trnL-F do DNA plastidial, demonstrou que *Croton*, como circunscrito por Webster (1993; 1994), não é um táxon monofilético, mostrando a necessidade de uma reavaliação da classificação infragenérica do gênero, pois as seções apresentadas por Webster (1993) não se mostraram monofiléticas em sua maioria.

Com exceção do estudo de Berry *et al.* (2005) que inclui poucos representantes neotropicais, a maioria dos estudos relacionados aos gêneros da família Euphorbiaceae bem como o gênero *Croton*, restringem-se principalmente a pesquisas taxonômicas e morfológicas. Entretanto existe ainda uma grande carência em estudos genéticos mais amplos neste gênero, incluindo análises populacionais, abordagem na qual marcadores de DNA podem elucidar diversos questionamentos.

O marcador molecular *DAF* (*DNA Amplification Fingerprinting*) tem sido amplamente utilizado na análise de diversidade em vegetais, principalmente por apresentar um potencial na geração de polimorfismos (SIMON *et al.*, 2007), sendo também utilizado em estudos de mapeamento genético, possuindo uma boa reprodutibilidade quando comparado ao RAPD

(*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WINTER *et al.*, 2000; BENKO-ISEPPON *et al.*, 2003). A técnica baseia-se na utilização de *primers* (iniciadores) aleatórios em uma maior concentração em relação a uma menor quantidade de DNA molde, uma das características principais que a diferencia do RAPD (CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1991a, b; SIMON *et al.*, 2007).

A técnica de ISSR também apresenta similaridades com o RAPD, uma vez que não requer conhecimento prévio da sequência-alvo, sendo considerada mais reprodutível devido ao uso de primers mais longos (16–25meros) desenhados de modo a anelar-se a sequências com padrões de microssatélites, permitindo o uso subsequente de temperaturas de anelamento mais altas (45–60°C), decorrendo em maior estringência (REDDY *et al.* 2002).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de 40 acessos selecionados entre 27 espécies do gênero *Croton* (usando representantes de *Jatropha* como grupo irmão), através de marcadores DAF e ISSR, avaliando a relação genética entre os taxa e populações estudados.

Materiais e Métodos

Uma lista das populações e espécies do gênero *Croton* analisadas encontra-se apresentada na Tabela 1. Foram coletadas espécies de *Croton* oriundas da flora nordestina, compreendendo localidades dos Estados de Pernambuco, Sergipe, Ceará, Bahia e Paraíba, regiões estas, caracterizadas como vegetações típicas do semi-árido. Alguns exemplares de outras localidades cultivados no Jardim Botânico da Universidade Johann Wolfgang Goethe – Frankfurt, Alemanha, também foram avaliados (Tabela 1). A identificação taxonômica foi realizada em parceria com o Laboratório de Morfo-Taxonomia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco pelos pesquisadores Maria de Fátima Araújo e Bruno Amorim.

Excisas foram produzidas para todo material coletado, sendo depositadas no herbário UFP, tendo sido a maioria das espécies também mantida sob cultivo na casa de vegetação do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco).

A extração do DNA genômico seguiu o descrito por Weising *et al.* (2004), com ajustes de acordo com o apresentado em Lira-Neto *et al.* (in prep., Capítulo 3). A qualificação e quantificação do DNA foram realizadas pelo método comparativo em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio e via espectrofotômetro Biophotometer Plus da Eppendorf.

Mediante os resultados da quantificação, uma precipitação seletiva de polissacarídeos foi desempenhada, segundo Michaels *et al.* (1994), em todo universo amostral.

A amplificação dos fragmentos de DNA do tipo DAF, seguiu Caetano-Anollés *et al.* (1991a) com as modificações introduzidas por Winter *et al.* (2000) e Benko-Iseppon *et al.* (2003), assim como descrito em Lira-Neto *et al.* (in prep., Capítulo 4).

A geração dos marcadores ISSR seguiu os procedimentos descritos por Bornet e Branchard (2001) com modificações de Amorim *et al.*, 2009 (comunicação pessoal) e ajustes na quantidade de DNA, principalmente no que diz respeito à quantidade de DNA, visto que concentração de 5 ng por reação mostrou-se mais eficiente.

Foram aplicados cinco iniciadores do tipo DAF (N-17, N-04, R160-9, OPN-6 e OPL-5) e seis para o marcador do tipo ISSR (808, 818, 855, 864, 887 e 860). Os fragmentos provenientes das amplificações foram visualizados e anotados inicialmente numa matriz binária de presença e ausência de bandas, considerando-se seu peso molecular. Posteriormente as matrizes de DAF e ISSR foram agrupadas e adequadas para análise de inferências bayesianas através do programa Mr. Bayes, segundo Huelsenbeck e Ronquist (2001). Essas inferências foram realizadas usando 10.800.000 gerações em duas réplicas, cujo parâmetro (temperaturas) foi estabelecido em 0,5 e as frequências de amostragem situadas em 100. Outro parâmetro utilizado foi *burn in* de 50.000. A priori, foram estabelecidas restrições topológicas indicando que indivíduos da mesma espécie deveriam permanecer 100% juntos nas topologias posteriores.

Resultados e Discussão

A análise dos polimorfismos gerados indicou, para esses marcadores, 100% de polimorfismo em todos os *primers* bem como um elevado número de loci gerados: 186 para os seis *primers* de ISSR e 208 para os cinco *primers* de DAF (Figs. 1 e 2). Neste caso, tal situação dificultou bastante a análise de similaridade, uma vez que se faz necessária a presença de loci capazes de consolidar agrupamentos de espécies. Em casos como o observado aqui, as construções das árvores baseadas em *bootstrap* perdem em significância estatística não sendo capazes de sustentar as tentativas de clados gerados. Entende-se, então, que os dois extremos analíticos devem ser evitados: a falta de variabilidade e o excesso dela, prioritariamente quando se tenta reconstruir as relações evolutivas do grupo de estudo.

No dendrograma gerado, os únicos agrupamentos observados foram intraespecíficos e, mesmo assim, ocorreram devido a parâmetros estabelecidos no método utilizado pelo programa, na tentativa de melhorar as relações interespecíficas das espécies amostradas.

Contudo, essas relações não puderam ser estabelecidas devido ao grande número de politomias observadas (Fig. 3).

Deste modo, se faz necessário o aumento do número de *primers* aplicados no experimento nas duas técnicas, de forma a tentar saturar as matrizes de similaridade em número de *loci* gerados. Assim, almeja-se que quanto maior o número de fragmentos de DNA analisados, maior será a significância, melhorando as correlações encontradas.

O experimento compreendeu espécies pertencentes a diferentes localidades do Nordeste, com espécies procedentes da Chapada Diamantina, na Bahia, no interior de Pernambuco e Parque Nacional Serra de Itabaiana em Sergipe, incluindo várias seções de *Croton*. Deste modo, diferentes formações vegetacionais, climáticas e geológicas atuam intrinsecamente na modulação das espécies e populações deste gênero.

Diante do exposto, no gênero *Croton*, as análises de *fingerprinting*, parecem ser mais úteis em investigações de menores níveis (intraespecífico). Assim sendo, a partir do aumento de informações acerca do genoma do grupo, seja sob o ponto de vista de aumento de iniciadores testados previamente na seleção ou utilização de outros marcadores que acessem outras regiões de DNA, possivelmente haverá um maior suporte nas investigações em nível genérico.

Adicionalmente, estes resultados apontam a necessidade para um aprofundamento analítico em níveis populacional e filogeográfico no grupo, bastante representativo na região Nordeste, para que se entenda como as populações se adaptam e se estruturam aos ambientes. Mediante tais análises, dados históricos de fluxo gênico entre indivíduos poderão ser elucidados e agregados aos dados biogeográficos, podendo subsidiar futuros estudos evolutivos.

Apesar do ineditismo do presente trabalho, são necessários estudos mais aprofundados envolvendo, além de um maior número de marcadores, a geração de sequências filogeneticamente informativas para táxons neotropicais, bem como sua associação a caracteres morfológicos importantes para um melhor entendimento da evolução e das relações entre os membros deste gênero, incluindo questões biogeográficas.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, à FACEPE (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte dado à execução deste trabalho na forma de bolsas e auxílio financeiro. Aos colegas Marccus Vinicius Alves e Bruno Amorim agradecemos pela coleta de exemplares, constante assistência e interessantes

discussões. Ao pesquisador Luis Carlos Belarmino agradecemos pela ajuda na análise dos dados com inferências Bayesianas.

Referências Bibliográficas

- BENKO-ISEPPON, A.M.; WINTER, P.; HÜTTEL, B; STAGGINUS, C.; MUHLBAUER, F.; KAHL, G. **Markers closely linked to *Fusarium* resistance genes in chickpea show homology to pathogenesis-related genes located on Arabidopsis chromosome 5 and 1.** Theoretical and Applied Genetics, 103: 379-286, 2003.
- BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K.J.; VAN, E.E.B.; RIINA, R. **Molecular phylogenetics of the giants genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu strictu) using *ITS* and *trnL-trn-F* DNA sequence data.** Amer. J. Bot., 92(8): 1520-1534, 2005.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. **Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting.** Plant. Mol. Bio. Rep., 19: 209-215, 2001.
- BURGER, W.; HUFT, M. **Flora costaricensis: Euphorbiaceae.** Fieldiana, Bot. 36: 1-169, 1995.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. **DNA Amplification Fingerprint using short arbitrary oligonucleotides primers.** Biotechnology, 9: 553-557, 1991a.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAN, B.J.; GRESSHOFF, P.M. **DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis.** Plant. Mol. Bio. Repor., 9: 292-305, 1991b.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. **MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees.** Bioinformatics 17: 754-755, 2001.
- JOSE, T.; INAMDAR, J.A. **Structure, ontogeny, and biology of nectaries in *Croton bonplandius* Baill.** Beitr. Biol. Pflanzen, 64:157-165, 1989.
- LIMA, R.B.; PIRANI, J.R. **Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.).** Biota Neotrop., vol. 8, no. 2, Abr./Jun, 2008.

- MICHAELS, S.D.; JOHN, M.C.; AMASINO, R.M. **Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation.** *Biotechniques*, 17: 274–276, 1994.
- Reddy, M.P.; Sarla, N.; Siddiq, E.A. **Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding.** *Euphytica*, 128: 9–17, 2002.
- SIMON, M.V.; BENKO-ISEPPON, A.M.; RESENDE, L.V.; WINTER, P.; KAHL, G. **Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna Savi* germplasm revealed by DNA Amplification Fingerprinting.** *Genome*, 50: 538-547, 2007.
- WEBSTER, G.L. **A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae).** *Taxon*, 42:793-823, 1993.
- WEBSTER, G.L. **Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae.** *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 81(1):33-144, 1994.
- WEISING, K.; HYBOM, H.; WOLFF, K. ; MEYER, W. **DNA Fingerprinting in Plants and Fungi.** *CRC Press*, Boca Raton, Florida. 322 p, 2004.
- WINTER, P.; BENKO-ISEPPON, A.M.; HUTTEL, B.; RATNAPARKHE, M.; TULLU, A.; SONNANTE, G.; PFAFF, T.; TEKEOGLU, M.; SANTRA, D.; SANT, V.J.; RAJESH, P.N.; KAHL, G.; MUEHLBAUER, F.J. **A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5.** *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1155-1163, 2000.

Tabela 1: Indivíduos utilizados no experimento dos marcadores DAF e ISSR em *Croton*. Identificação das respectivas espécies do gênero estudado, bem como a indicação dos locais de coleta e nome do coletor. Todas as coletas sem indicação de país foram coletadas em território nacional. Legenda das Abreviações: PNSI = Parque Nacional da Serra de Itabaiana. AMBI: Coletor Ana Maria Benko-Iseppon e cols.; MFA: Maria de Fátima Araújo Lucena; LPF: Leonardo Pessoa Felix.

Espécie	Local de Coleta	Coletor	Sigla
<i>Croton pediscelatus</i> Kunth	Brumado - BA	AMBI 1496	CPDBA53
	PNSI-SE	MFA	CPDSE42
<i>Croton lundianus</i> (Didr.) Müll.Arg.	PNSI-SE	MFA	CLDSE
<i>Croton adenocalyx</i> Baill.	PNSI-SE	MFA	CADSE
<i>Croton selowii</i> Baill.	PNSI-SE	MFA	CSLSE
<i>Croton rhaminifolioides</i> Pax & K. Hoffm	Mirandiba-PE	MFA	CRHPE25
	Catolés - BA	AMBI 1493a	CRHBA29
	Mirandiba-PE	MFA	CRHPE34
	Catolés - BA	AMBI 1494	CRHBA24
<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth.	Mirandiba-PE	MFA	CHTPE20
	Érico Cardoso - BA	AMBI 1460	CHTBA54
	Mirandiba-PE	MFA	CHTPE44
<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	Porto do Folha-SE	MFA	CBTPE31
	Mirandiba-PE	MFA	CBTPE33
<i>Croton urticifolius</i> Lam.	Areia-PB	LPF 11472	CUTPB17
	Catolés - BA	AMBI 1487	CUTBA12
<i>Croton jacobinensis</i> Baill.	Crato - CE	LPF 11766	CJBCE
<i>Croton grewoides</i> Baill.	Mirandiba-PE	MFA	CGWPE
<i>Croton muscicapa</i> Müll. Arg.	Rio de Contas - BA	AMBI 1425	CMCBA
<i>Croton campestris</i> A.St.-Hil.	Rio de Contas - BA	AMBI 1469	CCPBA09
	Rio de Contas - BA	AMBI 1449	CCPBA14
<i>Croton betulaster</i> Müll. Arg.	Rio de Contas - BA	AMBI 1434	CBLBA03
	Rio de Contas - BA	AMBI 1476	CBLBA46
<i>Croton tricolor</i> Klotzsch ex Baill.	Catolés - BA	AMBI 1488	CTQBA
<i>Croton adamantinus</i> Müll. Arg.	Rio de Contas - BA	AMBI 1468	CAMBA15
	Andaraí-BA	AMBI 1528	CAMBA32
<i>Croton pycnademius</i> Müll. Arg.	Caetité-BA	AMBI 1510	CPNBA
<i>Croton lobatus</i> L.	Rio de Contas - BA	AMBI 1481	CLBBA21
	Andaraí-BA	AMBI 1527b	CLBBA55
<i>Croton klotzschii</i> (Didr.) Müll.Arg.	Andaraí-BA	AMBI 1527a	CKTBA
<i>Croton</i> sp. 01	Caetité-BA	AMBI 1507	CspBA16
<i>Croton</i> sp. 03	Rio de Contas - BA	AMBI 1442	CspBA30
<i>Croton</i> sp. 04	Rio de Contas - BA	AMBI 1427	CspBA28
<i>Croton schultesii</i> Müll. Arg.	Rio de Contas - BA	AMBI 1445	CSCBA
<i>Croton echioides</i> Baill.	Érico Cardoso - BA	AMBI 1461	CECBA
<i>Croton grandulosus</i> L.	Catolés - BA	AMBI 1485	CGDBA45
	PNSI-SE	MFA	CGDSE49
	PNSI-SE	MFA	CGDSE51
<i>Croton pretissimum</i>	Alemanha, BG-UJWG	AMBI	CPTEUPA38
<i>Croton triqueter</i> Lam.	Igatu-BA	AMBI 1534	CTCBA22
<i>Jatropha multifida</i> L.	Alemanha, BG-UJWG	AMBI	JEUPA39
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Alemanha, BG-UJWG	AMBI	JEUPA52
<i>Jatropha moranii</i> L.	Alemanha, BG-UJWG	AMBI	JEUPA47

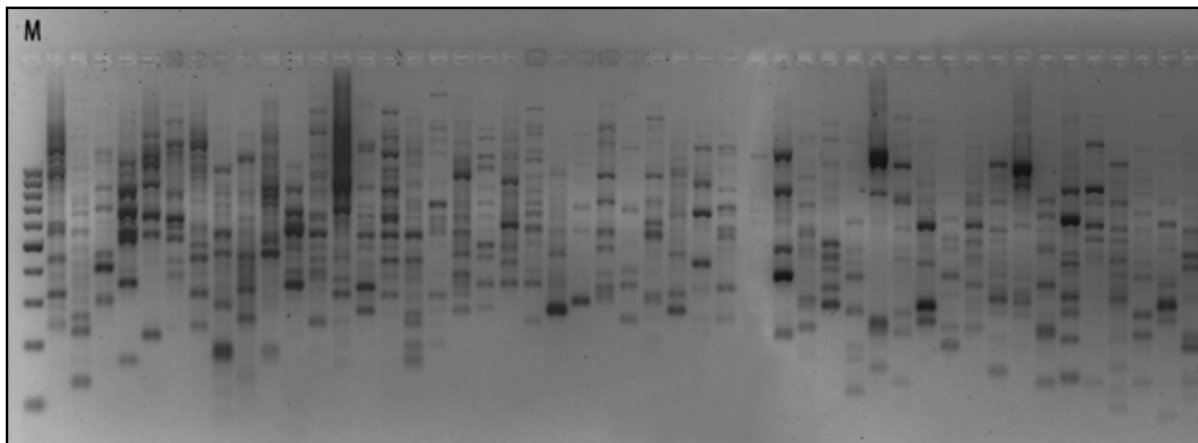


Figura 01: Fragmentos amplificados em *Croton* a partir da reação de DAF com o *primer* N-17, após eletroforese em gel de agarose, 1,8%. M: DNA padrão de 100 pb.

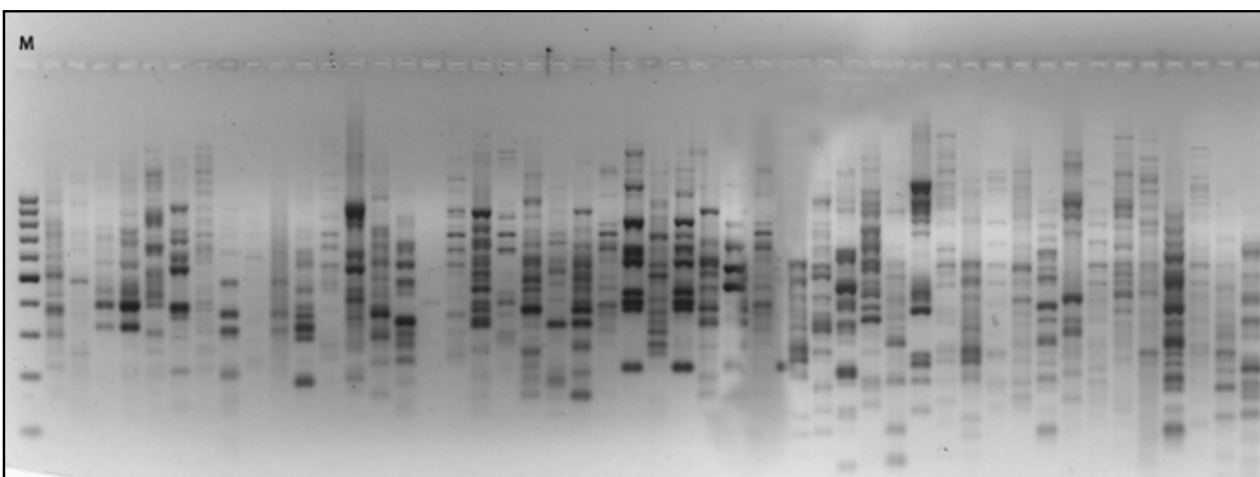


Figura 02: Fragmentos amplificados em *Croton* a partir da reação de ISSR com o *primer* 887, após eletroforese em gel de agarose, 1,8%. M: DNA padrão de 100 pb.

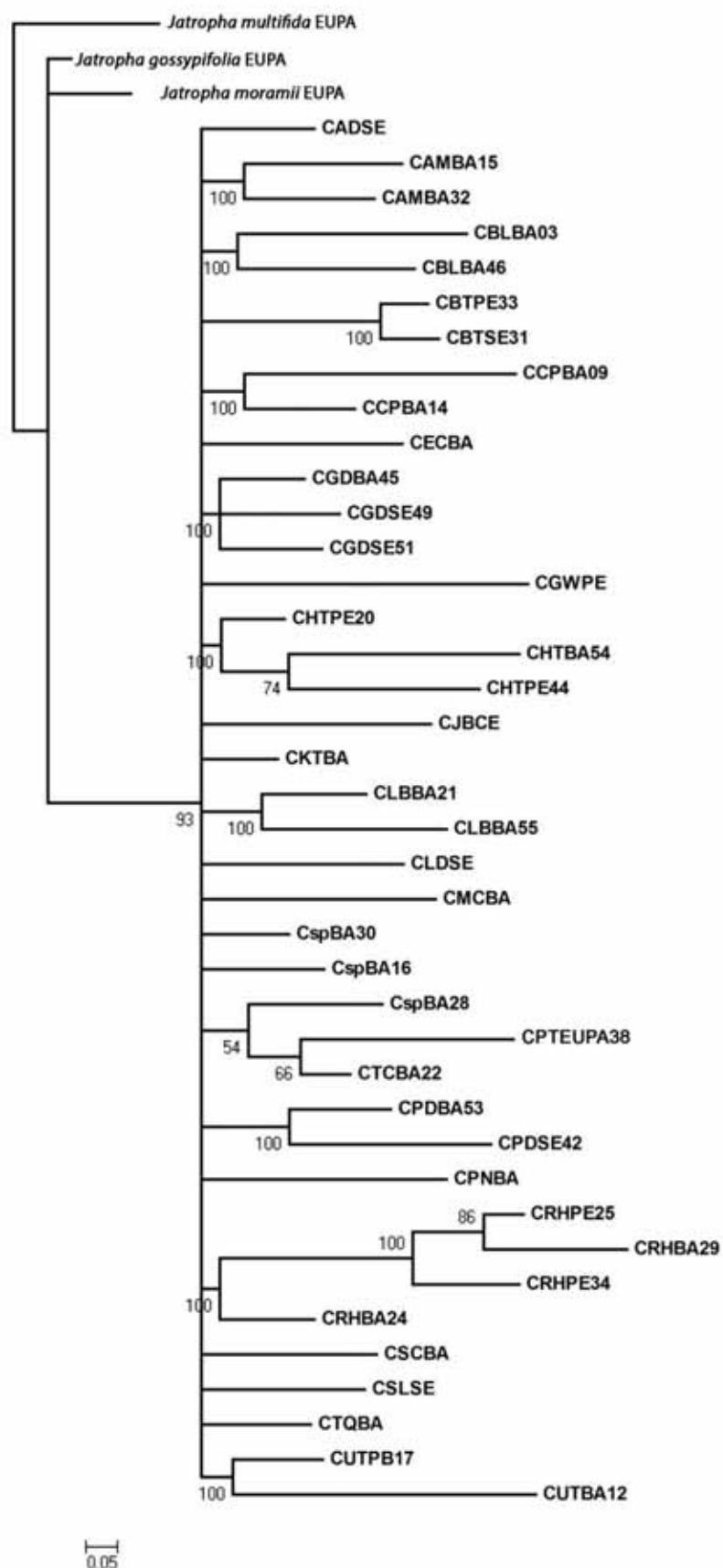


Figura 3: Análise Bayesiana a partir de marcadores DAF e ISSR em 40 indivíduos pertencentes a 21 espécies do gênero *Croton*. PE: Pernambuco; BA: Bahia; SE: Sergipe; CE: Ceará. Números na base do clado indicam valores de *bootstrap*. Espécies associadas às siglas indicativas das espécies encontram-se especificadas na Tabela 1.

CONCLUSÕES

- Apesar de pertencerem a seções distintas e possuírem grandes diferenças morfológicas, cinco das seis espécies estudadas citogeneticamente demonstraram relativa conservação cariomorfológica, com exceção de *C. lobatus* (seção *Astraea*);
- Com exceção de *C. lobatus* as espécies de *Croton* apresentaram uma aparente pobreza de heterocromatina constitutiva, estando esta categoria de sequência associada às RONS nas espécies analisadas;
- Os resultados obtidos indicam que estudos citogenéticos, como os aqui reportados, em outros representantes da seção *Astraea*, contribuirão na discussão da sua elevação, ou não, ao nível de gênero;
- Durante a seleção de *primers* para DAF e ISSR em *Croton* e *Chamaesyce* o elevado número de polimorfismos acessados e a consistência dos fenogramas gerados evidenciaram a eficiência das metodologias em inferir índices de variabilidade genética;
- O surpreendente número de loci polimórficos, gerados na aplicação dos primers de DAF e ISSR no banco da *Croton*, confirma observações de outras abordagens que refletem altíssima diversidade, refletida no posicionamento politômico de muitas entidades taxonômicas, indicando a necessidade de agregação de dados adicionais para melhor embasamento da análise.

ANEXOS

Instruções Genetics and Molecular Biology

SCOPE AND POLICY

Genetics and Molecular Biology (formerly named *Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics* - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética ([Brazilian Society of Genetics](#)).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal as judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

SUBMISSION OF PAPERS

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante, Editor-in-Chief
Genetics and Molecular Biology

Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736

14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brasil

2. A submission package sent to the Editorial

Office must

contain: **New**

a) A cover letter stating that all authors have approved the submission of the manuscript. The letter must be signed by the Corresponding Author and must inform the e-mail addresses of all other authors so that they can be contacted by the Editorial Office for confirmation of the submission.

b) An electronic copy of the text, tables and figures. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h).

Mailed CD-ROMs must be labeled with the first author's last name, platform and software (see detailed instructions below). This CD should also include files of Supplementary Material to be published online only, as well as of any unpublished or in press material cited in the text. Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

c) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; formatted to A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them

alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods –Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results –Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. Use standard abbreviations for journal titles.

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample Electronic Article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *Plos Biol* 2:194-205. <http://www.plosbiology.org>.

f) Internet Resources Section

this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. When databases are cited, date of consultation must be stated.

Sample Internet Resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

g) Tables: each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit

bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Scanned figures should not be submitted. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Color illustration can be accepted, but authors may be asked to defray the cost.

i) Nomenclature should adhere to current international standards.

j) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

k) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

m) Supplementary Material: Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the

published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures, they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. For online access, Supplementary material should be in PDF, JPEG or GIF formats.

In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement: *Supplementary material - the following online material is available for this article:*

- Table S1

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the

journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs and Copyright Transfer

Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval. A form of consent to publish and transfer of copyright will have to be signed by the corresponding author, also on behalf of any co-authors.

5. Reprints

Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.

Subscription

Membership to the Brazilian Society of Genetics entitles subscription to Genetics and Molecular Biology.

For nonmembers and institutions, the annual subscriptions rates (four issues/year) are:

Brazil and other South American Countries (Air Mail): Institutional - R\$ 500,00
Personal: R\$ 216,00.

Other Countries (Air Mail):
Institutional - US\$ 300.00

Revista Brasileira de Biociências

DIRETRIZES PARA AUTORES

Sumário do Processo de Submissão

Manuscritos deverão ser submetidos por um dos autores, em português, inglês ou espanhol. Para facilitar a rápida publicação e minimizar os custos administrativos, **a Revista Brasileira de Biociências aceitará somente submissões on-line. Não envie documentos impressos pelo correio.** O processo é compatível com os navegadores Internet Explorer versão 3.0 ou superior, Netscape Navigator e Mozilla Firefox. Outros navegadores não foram testados.

O autor da submissão será o responsável pelo manuscrito no envio eletrônico e em todo o acompanhamento do processo de avaliação.

Figuras e tabelas deverão ser organizadas em arquivos submetidos separadamente, como documentos suplementares. Documentos suplementares de qualquer outro tipo, como filmes, animações, ou arquivos de dados originais, podem ser submetidos como parte da publicação.

Se você estiver usando o sistema de submissão on-line pela primeira vez, vá para a página de Cadastro e registre-se, criando um 'login' e 'senha'. Se você está realmente registrado, mas esqueceu seus dados e não tem como acessar o sistema, clique em 'Esqueceu sua senha'.

Você verá que o processo de submissão on-line é fácil e auto-explicativo. São apenas 5 (cinco) passos.

Se você tiver problemas de acesso ao sistema, cadastro ou envio de trabalhos, por favor, entre em contato com o nosso Suporte Técnico.

Custos de publicação

Os autores não terão nenhuma despesa para a publicação dos seus trabalhos. Figuras e gráficos coloridos também são livres de despesas (ver adiante).

Seguindo a política do Open Access do Public Knowledge Project, assim que publicados, os autores receberão a URL que dará acesso ao arquivo em formato Adobe® PDF (Portable Document Format). Os autores

não receberão cópias impressas do seu manuscrito publicado.

Publicação e processo de avaliação

Durante o processo de submissão, será solicitado que os autores enviem uma carta de submissão, explicando o porquê de publicar na Revista, a importância do seu trabalho para o contexto de sua área e a relevância científica do mesmo.

Os manuscritos serão enviados para avaliadores, a menos que não se enquadrem no escopo da Revista. Antes de serem submetidos para consultores especializados, os trabalhos são avaliados pelo Editor-Chefe, o qual decide se o trabalho recebido é de suficiente relevância para a Revista Brasileira de Biociências. Os trabalhos serão sempre avaliados por dois especialistas que terão a tarefa de fornecer um parecer, tão logo quanto possível. Um terceiro avaliador poderá ser consultado caso seja necessário. Os avaliadores não serão obrigados a assinar os seus relatórios de avaliação.

Uma **"Carta de submissão"**, explicando o motivo de publicar em nossa Revista, a importância do seu trabalho para o contexto de sua área e a relevância científica do mesmo, deverá ser digitada no campo **"Comentários ao Editor"**, durante o processo de submissão eletrônica. Caso os autores decidam enviar uma versão assinada (em formato DOC ou PDF, por exemplo), a Carta de submissão pode ser enviada na forma de documento suplementar, separadamente.

Os autores **deverão fornecer informações de contato detalhado (telefone e e-mail) de pelo menos quatro potenciais revisores para o seu trabalho.** Estas informações deverão ser digitadas, também, no campo "Comentários ao Editor", durante a submissão, logo após a "Carta de submissão". Os potenciais revisores deverão ser especialistas na área de concentração do trabalho enviado. **Qualquer um dos revisores sugeridos não deverá ter publicado qualquer trabalho com os autores nos últimos cinco (5) anos, nem ser membro da mesma Instituição.** Revisores

sugeridos serão considerados revisores em potencial de acordo com a análise e recomendação dos Editores.

Desde que um manuscrito é avaliado, aceito, revisado e editorado, ele é imediatamente publicado na edição corrente da Revista Brasileira de Biociências, em formato PDF. Todos os autores têm a capacidade de acompanhar o progresso de submissão do seu trabalho no sistema a qualquer tempo, desde que esteja logado no sistema da revista.

Preparando os arquivos

Os textos deverão ser formatados em uma coluna, usando a fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo e margens de uma polegada (2,54 cm), em formato de papel A4. Todas as páginas devem ser numeradas sequencialmente. Não é necessário numerar as linhas. O manuscrito deverá estar em formato Microsoft® Word DOC (versão 2 ou superior). Arquivos em formato RTF também serão aceitos. **Não submeta arquivos em formato Adobe® PDF.** O arquivo que contém o texto principal do manuscrito não deverá incluir qualquer tipo de figura ou tabela. Estas deverão ser submetidas como documentos suplementares, separadamente.

Ao submeter um manuscrito, o autor responsável pela submissão deverá optar por uma das seguintes seções: 'Artigo completo', 'Revisão' ou 'Nota científica'.

Todos os trabalhos submetidos no envio on-line deverão subdivididos nas seguintes seções:

1. Documento Principal:

Primeira parte. Deverá conter as seguintes informações:

- Título do trabalho, conciso e informativo, com a primeira letra em maiúsculo, sem abreviações.
- Nome completo e por extenso do(s) autor(es), com iniciais em maiúsculo, afiliações e endereço completo de todos os autores, em nota de rodapé, e instituição financiadora (auxílio ou bolsas), se houver.
- Título abreviado do trabalho, com até 75 caracteres (incluindo espaços).
- Autor para contato e respectivo e-mail.

Segunda parte. Deverão conter as seguintes informações:

- Resumo: incluir o título do trabalho em português, quando o trabalho for escrito em inglês.

- Abstract: incluir o título do trabalho em inglês, quando o texto for em português.

Resumo e Abstract deverão conter, no máximo, 250 (duzentos e cinquenta) palavras, estruturados em apresentação, contendo o contexto e proposta do estudo, resultados e conclusões (por favor, omita os títulos).

- Palavras-chave e key words para indexação: no máximo cinco, não devendo incluir palavras do título.

Páginas subsequentes. 'Artigos completos' e 'Notas científicas' deverão estar estruturados em **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (Resultados e Discussão podendo ser reunidos), Agradecimentos e Referências**, seguidos de uma lista completa das legendas das figuras (se houverem), lista das figuras e tabelas (se houverem) e descrição de documentos adicionais (se houverem).

2. Documentos Suplementares:

Figuras e tabelas. Todas as imagens (ilustrações, fotografias, eletromicrografias e gráficos) são consideradas 'figuras'. **Figuras e tabelas devem ser fornecidos como arquivos separados (documentos suplementares), nunca incluídos no texto do documento principal.** Na editoração final, a largura máxima das figuras será: 170 mm, para duas colunas, e 82 mm, para uma coluna. Figuras coloridas serão permitidas. **Não haverá cobrança de custos adicionais para figuras a cores**, já que a impressão das mesmas (quando houver) será sempre feita em preto e branco (com informação que existe versão colorida das figuras on-line, na legenda).

Cada figura deverá ser editada para minimizar as áreas de espaços em branco, utilizando o tamanho final da ilustração. Se a figura consiste de diversas partes separadas, é importante que uma simples ilustração seja submetida, contendo todas as partes da figura. Escalas das figuras deverão ser fornecidas com os valores apropriados e devem fazer parte da própria figura (inseridas com o uso de um editor de imagens, como o Adobe® Photoshop, por exemplo), sendo posicionadas no canto inferior esquerdo de cada figura.

Ilustrações em preto e branco deverão ser fornecidas com aproximadamente 300 dpi de resolução, em formato TIFF ou JPG. Ilustrações mais detalhadas, como ilustrações botânicas ou zoológicas, deverão ser fornecidas com resoluções de, pelo menos, 600 dpi, em formato TIFF ou JPG. Para

fotografias (em preto e branco ou coloridas) e eletromicrografias, forneça imagens em TIFF ou JPG, com pelo menos, 300 dpi (ou 600 dpi se as imagens são uma mistura de fotografias e ilustrações em preto e branco).

ATENÇÃO! Como na editoração final dos manuscritos o tamanho útil destinado a uma figura de largura de página (duas colunas) é de 170 mm, para uma resolução de 300 dpi, a largura mínima das figuras deve ser **2000 pixels**. Para figuras de uma coluna (82 mm de largura), a largura mínima das figuras (para 300 dpi), deve ser pelo menos **970 pixels**. **Submissões de figuras fora destas características (larguras mínimas em pixels) serão imediatamente arquivadas.**

Por favor, não forneça imagens em arquivos Microsoft® PowerPoint (geralmente geradas com baixa resolução), nem embebidas em arquivos DOC. Arquivos contendo imagens em formato Adobe® PDF não serão aceitas.

As imagens que não contêm cor devem ser salvas como 'grayscale', sem qualquer tipo de camada ('layer'), como as geradas no Adobe® Photoshop, por exemplo (estes arquivos ocupam até 10 vezes mais espaço que os arquivos TIFF e JPG).

A Revista Brasileira de Biociências não aceitará figuras submetidas no formato GIF ou comprimidas em arquivos do tipo RAR ou ZIP. Se as figuras no formato TIFF são um obstáculo para os autores, por seu tamanho muito elevado, os autores podem convertê-las para o formato JPEG, antes da sua submissão, resultando em uma significativa redução no tamanho. Entretanto, não se esqueça que a compressão no formato JPEG pode causar prejuízos na qualidade das imagens. Assim, é recomendado que os arquivos JPEG sejam salvos nas qualidades 'Alta' (High) ou 'Máxima' (Maximum).

Os tipos de fontes nos textos das figuras deverão ser Arial ou Helvetica. Textos deverão ser legíveis. Abreviaturas nas figuras (sempre em minúsculas) devem ser citadas nas legendas e fazer parte da própria figura, inseridas com o uso de um editor de imagens (Adobe® Photoshop, por exemplo). **Não use abreviaturas, escalas ou sinais (setas, asteriscos), sobre as figuras, como "caixas de texto" do Microsoft® Word.**

Recomenda-se a criação de uma única estampa, contendo várias figuras reunidas, numa largura máxima de 170 milímetros (duas colunas) e altura máxima de 257 mm (página inteira). A letra indicadora

de cada figura deve estar posicionada no canto inferior direito. Inclua "A" e "B" (sempre em maiúsculas) para distingui-las colocando, na legenda, Fig. 1A, Fig. 1B, e assim por diante.

Não envie figuras com legendas na base das mesmas. As legendas deverão ser enviadas no final do documento principal.

Não use bordas de qualquer tipo ao redor das figuras. Se houver composição de figuras (Figs 1A, 1B, etc.), use cerca de 2 mm de espaço em branco entre cada figura.

É responsabilidade dos autores obter permissão para reproduzir figuras ou tabelas que tenham sido previamente publicadas.

As legendas deverão estar incluídas no documento principal do manuscrito, imediatamente após as Referências. Para cada figura, deverão ser fornecidas as seguintes informações: número da figura (em ordem numérica, usando algarismos arábicos (Figura 1, por exemplo; não abrevie); título abreviado da figura; legenda detalhada, com até 300 caracteres (incluindo espaços).

Cada tabela deverá ser numerada sequencialmente, com números arábicos (Tabela 1, 2, 3, etc; não abrevie). O título das tabelas deverá estar acima das mesmas. Tabelas deverão ser formatadas usando as ferramentas de criação de tabelas ('Tabela') do Microsoft® Word. Colunas e linhas da tabela devem ser visíveis, optando-se por usar linhas pretas que serão removidas no processo de edição final.

Não utilize padrões, tons de cinza, nem qualquer tipo de cor nas tabelas.

Dados mais extensos podem ser enviados como arquivos suplementares, mas que não estarão disponíveis no próprio artigo, mas como links para consulta pelo público.

Normas Gerais

Os nomes científicos, incluindo os gêneros e categorias infragenéricas, deverão estar em itálico. As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, deverão ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Citar o(s) autor(es) das espécies só a primeira vez em que as mesmas forem referidas no texto. Escrever os números até dez por extenso, a menos que sejam seguidos de unidade de medida, ou indiquem numeração de figuras e tabelas. Não utilizar espaço para separar as unidades de medidas dos valores. A posição preferencial de cada figura ou tabela poderá ser indicada no texto.

Sempre verifique que as figuras e tabelas estejam citadas no texto. No texto, use abreviaturas (Fig. 1 e Tab. 1, por exemplo). Evitar notas de rodapé. Se necessárias, utilizar numeração arábica em sequência.

As citações de autores no texto deverá seguir os seguintes exemplos: Baptista (1977), Souza & Barcelos (1990), Porto *et al.* (1979) e (Smith 1990, Santos *et al.* 1995). Citar o(s) autor(es) das espécies só a primeira vez em que as mesmas forem referidas no texto. Não serão aceitas citações de resumos de simpósios, encontros ou congressos. Comunicações pessoais não deverão ser incluídas na lista de Referências, mas poderão ser citadas no texto. A obtenção da permissão para citar comunicações pessoais e dados não publicados é de exclusiva responsabilidade dos autores. Abreviatura de periódicos científicos deverá seguir o Index Medicus/MEDLINE. Citações nas Referências deverão conter todos os nomes dos autores.

As referências deverão seguir os seguintes exemplos:

BATHER, F. A. 1900. The echinoderma. In: LANKASTER, E. R. (Ed.) *A treatise on Zoology*. London: Adam & Charles Black. v. 3, 325 p.

BONGERS, F., POPMA, J., MEAVE, J. & CARABIAS, J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, 74: 55-80.

BRIDSON, G. D. R. & SMITH, E. R. 1991. *Botanico-Periodicum-Huntianum/Supplementum*. Pittsburg: Hunt Institute.

BRUMMIT, R. K. & POWELL, C. E. 1992. *Authors of plant names*. Kew: Royal Botanic Gardens. 732 p.

CARNEIRO, F. G. 1997. Numerais em esfero-cristais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 49., 1997, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Ed. da UFMG. 1 CD-ROM.

CLEMENT, S. & SHELFORD, V. E. 1960. *Bio-ecology: an introduction*. 2nd ed. New York: J. Willey. 425 p.

DILLENBURG, L. R. 1986. *Estudo fitossociológico do estrato arbóreo da mata arenosa de restinga em Emboaba, RS*. 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

FORTES, A. B. 1959. *Geografia física do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Globo. 393 p.

SANTOS, R. P. & MARIATH, J. E. A. 2000. Embriologia de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: estudo da antera e grão de pólen e sua aplicação no melhoramento. In: WINGE, H. (Org.). CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2., 2000, Encantado, RS e REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., 2000, Encantado, RS. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO. p. 140-142.

STAFLEU, F. A. & COWAN, R. S. 1976-1988. *Taxonomic literature*. Utrecht: Scheltema & Holkema.

QUADRA, A. A. & AMÂNCIO, A. A. 1978. A formação de recursos humanos para a saúde. *Ciência e Cultura*, 30(12): 1422-1426.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Faculdade de Educação. Laboratório de Ensino Superior. 1974. *Planejamento e organização do ensino: um manual programado para treinamento de professor universitário*. Porto Alegre: Globo. 400 p.

ZANIN, A., MUJICA-SALLES, J. & LONGHI-WAGNER, H. M. 1992. Gramineae: Tribo Stipeae. *Bol. Inst. Biocienc.* 51: 1-174. (Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, 22).

Para documentos com DOI® (Digital Object Identifier) conhecido, seguir o exemplo abaixo (não usar “Disponível em:<...>Acesso em:<...>”):

SANTOS, R.P., MARIATH, J.E.A. & HESSE, M. 2003. Pollenkit formation in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). *Plant Syst. Evol.*, 237: 185-198.<<http://dx.doi.org/10.1007/s00606-002-0257-2>>

Links de páginas disponíveis na Internet devem ser citadas como abaixo:

POLÍTICA. 1998. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática. Disponível em:<<http://www.priberam.pt/Dicionarios/dlp.htm>>. Acesso em: 8 mar. 1999.