



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**DIVERSIDADE GENÔMICA E POTENCIAL FORMICIDA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton tetradenius* Baill.**

FABIANY DE ANDRADE BRITO

2020



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

FABIANY DE ANDRADE BRITO

**DIVERSIDADE GENÔMICA E POTENCIAL FORMICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Croton tetradenius* Baill.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutora em Ciências”.

Orientador
Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2020

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

B862d Brito, Fabiany de Andrade
Diversidade genômica e potencial formicida do óleo essencial de *Croton tetradenius* Baill / Fabiany de Andrade Brito; orientador Arie Fitzgerald Blank. – São Cristóvão, SE, 2020.
80 f. : il.

Tese (doutorado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Euforbiaceas. 2. Cróton (Botânica). 3. Essências e óleos essenciais. 4. Inseticidas vegetais. I. Blank, Arie Fitzgerald, orient. II. Título.

CDU 582.681.46:665.52/.54

FABIANY DE ANDRADE BRITO

**DIVERSIDADE GENÔMICA E POTENCIAL FORMICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Croton tetradenius* Baill.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Doutora em Ciências”.

APROVADA em 29 de julho de 2020.

Prof. Dr. Leandro Bacci
UFS
(Coorientador)

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Arrigoni-Blank
UFS

Prof. Dr. José Baldin Pinheiro
ESALQ/USP

Prof^a. Dr^a. Maria Imaculada Zucchi
APTA


Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank
UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

À minha mãe,
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todo poderoso pela proteção, saúde, força e determinação para trilhar essa jornada repleta de alegrias e desafios, me guiando sempre pelo bom caminho. A fé que carrego junto comigo com base forte em Cristo Jesus, Maria Santíssima, que passa na frente, e o glorioso São José intercedendo por mim. Por falar em interceder, a minha querida Santinha, Santa Teresinha do Menino Jesus que envia muitas rosas em forma de bênçãos, cuja devoção se iniciou no doutorado, me afastando de todo mal.

Ainda falando sobre o divino, agradeço por ter me colocado no ventre que aqui me trouxe, o da minha mãe Ruth. Por ela e para ela todas as coisas. É mérito dela eu ter me tornado quem hoje sou. Foi por ela que eu fiz a prova e foi ela quem não me fez desistir. Foi a pessoa certa para fazer minha matrícula no doutorado. Dedico e agradeço a ela não só essa, mas todas as minhas conquistas. Mãe que eu também tenho a oportunidade de cuidar como uma filha, juntas sempre! Meu irmão Gabriel, aliado e confidente, que está sempre torcendo por mim e me incentivando. É ele quem me ajuda prontamente em tudo que preciso e aguenta meu stress diário.

Ao professor Arie, que me orientou em uma longa jornada de quase 10 anos. Agradeço por todos esses anos, por me conceder pesquisas excelentes, pela preocupação com que os experimentos dessem certo, do campo ao laboratório. Pela paciência, motivação, amizade e ensinamentos. Também por ter me proporcionado a oportunidade de fazer doutorado sanduíche na ESALQ. Mais que um trabalho de qualidade, foi a realização de um sonho. A professora Fátima, exemplo de pessoa, muito dedicada e atenciosa. Ela que me recebe tão bem e sempre se preocupa em solucionar as pesquisas. Com ela também tive muitas palavras suaves e amigas. Aos dois, minha gratidão por todo sempre. Meu desejo é continuar nas pesquisas junto com vocês!

Agradeço a ele, que muito diz “para começar a ficar bom, precisa melhorar muito”, professor Leandro Bacci. Isso é só uma parte daquilo que ensina para nós, seus alunos, buscar fazer o melhor e com excelência todas as nossas atividades. Pessoa de índole e princípios admiráveis. Tê-lo como meu coorientador no doutorado foi uma honra.

Aos professores José Baldin e Maria Zucchi, agradeço as orientações no tempo em que estive no Laboratório Diversidade Genética e Melhoramento de Plantas. Pela amizade, por terem me recebido com tanto carinho e me tratado como se fosse sua orientada. Todas as experiências adquiridas durante esses quase 5 meses em Piracicaba foram muito enriquecedoras. Assim, cumpriu-se minha ida para ESALQ que era almejada desde o mestrado.

À Universidade Federal de Sergipe pela formação desde a graduação. Ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade onde fiz mestrado e doutorado. Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro na concessão da bolsa e financiamento das pesquisas. Também ao PROCAD no auxílio moradia em Piracicaba.

Ao Grupo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Aromáticas, Condimentares e Olerícolas - GPMACO, o qual tenho orgulho de fazer parte desde 2010. Em especial Alberto, amigo que esteve comigo nas coletas, experimentos e que me ajudou muito com a implantação do BAG. Minha amiga Daniela Nizio, quem me acolhe nos momentos difíceis, disponível sempre para ajudar e melhorar, principalmente nas escritas. Alisson, Thiago, Juliana, Mércia, Carlos, Luiz, Pedro, Vinicius, Gustavo, Elisângela e Sara. Muito obrigada a todos!

Ao pessoal do laboratório de Entomologia. Alisson que me ajudou desde o início, ele me deu atenção e graças a ele eu consegui prosseguir nos experimentos com formiga. Carlisson, me ajudou não só nas análises estatísticas, mas também me escutou e tranquilizou nos momentos de preocupação. Jefferson, ajudou em tantas noites até a madrugada via WhatsApp corrigindo o artigo. Ane, tão meiga e paciente, me acompanhou em muitas tardes no laboratório. Rosana, que também esteve comigo em alguns experimentos, mesmo não dando certo, mas me incentivou e abdicou de algumas manhãs/tardes para coletar formiga comigo. Muito obrigada!

A todos que em São Paulo me ajudaram com o trabalho de genética. Em especial, Gabriel Dequigiovanni, Carlos Eduardo Batista, Alessandro Pereira e Carolina Grando. Carol, pessoa incrível e que muito me ensinou, não só “geneticamente falando”, mas também com seus conselhos que levarei sempre comigo.

Agradeço a Márcia Leite e Mariana Niederheitmann que me deram abrigo em Piracicaba. Ter contado com o carinho e ajuda delas foi essencial, sem elas eu não teria morado a poucos metros da ESALQ. Saudades da Kitnet, ali deixei um pedaço de mim e foi lá que eu aprendi que viver sem televisão é muito melhor, que eu posso enjoar do tempero da minha comida e que o “glub” do garrafão de água na madrugada dá muito medo! Entre tantas outras coisas, morar sozinha trouxe muitos aprendizados e Piracicaba me proporcionou muitas experiências, amizades e passeios, os quais eu não teria oportunidade se não fosse a ida pelo doutorado.

Agradeço a meu namorado Tharcisio, pessoa a qual admiro muito, que me acompanha desde quando eu estava em Piracicaba. Por estar ao meu lado, pelo carinho, afeto, paciência e tantas coisas boas. Seu apoio e palavras incentivadoras foram muito importantes durante essa jornada.

A toda minha família, amigos (as), madrinhas e padrinhos...

Para finalizar, ao Corsinha. Foi graças a ele que eu não tive que enfrentar o “busão” de cada dia. Por causa dele eu pude chegar às 6 horas da manhã na UFS para aula, estudar ou montar experimentos, voltando para casa ao fim do dia ou da noite (antes ou depois do engarrafamento) em segurança, carregando meus pertences.

Palavras são poucas perto de toda gratidão que carrego no meu coração. Enfim doutora, com muito orgulho e alegria, principalmente porque tive pessoas muito especiais e essenciais ao meu lado.

Agradeço a todos!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Origem, botânica e usos de <i>Croton tetradenius</i> Baill	3
2.2 Conservação e caracterização de recursos genéticos vegetais.....	4
2.3 Diversidade e estrutura genética de plantas bioativas	6
2.4 Marcadores moleculares SNP (<i>Single Nucleotide Polimorphism</i>).....	8
2.5 Parâmetros genéticos.....	9
2.6 Atividade inseticida dos óleos essenciais.....	11
2.7 Uso potencial dos óleos essenciais no controle de formigas cortadeiras.....	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
4. ARTIGO 1: BAIXA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATIVAS DE <i>Croton tetradenius</i> Baill., UMA FUTURA CULTURA COM ATIVIDADE INSETICIDA, USANDO MARCADORES SNP	35
Resumo.....	35
Abstract	36
4.1. Introdução	36
4.2. Material e Métodos	38
4.3. Resultados	41
4.4. Discussão.....	45
4.5. Conclusões.....	48
4.6. Referências Bibliográficas	48
5. ARTIGO 2: TOXICIDADE E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS CAUSADAS PELOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Croton tetradenius</i> E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS EM <i>Acromyrmex balzani</i>	53
Resumo.....	53
Abstract	54
5.1. Introdução	54
5.2. Material e Métodos	55
5.3. Resultados	57
5.4. Discussão.....	62
5.5. Conclusões.....	63
5.6. Referências Bibliográficas	64
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Plantas de <i>Croton tetradenius</i> coletadas em Sergipe.....	4

ARTIGO 1

Figura	Página
1 Localização das 38 plantas de <i>Croton tetradenius</i> amostradas no estado de Sergipe, Brasil.....	40
2 Análise discriminante de componentes principais. Gráfico de densidade – considerando o primeiro componente principal – das 38 plantas de <i>Croton tetradenius</i> avaliadas em Sergipe. Cada pico representa os indivíduos de uma localidade, sendo: Porto da Folha: roxo; Poço Redondo: vermelho; Lagarto: verde; Pacatuba: azul..	43
3 Composição gráfica – COMPOPLOT - ilustrando as probabilidades de atribuição das 38 plantas de <i>Croton tetradenius</i> coletadas em Sergipe com base na análise discriminante de componentes principais. Cada planta é representada por uma barra vertical, dividida em cores de acordo com as localidades, que são as frações estimadas da associação dos indivíduos no agrupamento. As plantas de cada localidade estão representadas de acordo com as cores, sendo: Porto da Folha - roxo; Poço Redondo - vermelho; Lagarto - verde; Pacatuba - azul.....	43
4 Dendrograma das 38 plantas de <i>Croton tetradenius</i> , obtido pelo método UPGMA baseado na distância genética de Rogers (1972) com 10.000 <i>bootstraps</i> . As plantas de cada localidade estão representadas de acordo com as cores, sendo: Porto da Folha - roxo; Poço Redondo - vermelho; Lagarto - verde; Pacatuba - azul.	44

ARTIGO 2

Figura	Página
1 Curvas de sobrevivência e tempo letal médio (TL ₅₀) (intervalo de confiança de $\pm 95\%$) das operárias de <i>Acromyrmex balzani</i> expostas via fumigação, aos óleos essenciais de plantas de <i>Croton tetradenius</i> de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários por 70h	59
2 Distância total percorrida (mm) (A), velocidade (mm s ⁻¹) (B), velocidade angular (graus s ⁻¹) (C) e tempo imóvel (D) ($\pm$ erro padrão) das operárias de <i>Acromyrmex balzani</i> em arenas tratadas com óleos essenciais de plantas de <i>Croton tetradenius</i> de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários. Os tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).	61
3 Tempo (s) de imobilidade ($\pm$ erro padrão) das operárias de <i>Acromyrmex balzani</i> em arenas parcialmente tratadas com óleos essenciais de plantas de <i>Croton tetradenius</i> de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários. Os tratamentos seguidos pela mesma letra em cada zona, tratadas e não tratada, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).	62

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela		Página
1	Código de planta, origem e informação geográfica das 38 plantas de <i>Croton tetradenius</i> que foram amostradas no estado de Sergipe, Brasil	39
2	Estimativas de diversidade genética para as 4 localidades onde foram coletadas as 38 plantas de <i>Croton tetradenius</i> , incluindo número de amostras (N), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E), índice de Shannon (I) e coeficiente de endogamia ($f = 1 - H_O/H_E$).....	42
3	Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as 38 plantas de <i>Croton tetradenius</i> considerando as quatro localidades amostradas.....	42
4	F_{ST} par-a-par (Weir e Cockerham 1984) para as plantas do <i>C. tetradenius</i> nas quatro localidades amostradas em Sergipe.....	42

ARTIGO 2

Tabela		Página
1	Código de planta, origem e informação geográfica de plantas de <i>Croton tetradenius</i> de populações naturais no estado de Sergipe, Brasil.	55
2	Composição química (%) dos óleos essenciais de plantas de <i>Croton tetradenius</i> de populações naturais no estado de Sergipe, Brasil.....	58
3	Toxicidade de óleos essenciais de plantas de <i>Croton tetradenius</i> de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários sobre operárias de <i>Acromyrmex balzani</i> , via fumigação, após 48 h de exposição....	58
4	Tempo letal (TL_{50}) das operárias de <i>Acromyrmex balzani</i> expostas via fumigação, ao óleo essencial de plantas de <i>Croton tetradenius</i> de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários.....	60

RESUMO

BRITO, Fabiany de Andrade. **Diversidade genômica e potencial formicida do óleo essencial de *Croton tetradenius* Baill.** São Cristóvão: UFS, 2020. 68p. (Tese – Doutorado em Agricultura e Biodiversidade).*

Croton tetradenius Baill. (Euphorbiaceae), planta aromática e bioativa endêmica do Nordeste do Brasil, possui potencial inseticida e fungicida. Analisar a variabilidade genética e realizar a atividade biológica são etapas importantes na implantação de coleções em Bancos Ativos de Germoplasma visando a conservação de uma espécie vegetal. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estimar a diversidade genômica e estrutura genética de *C. tetradenius* em Sergipe, para introdução dessa espécie no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe (UFS), bem como realizar a avaliação da toxicidade e efeitos subletais dos óleos essenciais de genótipos de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários sobre a formiga cortadeira *Acromyrmex balzani*. Para análise genética, coletou-se 38 plantas em quatro municípios do estado de Sergipe, Brasil (Porto da Folha, Poço Redondo, Lagarto e Pacatuba) e utilizou-se os marcadores moleculares de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP), obtidos com a genotipagem por sequenciamento (GBS). Os óleos essenciais de cinco plantas de *C. tetradenius* das mesmas localidades e seus compostos majoritários: 1,8-cineol, α -pineno, cânfora, (*E*)-pinocarveol e *p*-cimeno, foram testados via fumigação sobre operárias de *A. balzani* coletadas dos formigueiros na UFS. O reagente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 3% foi usado na extração do DNA para o desenvolvimento da biblioteca genômica, seguido do sequenciamento, processamento das sequências brutas e filtragens, resultando na identificação de 1.387 marcadores SNPs. Uma baixa diversidade genética média foi observada ($H_O < H_E = 0,086$; $I = 0,143$; $f = 0,099$). De acordo com a análise de variância molecular (AMOVA), a maior diversidade genética foi observada dentro das localidades (95%) do que entre as localidades (5%) e foi baixa a diferenciação genética ($F_{ST} = 0,041-0,062$) entre as populações. A análise discriminante de componentes principais (DAPC) mostraram maior sobreposição das plantas de Lagarto e Poço Redondo, indicando que o fluxo gênico atual foi menor que o fluxo gênico histórico. A toxicidade dos tratamentos foi avaliada com as concentrações e tempos letais. Os efeitos subletais foram obtidos por meio de bioensaios comportamentais sem e com chance de escolha das formigas cortadeiras. Todos os tratamentos repeliram e afetaram o comportamento de *A. balzani*. A sobrevivência de *A. balzani* foi reduzida, sendo a maior TL_{50} de 42,91 horas para CRT042. Valores de CL_{50} variaram de 1,47 a 2,40 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para os óleos essenciais e de 0,45 a 11,20 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para os compostos majoritários, sendo a cânfora mais tóxica. Conclui-se que há viabilidade da implantação de uma coleção de *C. tetradenius* no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe com as plantas de *C. tetradenius* coletadas, sendo necessárias coletas adicionais de indivíduos nas quatro populações avaliadas, bem como a amostragem em outras regiões de ocorrência da espécie para ampliar a base genética. Foram verificadas a atividade formicida do óleo essencial e compostos majoritários de *C. tetradenius*, demonstrando seu potencial como inseticida natural sobre *A. balzani*.

Palavras-chave: diversidade genética, inseticida botânico, marcador molecular, SNP, velaminho-da-serra.

* Comitê Orientador: Arie Fitzgerald Blank – UFS (Orientador), Leandro Bacci – UFS (Coorientador).

ABSTRACT

BRITO, Fabiany de Andrade. **Genomic diversity and formicidal potential of the essential oil of *Croton tetradenius* Baill.** São Cristóvão: UFS, 2020. 68p. (Thesis - Doctor of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Croton tetradenius Baill. (Euphorbiaceae), an aromatic and bioactive plant endemic to the Northeast region of Brazil, has insecticide and fungicide potential. Analyzing genetic variability and implementing biological activity are important steps for establishing collections in Active Germplasm Banks for conservation of a plant species. Thus, the objective of the present study was to estimate the genomic diversity and genetic structure of *C. tetradenius* in Sergipe for introduction of this species in the Active Germplasm Bank of Medicinal and Aromatic Plants of the Federal University of Sergipe (Universidade Federal de Sergipe - UFS), as well as evaluate the toxicity and sublethal effects of essential oils from *C. tetradenius* genotypes and their major compounds on the leaf-cutting ant *Acromyrmex balzani*. Genetic analysis was conducted by collecting 38 plants in four cities in the state of Sergipe, Brazil (Porto da Folha, Poço Redondo, Lagarto, and Pacatuba) and using the molecular markers of single-nucleotide polymorphisms (SNP) obtained from genotyping by sequencing (GBS). The essential oils from five *C. tetradenius* plants from the same locations and their major compounds: 1,8-cineol, α -pinene, camphor, (*E*)-pinocarveol, and *p*-cymene, were tested by fumigation on *A. balzani* worker ants collected from anthills at UFS. The reagent 3% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was used in extraction of DNA for development of the genomic library, followed by sequencing, processing of the raw sequences, and filtering, resulting in identification of 1387 SNP markers. A low average genetic diversity was observed ($H_O < H_E = 0.086$; $I = 0.143$; $f = 0.099$). According to the analysis of molecular variance (AMOVA), greater genetic diversity was observed within the localities (95%) than between the localities (5%), and genetic differentiation ($F_{ST} = 0.041$ -0.062) among populations was low. The discriminant analysis of principal components (DAPC) showed greater overlap between the Lagarto and Poço Redondo plants, indicating that the current gene flow was less than the historical gene flow. The toxicity of the treatments was evaluated from the concentrations and lethal times. The sublethal effects were obtained through choice and no-choice behavioral bioassays of the leaf-cutting ants. All the treatments repelled *A. balzani* and affected ant behavior. *A. balzani* survival declined; the highest LT_{50} was 42.91 hours for CRT042. LC_{50} values ranged from 1.47 to 2.40 $\mu\text{L.L}^{-1}$ for the essential oils and from 0.45 to 11.20 $\mu\text{L.L}^{-1}$ for the major compounds, camphor being the most toxic. A *C. tetradenius* collection can be established in the Active Germplasm Bank of Medicinal and Aromatic Plants of the Federal University of Sergipe with the *C. tetradenius* plants collected. It is necessary to collect additional individuals in the four populations evaluated and to obtain samples from other regions where the species occurs to expand the genetic base. The formicidal activity of the essential oils and major compounds of *C. tetradenius* was confirmed, showing its potential as a natural insecticide against *A. balzani*.

Keywords: botanical insecticide, genetic diversity, molecular marker, SNP, *velaminho-da-serra*.

* Supervising Committee: Arie Fitzgerald Blank – UFS (Advisor), Leandro Bacci – UFS (Adjunct advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

A biodiversidade ou diversidade biológica descreve a variedade do mundo natural, envolvendo o conjunto de todas as espécies de seres vivos da biosfera. O Brasil é considerado um país megadiverso, detentor de uma ampla biodiversidade, principalmente dos recursos genéticos vegetais, como as plantas bioativas (KATE; LAIRD, 1999; MITTERMEIER et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007; VIJAYAN et al., 2011). O desmatamento e a fragmentação dos *habitats* têm causado enormes perdas destas plantas do seu ambiente natural. Nesse sentido, estratégias de conservação são imprescindíveis e a melhor alternativa é a conservação *ex situ* em Bancos Ativos de Germoplasma. Nesses locais, as plantas bioativas além de serem conservadas, são identificadas e caracterizadas para uso futuro em programas de melhoramento genético (SMALE; DAY-RUBENSTEIN, 2002; MIRJALILI et al., 2009; AMARAL JUNIOR et al., 2010). Dentre essas plantas bioativas estão as pertencentes à família Euphorbiaceae, de ampla distribuição nos variados tipos de vegetação brasileira e que possuem importância econômica, como as espécies de *Croton*, seu segundo maior gênero (RODRIGUES; CARVALHO, 2001; BESERRA et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2017; FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2019).

O gênero *Croton* é bastante diverso e apesar dos vários usos, principalmente na medicina a partir do conhecimento popular, ainda são necessários estudos mais aprofundados sobre as utilidades das espécies, a exemplo das que possuem óleos essenciais. Desta forma, destaca-se o *Croton tetradenius* Baill., que é endêmica do Nordeste do Brasil, cujo óleo essencial já foi constatado efeito fungicida e inseticida para uso na agricultura (SALATINO et al., 2007; TRINDADE; LAMEIRA, 2014; MAGALHÃES et al., 2015; CARVALHO et al., 2016; BLANK et al., 2017). *C. tetradenius* ocorre em locais com solo arenoso e pedregoso, em ambiente úmido e sombreado (LUCENA, 2009). Porém corre o risco de ser perdida do seu ambiente natural, a exemplo de alguns municípios de Sergipe os quais esta espécie ocorre, caso o desmatamento e a intensa fragmentação dos *habitats* continuem. Tudo isso antes mesmo de serem elucidados os potenciais usos dos óleos essenciais presentes nesta espécie. Dessa forma, demanda conservação em coleções *ex-situ* nos Bancos Ativos de Germoplasma.

Um dos grandes desafios para a implementação de Bancos Ativos de Germoplasma é a escolha de acessos que representem a diversidade genética existente em ambientes naturais (RAO, 2004). Assim, a caracterização genética pode ser realizada antes da implantação dos acessos nas coleções, usando marcadores moleculares de DNA para obter os dados sobre a diversidade e estrutura genômica. Tais informações são essenciais para implantação em coleções porque permite entender sua base genética, ou seja, se as plantas em estudo possuem baixa, mediana ou alta diversidade genética, bem como ter informações sobre o compartilhamento de alelos entre as populações naturais. Dessa forma, é possível estabelecer o número de plantas para representar a diversidade genética onde foram coletadas (SEGARRA-MORAGUES et al., 2005; GUPTA et al., 2015; SOLER et al., 2017; DULLOO et al., 2018).

A caracterização por meio dos marcadores moleculares de polimorfismos de nucleotídeos únicos (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) têm sido amplamente utilizados em várias análises genéticas, com aplicação na genotipagem em larga escala, eficientes na análise da diversidade e estrutura genômica populacional. Os SNPs são marcadores bialélicos e codominantes, apresentam ampla ocorrência no genoma, possibilitando a obtenção de um grande número de marcadores, sendo assim muito informativos na diferenciação entre os indivíduos (N'DA et al., 2016; KUHN et al., 2019; ZHAO et al., 2019).

Realizar caracterização das substâncias químicas oriundas do metabolismo secundário, como os óleos essenciais, também é importante, pois permite identificar quais compostos estão presentes nas amostras. Estes podem ser avaliados quanto aos potenciais usos, por meio da atividade biológica, como a ação inseticida em diversas pragas agrícolas (LIRA et al., 2015; TAIZ et al., 2017; PAVELA et al., 2020).

Já existem muitos estudos descrevendo o efeito inseticida dos óleos essenciais, causando toxicidade em insetos-praga devido à complexidade dos compostos químicos que atuam por meio de diferentes mecanismos de ação. Assim, produtos naturais com óleos essenciais presentes em sua formulação podem ser um método alternativo no controle de tais insetos-praga, principalmente por serem lipofílicos e biodegradáveis. Insetos eusociais são altamente organizados, com elaborada comunicação química, exibindo alterações comportamentais, tornando-se assim um grande problema para agricultores quando se tornam pragas, como as formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*. O controle químico aplicando inseticidas sintéticos é o mais usado nas culturas afetadas por estes insetos-praga. Porém demanda grande quantidade desses produtos altamente nocivos para o ambiente, animais e saúde humana, sendo importante a obtenção de métodos alternativos (LIMA, 2004; VILELA et al., 2008; LÓPEZ; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010; DELLA LUCIA et al. 2014; PAVELA et al., 2019).

As formigas cortadeiras de folhas podem causar grandes prejuízos, com danos que podem dizimar plantações inteiras. *Acromyrmex balzani* é uma formiga cortadeira de ampla importância econômica porque afeta diversas culturas, principalmente florestais e pastagens. Por isso é importante adotar estratégias para seu controle, por serem organismos altamente organizados e de difícil manejo (DELLA LÚCIA et al., 2013; DELLA LUCIA et al., 2014). Além do mais, ainda não foram cadastrados produtos específicos para seu controle. Nesse sentido, o desenvolvimento de formicidas à base de óleos essenciais torna-se uma alternativa promissora (SILVA et al., 2019).

Sendo assim, objetivou-se: (i) caracterizar a diversidade genômica e estrutura genética de plantas de *C. tetradenius* das populações nativas em Sergipe para implantação de uma coleção no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da UFS, utilizando marcadores SNP; (ii) avaliar a atividade formicida e alterações comportamentais dos óleos essenciais de genótipos de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários sobre a formiga cortadeira *Acromyrmex balzani*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem, botânica e usos de *Croton tetradenius* Baill

O gênero *Croton* (família Euphorbiaceae) possui cerca de 1.200 espécies de plantas distribuídas no continente americano e de ocorrência comum nos habitats tropicais, principalmente no bioma Caatinga. Só no Brasil, um dos principais centros de diversidade desse gênero, existem cerca de 350 espécies, com 252 endêmicas, presentes nos mais variados tipos de vegetação. É composto por plantas de hábitos heterogêneos, formado por árvores, arbustos, subarbustos, ervas, lianas ou trepadeiras (WEBSTER, 1993; BERRY et al., 2005; SECCO et al., 2012).

A ocorrência de espécies de *Croton* em regiões tropicais com vegetação secundária talvez tenha sido um fator chave para sua diversificação evolutiva. São espécies amplamente distribuídas e de endemismos locais, o que ocasiona a ocorrência desse gênero em muitas áreas dos trópicos. Uma grande diversidade morfológica foliar foi observada, a exemplo dos tricomas, que foram relevantes tanto na caracterização dos tipos quanto no reconhecimento das espécies, constituindo-se em uma das análises úteis na taxonomia desse gênero (MÜLLER 1866; WEBSTER, 1993; BURGER; HUFT, 1995; LUCENA; SALES, 2006).

São popularmente conhecidas como velames, canelas silvestres ou marmeleiros, e possuem uma vasta utilidade (FERNANDES et al., 1971). Alguns usos medicinais e populares desse gênero incluem tratamento contra o câncer, constipação intestinal, diarreia, problemas digestivos, diabetes, feridas externas, febre, hipertensão, inflamações, vermes intestinais, malária, dor, úlceras e obesidade. É evidente o enorme potencial desse gênero, porém mais estudos químicos e farmacológicos são necessários, dada sua magnitude. Algumas espécies ainda não foram estudadas quanto ao seu uso, porém acredita-se que muitas possuem grande potencial por sintetizarem compostos bioativos (CHARLES et al., 2007; SALATINO et al., 2007; LIMA; PIRANI, 2008; TRINDADE; LAMEIRA, 2014).

A presença de compostos bioativos diversos reflete na ampla utilização dos recursos genéticos desse gênero, tais como: *Croton sphaerogynus* como carrapaticida (CASTRO et al., 2019); *Croton urucurana* com atividade antifúngica (GURGEL et al., 2005); *Croton heliotropiifolius* com uso antibacteriano (ALENCAR-FILHO et al., 2017); *Croton grewioides* usada contra diarreia (SILVA et al., 2016); *Croton laevigatus* com ação anticâncer (SONG et al., 2017); *Croton lechleri* com uso antiviral e antioxidante (UBILLAS et al., 1994; DESMARCHELIER et al., 1997); *Croton echinocarpus* como anti-HIV (RAVANELLI et al., 2016) e *Croton megalocarpus* para produção de biodiesel (KAFUKU; MBARAWA, 2010). Sendo assim, constituem-se entre as melhores fontes de compostos químicos bioativos da família Euphorbiaceae (RIZK, 1987; PAYO et al., 2001; CARNEIRO et al., 2011).

Diversos metabólitos secundários são encontrados no gênero *Croton*, como os óleos essenciais, constituídos por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, além dos fenilbutanoides e alcaloides (SALATINO et al., 2007; AGUIAR et al., 2016). Assim, as espécies de *Croton* constituem-se em uma grande fonte de fitoquímicos com propriedades bioativas excepcionais e sua exploração pode ser útil para diferentes setores, como alimentar, de cosméticos, das indústrias medicinais e para agricultura. Os óleos essenciais obtidos das folhas de *Croton pulegioides* apresentaram 1,8-cineol ($15,86 \pm 0,23\%$), *p*-cimeno ($14,40 \pm 0,01\%$), cânfora ($13,28\% \pm 0,12\%$) e α -humuleno ($12,98 \pm 0,22\%$) em maior quantidade. Segundo os autores, a variabilidade na composição química dos óleos essenciais depende essencialmente da origem das amostras, bem como da influência da localização geográfica e do clima (NEVES; CAMARA, 2012). Ressalta-se que cerca de 18 espécies da família Euphorbiaceae de ocorrência no Brasil já estão em risco de extinção e o gênero *Croton* está entre os 20 gêneros mais diversos da flora brasileira inseridos nas perspectivas de conservação (CORDEIRO et al., 2013).

Dentre as espécies do gênero *Croton*, destaca-se *Croton tetradenius* Baill., de ampla ocorrência na região Nordeste do Brasil, em Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio

Grande do Norte e Sergipe (CARNEIRO-TORRES, 2009), além de Goiás e Minas Gerais. É encontrada na Caatinga e em florestas perenifólias, geralmente sob solo arenoso, pedregoso ou argiloso, como também em áreas de capoeiras, brejos de altitudes e áreas antropizadas. Monoica, aromática e com látex translúcido, essa planta arbustiva tem cerca de 1 metro, possui folhas alternas a verticiladas no ápice dos ramos; estípulas com 0,7-1 x 0,3-0,4 mm, persistentes, não foliáceas, triangulares, inteiras, sem glândulas; pecíolo não viscoso medindo de 1-2,3 cm. A inflorescência é terminal, racemiforme, medindo de 3-7,5 cm, contínua entre as cúlculas estaminadas e pistiladas. As flores unissexuais são estaminadas ou pistiladas, e suas sementes são oblongas, rugosas e marrons, medindo cerca de 3-4 x 2-3 mm. Por fim, os frutos são do tipo tricoca. Foi constatado que as fases de florescimento e frutificação geralmente ocorre nos meses de fevereiro e março (WEBSTER, 1994; LUCENA, 2009; SILVA et al., 2009).

Conhecida popularmente como velaminho-da-serra, *C. tetradenius* (Figura 1) possui um óleo essencial volátil presente nas folhas e, conforme estudado por Carvalho et al. (2016), é constituído por cerca de 26 compostos químicos, entre eles monoterpenos e sesquiterpenos, sendo a cânfora o majoritário. Em Sergipe, 37 plantas de *C. tetradenius* apresentaram baixa variabilidade química dentro de cada população e significativa variabilidade entre as populações estudadas, sendo estas quimicamente agrupadas em dois grupos distintos. Dentre os 25 compostos químicos observados, monoterpenos como α -pineno, α -terpineno, *p*-cimeno, 1,8-cineol, (*E*)-pinocarveol, cânfora, pinocarvona, *cis*-ascaridol e *trans*-ascaridol foram detectados em maior quantidade (ALMEIDA-PEREIRA et al., 2019).

Foi constatado que essa espécie tem potencial para controlar o crescimento de estirpes bacterianas de origem alimentar (ALMEIDA-PEREIRA et al., 2019), possui atividade inseticida sobre larvas e adultos de *Aedes aegypti* (CARVALHO et al., 2016) e contra o fungo fitopatogênico *Fusarium solani* (BLANK et al., 2017), o que a destaca com potencial uso para obtenção de produtos naturais, justificando a busca de estratégias para sua conservação, bem como estudos mais aprofundados (WEBSTER, 1994; FORZZA et al., 2010).



Figura 1: Plantas de *Croton tetradenius* coletadas em Sergipe.

2.2 Conservação e caracterização de recursos genéticos vegetais

A biodiversidade é a base da vida e sua perda ocasiona sérios problemas. Acontece que, devido à degradação ambiental, há o esgotamento dos recursos naturais. Dentre as causas dessa

degradação está o desmatamento, que é a supressão total da vegetação nativa de uma área (até mesmo com as queimadas) para outros usos da terra, como agrícola, construções urbanas e pastagens. Essas atividades antrópicas feitas de forma inadequada têm acarretado uma grande fragmentação ambiental e ocasionado a intensa pressão sobre a fauna e a flora, trazendo perdas irreversíveis desses recursos genéticos nos ambientes naturais, consequentemente gerando desequilíbrio ambiental (AGRAWAL et al., 2012; INPE, 2013; BRASIL, 2019).

No Brasil, a vegetação é muito heterogênea em seus variados tipos de clima, a exemplo da Caatinga, que contém pelo menos cem tipos de paisagens únicas, das quais fazem parte os refúgios montanhosos e os rios permanentes, como o Rio São Francisco. Esse bioma sofre gravemente pela degradação ambiental, especialmente com os processos de desertificação. Sabe-se que, para cada planta extinta, pelo menos outras 30 espécies a acompanha, muitas delas micro-organismos. Portanto, a perda da biodiversidade pode aumentar a uniformidade do material genético vegetal, levando a sua diminuição e até mesmo a extinção de espécies nos ambientes naturais. Em *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae), cujo centro de origem é a América do Sul, a erosão genética do material silvestre ocorreu devido ao intenso desmatamento (SILVA; CORRÊA, 2007; SILVA; RIOS, 2013; PHILLIPS, 2017).

Um componente importante que faz parte da biodiversidade são as plantas medicinais aromáticas (KATE; LAIRD, 1999; HEYWOOD, 2015; CHANDRA DE, 2016), cujos recursos genéticos estão sendo perdidos do ambiente com a continuidade do desmatamento, antes mesmo de serem elucidados todos os seus potenciais usos (OGWU et al., 2014; DULLOO et al., 2017). Como fonte medicinal, estas espécies sempre estiveram na vanguarda de praticamente todas as culturas das civilizações. São consideradas recursos importantes, a partir delas muitos medicamentos são produzidos. Por milhares de anos, as plantas medicinais têm sido usadas para tratar distúrbios da saúde, adicionar sabor ou conservar alimentos. Por isso, estes recursos necessitam urgente de estratégias que garantam a sua conservação para uso futuro, evitando assim, que espécies potencialmente úteis ao homem sejam perdidas (BENNETT et al., 2017; DAR et al., 2017; BAMOLA et al., 2018).

Essas espécies de plantas amplamente presentes nas populações naturais possuem diversos usos devido aos metabólitos secundários que possuem. Elas recebem a denominação de plantas bioativas, já que possuem alguma ação sobre outros seres vivos, cujo efeito pode se manifestar devido a sua presença no ambiente ou do uso direto das substâncias delas extraídas (DURMIC; BLACHE, 2012; VALLI et al., 2012; MOURA et al., 2018; CARDOSO et al., 2019). Exemplos de produtos naturais à base de plantas tem sido utilizados no controle de várias doenças e pragas agrícolas, consistindo em um dos fatores que fazem com que a conservação desses recursos genéticos vegetais se torne cada vez mais importante, especialmente para obtenção de uma agricultura sustentável, que visa suprir as necessidades de populações cada vez maiores (VIJAYAN et al., 2011). Para isso, a coleta de exemplares seguido da conservação *ex situ* evita sua perda causada pela degradação e fragmentação ambiental (KASSO; BALAKRISHNAN, 2013; SILVEIRA et al., 2018).

Desde o século passado, vários governos nacionais e centros internacionais de pesquisa agrícola desenvolvem uma série de programas e institutos para identificar e preservar os recursos genéticos vegetais *in situ* (isto é, em uso pelos agricultores locais) ou *ex situ*, em centros de bancos de genes ou em Bancos Ativos de Germoplasmas (BAG's). Várias espécies de plantas já foram coletadas e conservadas *ex situ*. A FAO estima que existem cerca de 7 milhões de recursos genéticos de plantas sendo armazenados em todo o mundo com um total de 1.308 BAG's, em 77 países. Existe ainda a preocupação de que o vasto conhecimento tradicional sobre plantas e seu lugar nos ecossistemas, obtidos ao longo dos milênios, possa ser perdido. Assim, uma solução foi desenvolver esse banco de dados *ex situ* para abrigar extensas coleções de plantas (JIA et al., 2017; PHILLIPS, 2017).

Manter as coleções de uma espécie em BAG é um passo importante para aumentar a compreensão dos recursos genéticos de plantas bioativas (BHERING et al., 2015), uma vez que essas coleções visam garantir um suprimento sustentável dos recursos genéticos vegetais.

Porém, para introduzir uma espécie em um BAG, é necessário coletar um número mínimo de acessos que represente a diversidade genética presente nas áreas de ocorrência natural a fim de realizar com êxito a conservação. Por isso, é preciso conhecer as populações nativas existentes para depois coletar e implantar a coleção, evitando também acessos duplicados (SEGARRA-MORAGUES et al., 2005; MASCHER et al., 2019). A manutenção do BAG demanda recursos financeiros e estruturais, mas por vezes há limitações, sejam elas na manutenção das plantas ou por falta de espaço físico quando há um número muito grande de amostras. Então, por esse motivo, as amostras a serem preservadas devem representar ao máximo o padrão de distribuição da diversidade genética de uma população em um menor número de indivíduos (CAVALLARI, 2004).

Os avanços tecnológicos na biologia molecular contribuíram substancialmente para a compreensão da diversidade genética das plantas (MONFARED et al., 2018). Nesse sentido, os marcadores moleculares são ferramentas eficientes para avaliação da variação genética (RAMAKRISHNAN et al., 2016). Eles permitem obter informações sobre a diversidade genética dos indivíduos que, por sua vez, contribui para uma seleção mais eficiente de quais e quantos indivíduos deverão ser incluídos no programa de conservação. Otimizando assim, tais recursos físicos, humanos e financeiros para manutenção do BAG, ajudando a selecionar os indivíduos de forma que uma amostra representativa daquela população seja efetivamente conservada (SEGARRA-MORAGUES et al., 2005; VINSON et al., 2018; DAR et al., 2019).

Numa etapa posterior, o conhecimento sobre a diversidade genética pode ser útil no planejamento de programas de melhoramento (SOUZA et al., 2020). Esse conhecimento é essencial para identificar pais geneticamente distantes com características agrônomicas favoráveis para produzir populações híbridas, permitindo a seleção e desenvolvimento de novas cultivares melhoradas (KUHN et al., 2019). Por exemplo, observada uma baixa diversidade genética entre as plantas que se pretende conservar, haverá a necessidade de coletas adicionais ou em outros locais de ocorrência a fim de ampliar a base genética para o melhoramento genético futuro. Para tal finalidade, é necessário dispor de uma alta e representativa diversidade genética (FARIAS NETO; RIBEIRO JÚNIOR, 2008; ROSA et al., 2013).

Para realizar um plano de manejo bem-sucedido de conservação *ex situ* de uma espécie vegetal, é necessário o conhecimento da diversidade e estrutura genética presentes nas populações nativas para projetar esquemas de amostragem apropriados e uma avaliação da representação genética do material coletado na população de origem, antes da sua implantação em BAG's (SEGARRA-MORAGUES et al., 2005). Além da caracterização genética, a conservação dos recursos genéticos vegetais deve ser acompanhada de diversos estudos, tais como: morfoagronômicos, fisiológicos, bioquímicos, moleculares (AMARAL JUNIOR et al., 2010) e de atividade biológica (MAXIA et al., 2009).

Em suma, a caracterização genética é um elo de ligação entre conservação e utilização de recursos genéticos vegetais, especialmente das plantas bioativas. Entender a diversidade dos recursos genéticos é um componente essencial da biodiversidade. Além disso, tais recursos genéticos estão associados a potenciais usos, pois são ingredientes essenciais para pesquisa e desenvolvimento (P&D) nas indústrias farmacêutica, universidades, medicina botânica, agricultura e biotecnologia industrial (SWANSON; GÖSCHL, 2000). Nesse sentido, há um esforço para associar a diversos recursos genéticos em todo o mundo o valor aplicado de uso direto no melhoramento genético (LEE; SOHN, 2016).

Além disso, a diversidade genética é a matéria-prima para o melhorista, porque o espectro de variação genética disponível determina o potencial de seleção e utilização dessas plantas (GUPTA et al., 2015). Assim, o conhecimento da diversidade e da estrutura genética é importante na seleção e conservação de plantas bioativas, fornecendo informações relevantes para a seleção, criação e conservação do BAG (SOLER et al., 2017).

2.3 Diversidade e estrutura genética de plantas bioativas

A variabilidade genética interpopulacional pode estar seriamente ameaçada com o desmatamento, principalmente devido à perda dos alelos, que por vezes são extintos com o desaparecimento das populações locais. Isto demanda a criação e manutenção de reservas naturais, sendo a diversidade genética um aspecto importante a ser considerado pelos órgãos públicos e outras instituições durante as ações de conservação da biodiversidade. Diversidade genética é definida como a variedade de alelos e genótipos em uma população, gerando diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais em indivíduos nas suas populações naturais. Estudos sobre a variação genética e a diferenciação entre populações de uma espécie são essenciais para avaliar as melhores estratégias em esquemas de amostragem e de conservação (FRANKHAM et al., 2008; SILVESTRINI et al., 2013; MONFARED et al., 2018). Dessa forma, elucidar a diversidade e a estrutura genômica nas espécies com potenciais usos, como as plantas bioativas de populações naturais, fornecem as informações relevantes para a seleção, implantação e estratégias de conservação de BAG's (SOLER et al., 2017).

A diversidade genética das espécies de plantas depende principalmente da adaptabilidade destas a ambientes em constante mudança, como ocorre nas plantas bioativas. Alguns fatores podem alterá-la entre as populações de mesma espécie, como as mudanças climáticas (PAULS et al., 2012; WAN et al., 2016), localização geográfica (SHILPHA et al., 2013), temperatura, umidade e tipo de solo, tamanho da população e sistema reprodutivo (HUANG et al., 2016). Fatores que trazem como consequência a diminuição do tamanho populacional devido à intervenção humana e fatores abióticos diversos, afetam diretamente não só a diversidade, como também a estrutura genética. Isso torna as populações vulneráveis devido à limitação do potencial evolutivo, fazendo com que estas não tenham variabilidade suficiente para sobreviver às mudanças ambientais abruptas (TORO et al., 2005; BALDONI et al., 2020).

A manutenção da diversidade genética é relevante na biologia da conservação, já que é ela quem fornece o potencial adaptativo e evolutivo de uma espécie. Por isso, o conhecimento da composição genética de uma espécie e de como ela está estruturada (organizada) nas suas populações são fundamentais nas estratégias de conservação. É importante entender também se a estruturação genética observada é uma característica natural ou é resultado das ações antrópicas, tais como a fragmentação dos *habitats*. A fragmentação pode alterar o fluxo gênico entre as populações, tornando-as mais suscetíveis à deriva genética e endogamia (FRANKHAM et al., 2008).

Populações pequenas de plantas em número e tamanho de área tendem, por vezes, a apresentar baixos níveis de diversidade genética. Com a intensa redução, uma solução seria seu conhecimento prévio para implementar melhores estratégias de conservação, antes dessas plantas serem perdidas do seu ambiente natural (JESUS et al., 2009; KAHILAINEN et al., 2014; DULLOO, 2018; RAMESHKUMAR et al., 2019). Baixo fluxo gênico, deriva genética e isolamento geográfico interferem, por exemplo, na estrutura genética de uma população de plantas bioativas. Comparado ao fluxo gênico, é mais provável que a deriva genética afete a baixa troca de genes entre *habitats* isolados (JONSSON et al., 2008; LI et al., 2019). Os níveis de variação e estrutura genética podem ser medidos dentro e entre as populações, e estes podem indicar, por exemplo, o status de espécie em risco de extinção, devido à destruição dos *habitats* das populações naturais (WANG et al., 2016).

As frequências genotípicas de plantas de populações naturais podem ser testadas para verificar se estão de acordo com o equilíbrio descrito por Hardy-Weinberg. Estes testes podem fornecer informações importantes sobre a estrutura genética das populações. O coeficiente de endogamia (F_{IS}), por exemplo, pode informar sobre o afastamento das proporções esperadas para uma população em equilíbrio. Um valor positivo indica um excesso de homozigotos, já negativo indica um déficit de homozigotos. Interpretar as causas desse excesso ou déficit é difícil, mas pode-se afirmar que a causa mais comum do excesso de homozigotos é o acasalamento não aleatório ou a subdivisão populacional. Quando é observado um déficit de

heterozigotos e diferenciação significativa, é possível inferir que essa estruturação pode ser consequência do isolamento pela distância entre as populações (ALLENDORF; LUIKART, 2007; FRANKHAM et al., 2008).

Em *Peganum harmala*, a alta diversidade genética auxiliou na orientação das coletas (EL-BAKATOUSHI; AHMED, 2018). Em mamona (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae) foi obtido uma melhor compreensão para conservação, bem como no manejo de germoplasma, orientando nos programas de melhoramento (BAJAY et al., 2009). Em *Jatropha curcas* L a baixa diversidade genética observada indicou a necessidade de ampliar a base genética e aumentar a variabilidade da coleção dessa espécie (ALKIMIM et al., 2013). Em populações de *Theobroma speciosum* observou-se que embora os efeitos da fragmentação sejam pequenos em populações, o processo de fragmentação persistente pode facilitar a deriva genética, levando essas populações à depressão por endogamia, ocasionando mudanças na estrutura e na perda da diversidade genética, necessitando de estratégias para sua preservação (DARDENGO et al., 2018). Fatores que afetaram a estrutura genética de espécies de *Zingiber* foram atribuídos à localização e fluxo gênico, via pólen (HUANG et al., 2016). A moderada variabilidade genética em estudos com plantas de populações nativas de *C. tetradenius* do estado de Sergipe usando marcadores ISSR foi relevante para sua conservação em futuros programas de melhoramento genético (ALMEIDA-PEREIRA et al., 2017).

A avaliação da diversidade e estrutura genética dentro e entre populações pode ser realizada por meio da utilização de diferentes técnicas. Dentre elas, os marcadores genéticos moleculares, que tratam de todo e qualquer fenótipo molecular de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (BORÉM; CAIXETA, 2009). Eles são caracterizados devido às diferenças genéticas no DNA, que são determinadas por mutações pontuais, gerando polimorfismos que podem ser acessados por várias técnicas, utilizando leis clássicas mendelianas. As principais vantagens que os marcadores moleculares possuem são a obtenção praticamente ilimitada de polimorfismos genéticos que podem ser detectados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, bem como de identificar o genótipo sem que haja influência ambiental (FALEIRO, 2007; KUMAR et al., 2009; IDREES; IRSHAD, 2014).

Nas plantas, os marcadores moleculares têm sido úteis para orientar a coleta de material genético com a finalidade de conservação *ex situ*, descrever a organização da variação genética em populações naturais e conhecer a magnitude da diversidade genética da espécie e das populações. Diferentes tecnologias moleculares possuem vantagens e limitações, que compreendem desde a infraestrutura disponível, requisitos técnicos e de custos, ao nível de conhecimento genético da espécie de interesse, bem como os tipos de dados que as diferentes técnicas podem gerar e nos níveis taxonômicos em que eles podem ser mais adequadamente aplicados (PHILLIPS; VASIL, 2001; FALEIRO, 2007).

2.4 Marcadores moleculares SNP (Single Nucleotide Polimorphism)

Os marcadores moleculares polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Polimorphism* - SNP), têm sido amplamente utilizados em várias análises genéticas. Os dados obtidos pelos marcadores moleculares SNP são fáceis de coletar em grandes quantidades devido à sua alta frequência no genoma, à facilidade de design dos conjuntos de transcriptomas (ou genomas) e à disponibilidade de plataformas de análise SNP de alto rendimento, sendo assim um marcador molecular potencialmente útil (N'DA et al., 2016; KUHN et al., 2019).

Os SNP podem ser definidos como qualquer substituição ou inserção/exclusão de base única (InDel) no genoma, em uma posição na fita de DNA de uma espécie, onde duas ou mais bases alternativas ocorrem em frequências consideráveis (> 1%). São marcadores codominantes, abundantes nas regiões codificantes e não codificantes para genotipagem de larga escala na descoberta simultânea de SNP. São importantes devido à sua abundância, distribuição uniforme e forte associação com as características de interesse. É possível o desenvolvimento de marcadores SNP em espécies não-modelos, para as quais há pouca ou

nenhuma informação de sequência genômica. São ideais para realizar estudos genéticos, identificação de cultivares, na genômica comparativa, evolução e mapeamento de *loci* de características quantitativas, bem como de diversidade e estrutura genética de populações/germoplasmas. Os marcadores SNPs também oferecem muitas aplicações no melhoramento de plantas como construção de mapas genéticos de alta resolução, identificação varietal e análise filogenética. Tudo isso pode ser feito utilizando o sequenciamento de nova geração, sequenciando e identificando SNPs de parte do genoma (até 10%) de um indivíduo (PRIMMER et al., 2002; OSMAN et al., 2003; FRANKHAM et al., 2008; HAYWARD et al., 2012; KUMAR et al., 2012; ZHANG et al., 2016; BALOCH et al., 2017; SICCHA-RAMIREZ et al., 2018).

O sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) permitiu um aumento considerável na escala das análises genômicas, sequenciando e genotipando milhares de regiões e genomas de interesse. Os avanços nas NGS reduziram os custos do sequenciamento de DNA até que o uso da metodologia de genotipagem por sequenciamento (*Genotyping by Sequencing* - GBS) tornou-se viável para espécies de genoma grande e de alta diversidade. A metodologia do GBS é considerada a abordagem mais conveniente para a detecção de SNP em larga escala e para realizar genotipagem de alto rendimento. Há um procedimento para a construção de bibliotecas GBS com base na redução da complexidade do genoma, usando enzimas de restrição (ERs). Isso ocorre de forma simples, rápida, extremamente específica, altamente reproduzível e que pode alcançar regiões importantes do genoma. A eficiência de sequenciamento para genotipagem é diretamente escalável com a diversidade genética. Esse procedimento pode ser generalizado para qualquer espécie a um baixo custo por amostra, logo os pesquisadores podem realizar caracterização genética de uma espécie sem primeiro ter que desenvolver ferramentas moleculares anteriores, ou podem determinar a estrutura da população para fins de conservação, mesmo que não haja o conhecimento prévio do genoma (ELSHIRE et al., 2011; NARUM et al., 2013; SWARTS et al., 2014; ANDREWS et al., 2016; PAVAN et al., 2017).

Os recentes avanços na genética estatística populacional oferecem o potencial de explorar informações genóticas multilocus individuais para testar com mais rigor as quantificações de indivíduos homozigotos e heterozigotos numa população. A análise genética por meio do marcador SNP é feita com o auxílio imprescindível dos softwares computacionais, que também foram projetados para uso de dados obtidos das plantas, afirmando que existe uma significativa relação entre *in silico* e resultados experimentais. Dessa forma, as ferramentas computacionais podem ajudar a identificar e caracterizar SNPs funcionais. Uma abordagem alternativa é tirar proveito das tecnologias de NGS e pontuar SNPs diretamente dos dados da sequência usando um *pipeline* de bioinformática (KHARABIAN, 2010; BHAT et al., 2016). Assim, com o desenvolvimento de tecnologias NGS, a exploração de marcadores SNP ganhou mais atenção e esse tipo de marcador é amplamente utilizado na pesquisa de genética de plantas bioativas (LI et al., 2019).

Os marcadores SNP foram ferramentas eficientes para detectar variabilidade genética em algumas espécies de plantas, mediante a interpretação de alguns parâmetros, tais como as heterozigosidades (observada e esperada – H_O/H_E), índice de Shannon (I), coeficiente de endogamia (f), F_{ST} par a par das populações, análise de variância molecular (AMOVA) e análises de agrupamento e de componentes principais (PCA). Por exemplo, em espécies de *Dendrobium*, *Physalis*, *Cryptomeria japônica*, gergelim e em videiras, este conhecimento auxiliou no desenvolvimento de estratégias de conservação para os germoplasmas, bem como na orientação dos cruzamentos (GARZÓN-MARTÍNEZ et al., 2015; BASAK et al., 2019; DE LORENZIS et al., 2019; IWASAKI et al., 2019; RYU et al., 2019).

2.5 Parâmetros genéticos

Em virtude das crescentes mudanças antrópicas nos ecossistemas naturais, é necessário monitorar a diversidade biológica. Nesse sentido, o potencial que os marcadores genéticos

moleculares podem proporcionar consiste em fornecer tais informações de diversidade relevantes. Dados genéticos observados são importantes para monitorar, manejar e conservar espécies vegetais. As estimativas genéticas na amostragem de plantas para fins de conservação dos recursos genéticos devem ser obtidas com a interpretação dos parâmetros genéticos analisados. Estimativas confiáveis de riqueza alélica e de coeficiente de endogamia, por exemplo, são importantes em investigações de genética de populações (COSTA et al., 2015).

Tomadas de decisões sobre a conservação de recursos genéticos precisam ser pautadas nos parâmetros genéticos populacionais, especialmente nas espécies com potenciais econômicos e alvo da interferência humana na natureza. Alguns parâmetros para fins de conservação são observados, como número médio de indivíduos para todos os locos analisados, número médio de alelos por loco, número efetivo de alelos por loco, riqueza alélica, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada (SILVA et al., 2014).

As frequências gênicas e genóticas para cada loco são calculadas por meio da contagem de alelos e genótipos. A frequência relativa dos heterozigotos, ou seja, a heterozigosidade observada (H_o), que é simplesmente a proporção dos indivíduos amostrados que são heterozigotos, é calculada com a divisão do número absoluto de heterozigotos pelo número de indivíduos da amostra. Já a heterozigosidade esperada (H_e) é calculada a partir do modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo $H_e = 2\sum[p_i(1-p_i)]$, em que p_i é a frequência relativa de um dado alelo (i) em cada amostra (VASCONCELLOS; CONTEL, 2006; FRANKHAM et al., 2008).

Dessa forma, para a avaliação e seleção genética precisa nas estratégias de conservação, estimativas de componentes de variância/covariância e outros parâmetros genéticos para características importantes devem ser conhecidas (LUPI et al., 2015). A variedade de índices de diversidade ocorre devido à evolução de conceitos em ecologia, bem como à discussão sobre perda de diversidade, que ganhou força principalmente nos últimos trinta anos. Assim, cada índice busca o modo mais simples e preciso para expressar o real estado de diversidade de espécies no ambiente (SEMENSATTO JÚNIOR, 2001).

O índice de Shannon (I) é um dos índices de diversidade genética mais utilizados, baseado na abundância proporcional das espécies. Possui facilidade de cálculo e possibilidade de comparação através de teste estatístico (teste t). Este índice apresenta duas premissas principais, a primeira de que os indivíduos estão distribuídos aleatoriamente em uma população indefinidamente grande (efetivamente infinita), e a segunda de que todas as espécies estão representadas. É calculado utilizando a fórmula $H' = -\sum p_i \log p_i$, onde p_i é a abundância relativa (proporção) da espécie i na amostra, dado por $p_i = n_i/N$, em que n_i é o número de indivíduos da espécie i e N é o número total de indivíduos. A base logarítmica pode ser a 2, a 10 ou n (SEMENSATTO JÚNIOR, 2001). O valor de I varia de 0 a 1, com valores mais próximos de zero apresentando menor diversidade (SILVA et al., 2015).

O coeficiente de endogamia ou endocruzamento foi proposto por Wright (1965) (f) e é a probabilidade de que indivíduos carreguem alelos em locos que sejam idênticos por descendência (FRANKHAM et al., 2008). Este é um parâmetro que afeta diretamente a diversidade genética de uma população e resume de forma conveniente sua estrutura genética. Nele há os seguintes parâmetros de descrição: o F_{IT} que expressa a correlação entre os gametas que se unem para produzir os indivíduos em relação aos gametas da população total, o F_{IS} que expressa a média das correlações, sendo cada uma delas proveniente dos gametas que se unem em cada subpopulação em relação aos gametas desta subpopulação e o F_{ST} que expressa a correlação entre os gametas ao acaso dentro da subpopulação em relação aos gametas da população total. Os três parâmetros apresentam a seguinte relação: $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$ (WRIGHT, 1965). O coeficiente de endogamia depende do tamanho efetivo da população, variando de 0 a 1, visto que, quanto menor for o tamanho da população, maior será o número de ancestrais comuns, conseqüentemente maior será o coeficiente de endogamia (BREDÁ, 2004).

A distribuição da variação genética dentro e entre localidades avaliadas para populações de plantas pode ser observada com a obtenção da análise de variância molecular (AMOVA), que revela se a porcentagem da variação genética está presente entre os indivíduos ou dentro das populações (EXCOFFIER et al., 1992).

Quando se quer inferir a estrutura da população determinando o número de *clusters* (grupos) observados sem conhecimento prévio, várias abordagens podem ser usadas, como o agrupamento *K-means*, agrupamento Bayesiano, métodos multivariados e a análise discriminante de componentes principais (DAPC) (JOMBART et al. 2010). O DAPC resume a variação máxima entre os grupos, minimizando as diferenças dentro do grupo (ROULLIER et al., 2013). Com as informações dessas funções discriminantes pode ser gerado um gráfico de barras (COMPOPLOT), com as probabilidades de atribuição de cada indivíduo aos agrupamentos formados (JOMBART; AHMED, 2011). Relações genéticas e divergência entre indivíduos podem ser observadas com a construção de dendrogramas utilizando o algoritmo UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic means*), com base na distância genética de Rogers (ROGERS, 1972).

Nesse sentido, os marcadores SNP podem ser úteis na avaliação da diversidade genômica e estrutura genética por meio da interpretação desses parâmetros genéticos. Sendo que podem ser obtidos a partir dos dados de plantas bioativas de populações naturais a serem implantadas em BAG's, incluindo aquelas que são potencialmente úteis devido à ação inseticida na agricultura.

2.6 Atividade inseticida dos óleos essenciais

As plantas são capazes de sintetizar um grande número de compostos químicos. Entre eles, os oriundos do metabolismo primário que participam do crescimento e desenvolvimento (lipídios, proteínas, carboidratos) e os oriundos do metabolismo secundário. Estes, chamados de metabólitos secundários, são originados a partir de rotas biossintéticas diversas que estão restritas às plantas pertencentes a determinadas famílias ou gêneros. Dentre os metabólitos secundários estão os óleos essenciais (OE's) ou óleos voláteis. Esses metabólitos possuem a função de proteger as plantas no ambiente contra perda de água, herbívoros e patógenos, servem como atrativos para polinizadores, estão envolvidos na comunicação química, funcionam como agentes de competição entre plantas e da simbiose entre plantas e microrganismos (BAKKALI et al., 2008; SIVAKUMAR; BAUTISTA-BAÑOS, 2014; DHIFI et al., 2016; TAIZ et al., 2017).

Os OE's são uma mistura de substâncias voláteis presentes em células ou glândulas especializadas de algumas plantas, umas delas compostas por mais de cem compostos químicos de substâncias moleculares complexas (dentro desta, pode existir uma variação de 5000-7000 constituintes químicos possíveis). Eles estão difundidos no reino vegetal, sendo que algumas famílias são amplas fontes dessas substâncias, tanto em diversidade química quanto em quantidade. Normalmente são encontrados em plantas superiores (cerca de 50 famílias) das angiospermas (KUMAR; SENAPATI, 2015; VASILEVA, 2015; HASSAN; SOLEIMANI, 2016; SAIDI et al., 2017; GEORGIEVA; KOSEV, 2018). As substâncias químicas mais comumente encontradas nos OE's são os álcoois simples, aldeídos, fenóis, ésteres, éteres, peróxidos, ácidos orgânicos, compostos de enxofre e terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) (SILVA, 2012; CHAMORRO et al., 2012; ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014; BASKAR et al., 2016; SIMÕES et al., 2017; SOUZA et al., 2019). Na maioria das vezes os compostos majoritários, que são aqueles presentes em maior quantidade nos OE's, são os principais responsáveis pela atividade biológica. Porém os compostos minoritários, apesar de estarem presentes em menor quantidade, podem interagir com os compostos mais abundantes da mistura e até mesmo entre si, interferindo na atividade biológica do OE devido às interações de sinergismo, aditismo e até mesmo antagonismo (CUENCA-ESTRELLA, 2004; CHAMORRO et al., 2012; OLIVERO-VERBEL et al., 2014; LINGAN, 2018; LUNA et al., 2019).

Os terpenos ou terpenoides são a classe estruturalmente mais variada presente nos OE's. O nome terpenoide ou terpeno deriva do fato de que os primeiros membros dessa classe foram isolados da terebentina. Para síntese de todos os terpenos, a regra que se aplica é a do isopreno, que é baseada em observações de química orgânica. O bloco de construção dos terpenos utiliza como matéria-prima unidades de isoprenos, o difosfato de isopentenila (IPP), que é um isopreno na forma ativa que está em equilíbrio com o seu isômero, o difosfato de dimetilalila (DMAPP). As reações de condensação dos terpenos ocorrem com a participação do fosfato, diferentemente das reações de condensação clássica. A biossíntese de terpenos pode ser dividida em duas rotas principais. Geralmente, as plantas usam duas vias separadas para formar o IPP: a do metil-eritritol-4-fosfato (MEP) que é plastidial e do acetato-mevalonato (MVA) que é citosólica. Nas células vegetais, a via MVA sintetiza o IPP citosólico, que pode ser transportado para as mitocôndrias para a biossíntese dos isoprenoides. No plastídio, o IPP e DMAPP são sintetizados pela via do MEP. Para construir IPP via MVA no citosol, inicialmente duas unidades de acetil coenzima A (Ac-CoA) são condensadas em acetoacetil-CoA por meio de uma reação catalisada pelo acetoacetil (AcAc) -CoA tioliase (AACT). O IPP e o DMAPP dão origem a mono e sesquiterpenos, que tem diversas funções entre os gêneros das plantas bioativas (ADAM et al., 2002; DEWICK, 2002). Os monoterpenos, por exemplo, são uma grande família de produtos naturais, conhecidos como constituintes dos OE's defensores das plantas que os possui, além de possuírem papéis ecológicos em atração polinizadora e alelopatia das plantas. Quando extraídos, podem ser amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (RAMAK et al., 2014).

Mais de 3000 OE's de diferentes plantas foram estudados, no entanto, apenas 300 são comercializados para várias aplicações. Uma característica importante dos OE's e de seus componentes é a hidrofobia, uma propriedade que lhes permite particionar lipídios das membranas celulares e mitocôndrias, afetando as estruturas celulares e tornando-as mais permeáveis. Os OE's possuem essa tendência lipofílica e peso molecular muito baixo. Devido a essas características, possuem a capacidade de penetrar no tecido de maneira mais rápida e fácil (BUTNARIU; SARAC, 2018; ATIF et al., 2020). Dessa forma, são atribuídas várias aplicações, como antiparasitários, antivirais, fungicidas e bactericidas pós-colheita e inseticidas para agricultura (MOUSSAOUI; ALAOUI, 2016; PAVELA et al., 2018; AHMED et al., 2019; PAVELA et al., 2019; ATIF et al., 2020; PAVELA et al., 2020).

Muitos OE's (e seus principais constituintes) de membros da família Euphorbiaceae possuem toxicidade via fumigação (MAGALHÃES et al., 2015). O gênero *Croton* possui uma ampla diversidade química nos OE's que conferem diversos usos, entre eles a atividade inseticida, como em *Croton cajucara*, *Croton linearis*, *Croton heliotropiifolius*, *Croton pulegioidorus*, *Croton regelianus*, *Croton palonostigma*, *Croton rudolphianus*, *Croton rhamnifolioides*, *Croton floribundus*, *Croton urucurana*, *Croton argyrophyllus* e *Croton tetradenius*. Os compostos químicos majoritários observados nessas plantas com potencial inseticidas foram espatulenol, (*E*)-cariofileno, α -pineno, biciclogermacreno, cânfora, linalol, metileugenol, sabineno, β -sabineno, β -pineno, β -elemeno, ascaridol e *p*-cimeno (ALEXANDER et al., 1991; KUBO et al., 1991; TORRES et al., 2008; SALATINO et al., 2007; SANTOS et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2015; CARVALHO et al., 2016; CRUZ et al., 2017; BRITO et al., 2018; SANTOS et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020). Vale ressaltar que a composição química dos OE's de plantas bioativas pode variar com base no genótipo, método de destilação, na origem geográfica, época de colheita, parte da planta e método de extração (MEJRI et al., 2010; GENG et al., 2014; CHEMAT; BOUTEKEDJIRET, 2015; NIZIO et al., 2015; SANTOS et al., 2015; ELYEMNI et al., 2019).

O conhecimento sobre a composição química e a bioatividade dos OE's têm sido de grande importância e há o interesse em substâncias novas e eficientes, sem efeitos negativos ao ambiente e melhores propriedades no controle de patógenos, além da agregação de valor econômico à flora. Tudo isso é ocasionado justamente pelo conteúdo diverso dos componentes químicos presentes nos OE's (LINHARES NETO et al., 2018) destacando não só sua ação

inseticida, como também repelente contra insetos-praga. Os potenciais efeitos repelentes dos OE's e seus constituintes químicos contra insetos já foram avaliados para muitas espécies de plantas (NOVAK; GERBERG, 2005; LIRA et al., 2015; MOSSA, 2016; SOUZA et al., 2019).

Há diversas maneiras de expressão da atividade inseticida pelos OE's, que podem agir causando mortalidade, deformações nos diferentes estágios de desenvolvimento, repelência e deterência, inibição da oviposição, na alimentação e no crescimento, alterações no sistema hormonal, alterações morfogênicas, no comportamento sexual, esterilização dos adultos e mortalidade na fase imatura ou adulta. O efeito tóxico dos OE's pode ser atribuído à variabilidade de padrões fitoquímicos, mas envolve vários outros fatores. O ponto de entrada da toxina é um deles. A ação repelente é o modo de ação mais comum dos óleos essenciais e de seus compostos majoritários, onde os insetos identificam compostos nocivos no ambiente e desenvolvem comportamentos de defesa, como a fuga. Comumente, os OE's podem ser inalados, ingeridos ou absorvidos pelo exoesqueleto dos insetos. Eles também agem em enzimas digestivas e neurológicas, além de interagir com o tegumento do inseto e ação fumigante e de contato sobre diversas pragas (ISMAN, 2006). O mecanismo da toxicidade dos OE's pode estar relacionado à inibição da acetilcolinesterase (AChE) (RIBEIRO et al., 2020). A AChE é uma enzima responsável pela catálise da hidrólise da acetilcolina (um neurotransmissor), que atua transmitindo a mensagem de um neurônio para outro no sistema nervoso de vários organismos. Quando ocorre uma inibição da AChE, ocorre um acúmulo de acetilcolina nas sinapses colinérgicas, perturbando a transmissão do impulso nervoso do inseto-praga (LÓPEZ; PASCUAL-VILLALOBOS, 2014).

Os OE's têm potencial para serem usados no campo para controlar formigas cortadeiras, importante inseto-praga de algumas culturas agrícolas (ALONSO; SANTOS, 2013; CASTANO-QUINTANA et al., 2013). OE's dos quimiotipos calamusenona e β -cariofileno de *Hyptis pectinata* foram mais tóxicos do que seus compostos majoritários sobre *Atta sexdens* rubropilosa e *Acromyrmex balzani*, destacando-os como matéria-prima de grande potencial para o desenvolvimento de novos formicidas (FEITOSA-ALCANTARA et al., 2017).

2.7 Uso potencial dos óleos essenciais no controle de formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras presentes em diversos ecossistemas afetam a biodiversidade, a estrutura do solo e a disponibilidade de nutrientes em áreas naturais dos Neotrópicos (FARJI-BRENER; WERENKRAUT, 2015). Apesar de seu efeito positivo nos ecossistemas naturais com função importante na natureza, são capazes de se tornarem insetos-praga, principalmente em monocultivos. Dessa maneira, podem ocasionar grandes perdas econômicas em diversas culturas, principalmente pastagens e florestais, como eucalipto. O ataque de formigas cortadeiras pode levar a um nível de desfolha de até 100%, causando a redução no diâmetro e altura das plantas. Além dos danos diretos, existem os danos indiretos ocasionados pela redução da resistência das plantas atacadas, tornando-as suscetíveis a outros insetos, como também a fungos e bactérias. Os prejuízos alcançam a ordem de bilhões de dólares (YING; KOOKANA, 2006; CANTARELLI, 2005). Portanto, deve-se, na tomada de decisão, optar por métodos químicos, biológicos, mecânicos ou culturais para controlá-las (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; MONTOYA-LERMA et al., 2012; DELLA LUCIA et al., 2014). Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Ordem Hymenoptera, Família Formicidae, Tribo Attini) são os principais quando se referem a formigas cortadeiras como insetos-praga (HÖLLDOBLER; WILSON 1990; MONTOYA-LERMA et al. 2012).

O gênero *Acromyrmex* trata-se de um grupo relativamente pouco estudado, uma vez que a maioria dos trabalhos é referente a espécies do gênero *Atta*. Isto torna o estudo de *Acromyrmex* importante não apenas para compreender o forrageamento destas formigas, como também estes comportamentos complexamente coordenados se originaram e evoluíram (LIMA, 2004). As formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. vivem em simbiose com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* Möller, que cresce e é cultivado em seus ninhos e atua como sua principal fonte

de alimento (SILVA et al., 2003; MORAIS et al., 2015), a exemplo da *Acromyrmex balzani* conhecida popularmente como quenquéns (DE FINE LICHT et al., 2013).

Acromyrmex balzani (EMERY, 1890) é uma das espécies de formigas cortadeiras especializadas em forragear gramíneas e coletar pétalas de flores (LIMA, 2004). Essa espécie foi descrita no século XIX, quando o gênero *Acromyrmex* ainda era considerado parte do gênero *Atta*. Sua ocorrência era restrita ao território sul da Amazônia, incluindo uma porção significativa do Brasil, especialmente no centro-sul (FOWLER, 1988). As operárias possuem elevado grau polimórfico com tamanhos variados, são as menores do grupo e costumam ser facilmente confundidas com outras espécies. Por isso, é comum levar-se mais em conta características das operárias maiores, que têm olhos pouco salientes, quatro a cinco pares de espinhos dorsais no pronoto - eretos ou angulosos - e uma crista visível no mesonoto. Apresentam numerosos tubérculos na superfície do 7º gáster, o que lhes confere uma aparência áspera quando vista de lado (EMERY, 1890; ANJOS et al., 1998).

No gênero *Acromyrmex* há colônias menores em relação às espécies de *Atta* (LIMA, 2004). Pimenta et al. (2007), em seu estudo sobre o forrageamento de *A. balzani*, observaram que o tamanho máximo de câmara encontrado foi de 12,0 cm de comprimento por x 13,0 cm de largura, por x 13,0 cm de altura. O número de câmaras foi de quatro ou cinco, sempre superpostas, com profundidade máxima do ninho igual a 95,0 cm. O número de operárias adultas por colônia variou de 820 a 1945. Quanto à dinâmica de forrageamento, essa espécie forrageia predominantemente à noite e em horas mais frescas do dia, e transportou para o interior do ninho uma maior quantidade de gramíneas.

A estrutura de cuidados cooperativos com as ninhadas, divisão reprodutiva, do trabalho e a sobreposição de gerações contribuem para o trabalho das colônias, bem como ilustram a complexidade da organização social destes seres. Há os cuidados e higiene da ninhada, no cultivo dos fungos, entre outros comportamentos, adquirindo ainda uma complexidade estrutural dos ninhos. Em suma, são insetos eusociais, exibem organização social, do trabalho, forrageamento, cultivo de fungos, higiene e com estrutura complexa de ninhos, o que dificulta notoriamente seu manejo e controle populacional (DELLA-LÚCIA et al., 2013).

O controle das formigas cortadeiras é realizado quase que exclusivamente com a aplicação de inseticidas químicos sintéticos via fumigação ou com iscas tóxicas que consistem em atrativos, à base de Fipronil (Fenil pirazol) e Sulfluramida (Sulfonamida Fluoroalifática) (BRASIL, 2010; DELLA LÚCIA et al., 2014; GANDRA et al., 2016). Entretanto, a aplicação de inseticidas sintéticos pode provocar muitos problemas, como a contaminação ambiental, mortalidade de insetos não-alvo, como os inimigos naturais do ambiente e efeitos adversos à saúde humana, além de proibição por parte de certificadoras florestais, com alto apelo no mercado internacional como o FSC - *Forest Stewardship Council* (FSC, 2013; RIBEIRO et al., 2020). Assim, é necessário o desenvolvimento de produtos alternativos para substituir os formicidas sintéticos, que sejam de rápida ação no inseto-praga alvo e com menor persistência ambiental (ISMAN, 2006; EL-WAKEIL, 2013; HUSSEIN et al., 2017). Nesse sentido, as plantas produzem naturalmente compostos bioativos que são defensivos contra herbívoros, a exemplo dos metabólitos secundários como os OE's conforme já explicitado, que também já foram relatados como agentes formicidas naturais (SILVA et al., 2003; BENELLI et al., 2017; RALIYA et al., 2018). Os OE's são promissores para a atividade biológica inseticida e repelente (CHELLAPPANDIAN et al., 2018; SILVA et al., 2018).

Na toxicidade, OE's agem nos insetos causando sintomas neurotóxicos semelhantes aos produzidos por inseticidas organofosfatos e carbamatos. Os monoterpenos têm ação inseticida atribuída ao fato de agirem diretamente na via de inibição da acetilcolinesterase (AChE). A acetilcolina (ACh) é encontrada em vertebrados e artrópodes e é um dos principais compostos pelos quais os impulsos elétricos são transmitidos para outras células nervosas ou para músculos voluntários e involuntários. Muitos dos constituintes dos óleos essenciais têm sido identificados como inibidores da AChE. Estudos sobre a relação estrutura-atividade entre AChE e monoterpenos indicaram que os hidrocarbonetos possuem forte inibição comparados a álcoois.

A acetilcolinesterase está envolvida na interrupção da transmissão do impulso pela hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina em numerosas vias colinérgicas, nos sistemas nervosos central e periférico. A inativação da enzima, induzida pelos seus inibidores, conduz à acumulação de acetilcolina, hiperestimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos, e interrupção da neurotransmissão. Assim, uma intoxicação por inibidores da acetilcolinesterase manifesta-se com sintomas nicotínicos, muscarínicos e do sistema nervoso central. A acetilcolina é degradada eficazmente pela acetilcolinesterase, estando ela presente nas sinapses colinérgicas e sendo responsável pela hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético. A acetilcolina é um importante neurotransmissor que medeia a contração muscular no músculo-esquelético e liso, a estimulação pré-ganglionar no sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático) e a estimulação pós-ganglionar no sistema parassimpático. Estas ações da acetilcolina resultam, classicamente, na ativação de receptores nicotínicos (nos gânglios autônomos e músculo esquelético) e de receptores muscarínicos (no miocárdio, glândulas exócrinas e músculo liso) (RYAN; BYRNE, 1988; LÓPEZ; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010).

Além da toxicidade, os compostos químicos presentes nos óleos essenciais modulam o comportamento desses insetos, sendo repelentes naturais e promissores em estratégias integradas de manejo de pragas. Os OE's repelentes podem ser usados em certos cenários em que os inseticidas tradicionais não estão disponíveis, como em pomares orgânicos e em conjunto com outras ferramentas para potencializar o efeito repelente (ORTIZ et al., 2017; BUTELER et al., 2019).

Os óleos essenciais de mostarda, canela e cravo têm efeitos de contato e ingestão em operárias de *Atta sexdens* rubropilosa e *Acromyrmex subterraneus* molestans e são promissores no controle dessas formigas cortadeiras (RIBEIRO; FOUAD, 2016). O desenvolvimento de pesquisas para a produção de inseticidas naturais utilizando OE's de plantas é de grande importância. Portanto, podem se tornar matéria-prima para o método de controle alternativo, pois são biodegradáveis (SOUZA et al., 2019). São, de maneira geral, reconhecidos como uma importante fonte natural de formicidas. Os compostos de óleo essencial e derivados são considerados um meio alternativo para controlar muitos insetos prejudiciais e sua rápida degradação no meio ambiente aumentaram a especificidade, que favorece os insetos benéficos do ambiente (TRIPATHI et al., 2009).

Não existe nenhum produto registrado no site do Ministério da Agricultura para controlar a formiga cortadeira *A. balzani*. Porém diversos estudos envolvendo os OE's e compostos majoritários indicam que a continuidade dessas pesquisas poderão auxiliar no registro de produtos para o controle dessa e de outras espécies de formigas. Já foi constatado que OE's de *Eplingiella fruticosa*, coletadas no estado de Sergipe, e seus compostos majoritários, foram tóxicos via fumigação, diminuindo sobrevivência e afetando seu comportamento (SILVA et al., 2019), sendo promissores no desenvolvimento de produtos naturais formicidas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, P.; HECHT, S.; EISENREICH, W.; KAISER, J.; GRÄWERT, T.; ARIGONI, D.; BACHER, A.; ROHDICH, F. Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.19, p.12108-12113, 2002.

AGRAWAL, R.C.; ARCHAK, S.; TYAGI, R.K. An overview of biodiversity informatics with special reference to plant genetic resources. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.84, p.92-99, 2012.

AGUIAR, F.L.L.; MORAIS, S.M.; SANTOS, H.S.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDEIRA, P.N.; BRITO, E.H.S.; ROCHA, M.F.G.; FONTENELLE, R.O.S. Antifungal activity and synergistic effect of acetophenones isolated from species *Croton* against dermatophytes and yeasts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.10, p.216-222, 2016.

AHMED, A.F.; ATTIA, F.A.; LIU, Z.; LI, C.; WEI, J.; KANG, W. Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. **Food Science Human Wellness**, v.8, n.3, p.299-305, 2019.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.14, p.325-54, 2007.

ALENCAR FILHO, J.M.T.; ARAÚJO, L.C.; OLIVEIRA, A.P.; GUIMARÃES, A.L.; PACHECO, A.G.M.; SILVA, F.S. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.27, p.440-444, 2017.

ALEXANDER, I.C.; PASCOE, K.O.; MANCHARD, P.; WILLIAMS, L.A.D. An insecticidal diterpene from *Croton linearis*. **Phytochemistry**, v.30, n.6, p.180-1803, 1991.

ALKIMIM, E.R.; SOUSA, T.V.; SOARES, B.O.; SOUZA, D.A.; JUHÁSZ, A.C.P.; NIETSCH, S.; COSTA, M.R. Genetic diversity and molecular characterization of physic nut genotypes from the active germplasm bank of the Agricultural Research Company of Minas Gerais, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n.9, p.907-913, 2013.

ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Blackwell Publishing: USA, 2007. 663p.

ALMEIDA-PEREIRA, C.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; BARBOSA, A.A.T.; NIZIO, D.A.C.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SAMPAIO, T.S.; ALVES, R.P.; ARAUJO-COUTO, H.; FEITOSA-ALCANTARA, R.B.; MELO, J.O.; BLANK, A.F. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. Germplasm. **Journal of Essential Oil Research**, p.1-12. 2019.

ALMEIDA-PEREIRA, C.S.; SILVA, A.V.C.; ALVES, R.P.; FEITOSA-ALCANTARA, R.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; ALVARES-CARVALHO, S.V.; COSTA, T.S.; WHITE, L.A.S.; PINTO, V.S.; SAMPAIO, T.S.; BLANK, A.F. Genetic diversity of native populations of *Croton tetradenius* Baill. using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n.2, 2017.

ALONSO, E.C.; SANTOS, D.Y.A.C. *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) seed oil toxicity against *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, v.106, p.742-746, 2013.

AMARAL JÚNIOR, A.T.; VIANA, A.P.; GONÇALVES, L.S.A.; BARBOSA, C.D. Procedimentos Multivariados em Recursos Genéticos Vegetais. In: PEREIRA, T.N.S. (ed.). **Germoplasma: Conservação, Manejo e Uso no Melhoramento de Plantas**. Viçosa, MG. p.205-254, 2010.

ANDREWS, K.R.; GOOD, J.M.; MILLER, M.R.; LUIKART, G.; HOHENLOHE, P.A. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. **Nature Reviews Genetics**, v.17, p.81-92, 2016.

ANJOS, N.S; DELLA LUCIA, T.M.C.; MAYHÉ-NUNES, A.J. **Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamento**. Ponte nova: MG, 1998. 100p.

ATIF, M.; ILAVENIL, S.; DEVANESAN, S.; ALSALHIA, M.S.; CHOI, K.C.; VIJAYARAGHAVAN, P.; ALFURAYDI, A.A.; ALANAZI, N.F. Essential oils of two medicinal plants and protective properties of jack fruits against the spoilage bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v.147, 112239, 2020.

BAJAY, M.M.; PINHEIRO, J.B.; BATISTA, C.E.A.; NOBREGA, M.B.M.; ZUCCHI, M.I. Development and characterization of microsatellite markers for castor (*Ricinus communis* L.), an important oleaginous species for biodiesel production. **Conservation Genetic Resources**, v.1, p.237-239, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BALDONI, A.B.; TEODORO, L.P.R.; TEODORO, P.E.; TONINI, H.; TARDIN, F.D.; BOTIN, A.A.; HOOGERHEIDE, E.S.S.; BOTELHOA, S.C.C.; LULU, J.; FARIAS NETO, A.L.; AZEVEDO, V.C.R. Genetic diversity of Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) in southern Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, v.458, 2020.

BALOGH, F.S.; ALSALEH, A.; SHAHID, M.Q.; ÇİFTÇİ, V.; DE MIERA, L.E.S.; AASIM, M.; NADEEM, M.A.; AKTAŞ, H.; O'ZKAN, H.; HATİPOĞLU, R. A whole genome DArTseq and SNP analysis for genetic diversity assessment in durum wheat from central fertile crescent. **PLoS One**, v.12, e0167821, 2017.

BAMOLA, N.; VERMA, P.; NEGI, C. A Review on Some Traditional Medicinal Plants. **International Journal of Life-Sciences Scientific Research**, v.4, n.1, p.1550-1556, 2018.

BASAK, M.; UZUN, B.; YOL, E. Genetic diversity and population structure of the Mediterranean sesame core collection with use of genome-wide SNPs developed by double digest RAD-Seq. **PLoS ONE**, v.14, n.10, e0223757, 2019.

BASKAR, K.; MOHANKUMAR, S.; SUDHA, V.; MAHESWARAN, R.; VIJAYALAKSHMI, S.; JAYAKUMAR, M. Meliaceae plant extracts as potential mosquitocides - a review. **Entomology, Ornithology and Herpetology**, v.5, n.172, p.1-4, 2016.

BENELLI, G.; CANALE, A.; TONIOLO, C.; HIGUCHI, A.; MURUGAN, K.; PAVELA, R.; NICOLETTI, M. Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? **Natural Product Research**, v.31, p.369–386, 2017.

BENNETT, J.R.; MALONEY, R.F.; STEEVES, T.E.; BOAST, J.B.; POSSINGHAM, H.P.; SEDDON, P.J. Spending limited resources on de-extinction could lead to net biodiversity loss. **Nature Ecology and Evolution**, v.1, 2017.

BERRY, P.E.; HIPP, A.L.; WURDACK, K.J.; VAN EE, B.W.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF sequence data. **American Journal of Botany**, v.92, p.1520-1534, 2005.

BESERRA, F.P; AGUIAR, R.W.S; CARVALHO, E.E.N; BORGES, J.C.M; VLE, B.N do. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) como novo bioinseticida: análise fitoquímica preliminar e atividade larvica contra *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). **Revista Amazônia Science and Health**, v.2, n.3, p.17-25, 2014.

BHAT, J.A.; ALI, S.; SALGOTRA, R.K.; MIR, Z.A.; DUTTA, S.; JADON, V.; TYAGI, A.; MUSHTAQ, M.; JAIN, N.; SINGH, P.K.; SINGH, G.P.; PRABHU, K.V. Genomic Selection in the Era of Next Generation Sequencing for Complex Traits in Plant Breeding. **Frontiers in Genetics**, v.7, 2016.

BHERING, L.L; ALMEIDA FILHO, J.E.; PEIXOTO, L.A.; LAVIOLA, B.G.; GOMES, B.E.L. Plateau regression reveals that eight plants per accession are representative for *Jatropha* germplasm bank. **Industrial Crops and Products**, v.65, p.210-215, 2015.

BLANK, A.F.; ALMEIDA, C.S.; ALVES, R.P.; SAMPAIO, T.S.; FEITOSA-ALCÂNTARA, R. S.; MELO, J.O.; PINTO, V.S.; SILVA, J.H.S.; BRITO, F.A.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; GAGLIARDI, P.R.; NUNES, R.S.; LIMA, A.D.; NOGUEIRA, P.C.R. 2017. Formulação fungicida à base de óleo essencial de *Croton tetradenius* para controlar ou eliminar o fitopatógeno *Fusarium solani*. Patent BR-10-2017-000272-1. INPI, Rio de Janeiro, 2017.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; Brasília, DF: Embrapa Café, 2009. 532 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2010). **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Recuperado de <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>.

BRAZIL. **Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Brazilian Forests at a glance: 2019**. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Brazilian Forests Service. Brasília: MAPA/SFB, 2019. 207p.

BREDA, F.C.; EUCLYDES, R.F.; PEREIRA, C.S.; TORRES, R.A.; CARNEIRO, P.L.S.; SARMENTO, J.L.R.; TORRES FILHO, R.A.; MOITA, A.K.F. Endogamia e Limite de Seleção em Populações Seleccionadas Obtidas por Simulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.2017-2025, 2004.

BRITO, S.S.S.; MALHEIRO, R.; BAPTISTA, P.; PEREIRA, J.A. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, v.113, p.308-315, 2018.

BURGER, W.; HUFT, M. Flora costaricensis: Euphorbiaceae. **Fieldiana Botany**, v.36, p.1-169, 1995.

BUTELER, M.; ALMA, A.M.; HERRERA, M.L.; GOROSITO, N.B.; FERNANDEZ, P.C Novel organic repellent for leaf-cutting ants: tea tree oil and its potential use as a management tool. **International Journal Of Pest Management**, 2019.

BUTNARIU, M.; SARAC. I. Essential Oils from Plants. **Journal of Biotechnology and Biomedical Science**, v.1, n.4, 2018.

CANTARELLI, E.B. **Silvicultura de precisão no monitoramento e controle de formigas cortadeiras em plantios de *Pinus***. 2005. 108p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2005.

CARDOSO, J.C.; OLIVEIRA, M.E.B.S.; CARDOSO, F.C.I. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v.37, n.2, 2019.

CARNEIRO, V.A.; SANTOS, H.S.; ARRUDA, F.V.S.; BANDEIRA, P.N.; ALBUQUERQUE, M.J.R.; PEREIRA, M.O.; HENRIQUES, M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. **Molecules**, v.16, p.190-201, 2011.

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

CARVALHO, K.S.; SILVA, S.L.C.; SOUZA, I.A.; GUALBERTO, S.A.; CRUZ, R.C.D. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. **Parasitology Research**, v.115, 3441-3448, 2016.

CASTANO-QUINTANA, K.; MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C. Toxicity of foliage extracts of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) workers. **Industrial Crops and Products**, v.44, p.391-395, 2013.

CASTRO, K.N.C.; CHAGAS, A.C.S.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; CANUTO, K.M.; BRITO, E.S.S.; RODRIGUES, T.H.S.; ANDRADE, I.M. Acaricidal potential of volatile oils from *Croton* species on *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.29, p.811-815, 2019.

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

CHAMORRO, E.R.; ZAMBÓN, S.N.; MORALES, W.G.; SEQUEIRA, A.F.; VELASCO, G.A. Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography. **Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications**, p.307-324, 2012.

CHANDRA DE, L. Bio-Diversity and Conservation of Medicinal and Aromatic Plants. **Advances in Plants and Agriculture Research**, v.5, n.4, 00186, 2016.

CHARLES, C.D.; MARIBETH, L.; DANIEL, L.N.; KENNETH, J.W.; DAVID, A.B. Floral gigantism in *Rafflesiaceae*. **Science Express**, p.1812, 2007.

CHELLAPPANDIAN, M.; VASANTHA-SRINIVASAN, P.; SENTHIL-NATHAN, S.; KARTHI, S.; THANIGAIVEL, A.; PONSANKAR, A.; KALAIVANI, K.; HUNTER, W.B. Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against Dengue. **Environment International**, v.113, p.214-230, 2018.

CHEMAT, F.; BOUTEKEDJIRET, C. Extraction steam distillation. **Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**, v.155, p.1-12, 2015.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; CARDIEL, J.M.; STEINMANN, V.; CARUZO, M.B.R.; RIINA, R.; LIMA, L.R. DE; MAYA-L., C.A.; BERRY, P.; CARNEIRO-TORRES, D.S.; SILVA, O.L.M.; SALES, M.F.D.; SILVA, M.J. DA; SODRÉ, R.C.; MARTINS, M.L.L.; PSCHIEDT, A.C.; ATHIÊ-SOUZA, S.M.; MELO, A.L.D.; OLIVEIRA, L.S.D.; PAULA-SOUZA, J.; SILVA, R.A.P. Euphorbiaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2013.

COSTA, L.S.; CORNELEO, N.S.; STEFENON, V.M. Conservation of Forest Biodiversity: how sample size affects the estimation of genetic parameters. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.2, 2015.

CRUZ, R.C.D.; SILVA, S.L.C.E.; SOUZA, I.A.; GUALBERTO, S.A.; CARVALHO, K.S.; SANTOS, F.R.; CARVALHO, M.G. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia: Muridae). **Journal of Medical Entomology**, p.1-9, 2017.

CUENCA-ESTRELLA, M. combinations of antifungal agents in therapy-what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, n.5, p.854-69, 2004.

DAR, A.A.; MAHAJAN, R.; SHARMA, S. Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.89, n.11, p.1755-1763, 2019.

DAR, R.A.; SHAHNAWAZ, M.; QAZI, P.H. General overview of medicinal plants: A review. **The Journal of Phytopharmacology**, v.6, n.6, p.349-351, 2017.

DARDENGO, J.F.E.; ROSSI, A.A.B.; VARELLA, T.L. The effects of fragmentation on the genetic structure of *Theobroma speciosum* (Malvaceae) populations in Mato Grosso, Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v.66, n.1, p.218-226, 2018.

DE FINE LICHT, H.H.; SCHIOTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; ROEPSTORFF, S.N.P.; BOOMSMA, J.J. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 110, n. 2, p.583-587, 2013.

DE LORENZIS, G.; MERCATI, F.; BERGAMINI, C.; CARDONE, M.F.; LUPINI, A.; MAUCERI, A.; CAPUTO, A.R.; ABBATE, L.; BARBAGALLO, M.G.; ANTONACCI, D.; SUNSERI, F.; BRANCADORO, L. SNP genotyping elucidates the genetic diversity of

- Magna Graecia grapevine germplasm and its historical origin and dissemination. **BMC Plant Biology**, v.19, n.7, 2019.
- DELLA LUCIA, T.; GANDRA, L.; GUEDES, R. Managing leafcutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v.70, n.1, p.14-23, 2014.
- DELLA LUCIA, T.M.; GANDRA, L.C.; GUEDES, R.N. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v.70, n.1, p.14-23, 2013.
- DESMARCHELIER, C.; SCHAUS, F.W.; COUSSIO, J.; CICCA, G. Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell.-Arg. on the production of active oxygen radicals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, p.103-108, 1997.
- DEWICK, P.M. The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v.19, p.181-222, 2002.
- DHIFI, W.; BELLILI, S.; JAZI, S.; BAHLOUL, N.; MNIF, W. Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. **Medicines**, v.3, n.4, p.25, 2016.
- DULLOO, M.E. Maintaining diversity of plant genetic resources as a basis for food security. **Bioversity International**, p.1-10, 2018.
- DULLOO, M.E.; REGE, J.E.O.; RAMIREZ, M.; DRUCKER, A.G.; PADULOSI, S.; MAXTED, N.; STHAPIT, B.; GAUCHAN, D.; THORMANN, I.; GAISBERGER, H.; ROUX, N.; SARDOS, J.; RUAS, M.; ROUARD, M. Conserving agricultural biodiversity for use in sustainable food systems. In: Mainstreaming Agrobiodiversity in Sustainable Food Systems: Scientific Foundations for an Agrobiodiversity. **Bioversity International**, Rome, Italy (Chapter 5), p.103-139, 2017.
- DURMIC, Z.; BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, p.150-162, 2012.
- EL-BAKATOUSHI, R.; AHMED, D.G.A. Evaluation of genetic diversity in wild populations of *Peganum harmala* L., a medicinal plant. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.16, p.143-151, 2018.
- ELSHIRE, R.J.; GLAUBITZ, J.C.; SUN, Q.; POLAND, J.A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E.S.; MITCHELL, S.E. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. **PLoS ONE**, v.6, n.5, e19379, 2011.
- EL-WAKEIL, N.E. Botanical pesticides and their mode of action. **Gesunde Pflanzen**, v.65, p.125-149, 2013.
- ELYEMNI, M.; LOUASTE, B.; NECHAD, I.; ELKAMLI, T.; BOUIA, A.; TALEB, M.; CHAOUCH, M.; ELOUTASSI, N. Extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. By two different methods: hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation. **Transfusion and Apheresis Science**, 3659432, 2019.
- EMERY, C. Voyage de M.E. Simon au Venezuela. **Formicidae, Ann. Soc. Entomol.**, v.10, p.55-76, 1890.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.

FARJI-BRENER, A.G.; WERENKRAUT, V. A meta-analysis of leaf-cutting ant nest effects on soil fertility and plant performance. **Ecology Entomology**, v.40, n.2, p.150-158, 2015.

FEITOSA-ALCANTARA, R.B.; BACCI, L.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; SILVA, I.M.A.; SOARES, C.A.; SAMPAIO, T.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Essential oils of *Hyptis pectinata* chemotypes: isolation, binary mixtures and acute toxicity on leaf-cutting ants. **Molecules**, v.22, 621, 2017.

FERNANDES, A.G.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A. Canelas silvestres nordestinas: aspectos botânicos, químicos e farmacológicos. **Ciência Cultural**, v.32, p.26-33, 1971.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Euphorbiaceae**, 2019. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113>>. Acesso em 03 de Junho 2019.

FORZZA, R.C.; LEITMAN, P.M.; COSTA, A.F.; CARVALHO JR., A.A.; PEIXOTO, A.L.; WALTER, B.M.T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D.P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H.C.; PRADO, J.; STEHMANN, J.R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; PIRANI, J.R.; SYLVESTRE, L.; MAIA, L.C.; LOHMANN, L.G.; QUEIROZ, L.P.; SILVEIRA, M.; COELHO, M.N.; MAMEDE, M.C.; BASTOS, M.N.C.; MORIM, M.P.; BARBOSA, M.R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.B.; SOUZA, V.C. **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 1699p.

FOWLER, H.G. Taxa of the neotropical grass-cutting ants, *Acromyrmex* (Moellerius) (Hymenoptera: Formicidae: Attini). **Científica**, São Paulo, 1988.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, São Paulo / Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280p.

FSC. FSC Pesticides Policy Guidance Addendum: List of Approved Derogations For Use of 'Highly Hazardous' Pesticides. (2013). Recuperado de <http://www.scsglobalservices.com/files/standards/fsc-gui-30-001a_v1-0_en_list_ofapproved_derogations_for_use_of_highly_hazardous_pesticides.pdf>.

GANDRA, L.C.; AMARAL, K.D.; COUCEIRO, J.C.; DELLA LUCIA, T.M.; GUEDES, R.N. Mechanism of leaf-cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. **Pest Management Science**, v.72, n.8, p.1475-1481, 2016.

GARZÓN-MARTÍNEZ, G.A.; OSORIO-GUARÍN, J.A.; DELGADILLO-DURÁN, P.; MAYORGA, F.; ENCISO-RODRÍGUEZ, F.E.; LANDSMAN, D.; MARÍÑO-RAMÍREZ, L.; BARRERO, L.S. Genetic diversity and population structure in *Physalis peruviana* and related

taxa based on InDels and SNPs derived from COSII and IRG markers. **Plant Gene**, v.4, p.29-37, 2015.

GENG, Z.; ZHU, W.; SU, H.; ZHAO, Y.; ZHANG, K-Q.; YANG, J. Recent advances in genes involved in secondary metabolite synthesis, hyphal development, energy metabolism and pathogenicity in *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*). **Biotechnology Advances**, v.32, p.390-402, 2014.

GEORGIEVA, N.; KOSEV, V. Adaptability and Stability of White Lupin Cultivars. **Banat's Journal of Biotechnology**, v.9, n.19, p.65-76, 2018.

GUPTA, A.K.; MISHRA, R.; LAL, R.K. Genetic resources, diversity, characterization and utilization of agronomical traits in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Industrial Crops and Products**, v.77, p.708–712, 2015.

GURGEL, L.A.; SIDRIM, J.J.C.; MARTINS, D.T.; FILHO, V.C.; RAO, V.S. *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.409-412, 2005.

HASSAN, S.A; SOLEIMANI, T. Improvement of artemisinin production by different biotic elicitors in *Artemisia annua* by elicitation–infiltration method. **Banat's Journal of Biotechnology**, v.7, n.13, p.82-94, 2016.

HAYWARD, A.; MASON, A.H.; MASON, A.; DALTON-MORGAN, J.; ZANDER, M.; EDWARDS, D.; BATLEY. SNP discovery and applications in *Brassica napus*. **Plant Biotechnology Journal**, v.39, p.1-12, 2012.

HEYWOOD, V.H. Biodiversity, Conservation and Ethnopharmacology. **Ethnopharmacology**, p.41-52, 2015.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Springer, Berlin, 1990. 732p.

HUANG, W.; ZHAO, X.; ZHAO, X.; LI, Y.; LIAN, J. Effects of environmental factors on genetic diversity of *Caragana microphylla* in Horqin Sandy Land, northeast China. **Ecology Evolution**, v.6, p.8256-8266, 2016.

HUSSEIN, A.H.; SAID-AL, A.H.L.; WAFAA, M.H.; TKACHENKO, K.G. Essential oils with potential as insecticidal agents: a review. **International Journal of Environmental Planning and Management**, v.3, n.4, p. 23-33, 2017.

IDREES, M.; IRSHAD, M. Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: A Review. **European Academic Research**, v.2, n.1, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). 2013. **Metodologia para o Cálculo da Taxa Anual de Desmatamento na Amazônia Legal**. Disponível em: <http://www.obt.inpe.br/prodes/metodologia_TaxaProdes.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2020.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v.51, p.45-66, 2006.

- IWASAKIA, H.; UCHIYAMA, K.; KIMURA, M.; SAITO, Y.; HAKAMATA, T.; IDE, Y. Impact of a tree improvement program on the genetic diversity of sugi (*Cryptomeria japonica* D Don) plantations. **Forest Ecology and Management**, v.448, p.466-473, 2019.
- JESUS, F.F.; ABREU, A.G.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. **Plant Systematics Evolution**, v.277, p.187-196, 2009.
- JIA, J.; LI, H.; ZHANG, X.; LI, Z.; QIU, L. Genomics-based plant germplasm research (GPGR). **The Crop Journal**, p.166-174, 2017.
- JONSSON, M.; BERTILSSON, M.; EHRLÉN, J.; LÖNN, M. Genetic divergence of climatically marginal populations of *Vicia pisiformis* on the Scandinavian Peninsula. **Hereditas**, v.145, p.1-8, 2008.
- JOMBART, T.; AHMED, I. Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics**, v.27, p.3070–3071, 2011.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **Genetics**, v.11, n.94, p.1–15, 2010.
- KAFUKU, G.; MBARAWA, M. Biodiesel production from *Croton megalocarpus* oil and its process optimization. **Fuel**, v.89, p.2556-2560, 2010.
- KAHILAINEN, A.; PUURTINEN, M.; KOTIAHO, J.S. Conservation implications of species-genetic diversity correlations. **Glob Ecology and Conservation**, v.2, p.315-323, 2014.
- KASSO, M.; BALAKRISHNAN, M. *Ex Situ* Conservation of Biodiversity with Particular Emphasis to Ethiopia. **Hindawi Publishing Corporation**, p.1-12, 2013.
- KATE, S.A. LAIRD. **Earthscan Publications Ltd**. London, 1999. 398p.
- KHARABIAN, A. An eficiente computational method for screening functional SNPs in plants. **Journal of Theoretical Biology**, v.265, p.55-62, 2010.
- KUBO, I.; ASAKA, Y.; SHIBATA, K. Insect growth inhibitory nor-diterpenes, *cis*-dehydrocrotonin and *trans*-dehydrocrotonin, from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v.30, p.2545-2546, 1991.
- KUHN, D.N.; DILLON, N.; BALLY, I.; GROH, A.; RAHAMAN, J.; WARSCHEFSKY, E.; FREEMAN, B.; INNES, D.; CHAMBERS, A.H. Estimation of genetic diversity and relatedness in a mango germplasm collection using SNP markers and a simplified visual analysis method. **Scientia Horticulturae**, v.252, p.156-168, 2019.
- KUMAR, A.; SENAPATI, B.K. Genetic analysis of character association for polygenic traits in some recombinant inbred lines (ril's) of rice (*Oryza sativa* L.). **Banat's Journal of Biotechnology**, v.6, n.11, p.90-99, 2015.
- KUMAR, P.; GUPTA, V.K.; MISRA, A.K.; MODI, D.R.; PANDEY, B.K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics**, v.2, n.4, p.141-162, 2009.

KUMAR, S.; BANKS, T.W.; CLOUTIER, S. SNP discovery through next-generation sequencing and its applications. **International Journal of Plant Genomics**, p.1-15, 2012.

LEE, B.K.; SOHN, S.Y. Patent portfolio-based indicators to evaluate the commercial benefitsof national plant genetic resources. **Ecological Indicators**, v.70, p.43-52, 2016.

LI, Z-W.; LU, M-X.; GICHIRA, A.W.; ISLAM, M.R.; WANG, Q-F.; CHEN, J-M. Genetic diversity and population structure of *Ottelia acuminata* var. *jingxiensis*, an endangered endemic aquatic plant from southwest China. **Aquatic Botany**, v.152, p.20-26, 2019.

LIMA, L.R. DE; PIRANI, J.R. Taxonomic revision of Croton sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica**, v.8, n.2, p.176-231, 2008.

LIMA, M.G.B. **Ecologia do forrageamento da formiga *Acroinymex balzani* (Hymenoptera: Formicidae)**. 2004. 30p. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2004.

LINGAN, K. A review on major constituents of various essential oils and its application. **Journal of Translational Medicine**, v.8, n.1, 2018.

LINHARES NETO, M.V.; SILVA, R.O.; OLIVEIRA, F.F.; COSTA, L.C.B.; CONCEIÇÃO, A.O.; OLIVEIRA, R.A. Avaliation anti-Candida of essential oils from three medicinal plants species (Astereaceae). **South African Journal of Botany**, v.115, p.132-137, 2018.

LIRA, C.S.; PONTUAL, E.V.; ALBUQUERQUE, L.P.; PAIVA, L.M.P.; PAIVA, P.M.G.; OLIVEIRA, J.V.; NAPOLEÃO, T.H.; NAVARRO, D.M.A.F. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). **Crop Protection**, v.71, p.95-100, 2015.

LÓPEZ, M.D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Are monoterpenoids and phenylpropanoids efficient inhibitors of acetylcholinesterase from stored product insect strains? **Flavour and Fragrance Journal**, v.30, p.108-112, 2014.

LÓPEZ, M.D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v.31, n.2, p.284-288, 2010.

LUCENA, M.F. de A.; SALES, M.F. de. Tricomas foliares em espécies de *Croton* L. (Crotonoideae-Euphorbiaceae). **Rodriguésia**, v.57, n.1, p.11-25, 2006.

LUCENA, M.F.A. **Diversidade de Euphorbiaceae sensu lato no Nordeste do Brasil**. 2009. 197f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2009.

LUNA, E.C.; LUNA, I.S.; SCOTTI, L.; MONTEIRO, A.F.M.; SCOTTI, M.T.; MOURA, R.O.; ARAÚJO, R.S.A.; MONTEIRO, K.L.C.; AQUINO, T.M.; RIBEIRO, F.F.; MENDONÇA, F.J.B. Active essential oils and their components in use against neglected diseases and arboviruses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-52, 2019.

LUPI, T.M.; LEÓN, J.M.; NOGALES, S.; BARBA, C.; DELGADO, J.V. Genetic parameters of traits associated with the growth curve in *Segureña sheep*. **The Animal Consortium**, p.1-7, 2015.

MAGALHÃES, C.R.I.; OLIVEIRA, C.R.F.; MATOS, C.H.C.; BRITO, S.S.S.; MAGALHÃES, T.A.; FERRAZ, M.S.S. Potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, p.1150-1158, 2015.

MASCHER, M.; SCHREIBER, M.; SCHOLZ, U.; GRANER, A.; REIF, J.C.; STEIN, N. Genebank genomics bridges the gap between the conservation of crop diversity and plant breeding. **Nature Genetics**, v.51, p.1076–1081, 2019.

MAXIA, A.; MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PORCEDDA, S.; TUVERI, E.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. **Fitoterapia**, v.80, n.1, p.57-61, 2009.

MEJRI, J.; ABDERRABBA, M.; MEJRI, M. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. **Industrial Crops and Products**, v.32, p.671-673, 2010.

MIRJALILI, M.H.; FAKHR-TABATABAEI, S.M.; ALIZADEH, H.; GHASSEMPOUR, A.; MIRZAJANI, F. Genetic and whitafurin a analysis of Iranian natural populations of *Whithania somnifera* and *W. coagulans* by RAPD and HPTLC. **Natural Product Communications**, v.4, p.337-346, 2009.

MITTERMEIER, R.A.; DA FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. A Brief History of Biodiversity Conservation in Brazil. **Conservation Biology**, v.9, n.3, p.601-607, 2005.

MONFARED, M.A.; SAMSAMPOUR, D.; SHARIFI-SIRCHI, G.R.; SADEGHI, F. Assessment of genetic diversity in *Salvadora persica* L. based on Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) genetic marker. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.16, p.661-667, 2018.

MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I.; FARJI-BRENER, A.; CALLE, Z. Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control. **International Journal of Pest Management**, v.58, n.3, p.225-247, 2012.

MORAIS, W.C.C.; LIMA, M.A.P.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, M.A.; BRAGAN, M.A.L.; SERRÃO, J.E.; DELLA LUCIA, T.M.C. Extracts of *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum* and *Mentha piperita* inhibit the growth of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Industrial Crops and Products**, v.65, p.463-466, 2015.

MOSSA, A.T.H. Green pesticides: essential oils as biopesticides in insect-pest management. **Journal of Environmental Science and Technology**, v.9, p.354-378, 2016.

MOURA, G.S.; OLIVEIRA, I.J.; BONOME, L.T.S.; FRANZENER, G. *Eugenia uniflora* L.: potential uses as a bioactive plant. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.85, p.1-9, 2018.

MOUSSAOUI, F.; ALAOUI, T. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.6, n.1, p.32-37, 2016.

MÜLLER, J. Euphorbiaceae. In: CANDOLLE, A.P. **Prodomus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis**, v. 15, n.2, p.189-1261, 1866.

NASCIMENTO, M.R.; SILVA, G.S.; CONCEIÇÃO, G.M. Euphorbiaceae: checklist de uma coleção botânica, Maranhão, Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.14, n.25, 2017.

N'DA, H.A.; AKANVOU, L.; POKOU, N'. D.; AKANZA, P.K.; KOUAKOU, C.K.; ZORO BI, I.A. Genetic diversity and population structure of maize landraces from Côte d'Ivoire. **African Journal of Biotechnology**, v.15, n.44, p.2507-2516, 2016.

NARUM, S.R.; BUERKLE, C.A.; DAVEY, J.W.; MILLER, M.R.; HOHENLOHE, P.A. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. **Molecular Ecology**, v.22, p.2841-2847, 2013.

NEVES, I.A.N.; CAMARA, C.A.G. Volatile Constituents of Two *Croton* Species from Caatinga Biome of Pernambuco – Brasil. **Records of Natural Products**, v.6, n.2, p.161-165, 2012.

NIZIO, D.A.C.; BRITO, F.A.; SAMPAIO, T.S.; MELO, J.O.; SILVA, F.L.S.; GAGLIARDI, P.R.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; ANJOS, C.S.; ALVES, P.B.; WISNIEWSKI JUNIOR, A.; BLANK, A.F. Chemical diversity of native populations of *Varronia curassavica* Jacq. and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. **Industrial Crops and Products**, v.76, p.437-448, 2015.

NOVAK, R.J.; GERBERG, E.J. Natural-based repellent products: efficacy for military and general public uses. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.21, p.7-11, 2005.

OGWU, M.C.; OSAWARU, M.E.; CHIME, A.O. Comparative assessment of plant diversity and utilization patterns of tropical home gardens in edo state, Nigeria. **Scientia Africana**, v.13, n.2, p.146-162, 2014.

OLIVERO-VERBEL, J.; BARRETO-MAYA, A.; BERTEL-SEVILLA, A.; STASHENKO, E.E. Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.3, 2014.

ORTIZ, A.G.; PERES FILHO, O.; SANTOS, A.; SOUZA, M.D.; FAVARE, L.G.; NASCIMENTO, D.A. Response of the foraging of *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1858) and *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) to *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh seedlings with different nutritional restrictions. **Revista Espacios**, v.38, n.44, p.1, 2017.

OSMAN, A.; JORDAN, B.; LESSARD, P.A.; MUHAMMAD, N.; HARON, M.R.; RIFFIN, N.M.; SINSKEY, A.J.; RHA, C.; HOUSMAN, D.E. Genetic diversity of *Eurycoma longi-folia* inferred from single nucleotide polymorphisms. **Plant Physiology**, v.131, p.1294-1301, 2003.

- PAULS, S.U.; NOWAK, C.; BÁLINT, M.; PFENNIGER, M. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. **Molecular Ecology**, v.22, p.925-946, 2012.
- PAVAN, S.; MARCOTRIGIANO, A.R.; CIANI, E.; MAZZEO, R.; ZONNO, V.; RUGGIERI, V.; LOTTI, C.; RICCIARDI, L. Genotyping-by-sequencing of a melon (*Cucumis melo* L.) germplasm collection from a secondary center of diversity highlights patterns of genetic variation and genomic features of different gene pools. **BMC Genomics**, v.18, n.59, p.1-10, 2017.
- PAVELA, R.; BARTOLUCCI, F.; DESNEUX, N.; LAVOIR, A.V.; CANALE, A.; MAGGI, F.; BENELLI, G. Chemical profiles and insecticidal efficacy of the essential oils from four *Thymus* taxa growing in central-southern Italy. **Industrial Crops and Products**, v.138, 111460, 2019.
- PAVELA, R.; BENELLI, G.; CANALE, A.; MAGGI, F.; MÁRTONFI, P. Exploring essential oils of Slovak medicinal plants for insecticidal activity: The case of *Thymus alternans* and *Teucrium montanum* subsp. *Jailae*. **Food and Chemical Toxicology**, v.138, 111203, 2020.
- PAVELA, R.; ZABKA, M.; VRCHOTOVA, N.; TRISKA, J. Effect of foliar nutrition on the essential oil yield of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Industrial Crops and Products**, v.112, p.762-765, 2018.
- PAYO, H.A.; DOMINICIS, M.E.; MAYOR, J.; OQUENDO, M.; SARDUY, R. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmácia**, v.35, p.203-206, 2001.
- PHILLIPS, P.W.B. Ownership of plant genetic resources. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**, v.2, n.2, p.289-295, 2017.
- PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. DNA-Based Markers in Plants. **Kluwer Academic**, p.9-29, 2001.
- PIMENTA, L.B.; ARAÚJO, M.S.; LIMA, R.L.; SILVA, J.M.S.; NAVES, V.O. Dinâmica de forrageamento e caracterização de colônias de *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente de cerrado goiano. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v.5, n.9, p.1-12, 2007.
- PRIMMER, C.R.; BORGE, T.; LINDELL, J.; SAETRE, G.P. Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. **Molecular Ecology**, v.11, p.603-612, 2002.
- RALIYA, R.; SAHARAN, V.; DIMKPA, C.; BISWAS, P. Nanofertilizer for precision and sustainable agriculture: current state and future perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, p.6487-6503, 2018.
- RAMAK, P.; OSALOO, S.K.; SHARIFI, M.; EBRAHIMZADE, H.; BEHMANES, M. Biosynthesis, regulation and properties of plant monoterpenoids. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, n.29, p.983-991, 2014.

RAMAKRISHNAN, M.; CEASAR, S.A.; DURAIPANDIYAN, V.; AL-DHABI, N.A.; IGNACIMUTHU, S. Using molecular markers to assess the genetic diversity and population structure of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) from various geographical regions. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.2, p.361-376, 2016.

RAMESHKUMAR, R.; PANDIAN, S.; RATHINAPRIY, P.; SELVI, C.T.; SATISH, L.; GOWRISHANKAR, S.; LEUNG, D.W.M.; RAMESH, M. Genetic diversity and phylogenetic relationship of *Nilgirianthus ciliatus* populations using ISSR and RAPD markers: Implications for conservation of an endemic and vulnerable medicinal plant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.18, 101072, 2019.

RAO, N.K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal Biotechnology**, v.3. p.136–145, 2004.

RAVANELLI, N.; SANTOS, K.P.; MOTTA, L.B.; LAGO, J.H.G.; FURLAN, C.M. Alkaloids from *Croton echinocarpus* Baill.: Anti-HIV potential. **South African Journal of Botany**, v.102, p.153-156, 2016.

RIBEIRO, I.A.T.A.; SILVA, R.; SILVA, A.G.; MILET-PINHEIRO, P.; PAIVA, P.M.G.; NAVARRO, D.M.A.F.; SILVA, M.V.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T.S. Chemical characterization and insecticidal effect against *Sitophilus zeamais* (maize weevil) of essential oil from *Croton rudolphianus* leaves. **Crop Protection**, v.129, 2020.

RIBEIRO, R.C.; FOUAD, H.A. Potential use of essential oils to control the leaf-cutting ants; *Atta sexdens rubropilosa* and *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera: Formicidae). **International Journal of Industrial Entomology**, v.32, n.1, p.26-34, 2016.

RIZK, A.F.M. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Botanical Journal Linnean Society**, v.94, p.293-326, 1987.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do Alto Rio – Minas Gerais. Brasil. **Ciência Agrotecnologia**, v. 25, n.1, p.102-123, 2001.

ROGERS, J.S. Measures of genetic similarity and genetic distance. Austin: University of Texas Publication. **Study Genetic**, v.7, 1972.

ROSA, A.N.; MARTINS, E.N.; MENEZES, G.R.O.; SILVA, L.O.C. **Melhoramento genético aplicado em gado de corte**: Programa Geneplus Brasília, DF: Embrapa, 2013. 256 p.

ROULLIER, C.; BENOIT, L.B.; MCKEY, D.B.; LEBOT, B. Historical collections reveal patterns of diffusion of sweet potato in Oceania obscured by modern plant movements and recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, p.2205–2210, 2013.

RYAN, M.F.; BYRNE, O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. **Journal of Chemical Ecology**, v.14, n.10, 1988.

RYU, J.; KIM, W.J.; IM, J.; KANG, K-W.; KIM, S.H.; JO, Y.D.; KANG, S-Y.; LEED, J.H.; HÁ, N.K. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery through genotyping-

bysequencing (GBS) and genetic characterization of *Dendrobium* mutants and Cultivars. **Scientia Horticulturae**, v.244, p.225-233, 2019.

SAIDI, A.; EGHBALNEGAD, Y.; HAJIBARAT Z. Study of genetic diversity in local rose varieties (*Rosa* spp.) using molecular markers. **Banat's Journal of Biotechnology**, v.8, n.16, p.148-157, 2017.

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

SANTOS, C.P.; OLIVEIRA, T.C.; PINTO, J.A.O.; FONTES, S.S.; CRUZ, E.M.O.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; ANDRADE, T.M.; MATOS, I.L.; ALVES, P.B.; INNECCO, R.; BLANK, A.F. Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. germplasm. **Industrial Crops and Products**, v.76, p.416-421, 2015.

SANTOS, K. P.; MOTTA, L. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. et al. Antiproliferative activity of flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae). **Biomed Research International**, v. 2015, 2015.

SECCO, R.S.; CORDEIRO, I.; SENNA-VALE, L.; SALES, M.F.; LIMA, M.R., MEDEIROS, D.; HAIAD, B.S.; OLIVEIRA, A.S.; CARUZO, M.B.R.; CARNEIRO-TORRES, D.; BIGIO, N.C. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l in Brazil. **Rodriguésia**, v.63, p.227-242, 2012.

SEGARRA-MORAGUES, J.G.; IRIONDO, J.M.; CATALÁN, P. Genetic fingerprinting of germplasm accessions as an Aid for species conservation: a case study with *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae), one of the most critically endangered Iberian plants. **Annals Botany**, v.96, n.7, p.1283-1292, 2005.

SEMENSATTO JR., D. L. **Foraminíferos e tecamebas do Canal do Poço, Sergipe: distribuição e condicionantes**. 2001. 45p Trabalho de Conclusão de Curso (UNESP), 2001.

SHILPHA, J.; SILAMBARASAN, T.; PANDIAN, S.K.; RAMESH, M. Assessment of genetic diversity in *Solanum trilobatum* L., an important medicinal plant from South India using RAPD and ISSR markers. **Genetics Resources and Crop Evolution**, v.60, p.807-818, 2013.

SICCHA-RAMIREZA, Z.R.; MAROSO, F.; PARDO, B.G.; FERNÁNDEZ, C.; MARTÍNEZ, P.; OLIVEIRA, C. SNP identification and validation on genomic DNA for studying genetic diversity in *Thunnus albacares* and *Scomberomorus brasiliensis* by combining RADseq and long read high throughput sequencing. **Fisheries Research**, v.198, p.189-194, 2018.

SILVA, A.; BACCI, M.J.R.; SIQUEIRA, C.G.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. Survival of *Atta sexdens* on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v.49, p.307-313, 2003.

SILVA, A.D.S.; SILVA, K.M.; CLEMENTINO NETO, J.; COSTA, V.C.O.; PESSÔA, H.L.F.; J.F.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; CAVALCANTE, F.A. *Croton grewioides* Baill. (Euphorbiaceae) shows antidiarrheal activity in mice. **Pharmacognosy Research**, v.8, n.3, p.202-205, 2016.

SILVA, A.F.G.; FEITOSA, B.H.; LIMA, V.T.; SILVA, V.F.B. Antioxidant activity and total phenol, flavonoid and tannin contents of *Croton floribundus* and *Croton urucurana*. **Enciclopédia Biosfera**, v.16, n.30, 2019.

SILVA, A.L.S. **Characterization and evaluation of larvicidal activity of essential oil of *Zingiber officinale roscoe* (ginger) front mosquito *Aedes aegypti***. 2012. 73f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís-MA, 2012.

SILVA, A.V.C.; MUNIZ, E.N.; ALMEIDA, C.S.; VITÓRIA, M.F. da; LEDO, A.S.; MELO, M.F.V.; RABBANI, A.R.C. Genetic diversity and sex identification in *Genipa americana* L. **Tropical and Subtropical Agroecosystem**, v.18, p.81-86, 2015.

SILVA, D.C.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BACCI, L.; BLANK, A.F.; FARO, R.R.N.; PINTO, J.A.O.; PEREIRA, K.L.G. Toxicity and behavioral alterations of essential oils of *Eplingiella fruticosa* genotypes and their major compounds to *Acromyrmex balzani*. **Crop Protection**, v.116, p.181-187, 2019.

SILVA, D.D.E.; RIOS, F.R.A. Degradação ambiental: Uma análise sobre a agricultura no Semiárido Nordeste. **Revista Brasileira De Gestão Ambiental**, v.7, n.2, p.01-06, 2013.

SILVA, F.L.M.; CÔRREA, A.C.B. Relações entre geossistemas e usos da terra em microbacia hidrográfica semi-árida: o caso do Riacho Gravatá/ Pesqueira – PE. In: **Revista de Geografia**. Recife: UFPE, v.24, n.1, 2007.

SILVA, I.M.A.; MARTINS, G.F.; MELO, C.R.; SANTANA, A.S.; FARO, R.R.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; PICANÇO, M.C.; CRISTALDO, P.F.; ARAÚJO, A.P.A.; BACCI, L. Alternative control of *Aedes aegypti* resistant to pyrethroids: lethal and sublethal effects of monoterpane bioinsecticides. **Pest Management Science**, v.74, p.1001-1012, 2018.

SILVA, J.S.; SALES, M.F.; CARNEIRO-TORRES, D.S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale Do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v.60, n.4, p.879-901, 2009.

SILVA, S.M.M.; MARTINS, K.; MESQUITA, A.G.G.; WADT, L.H.O. Genetic parameters for *Hymenaea courbaril* L. conservation in southwestern Amazon. **Ciência Florestal**, v.24, n.1, p.87-95, 2014.

SILVEIRA, F.A.O.; TEIXIDO, A.L.; ZANETTI, M.; PÁDUA, J.G.; ANDRADE, A.C.S.; COSTA, M.L.N. *Ex situ* conservation of threatened plants in Brazil: a strategic plan to achieve Target 8 of the Global Strategy for Plant Conservation. **Rodriguésia**, v.69, n.4, p.1547-555, 2018.

SILVESTRINI, M.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; ZUCCHI, M.I.; SANTOS, F.A.M. Cytogenetics and characterization of microsatellite loci for a South American pioneer tree species, *Croton floribundus*. **Genome**, v.56, p.743-751, 2013.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2017.

SIVAKUMAR, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, v.64, p.27-37, 2014.

- SMALE, M.; DAY-RUBENSTEIN, K. The demand for crop genetic resources: international use of the US National Plant Germplasm System. **World Development**, v.30, n.9, p.1639-1655, 2002.
- SOLER, S.; GRAMAZIO, P.; FIGÀS, M.R.; VILANOVA, S. Genetic structure of *Cannabis sativa* var. *indica* cultivars based on genomic SSR (gSSR) markers: Implications for breeding and germplasm management. **Industrial Crops and Products**, v.104, p.171-178, 2017.
- SONG, J-T.; LIU, X-Y.; LI, A.L.; WANG, X.L.; SHEN, T.; REN, D.M.; LOU, H.X.; WANG, X.N. Cytotoxic abietane-type diterpenoids from twigs and leaves of *Croton laevigatus*. **Phytochemistry Letters**, v.22, p.241-246, 2017.
- SOUZA, L.L.; ALVES, A.A.C.; OLIVEIRA, E.J. Phenological diversity of flowering and fruiting in cassava germplasm. **Scientia Horticulturae**, v.265, 2020.
- SOUZA, M.A.; SILVA, L.; MACÊDO, M.J.F.; LACERDA-NETO, L.J.; SANTOS, M.A.C.; COUTINHO, H.D.M.; CUNHA, F.A.B. Adulticide and repellent activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) – A review. **South African Journal of Botany**, v.124, p.160-165, 2019.
- SWANSON, T.; GÖSCHL, T. Property rights issues involving plant genetic resources: implications of ownership for economic efficiency. **Ecology Economy**, v.32, n.1, p.75-92, 2000.
- SWARTS, K.; LI, H.; NAVARRO, A.R.J.; AN, D.; ROMAY, M.; HEARNE, S.; ACHARYA, C.C.; GLAUBITZ, J.; MITCHELL, S.J.; ELSHIRE, R.; BUCKLER, E.J.; BRADBURY, P. Novel methods to optimize genotypic imputation for low-coverage, Next-Generation sequence data in crop plants. **The Plant Genome**, v.7, n.3, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888p.
- TORO, M.A.; CABALLERO, A. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.360, p.1367-1378, 2005.
- TORRES, M.C.M.; ASSUNÇÃO, J.C.; SANTIAGO, G.M.P.; ANDRADE-NETO, M.; SILVEIRA, E.R.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, O.D.L. Larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. **Chemistry and Biodiversity**, 2008.
- TORRES, M.C.M.; ASSUNÇÃO, J.C.; SANTIAGO, G.M.P.; ANDRADE- NETO, M.; SILVEIRA, E.R.; COSTA- LOTUFO, L.V.; BEZERRA, D.P.; MARINHO FILHO, J.D.B.; VIANA, F.A.; PESSOA, O.D.L. Larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. **Chemistry and Biodiversity**, v.5, p.2724-2728, 2008.
- TRINDADE, M.J.S.; LAMEIRA, O.A. Species from the Euphorbiaceae family used for medicinal purposes in Brazil. **Revista cubana de plantas medicinales**, v.19, n.4, p.292-309, 2014.

TRIPATHI, A.K.; UPADHYAY, S.; BHUIYAN, M.; BHATTACHARYA, P.R. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v.1, n.5, p.1-13, 2009.

UBILLAS, R.; JOLAD, S.D.; BRUENING, R.C.; KERNAN, M.R.; KING, S.R.; SESIN, D.R.; BARRETI, M.; STODDART, C.A.; FLASTER, T.; KUO, J.; AYALA, F.; MEZA, E.; CASTANEL, M.; MCMEEKIN, D.; ROZHON, E.; TEMPESTA, M.S.; BARNARD, D.; HUFFMAN, J.; SMEE, D.; SIDWELL, R.; SOIKE, K.; BRAZIER, A.; SAFRIN, S.; ORLANDO, R.; KENNY, P.T.N.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K. Antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). **Phytomedicine**, v.1, p.77-106, 1994.

VASCONCELLOS, B.F.; CONTEL, E.P.B. Variabilidade genética em algumas criações comerciais brasileiras de escargots (*Helix aspersa*, Müller, 1774). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica**, v.58, n.2, p.242-250, 2006.

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.S.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; FURLAN, M.; LOPES, M.N.; BOLZANI, V.S. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova**, v.35, n.11, 2012.

VASILEVA, V. Root biomass accumulation in vetch (*Vicia sativa* L.) after treatment with organic fertilizer. **Banat's Journal of Biotechnology**, v.6, n.11, p.100-105, 2015.

VIJAYAN, K.; SARATCHANDRA, B.; SILVA, J.A.T. Germplasm conservation in mulberry (*Morus* spp.). **Scientia Horticulturae**, v.128, p.371-379, 2011.

VILELA, E.F.; SANTOS, I.A.; SCHOEREDER, J.H.; SERRÃO, J.E.; CAMPOS, L.A.O.; LINO-NETO, J. **Insetos sociais: da biologia à aplicação**. Viçosa, MG: UFV, 2008. 442p.

VINSON, C.C.; MANGARAVITE, E.; SEBBENN, A.M.; LANDER, T.A. Using molecular markers to investigate genetic diversity, mating system and gene flow of Neotropical trees. **Brazilian Journal of Botany**, v.41, p.481-496, 2018.

WAN, J-Z.; WANG, C-J.; LIU, C-X.; LI, H-L. Climate change may alter genetic diversity of *Duchesnea indica*, a clonal plant species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.66, p.114-122, 2016.

WANG, A.; ZHANG, P.; LIU, X.; LIANG, J.; LI, W. Genetic structure and diversity of *Glehnia littoralis*, an endangered medicinal plant in China. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.66, p.265-271, 2016.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v.81, n.1, p.33-144, 1994.

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

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, Lancaster, v. 19, p.395- 420, 1965.

YING, G.G.; KOOKANA, R.S. Persistence and movement of fipronil termiticide with under slab and trenching treatments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.25, p.2045-2050, 2006.

ZHANG, X.-M.; ZHANG, Z.-H.; GU, X.-Z.; MAO, S.-L.; LI, X.-X.; CHADOEUF, J.; PALLOIX, A.; WANG, L.-H.; ZHANG, B.-X. Genetic diversity of pepper (*Capsicum* spp.) germplasm resources in China reflects selection for cultivar types and spatial distribution. **Journal of Integrative Agriculture**, v.15, p.1991-2001, 2016.

ZHAO, H.; JUA, Y.; JIANG, J.; MIN, Z.; FANGA, Y.; LIU, C. Downy mildew resistance identification and SSR molecular marker screening of different grape germplasm resources. **Scientia Horticulturae**, v.252, p.212-221, 2019.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.18, p.925–938, 2014.

4. ARTIGO 1

BAIXA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATIVAS DE *Croton tetradenius* Baill., UMA FUTURA CULTURA COM ATIVIDADE INSETICIDA, USANDO MARCADORES SNP

RESUMO

Croton tetradenius é uma espécie aromática que possui óleos essenciais com ação inseticida e fungicida para agricultura. Sua implantação em Bancos Ativos de Germoplasma é essencial para conservação e uso futuro, sendo necessário observar sua variabilidade genética. O objetivo deste estudo foi estimar a diversidade e estrutura genômica de *C. tetradenius* em populações nativas do estado do Sergipe, para introdução no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe, utilizando marcadores de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP). Foram coletadas 38 plantas em 4 municípios. O sequenciamento de bibliotecas genômicas da genotipagem por sequenciamento (GBS) de *C. tetradenius* resultou na identificação de 1387 SNPs de alta qualidade. A diversidade genética média foi baixa ($H_O < H_E = 0,086$; $I = 0,143$; $f = 0,099$). A análise de variância molecular (AMOVA) revelou uma maior variação genética dentro das localidades (95%) e a diferenciação genética entre as localidades foi baixa ($F_{ST} = 0,041-0,062$). Na análise discriminante de componentes principais (DAPC) houve maior sobreposição das plantas de Lagarto e Poço Redondo, indicando que a fragmentação recente do habitat pode isolar as populações. Com base nestes resultados, serão necessárias coletas adicionais de um grande número de indivíduos nas quatro populações avaliadas e em outras regiões de ocorrência, para ampliar a base genética desta espécie.

Palavras-chave: conservação; diversidade e estrutura genética; plantas aromáticas.

ABSTRACT

LOW GENETIC DIVERSITY IN NATIVE POPULATIONS OF *Croton tetradenius* Baill., A FUTURE CROP WITH INSECTICIDE ACTIVITY, USING SNP MARKERS

Croton tetradenius is an aromatic specie that has essential oils of insecticidal and fungicidal action for agriculture. It's implantation in Active Germplasm Banks is essential for conservation and future use, being necessary to observe its genetic variability. The aim of this study was to estimate the diversity and genomic structure of *C. tetradenius* in native populations of the State of Sergipe, for introduction into the Active Germplasm Bank of Medicinal and Aromatic Plants at the Federal University of Sergipe, using Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers. Were collected collected 38 plants in 4 cities. The sequencing of genomic libraries with Genotyping by Sequencing (GBS) *C. tetradenius* resulted in the identification of 1387 high quality SNPs. The average genetic diversity was low ($H_O < H_E = 0.086$; $I = 0.143$; $f = 0.099$). The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) revealed greater genetic variation within the localities (95%) and the genetic differentiation between the localities was low ($F_{ST} = 0.041-0.062$). The Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) there was a greater overlap of the Lagarto and Poço Redondo plants, indicating that recent habitat fragmentation may isolate populations. Based on these results, additional collections from a large number of individuals in the four populations evaluated and in other regions of occurrence will be necessary to expand the genetic base of this specie.

Keywords: aromatic plants; genetic diversity and structure; conservation.

4.1. Introdução

O desmatamento e a fragmentação de habitats em áreas naturais são problemas de escala global relacionados principalmente à mudança de uso do solo para fins agrícolas, pastagens ou construções, resultando em consequências negativas cujo entendimento é crucial para a manutenção de agroecossistemas estáveis e do bem-estar dos seres vivos (Semper-Pascual et al. 2019; Wang e Gamon 2019). A perda da biodiversidade interespecífica é uma consequência alarmante e notadamente expressiva em muitos ecossistemas; contudo, a perda da diversidade genética intraespecífica também é preocupante por não ser diretamente mensurável e por ser difícil de observar em poucas gerações, afetando a viabilidade a longo prazo de populações naturais em ecossistemas antropizados (Jamieson et al. 2008). Nesse aspecto, muitos recursos genéticos vegetais podem ser perdidos antes mesmo de se mensurar a sua variabilidade (Rao 2004) e de elucidar seus potenciais funcionais (Dulloo 2018), como o potencial fitoterápico (Zahn et al. 2019), de produção de biodiesel (Kafuku e Mbarawa 2010), de inseticidas (Carvalho et al. 2016) e de fungicidas naturais (Blank et al. 2017).

Para mitigar essas perdas, a conservação *ex situ* de componentes da diversidade biológica torna-se, em alguns casos, a única alternativa viável (Dulloo et al. 2017; Dulloo 2018). Dentre as estratégias de conservação *ex situ* está o Banco Ativo de Germoplasma, que é uma coleção de acessos de espécies vegetais onde a variabilidade genética pode ser identificada, caracterizada e conservada como fontes de genes para uso futuro em programas de melhoramento genético, podendo ser ampliada com a utilização de novos acessos oriundos das áreas de ocorrência (Díez et al. 2018; Terzić et al. 2020). Porém um dos grandes desafios da implementação de Bancos Ativos de Germoplasma é a escolha de acessos que representem a diversidade genética existente em ambientes naturais (Rao 2004). Uma das técnicas modernas utilizadas para esta escolha é a caracterização genética de plantas usando marcadores moleculares de DNA (Souza 2015). Os marcadores moleculares têm como vantagens a não influência das condições ambientais, fisiológicas e da idade da planta, consistindo numa ferramenta de controle de qualidade e de monitoramento de produtos desenvolvidos no Banco

Ativo de Germoplasma, aumentando o potencial e a lucratividade comercial destes produtos (Khan et al. 2015).

Atualmente, um dos marcadores moleculares mais utilizados para estimar a diversidade e a estrutura genética vegetal são os marcadores SNP (*Single-Nucleotide Polymorphisms*). Por serem abundantes nas plantas e permitirem uma maior cobertura do genoma, resultam em estimativas de diversidade genética mais precisas, além de permitir estudos sobre a adaptação de genótipos relacionados ao ambiente. Adicionalmente, técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) têm contribuído para uma genotipagem de alto rendimento, reduzindo o custo e o tempo de identificação destes marcadores e de obtenção dos resultados (Kim et al. 2016; Kethom et al. 2019). Uma dessas técnicas é o desenvolvimento de bibliotecas genômicas baseadas em GBS (*Genotyping by Sequencing*), que reduz as etapas de preparação da biblioteca genômica, com a geração de fragmentos utilizando enzimas de restrição. Essa técnica demonstrou ser útil para estudo da diversidade genômica em plantas, até mesmo naquelas sem um genoma de referência (Elshire et al. 2011).

Uma espécie vegetal aromática que tem potencial inseticida e demanda caracterização molecular para implementação em Bancos Ativos de Germoplasma é *Croton tetradenius* Baill, conhecida popularmente como velaminho-da-serra. Trata-se de um arbusto monoico com cerca de 1 metro, de látex translúcido, com ampla ocorrência no Nordeste brasileiro, a exemplo de Sergipe (Carneiro-Torres 2009; Silva et al. 2010; Carvalho et al. 2016; Brito et al. 2020). Essa espécie, como outras pertencentes ao gênero *Croton* (Euphorbiaceae), sintetiza metabólitos secundários como terpenos, que são constituintes químicos comumente observados nos óleos essenciais e que conferem diferentes tipos de atividade biológica (Webster 1993; Berry et al. 2005; Silva et al. 2010; Flora Do Brasil 2020 em construção 2019). Em plantas do estado brasileiro de Sergipe foi observado no óleo essencial a presença de 25 compostos químicos, com monoterpenos majoritários (Almeida-Pereira et al. 2019). Foi observada a ação inseticida contra *Aedes aegypti* e fungicida contra o fungo fitopatogênico *Fusarium solani* (Blank et al. 2017). Óleos essenciais de plantas coletadas em Sergipe nos municípios de Porto da Folha, Lagarto, Poço Redondo e Pacatuba e seus compostos majoritários, apresentaram atividade formicida sobre a formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* (Brito et al. 2020).

Apesar do grande potencial para obtenção de produtos naturais à base de óleos essenciais de *C. tetradenius*, a degradação ambiental das áreas de vegetação nativa do estado de Sergipe pode ocasionar a perda dessa espécie e de sua variabilidade genética (Ghorbanpour e Varma 2017). Estudos genéticos com marcadores ISSR em populações nativas de *C. tetradenius* do estado de Sergipe evidenciaram moderada variabilidade genética (Almeida-Pereira et al. 2017), que pode ser perdida com o desmatamento. Assim, a implementação em Banco Ativo de Germoplasma visando a conservação deste importante recurso genético e seu uso posterior em programas de melhoramento genético é uma alternativa viável e necessária. A avaliação com SNPs é uma ferramenta que irá acessar de uma forma mais ampla a diversidade presente entre os acessos (Pádua 2018; Ma et al. 2020). Por sua robustez, futuramente os dados genéticos poderão ser comparados com informações fenotípicas para associar características de interesse com genes específicos para produção dos óleos essenciais e síntese de compostos químicos (Lu et al. 2014; Yang et al. 2017; Ceccon et al. 2020).

Utilizando marcadores moleculares SNPs obtidos pelo protocolo de GBS esperamos responder a seguinte pergunta: os níveis de diversidade genética das localidades amostradas permitem a implementação de um Banco Ativo de Germoplasma com acessos de ampla base genética? Desta forma, o objetivo deste estudo foi estimar a diversidade e estrutura genética de *C. tetradenius* em populações nativas do estado do Sergipe, com base em marcadores SNP, para selecionar indivíduos para compor uma coleção de *C. tetradenius* do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Coleta do Material Vegetal

Foi feita a prospecção e coleta do material vegetal no estado de Sergipe, nos municípios de Porto da Folha, Poço Redondo, Lagarto e Pacatuba (Tabela 1, Figura 1), foram coletadas amostras de 38 plantas de *Croton tetradenius* para compor uma coleção no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe, localizado na fazenda experimental Campus Rural, em São Cristóvão, Sergipe, Brasil (11° 00' S; 37° 12' W). Folhas frescas e jovens de cada planta foram envoltas em gaze esterilizada e acondicionadas em gelo no momento da coleta para evitar a oxidação. Em seguida, foram armazenadas a -80.0 °C até a liofilização em aparelho LioTop L101 (Liobras, São Carlos, SP, Brasil). Após a liofilização, as amostras foram armazenadas em um dessecador contendo sílica gel até a extração do DNA. Os *voucheres* de todas as 38 plantas foram depositados e identificados no Herbário da Universidade Federal de Sergipe. O projeto está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número A8CCB3B.

Chove ao longo do ano inteiro em todos esses municípios de Sergipe. Pacatuba tem uma variação sazonal extrema na precipitação mensal de chuva. O máximo de chuvas ocorre durante os 31 dias em maio, com acumulação total média de 130 milímetros. O mínimo de chuva ocorre por volta do início de dezembro, com acumulação total média de 14 milímetros. Em Porto da Folha, o máximo de chuva ocorre durante os 31 dias de junho, com acumulação total média de 69 milímetros. O mínimo de chuva ocorre em novembro, com acumulação total média de 14 milímetros. Já em Lagarto, o máximo de chuva ocorre durante os 31 dias na segunda quinzena de maio, com acumulação total média de 95 milímetros. O mínimo de chuva ocorre por volta da segunda quinzena de setembro, com acumulação total média de 26 milímetros. Poço Redondo possui déficit hídrico praticamente todo o ano, em março (136,9 mm), junho (66,4 mm) e julho (96,0 mm) ocorreram mais chuvas na região (Emdagro 2019; Weather Spark 2020).

4.2.2. Preparo das amostras e desenvolvimento da biblioteca genômica de GBS

O DNA foi extraído das folhas jovens utilizando o protocolo baseado no reagente CTAB 3% (brometo de cetiltrimetilamônio) (Doyle e Doyle 1990), no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento de Plantas, no Departamento de Genética da ESALQ-USP em Piracicaba, São Paulo. As 38 amostras foram quantificadas em gel de agarose 1% (p/v) e padronizadas para concentração de 30 ng/μl para a preparação da biblioteca genômica baseada em GBS (*Genotyping-by-Sequencing*), seguindo o protocolo com dupla digestão descrito por Poland et al. (2012). Primeiramente, o DNA genômico de cada indivíduo foi digerido por duas enzimas de restrição (*Nsi I* e *Mse I*), escolhidas após testes considerando o tamanho do genoma e a quantidade de sequências repetitivas. Os fragmentos digeridos de cada amostra foram ligados a adaptadores individuais (*barcodes*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e a adaptadores específicos para a tecnologia Illumina (Illumina, CS, Pro). Os produtos de restrição-ligação foram então reunidos em um único *pool* (multiplex), que foi purificado utilizando QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN®), e amplificados por PCR visando enriquecer os fragmentos com ambos sítios de restrição. Após essa etapa, a biblioteca foi novamente purificada, validada e quantificada em aparelho Qubit V3.0 Fluoremeter (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), para ser submetida ao sequenciamento em plataforma Illumina (Illumina, Inc.).

Tabela 1 Código de planta, origem e informação geográfica das 38 plantas de *Croton tetradenius* que foram amostradas no estado de Sergipe, Brasil.

Código das plantas	Município de origem	Georreferenciamento	Voucher
CRT104	Porto da Folha	S 09°58'55,6" W 037°27'12,9"	ASE 41453
CRT105	Porto da Folha	S 09°58'56,2" W 037°27'12,5"	ASE 41454
CRT106	Porto da Folha	S 09°58'55,3" W 037°27'12,4"	ASE 41455
CRT111	Porto da Folha	S 09°58'45,4" W 037°26'44,5"	ASE 41457
CRT112	Porto da Folha	S 09°58'45,1" W 037°26'44,1"	ASE 41458
CRT113	Porto da Folha	S 09°58'45,7" W 037°26'43,3"	ASE 41459
CRT115	Porto da Folha	S 09°58'46,1" W 037°26'43,6"	ASE 41460
CRT116	Porto da Folha	S 09°58'47,7" W 037°27'05,4"	ASE 41461
CRT120	Porto da Folha	S 09°58'45,5" W 037°27'06,6"	ASE 41462
CRT203	Poço Redondo	S 09°58'20,5" W 037°52'01,0"	ASE 41463
CRT215	Poço Redondo	S 09°58'52,5" W 037°52'05,6"	ASE 41464
CRT222	Poço Redondo	S 09°58'52,8" W 037°52'04,3"	ASE 41465
CRT223	Poço Redondo	S 09°58'53,3" W 037°52'04,6"	ASE 41466
CRT224	Poço Redondo	S 09°58'53,6" W 037°52'04,5"	ASE 41467
CRT230	Poço Redondo	S 09°58'47,9" W 037°52'11,3"	ASE 41468
CRT231	Poço Redondo	S 09°58' 47,7" W 037°52'11,5"	ASE 41469
CRT232	Poço Redondo	S 09°58'46,5" W 037°52'12,1"	ASE 41470
CRT236	Poço Redondo	S 09°58'44,6" W 037°52'13,6"	ASE 41471
CRT237	Poço Redondo	S 09°58'20,4" W 037°52'01,1"	ASE 41472
CRT303	Lagarto	S 10°51'37,9" W 037°39'17,8"	ASE 41473
CRT308	Lagarto	S 10°51'37,9" W 037°39'19,6"	ASE 41474
CRT321	Lagarto	S 10°51'38,5" W 037°39'17,5"	ASE 41475
CRT323	Lagarto	S 10°51'37,8" W 037°39'17,9"	ASE 41476
CRT325	Lagarto	S 10°51'37,7" W 037°39'18,0"	ASE 41478
CRT328	Lagarto	S 10°51'38,0" W 037°39'19,6"	ASE 41479
CRT331	Lagarto	S 10°51'37,8" W 037°39'19,8"	ASE 41480
CRT334	Lagarto	S 10°51'38,4" W 037°39'17,7"	ASE 41481
CRT335	Lagarto	S 10°51'38,6" W 037°39'17,4"	ASE 41482
CRT401	Pacatuba	S 10°32'44,9" W 036°40'35,5"	ASE 41483
CRT402	Pacatuba	S 10°32'44,8" W 036°40'35,7"	ASE 41484
CRT403	Pacatuba	S 10°32'44,8" W 036°40'35,9"	ASE 41485
CRT405	Pacatuba	S 10°32'44,9" W 036°40'36,6"	ASE 41486
CRT409	Pacatuba	S 10°32'44,0" W 036°40'37,2"	ASE 41487
CRT410	Pacatuba	S 10°32'43,8" W 036°40'37,4"	ASE 41488
CRT414	Pacatuba	S 10°32'45,3" W 036°40'36,7"	ASE 41489
CRT415	Pacatuba	S 10°32'45,5" W 036°40'36,9"	ASE 41490
CRT417	Pacatuba	S 10°32'46,1" W 036°40'36,4"	ASE 41491
CRT418	Pacatuba	S 10°32'46,3" W 036°40'36,3"	ASE 41492

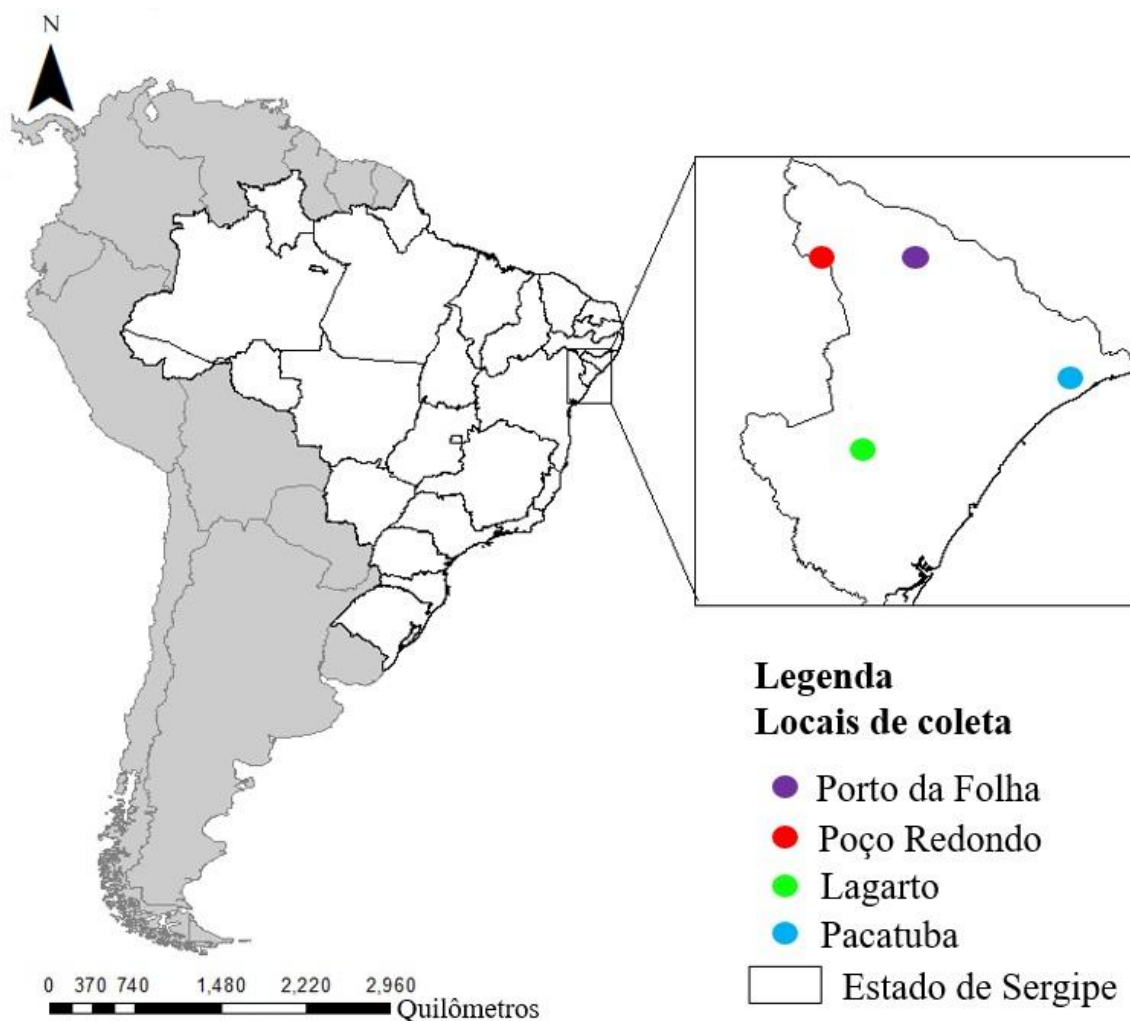


Fig. 1 Localização das 38 plantas de *Croton tetradenius* amostradas no estado de Sergipe, Brasil.

4.2.3. Análise de Dados

4.2.3.1 Processamento de sequências brutas e filtrações para identificação dos SNPs

As leituras de sequências brutas foram processadas no programa *Stacks* (Catchen et al. 2013), utilizando um *pipeline* para espécies que não possuem genoma de referência. Inicialmente as sequências brutas foram demultiplexadas usando o módulo *process_radtags*, o qual também removeu sequências com baixa qualidade. O módulo *ustacks* foi utilizado para o alinhamento das sequências e formação de pilhas de sequências homólogas e curtas (*stacks*) para permitir a identificação de locos com nucleotídeos polimórficos. Os parâmetros usados nesse processo foram a profundidade mínima dos *stacks* ($-m = 3$) e a distância máxima permitida entre os *stacks* para mesclá-las em um loco ($-M = 2$). Os locos de cada amostra foram agrupados em um catálogo usando o módulo *cstacks*, permitindo distância máxima entre locos de cada amostra de 2 nucleotídeos ($-n = 2$). Grupos de *stacks* de cada indivíduo foram comparados com o catálogo usando o módulo *sstacks*. Depois disso, o módulo *rxstacks* fez correções dos genótipos individuais removendo locos com baixa probabilidade ($-ln_lim = 10$). Finalmente, o módulo *populations* foi usado para filtrar os marcadores SNP usando os parâmetros: frequência do alelo menos frequente ($MAF \geq 0,01$), profundidade mínima dos *stacks* ($m \geq 3$), retenção de apenas um marcador por tag, ocorrendo em pelo menos 75% dos indivíduos de cada localidade.

4.2.3.2 Diversidade e estrutura genômica

Utilizando o programa GenAlEx (Peakall e Smouse 2012) foram estimadas as heterozigosidades observadas (H_O) e esperadas (H_E), Índice de Shannon (I) e coeficiente de endogamia de Wright (1965) (f). A distribuição da variação genética dentro e entre as localidades de coleta das plantas de *C. tetradenius* foi observada na análise de variância molecular (AMOVA) e sua significância foi testada com 1000 permutações. A estrutura genética foi avaliada aos pares pelas estimativas de Weir e Cockerham (1984) (F_{ST}) entre as localidades e sua significância baseada em 1000 *bootstraps*, no GenAlEx.

A estrutura genômica baseada na variação dos SNPs foi avaliada pela Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC, Jombart et al. 2010) com o pacote *adeigenet* 2.0.0 (Jombart e Ahmed 2011) para R (R Core Team 2016). Essa análise não possui pressupostos como ausência de ligação e equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de grupos (Jombart et al. 2010). O DAPC resume a variação máxima entre os grupos, minimizando as diferenças dentro do grupo (Roullier et al. 2013). Com as informações dessas funções discriminantes foi gerado um gráfico de barras (COMPOPLOT), com as probabilidades de atribuição de cada indivíduo aos agrupamentos formados (Jombart e Ahmed 2011).

Relações genéticas e divergência entre indivíduos foram investigadas com a construção de um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic means*), com base na distância genética de Rogers (Rogers 1972) obtido com o pacote *poppr* (Kamvar et al. 2014) para R (R Core Team 2015). 10000 *bootstraps* foram realizados para inferir a confiança dos agrupamentos. Os dendrogramas finais foram formatados no FigTree 1.4.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e MEGA versão 7 (Kumar et al. 2016).

4.3. Resultados

As bibliotecas genômicas foram sequenciadas com sucesso para as 38 plantas de *C. tetradenius*, e o sequenciamento resultou em 643.234.54 *reads*. Após controle de qualidade, demultiplex e filtragem de dados perdidos ou ambíguos, foram identificados 1387 SNPs bialélicos de alta qualidade, que foram utilizados para caracterizar a diversidade e a estrutura genética das plantas de *C. tetradenius*. A profundidade média de sequenciamento foi 3,04 (SD $\pm$ 28,16). Dentre os SNPs foram observadas mais transições (67,4%) do que transversões (36%), e as mutações mais frequentes foram as transições A-G (35,4%) e C-T (32,01%).

A heterozigosidade observada (H_O) variou de 0,055 a 0,088, com uma média de 0,072 que é significativamente menor à heterozigosidade esperada (H_E), que variou de 0,061 a 0,102 com uma média de 0,086, e a população de Pacatuba foi a localidade que obteve menores índices de heterozigosidade. O índice de Shannon (I) médio observado foi de 0,143, com a variação de 0,098 a 0,168. O coeficiente de endogamia médio ($f = 0,099$) é significativamente diferente de 0 (Tabela 2).

Na variação da distribuição genética dentro e entre localidades, observa-se pela AMOVA que a maior diversidade está presente nas plantas de uma mesma localidade (95%) do que entre as localidades coletadas (5%) (Tabela 3). O F_{ST} entre pares de localidades variou de 0,037 (Poço Redondo e Porto da Folha) a 0,062 (Lagarto e Pacatuba), com o valor médio de (0,086) (Tabela 4) e indicou fraca a moderada diferenciação genética. Com isso, a estrutura genética entre populações foi baixa, porém significativa, indicando que não há grande diferenciação entre os grupos definidos.

Tabela 2 Estimativas de diversidade genética para as 4 localidades onde foram coletadas as 38 plantas de *Croton tetradenius*, incluindo número de amostras (N), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_E), índice de Shannon (I) e coeficiente de endogamia ($f = 1 - H_o/H_E$).

Localidade	N	H_o	H_E	I	f
Porto da Folha	9	0,066	0,083	0,139	0,133
Poço Redondo	10	0,080	0,099	0,166	0,100
Lagarto	9	0,088	0,102	0,168	0,090
Pacatuba	10	0,055	0,061	0,098	0,062
Média		0,072	0,086	0,143	0,099

Tabela 3 Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as 38 plantas de *Croton tetradenius* considerando as quatro localidades amostradas.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Variância	Porcentagem %	p-valor
Entre populações	3	1090,050	363,350	9,627 ^{NS}	5	0,051
Dentre populações	72	13003,2	180,600	180,600 ^{NS}	95	
Total	75	14093,25		190,227	100	

^{NS} Não houve diferenças significativas.

Tabela 4 F_{ST} par-a-par (Weir e Cockerham 1984) para as plantas do *C. tetradenius* nas quatro localidades amostradas em Sergipe.

	Poço Redondo	Lagarto	Pacatuba	Porto da Folha
Poço Redondo	-			
Lagarto	0,041 ^{**}	-		
Pacatuba	0,061 [*]	0,062 [*]	-	
Porto da Folha	0,037 ^{**}	0,043 ^{**}	0,058 [*]	-

^{*}, ^{**}, significativo a 0,05 e 0,01, respectivamente.

Na Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) (Figura 2) é possível observar que alguns indivíduos coletados em Lagarto e Poço Redondo estão sobrepostos, assim como há sobreposição com alguns indivíduos de Porto da Folha. As plantas coletadas em Pacatuba quase não se sobrepuseram às das demais localidades. No gráfico de composição do genótipo (COMPOPLOT) (Figura 3) é possível observar pela mistura das cores que representam as localidades, o fluxo gênico que ocorreu entre elas, mesmo naqueles em que a probabilidade de associação foi baixa. Pacatuba (cor azul) é diferente das demais, mas ainda há pouca sobreposição. Apenas em CRT303, CRT321, CRT405, CRT409 e CRT417 não houve mistura de alelos.

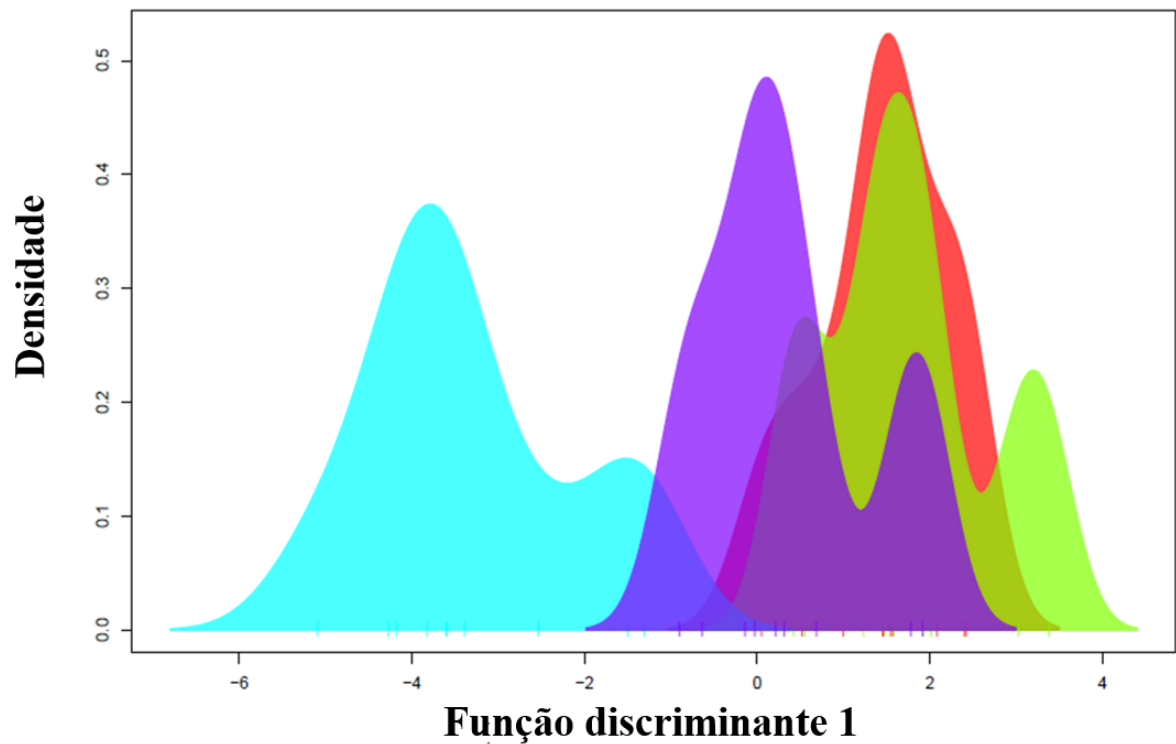


Fig. 2 Análise discriminante de componentes principais. Gráfico de densidade – considerando o primeiro componente principal – das 38 plantas de *Croton tetradenius* avaliadas em Sergipe. Cada pico representa os indivíduos de uma localidade, sendo: Porto da Folha - roxo; Poço Redondo - vermelho; Lagarto - verde; Pacatuba - azul.

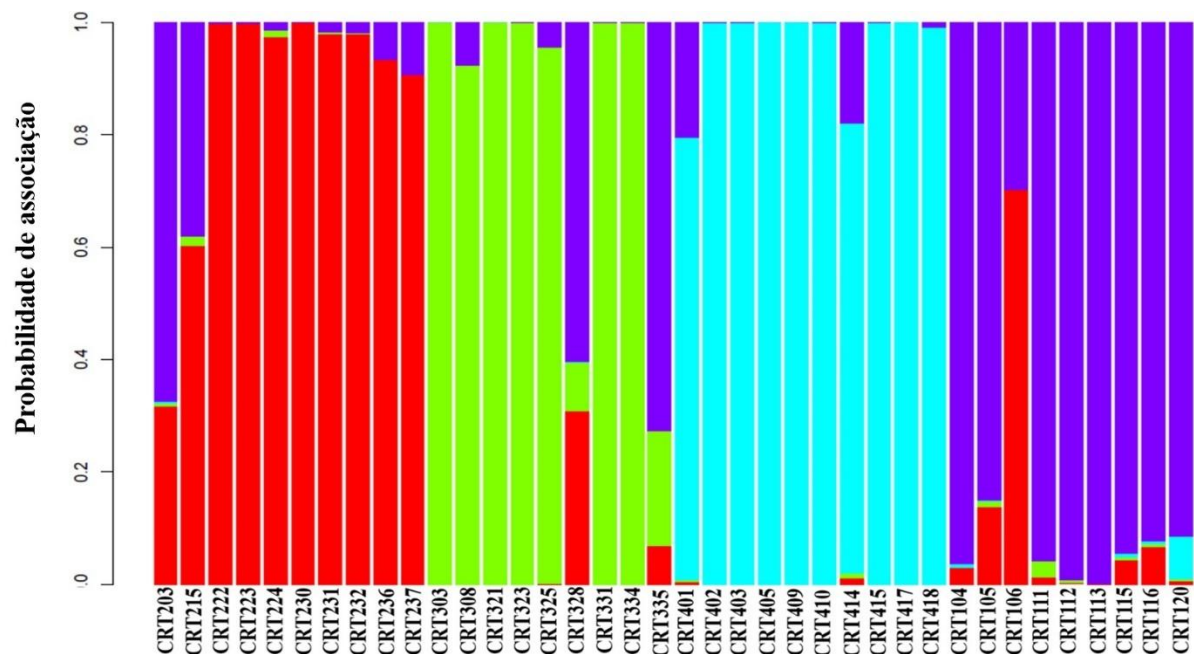


Fig. 3 Composição gráfica (COMPOPLOT) ilustrando as probabilidades de atribuição das 38 plantas de *Croton tetradenius* coletadas em Sergipe com base na análise discriminante de componentes principais. Cada planta é representada por uma barra vertical, dividida em cores de acordo com as localidades, que são as frações estimadas da associação dos indivíduos no agrupamento. As plantas de cada localidade estão representadas de acordo com as cores, sendo: Porto da Folha - roxo; Poço Redondo - vermelho; Lagarto - verde; Pacatuba - azul.

De acordo com o dendrograma (Figura 4), a planta CRT321 do município de Lagarto está mais distante geneticamente das demais. CRT222 e CRT223 apresentaram 80,2% de similaridade, CRT303 e CRT323 71,3%, CRT230 e CRT231 64,3%, e CRT402, CRT403, CRT405, CRT409, CRT410, CRT415, CRT418 obtiveram 83,3%. CRT328 e CRT414 (59,1% de similaridade) foi o único par com indivíduos de localidades diferentes, sendo provenientes de Lagarto e Pacatuba, respectivamente.

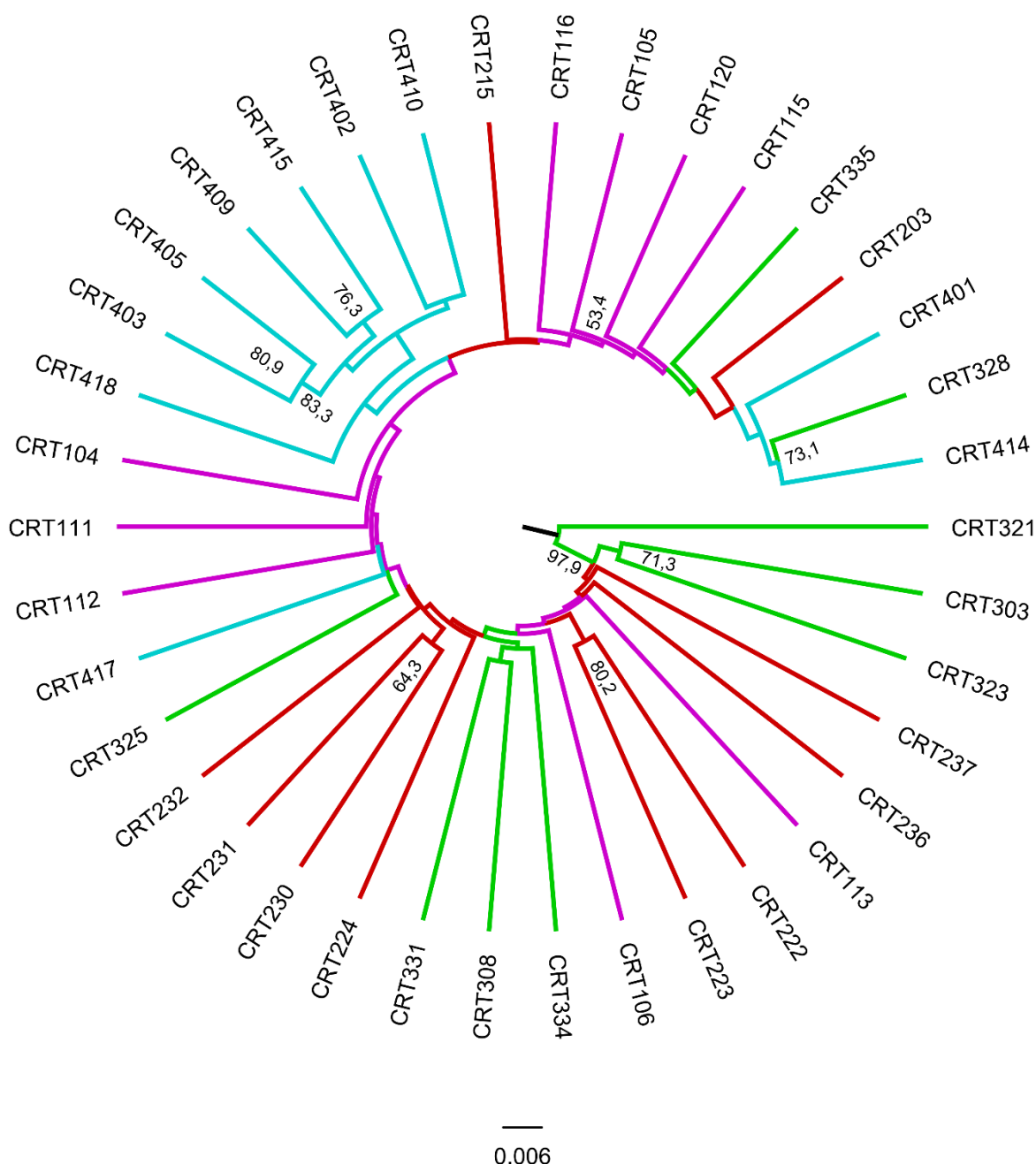


Fig. 4 Dendrograma das 38 plantas de *Croton tetradenius*, obtido pelo método UPGMA baseado na distância genética de Rogers (1972) com 10.000 *bootstraps*. As plantas de cada localidade estão representadas de acordo com as cores, sendo: Porto da Folha - roxo; Poço Redondo - vermelho; Lagarto - verde; Pacatuba - azul.

4.4. Discussão

A avaliação genética por marcadores moleculares é essencial para a conservação eficiente e utilização racional dos recursos genéticos vegetais, sendo que tais estudos são indispensáveis para a realização da coleta, manejo sustentável e da conservação *in situ* ou *ex situ* (Li et al. 2015; Wadt et al. 2018). Nesse sentido, este é o primeiro estudo genético com plantas de *C. tetradenius* utilizando marcadores SNP resultantes do desenvolvimento de bibliotecas genômicas de GBS, que possibilitou estimar a diversidade e estrutura genética das localidades estudadas visando a implantação de um Banco Ativo de Germoplasma em Sergipe. O conhecimento da diversidade genética dos indivíduos é de suma importância, pois contribui para a informação das espécies e permite a seleção de plantas a serem inseridas nas estratégias de conservação (Almeida-Pereira et al. 2017). No presente estudo, incluímos mais uma população de plantas do município de Pacatuba, ampliando a cobertura populacional dessa espécie no Estado em relação ao estudo anterior de Almeida-Pereira et al. (2017).

As sequências contendo os SNPs das plantas de *C. tetradenius* tiveram mais transições do que transversões. Já foi observado que a frequência das transições é, geralmente, mais alta que a frequência das transversões (Vignal et al. 2002; Lyons e Lauring 2017). A hipótese seletiva postula que a seleção natural desfavorece as transversões. Assim, se a taxa de transições for mais alta e as transições tiverem maior probabilidade de serem conservativas, estas ocorrerão com mais frequência simplesmente devido ao viés de mutação de transição (Zhang 2000; Lyons e Lauring 2017). Assim, essa alta razão de transição sobre transversão já sugere um baixo nível de divergência genética nas comparações de genoma (Barchi et al. 2011).

A variação genética nas espécies vegetais é fortemente afetada por vários fatores históricos e demográficos, incluindo a distribuição geográfica, a forma de vida, o tamanho da população e o sistema reprodutivo (Zhu et al. 2009). Assim, a variabilidade genética de uma população pode ser mensurada pelas estimativas de heterozigosidade (McManus et al. 2011). Em *C. tetradenius*, observamos que as frequências genotípicas das localidades estudadas desviam do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma vez que as heterozigosidades observadas (H_O) foram menores que as heterozigosidades esperadas (H_E), o que indica uma deficiência de heterozigotos nas populações ocasionada por cruzamentos não aleatórios (Frankham et al. 2008). A não aleatoriedade dos cruzamentos nas populações ocorre devido ao cruzamento entre indivíduos aparentados (Islam et al. 2020) e ao sistema reprodutivo, mais especificamente à autofecundação em espécies vegetais (Ortega e Dicenta 2006; Awad e Billiard 2017).

Para *C. tetradenius*, observamos que o coeficiente de endogamia obtido (0,099) foi baixo, porém significativo, indicando a ocorrência locos em homozigose no genoma da espécie devido ao cruzamento não preferencial entre os indivíduos aparentados (Charlesworth e Willis 2009; Stelmann et al. 2009), o que pode explicar, em grande parte, as baixas estimativas de heterozigosidade. Já com relação ao sistema reprodutivo da espécie, sabe-se que *C. tetradenius* é uma espécie monoica, com reprodução preferencialmente alógama (Silva 2009), o que, a princípio, não estaria relacionado à diminuição dos locos heterozigotos nas populações analisadas.

Outra estimativa que mensura a variabilidade genética é o índice de Shannon, podendo variar de 0 a 1, com valores próximos a zero apresentando menor diversidade genética (Silva et al. 2015). No presente estudo, o valor médio obtido entre as populações (0,143) também indicou menor diversidade genética. Valores similares foram observados por Liu et al. (2011) estudando uma planta medicinal ameaçada de extinção (*Neopicrorhiza scrophulariiflora*), destacando que o cultivo artificial em Bancos Ativos de Germoplasma é imprescindível para espécies de importância medicinal, a fim de garantir um suprimento sustentável dos seus recursos genéticos ao adicionar indivíduos que cubram o máximo possível da sua faixa de ocorrência natural.

Em Sergipe, Almeida-Pereira et al. (2017) observaram moderados níveis de diversidade genética para *C. tetradenius* com marcadores ISSR, com H_E e índices de Shannon com médias

de 0,30 e 0,45, respectivamente, resultados que também ajudarão na seleção de plantas para implantação do Banco Ativo de Germoplasma. Porém, ao contrário dos marcadores ISSR que são dominantes (Silva et al. 2015), os marcadores SNP são codominantes, em que ocorre a diferenciação entre os indivíduos homozigotos e heterozigotos (Ganal et al. 2019). Por possuírem natureza bialélica, há um menor índice de variação dos marcadores SNP, fazendo com que as estimativas de diversidade genética tenham valor menor quando comparadas às estimativas obtidas com outros marcadores (Vignal et al. 2002). Contudo, por possuírem ampla ocorrência no genoma e por milhares de SNPs serem analisados simultaneamente, são marcadores mais informativos e amplamente utilizados na pesquisa genética de plantas (Li et al. 2015).

A falta de variabilidade genética tem sido observada nas espécies que ocorrem em apenas uma ou poucas localidades (Liu et al. 2011; López-Pujol et al. 2013), como é o caso dos estudos com as espécies endêmicas de *Minasia*, *Phellodendron amurense*, *Bupleurum rotundifolium* e *Coristospermum huteri* (Jesus et al. 2009; Brutting et al. 2012; López-Pujol et al. 2013; Yang et al. 2016). Os baixos níveis de diversidade genética em espécies com populações pequenas são geralmente relacionados ao sistema reprodutivo e à endogamia intrapopulacional devido ao reduzido número de indivíduos (Brutting et al. 2012; Dardengo et al. 2017). Mas a diversidade e a estrutura genética das populações de plantas também são reguladas pelo fluxo gênico dentro e entre populações e pela deriva genética, especialmente em populações de tamanho reduzido e isoladas geograficamente (Spielman et al. 2004; Aavik et al. 2017). Com relação ao fluxo gênico, a redução do tamanho populacional causado pela perturbação humana e pela fragmentação do habitat limita a eficiência da polinização por insetos e ventos durante a floração, bem como a movimentação de dispersores de sementes e, conseqüentemente, gera uma menor diversidade genética dentro da população, levando até mesmo ao risco de extinção das espécies (Gan et al. 2013). Já em relação à deriva genética, os efeitos deletérios da fixação dos alelos são mais prováveis de acontecer quanto menor for o tamanho da população (López-Pujol et al. 2013). Para *C. tetradenius*, observamos que as plantas estão em uma região que tem passado por um processo de desmatamento nas últimas décadas, e que agora estão restritas à fragmentos florestais com poucos indivíduos. Além da redução da diversidade genética, estes poucos indivíduos de *C. tetradenius* são recursos genéticos que podem se perder caso o desmatamento continue (FAO 2016; Kulevycz et al. 2020).

A baixa estruturação genética entre populações de *C. tetradenius*, observada tanto pelos valores médio de F_{ST} e par-a-par quanto pela AMOVA, pode indicar que o compartilhamento de alelos entre populações é elevado em razão do fluxo gênico atual entre populações, ou por ter ocorrido fluxo gênico histórico entre as populações. Na DAPC foi observada sobreposição entre as quatro localidades. As populações mais próximas geograficamente (Porto da Folha e Poço Redondo) possuem baixo valor de F_{ST} par-a-par e apresentam sobreposição (Tabela 4; Figura 2). O COMPOPLOT indica as probabilidades de atribuição de indivíduos para os diferentes grupos (Jombart et al. 2010). Foi possível observar que oito plantas das populações estudadas, sendo elas CRT105, CRT116, CRT120, CRT203, CRT215, CRT328, CRT335 e CRT414, foram as mais representativas, possuindo uma mistura dos quatro grupos, observada pelas cores que as dividiram, indicando que essas plantas partilham alelos devido ao cruzamento histórico ou atual. CRT328 e CRT335 possuem três cores bem diferenciadas, com grande parte das cores presente em maior proporção da que aparece nas populações de Porto da Folha e Poço Redondo, indicando compartilhamento de alelos histórico ou atual.

A estrutura genética das populações pode ser influenciada por barreiras reprodutivas e/ou por barreiras ambientais (Baak et al. 2015; Lafon-Placette et al. 2016; Bradburd et al. 2018). Barreiras reprodutivas pré- e pós-polinização, como diferenças fenológicas entre indivíduos e sistemas de autoincompatibilidade podem ocasionar a redução no fluxo gênico, determinando a rapidez de sua diminuição e em quais locais serão afetados primeiro (Macaya-

Sanz et al. 2011; Sobel e Chen 2014; Baack et al. 2015). Já as barreiras ambientais, como o isolamento geográfico e a altitude, também afetam o fluxo gênico e promovem um aumento na deriva genética (Ratkiewicz e Borkowska 2006). Como a fragmentação recente da paisagem reduz o tamanho das populações, isolando-as, aumenta a deriva genética e diminui o fluxo gênico (Aguilar et al. 2008; Fan et al. 2019), esta também atua como uma barreira ambiental. Para *C. tetradenius*, o desmatamento das áreas de ocorrência da espécie e a sua subsequente fragmentação, seguidos do maior distanciamento entre estas populações, pode ter contribuído com o fluxo gênico entre as áreas estudadas, ocasionando a baixa estruturação genética observada.

O conhecimento da estrutura genética é importante na seleção e no melhoramento de cultivares com interesses medicinais, e fornece informações relevantes para a seleção, criação e conservação de germoplasma (Soler et al. 2017). Estimar como a diversidade genética está estruturada dentro e entre populações naturais utilizando marcadores moleculares é fundamental para delinear o esquema de amostragem de recursos genéticos no campo, de maneira a obter um Banco Ativo de Germoplasma com diversidade alélica representativa de suas populações de origem (Segarra-Moragues et al. 2005). Para *C. tetradenius*, com base nos resultados de baixa diversidade e de maior diversidade genética dentro de populações do que entre populações, serão adicionados ao Banco Ativo de Germoplasma os acessos provenientes das 4 populações, sendo necessário coletas adicionais para amostrar um número maior de indivíduos em cada população.

Estudos com Bancos Ativos de Germoplasma de plantas aromáticas que observaram diversidade genética baixa a mediana, a exemplo de *Varronia curassavica* e *Myrcia lundiana* em Sergipe, sugeriram que a expansão da diversidade genética do Banco Ativo de Germoplasma é necessária para a conservação das espécies, destacando a importância do local de coleta das plantas (Alves et al. 2016; Brito et al. 2016). Nesse sentido, visto que a diversidade genética das populações de *C. tetradenius* foi baixa nessas populações do estado de Sergipe, futuramente, novas coletas para ampliar a diversidade genética dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma devem ser realizadas nas demais regiões de ocorrência dessa espécie, com a amostragem de um grande número de indivíduos dentro de cada população.

Essa expansão, aliada ao aumento no número de amostras validadas e dos marcadores moleculares utilizados para mensurar os níveis de diversidade genética, produzirão informações úteis para uso em futuros programas de melhoramento genético (Alves et al. 2016; Brito et al. 2016) de *C. tetradenius*. A baixa diversidade genética não é desejável no melhoramento devido à perda de vigor e ao aumento da vulnerabilidade das plantas (Aguilar et al. 2008; Borém et al. 2017; Simiqueli et al. 2018; Ying et al. 2018). Além disso, a identificação de acessos com baixos coeficientes de similaridade pode ser usada para realizar o cruzamento entre pais geneticamente diversos, a fim de produzir progênies com maior variação genética em relação às progênies oriundas do cruzamento entre pais intimamente relacionados (Messmer et al. 1993). Diante destes fatores, e visto que a composição química dos óleos essenciais é influenciada por fatores genéticos (Nizio et al. 2015), um Banco Ativo de Germoplasma de *C. tetradenius* contendo acessos com maior diversidade genética é fundamental para o melhoramento genético da espécie, visando maior aproveitamento dos óleos essenciais não só no entendimento da bioquímica complexa envolvida na biossíntese de metabólitos secundários dessas plantas, mas também a identificação e o isolamento de genes envolvidos em diferentes etapas de várias vias metabólicas da síntese de compostos químicos dos óleos essenciais (Kumar e Gupta 2008; Panda et al. 2015). Futuramente, será necessário ampliar a diversidade varietal, que exigirá um número elevado de plantas utilizadas na multiplicação de acessos para evitar a perda dos alelos em baixas frequências.

4.5. Conclusões

A baixa diversidade genética e a baixa estruturação da variabilidade genética entre populações de *C. tetradenius* analisadas forneceram uma base importante para as estratégias de conservação da espécie em Banco Ativo de Germoplasma. Como os acessos coletados não apresentaram base genética ampla, requisito tanto para a conservação como para alcançar progresso nos cruzamentos em programas de melhoramento, serão necessárias novas coletas de amostras de plantas representativas de cada uma das quatro localidades estudadas em Sergipe. Assim como a prospecção e coleta em outras regiões de ocorrência, visando ampliar a diversidade genética da coleção a ser implementada no Banco Ativo de Germoplasma, que futuramente irá avaliar o teor e os compostos químicos de interesse para os óleos essenciais desta espécie.

4.6. Referências Bibliográficas

- Aavik T, Talve T, Thetloff M, Uuemaa E, Oja T (2017) Genetic consequences of landscape change for rare endemic plants – A case study of *Rhinanthus osiliensis*. *Biol Conserv* 210:125–135
- Aguilar R, Quesada M, Ashworth L, Herreras-Diego Y, Lobo J (2008) Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: Susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Mol Ecol* 17:5177–5188
- Almeida-Pereira CS, Nogueira PCL, Barbosa AAT et al (2019) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of a *Croton tetradenius* Baill. *Germplasm. J Essent Oil Res* 31:379–389
- Almeida-Pereira CS, Silva AVC, Alves RP et al (2017) Genetic diversity of native populations of *Croton tetradenius* Baill. using ISSR markers. *Genet Mol Res* 16(2):1–12
- Alves MF, Nizio DAC, Brito FA et al (2016) Analysis of genetic diversity of a native population of *Myrcia lundiana* Kiaersk. plants using ISSR markers. *Genet Mol Res* 15(4):1–10
- Awad AD, Billiard S (2017) The double edged sword: The demographic consequences of the evolution of self-fertilization. *Evol* 71(5):1178–1190
- Baack E, Melo MC, Rieseberg LH, Ortiz- Barrientos D (2015) The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytol* (4):968–84
- Barchi L, Lanteri S, Portis E, Acquadro A, Valè G, Toppino L, Rotino GL (2011) Identification of SNP and SSR markers in eggplant using RAD tag sequencing. *BMC Genom* 12(1):304
- Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, Van Ee B, Riina R (2005) Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF sequence data. *Am J Bot* 92:1520–1534
- Blank AF, Almeida CS, Alves RP et al (2017) Formulação fungicida à base de óleo essencial de *Croton tetradenius* para controlar ou eliminar o fitopatógeno *Fusarium solani*. Patent BR-10-2017-000272-1. INPI, Rio de Janeiro
- Borém A, Miranda GV, Fritsche-Neto R (2017) Melhoramento de plantas. Viçosa, Editora UFV
- Bradburd GS, Coop GM, Ralph PL (2018) Inferring Continuous and Discrete Population Genetic Structure Across Space. *Genetics* 210(1):33–52
- Brito FA, Bacci L, Santana SS et al (2020) Toxicity and behavioral alterations caused by essential oils of *Croton tetradenius* and their major compounds on *Acromyrmex balzani*. *Crop prot* 137:105259
- Brito FA, Nizio DAC, Silva AVC et al (2016) Genetic diversity analysis of *Varronia curassavica* Jacq. accessions using ISSR markers. *Genet Mol Res* 15(3):1–10
- Brutting C, Meyer S, Kuhne P, Hensen I, Wesche K (2012) Spatial genetic structure and low diversity of the rare arable plant *Bupleurum rotundifolium* L. indicate fragmentation in Central Europe. *Agr Ecosyst Env* 161: 70–77

- Carneiro-Torres DS (2009) Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga. Tese, Universidade Estadual de Feira de Santana
- Carvalho KS, Silva SLC, Souza IA, Gualberto SA, Carvalho KS, Santos FR, Carvalho MG (2016) Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. Parasitol Res 115:3441–3448
- Catchen JM, Hohenlohe P, Bassham S, Amores A, Cresko WA (2013) Stacks: an analysis tool set for population genomics. Mol Ecol 22(11):3124–3140
- Ceccon CC, Caverzan A, Margis R, Salvadori JR, Grando MF (2020) Gene stacking as a strategy to confer characteristics of agronomic importance in plants by genetic engineering. Ciênc Rural 50:6 e20190207
- Charlesworth D, Willis JG (2009) The genetics of inbreeding depression. Fund Concep Genet 10(7):783–796
- Dardengo JFE, Rossi APB, Varella TL (2017) The effects of fragmentation on the genetic structure of *Theobroma speciosum* (Malvaceae) populations in Mato Grosso, Brazil. Rev Biol Trop 66(1):218–226
- Díez MJ, De la Rosa L, Martín I et al (2018) Plant Genebanks: Present situation and proposals for their improvement. The case of the spanish network. Front Plant Sci 9:1794
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of Plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13–15
- Dulloo ME (2018) Maintaining diversity of plant genetic resources as a basis for food security. Biovers Int 1–10
- Dulloo ME, Rege JEO, Ramirez M et al (2017) Conserving agricultural biodiversity for use in sustainable food systems. In: Bioversity International. Mainstreaming Agrobiodiversity in Sustainable Food Systems: Scientific Foundations for an Agrobiodiversity. Biovers Int, Rome, Italy (Chapter 5) pp 103-139
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q et al (2011) A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. PLoS One 6(5):e19379
- Emdagro. Dados de precipitação de Sergipe. Disponível em: <https://www.emdagro.se.gov.br/>. Acesso em: 10 set. 2020.
- Fan X-R, Njeri HK, Li WC, Chen YY (2019) Abundant historical gene flow within and among river systems for populations of *Ottelia acuminata* var. *jingxiensis*, an endangered macrophyte from southwest China. Aquat Bot 157:1–9
- Flora do Brasil 2020 em construção (2019) Euphorbiaceae. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113>>. Acesso em 03 de Junho 2019.
- Food and agriculture organization of the united nations – FAO (2016) Global Forest Resources Assessment 2015. How are the world's forests changing? Second edition, 2016.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto, São Paulo / Sociedade Brasileira de Genética.
- Gan XH, Cao LL, Zhang XM, Li H (2013) Floral biology, breeding system and pollination ecology of an endangered tree *Tetracentron sinense* Oliv. (Trochodendraceae). Bot Stud 54:50
- Ganal MW, Plieske J, Hohmeyer A et al (2019) High-throughput genotyping for cereal research and breeding. Appl Genet Gen Res Cer 3–17
- Ghorbanpour M, Varma A (2017) Medicinal plants and environmental challenges. Springer International Publishing
- Islam MR, Zhang Y, Li Z-Z, Liu H, Chen JM, Yang XY (2020) Genetic diversity, population structure, and historical gene flow of *Nelumbo lutea* in USA using microsatellite markers. Aquat Bot 160: 1–8
- Jamieson IG, Grueber CE, Waters JM, Gleeson DM (2008) Managing genetic diversity in threatened populations: a New Zealand perspective. New Zeal J Ecol 32(1):130–137

- Jesus FF, Abreu AG, Semir J, Solferini VN (2009) Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. *Plant Syst Evol* 277:187–196
- Jombart T, Ahmed I (2011) Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27: 3070–3071
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *Genetics* 11:94 1–15
- Kafuku G, Mbarawa M (2010) Alkaline catalyzed biodiesel production from *Moringa oleifera* oil with optimized production parameters. *Appl energy* 87(8):2561–2565
- Kamvar ZN, Tabima JF, Gruenewald NJ (2014) Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2:e281
- Kethom W, Tongyoo P, Mongkollporn O (2019) Genetic diversity and capsaicinoids content association of Thai chili landraces analyzed by whole genome sequencing-based SNPs. *Sci Hortic* 249:401–406
- Khan AS, Ali S, Khan IA (2015) Morphological and molecular characterization and evaluation of mango germplasm: An overview. *Sci Hortic* 194:353–366
- Kim SR, Ramos J, Ashikari M et al (2016) Development and validation of allele-specific SNP/indel markers for eight yield-enhancing genes using whole-genome sequencing strategy to increase yield potential of rice, *Oryza sativa* L. *Rice* 9(12):1–17
- Kulevich RA, Oliveira OS, Pompeu N, Silva BA, Souza EC (2020) Analysis of forests' genetic vulnerability and arguments to reduce deforestation. *Ambiente e Sociedade* 23:e02222
- Kumar J, Gupta P (2008) Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnol Rep* 2(2):93–112
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870–1874
- Lafon-Placette C, Vallejo-Marín M, Parisod C, Abbott R (2016) Current plant speciation research: unravelling the processes and mechanisms behind the evolution of reproductive isolation barriers. *New Phytol* 209(1):29–33
- Li XY, Xu HX, Feng JJ, Chen JW (2015) Mining of genic SNPs and diversity evaluation of landraces in loquat. *Sci Hortic* 195:82–88
- Liu X-L, Qian Z-G, Liu F-H, Yang YW, Pu CX (2011) Genetic diversity within and among populations of *Neopicrorhiza scrophulariiflora* (Scrophulariaceae) in China, an endangered medicinal plant. *Biochem Syst Ecol* 39:297–301
- López-Pujol J, Martinell MC, Blanché S, Sáez L (2013) The 'paradigm of extremes': extremely low genetic diversity in an extremely narrow endemic species, *Coristospermum huteri* (Umbelliferae). *Plant Syst Evol* 299:439–446
- Lu X, Zhang F, Shen Q et al (2014) Overexpression of allene oxide cyclase improves the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* L. *PLoS One* 9(3):e91741
- Lyons DM, Lauring AS (2017) Evidence for the Selective Basis of Transition-to-Transversion Substitution Bias in Two RNA Viruses. *Mol Biol Evol* 25:1–11
- Ma ZS, Lianwei L, Zhang Y-P (2020) Defining individual-level genetic diversity and similarity profiles. *Sci Rep* 10:5805
- Macaya-Sanz D, Suter L, Joseph J et al (2011) Genetic analysis of post-mating reproductive barriers in hybridizing European *Populus* species. *Heredity* 107:478–486
- McManus C, Paiva S, Corrêa OS, Seixas L, Melo CB de (2011) Estatísticas para descrever genética de populações. Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira (INCT), Série Técnica: Genética 51.
- Messmer MM, Melchinger AE, Herrmann RG, Boppenmaier J (1993) Relationships among Early European Maize Inbreds: II. Comparison of Pedigree and RFLP Data. *Crop Breed Genet Cytol* 33(5):944–950

- Nizio DAC, Brito FA, Sampaio TS et al (2015) Chemical diversity of native populations of *Varronia curassavica* Jacq. and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. *Ind Crop Prod* 76:437–448
- Ortega E, Dicenta F (2006) Self-fertilization in homozygous and heterozygous self-compatible almonds. *Sci Hort* 109(3):288–292
- Pádua JG (2018) Conservation of crop genetic resources in Brazil in the context of the target 9 of the Global Strategy for Plant Conservation. *Rodriguésia* 69(4):1557–1565
- Panda S, Naik D, Kamble A (2015) Population structure and genetic diversity of the perennial medicinal shrub *Plumbago*. *AoB Plants* 7: plv048
- Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink J-L (2012) Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme Genotyping-by-Sequencing approach. *PLoS One* 7(2):e32253
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinf Appl Note* 28: 2537–2539
- R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- R Core Team (2016) R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Rao NK (2004) Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *Afr J Biotechnol* 3:136–145
- Ratkiewicz M, Borkowska A (2006) Genetic structure is influenced by environmental barriers: empirical evidence from the common vole *Microtus arvalis* populations. *Acta Theriol* 51(4):337–344
- Rogers JS (1972) Measures of genetic similarity and genetic distance. Austin: University of Texas Publication. Stud genet 7.
- Roullier C, Benoit LB, McKey DB, Lebot B (2013) Historical collections reveal patterns of diffusion of sweet potato in Oceania obscured by modern plant movements and recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:2205–2210
- Segarra-Moragues JG, Iriondo JM, Catalán P (2005) Genetic fingerprinting of germplasm accessions as an Aid for species conservation: a case study with *Borderea chouardii* (Dioscoreaceae), one of the most critically endangered Iberian plants. *Ann Bot* 96(7):1283–1292
- Semper-Pascual A, Decarre J, Baumann M et al (2019) Biodiversity loss in deforestation frontiers: Linking occupancy modelling and physiological stress indicators to understand local extinctions. *Biol Conserv* 236:281–288
- Silva JS (2009) O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) em Pernambuco, com ênfase nas espécies da microrregião do Vale do Ipanema. Dissertação, Universidade Federal Rural de Pernambuco
- Silva AVC, Muniz EN, Almeida CS, Vitória MF da, Ledo AS, Melo MFV, Rabbani ARC (2015) Genetic diversity and sex identification in *Genipa americana* L. *Trop Subtrop Agroecosyst* 18:81–86
- Silva JS, Sales MF, Gomes AP, Carneiro-Torres DS (2010) Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot Bras* 24:441–453
- Simiqueli GF, Resende MDV, Motoike SY, Henriques E (2018) Inbreeding depression as a cause of fruit abortion in structured populations of macaw palm (*Acrocomia aculeata*): Implications for breeding programs. *Ind Crop Prod* 112: 652–659
- Sobel JM, Chen GF (2014) Unification of methods for estimating the strength of reproductive isolation. *Evol* 68:1511–1522
- Soler S, Gramazio P, Figàs MR et al (2017) Genetic structure of *Cannabis sativa* var. *indica* cultivars based on genomic SSR (gSSR) markers: Implications for breeding and germplasm management. *Ind Crop Prod* 104:171–178

- Souza DCL (2015) Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. *Rev Bras Pl Med* 17(3):495–503
- Spielman D, Brook BV, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc Natl Acad Sci* 101:15261–15264
- Stelmann P, Henson I, Renison D et al (2009) Biparental inbreeding depression, genetic relatedness and progeny vigour in a wind-pollinated treeline species in Argentina. *Plant Ecol* 205:155–164.
- Terzić S, Boniface M-C, Marek L et al (2020) Gene banks for wild and cultivated sunflower genetic resources. *OCL* 27(9):1–14
- Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34:275–305
- Wadt LHO, Faustino CL, Staudhammer CL et al (2018) Primary and secondary dispersal of *Bertholletia excelsa*: implications for sustainable harvests. *For Ecol Manag* 415:98–105
- Wang R, Gamon JA (2019) Remote sensing of terrestrial plant biodiversity. *Remote Sens Environ* 231:1–15
- Weather Spark. O clima típico de qualquer lugar da Terra, 2020. Disponível em: <https://pt.weatherspark.com/>. Acesso em: 10 set. 2020.
- Webster GL (1993) A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42:793–823.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evol* 38:1358–1370
- Wright S (1965) The Interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evol* 19:395–420
- Yang H, Li X, Liu D et al (2016) Genetic diversity and population structure of the endangered medicinal plant *Phellodendron amurense* in China revealed by SSR markers. *Biochem Syst Ecol* 66:286–292
- Yang N, Zhou W, Su J et al (2017) Overexpression of SmMYC2 Increases the Production of Phenolic Acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Front Plant Sci* 8:1804
- Ying Z, Ge G, Liu Y (2018) The effects of clonal integration on the responses of plant species to habitat loss and habitat fragmentation. *Ecol Model* 384:290–295
- Zahn R, Perry N, Perry E, Mukaetova-Ladinska EB (2019) Use of herbal medicines: Pilot survey of UK users' views. *Complement Ther Med* 44:83–90
- Zhang J (2000) Rates of conservative and radical nonsynonymous nucleotide substitutions in mammalian nuclear genes. *J Mol Evol* 50(1):56–68
- Zhu Y, Geng Y, Tersing T, Liu N, Wang Q, Zhong Y (2009) High genetic differentiation and low genetic diversity in *Incarvillea younghusbandii*, an endemic plant of Qinghai-Tibetan Plateau, revealed by AFLP markers. *Biochem Syst Ecol* 37:589–596

5. ARTIGO 2

TOXICIDADE E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS CAUSADAS PELOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Croton tetradenius* E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS EM *Acromyrmex balzani*

Artigo publicado: Crop Protection

RESUMO

A formiga cortadeira de folhas *Acromyrmex balzani* é uma espécie responsável por causar grandes perdas em culturas agrícolas, pastagens e plantações florestais. *Croton tetradenius*, uma planta aromática de ampla ocorrência no Nordeste do Brasil, possui potencial como inseticida botânico no controle de formigas cortadeiras. O presente estudo avaliou a toxicidade e os efeitos subletais dos óleos essenciais de plantas de *C. tetradenius* de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários, aplicados via fumigação, em operárias de *A. balzani*. Os óleos essenciais utilizados nesse estudo foram obtidos de cinco plantas de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários 1,8-cineol, α -pineno, cânfora, (*E*)-pinocarveol e *p*-cimeno, adquiridos comercialmente. Todos os tratamentos exibiram atividade formicida, com valores de CL_{50} variando de 1,47 a 2,40 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para os óleos essenciais e 0,45 a 11,20 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para os compostos majoritários. A cânfora foi o composto químico mais tóxico testado. Após exposição, houve a redução da sobrevivência de *A. balzani*. A maior TL_{50} observada foi de 42,91 horas para o óleo essencial da planta CRT042. Os óleos essenciais e seus compostos majoritários repeliram e afetaram o caminhamento das operárias de *A. balzani*. Foi verificada a atividade formicida do óleo essencial de *C. tetradenius* e de seus compostos majoritários, e demonstrado que ele tem potencial como inseticida natural no controle de *A. balzani*.

Palavras-chave: Euphorbiaceae, óleo volátil, inseticida botânico, atividade formicida, efeito subletal.

ABSTRACT

TOXICITY AND BEHAVIORAL ALTERATIONS CAUSED BY ESSENTIAL OILS OF *Croton tetradenius* AND THEIR MAJOR COMPOUNDS ON *Acromyrmex balzani*

Leafcutter ant *Acromyrmex balzani* is a species responsible for causing important losses in agricultural crops, pastures and forest plantations. *Croton tetradenius*, an aromatic plant of wide occurrence in northeastern Brazil, is a plant that has great potential as a botanical insecticide for control of leafcutter ants. The present study evaluates the toxicity and sublethal effects of essential oils of *C. tetradenius* plants from natural populations in the state of Sergipe, Brazil, and their major compounds, applied by fumigation on *A. balzani* workers. The essential oils used in the study were obtained from five plants of *C. tetradenius* and their major compounds - 1,8-cineole, α -pinene, camphor, (*E*)-pinocarveol and *p*-cymene-, acquired commercially. All treatments exhibited formicidal activity, with LC₅₀ values ranging from 1.47 to 2.40 $\mu\text{L.L}^{-1}$ for the essential oils and 0.45 to 11.20 $\mu\text{L.L}^{-1}$ for the major compounds. Camphor was the most toxic tested compound. After exposure, there was a reduction in the survival of *A. balzani*. The highest observed LT₅₀ was 42.91h for essential oils of plant CRT042. The essential oils and their major compounds repelled and affected the walking behavior of *A. balzani* workers. The formicidal activity of *C. tetradenius* essential oil and its major compounds was verified, and we demonstrated that it has potential as a natural insecticide to control *A. balzani*.

Keywords: Euphorbiaceae, volatile oils, botanic insecticides, formicidal activity, sublethal effects.

5.1. Introdução

As formigas cortadeiras são pragas que atacam várias culturas agrícolas, causando perdas econômicas que podem chegar a bilhões de dólares por ano. O uso de inseticidas sintéticos para seu controle pode resultar em sérios danos à saúde humana, ao meio ambiente e a organismos não-alvo (Almeida et al., 2007; Montoya-Lerma et al., 2012). A formiga cortadeira de folhas *Acromyrmex balzani* pode causar danos em pastagens, além de culturas agrícolas e florestais. A busca de ingredientes ativos para o manejo desta praga é essencial, uma vez que não existem inseticidas registrados para seu controle (Pimenta et al., 2007; Pereira et al., 1999; Holldobler e Wilson, 1990).

Muitos estudos já sugeriram o uso de óleos essenciais e seus compostos majoritários como alternativas potenciais para o controle de pragas agrícolas. Os óleos essenciais podem ter atividade repelente e inseticida, constituindo como uma alternativa aos inseticidas sintéticos (Pavela e Benelli, 2016; Pavela, 2016). Devido à presença de metabólitos secundários tóxicos, muitas plantas não são forrageadas por formigas cortadeiras, o que sugere que tais compostos são promissores no manejo desses insetos-praga (Feitosa-Alcântara et al., 2017). Além de serem menos tóxicos para os mamíferos (Vasanth-Srinivasan et al., 2018), os óleos essenciais podem ser eficazes em baixas doses e afetar os organismos-alvo com diferentes mecanismos de ação (Zoubiri e Baaliouamer, 2014; Pavela, 2015; Anjum e Wright, 2016; Rajkumar et al., 2019).

Insetos eusociais, como as formigas cortadeiras, têm uma grande capacidade de perceber mudanças nos fatores externos que ocorrem ao redor do ninho. Portanto, mudanças em seu comportamento após a exposição a óleos essenciais devem ser observadas (Silva et al., 2018). Os óleos essenciais de espécies vegetais aromáticas nativas do Nordeste brasileiro demonstraram ter atividade formicida e induzem alterações comportamentais em *A. balzani* (Feitosa-Alcântara et al., 2017; Silva et al., 2019).

O gênero *Croton* compreende espécies que sintetizam metabólitos secundários, como flavonoides, alcaloides e terpenos, que são compostos químicos mais comumente encontrados

nos óleos essenciais. Estes conferem diferentes tipos de atividade biológica, por exemplo, propriedades antimicrobianas e inseticidas, justificando sua pesquisa para o desenvolvimento de produtos naturais à base de plantas (Rizk, 1987; Alexander et al., 1991; Berry et al., 2005; Carneiro-Torres, 2009; Queiroz et al., 2014; Wijesundara et al., 2016; Nascimento et al., 2017; Flora do Brasil 2020 em construção, 2019). *Croton tetradenius* Baill., uma espécie aromática desse gênero, é um arbusto de ampla ocorrência no Nordeste do Brasil e nos estados de Goiás e Minas Gerais. Seu óleo essencial contém aproximadamente 26 compostos químicos, sendo a cânfora o majoritário (Carvalho et al., 2016). Estudos demonstraram que o óleo essencial de *C. tetradenius* possui atividade inseticida contra larvas e adultos de *Aedes aegypti* e atividade fungicida contra o fungo fitopatogênico *Fusarium solani* (Carvalho et al., 2016; Blank et al., 2017). Portanto, espécies desse gênero podem ser uma alternativa viável para o controle de formigas cortadeiras, uma vez que os óleos essenciais de algumas espécies já demonstraram ter atividade inseticida. O objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade dos óleos essenciais de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários aplicados via fumigação, sobre as operárias de *A. balzani* e suas alterações comportamentais.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Óleos essenciais e compostos majoritários

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram obtidos por hidrodestilação, usando aparelho Clevenger modificado, a partir de amostras de folhas secas coletadas de cinco plantas de *Croton tetradenius* em populações naturais do estado de Sergipe, Brasil. Os dados de identificação, origem e georreferenciamento de cada planta estão na Tabela 1.

Tabela 1: Código de planta, origem e informação geográfica de plantas de *Croton tetradenius* de populações naturais no estado de Sergipe, Brasil.

Código da planta	Origem (Município)	Georreferenciamento
CRT013	Porto da Folha	9°58'45,4" S; 37°27'6,6"W
CRT023	Lagarto	10°51'40,7"S; 37°39'25,0"W
CRT031	Poço Redondo	9°58'7,0"S; 37°51'49,0"W
CRT042	Lagarto	10°48'51,4"S; 37°36'52,4"W
CRT052	Pacatuba	10°32'44,7"S; 36°40'35,8"W

Os óleos essenciais de *C. tetradenius* foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), utilizando um detector de ionização de chama (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu). Os compostos químicos foram identificados com base na comparação com os índices de retenção descritos na literatura (Adams, 2007). Para o índice de retenção, usamos a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de n-alcanos (nC9-nC31). Também utilizamos cinco bibliotecas do equipamento (NIST05, NIST05s, NIST21, NIST107 e WILEY8), que permitiram comparar os dados dos espectros com os encontrados nas bibliotecas, adotando um índice de similaridade de 92%. Além dos óleos essenciais, os padrões dos compostos majoritários encontrados nas plantas do presente estudo foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha).

5.2.2. Insetos

As operárias de *Acromyrmex balzani* foram obtidas diretamente dos ninhos encontrados no campus da Universidade Federal de Sergipe, em São Cristóvão, SE, Brasil (10°54' S, 37°04' W). Operárias do mesmo tamanho ($9,37 \pm 1,28$ mg) foram utilizadas nos bioensaios.

5.2.3 Bioensaios de toxicidade aguda via fumigação

A toxicidade dos óleos essenciais (CRT013, CRT023, CRT031, CRT042 e CRT052) e de seus compostos majoritários (1,8-cineol, α -pineno, cânfora, (*E*)-pinocarveol e *p*-cimeno) foi avaliada com base nas concentrações letais (CL) e tempos letais (TL) contra *A. balzani*. Os bioensaios preliminares foram realizados utilizando três concentrações (1, 5 e 10 μ L por L de ar). A partir desses testes, as concentrações foram determinadas nos bioensaios subsequentes para a construção de curvas de concentração-mortalidade. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 frascos de vidro (repetições), 7 formigas por concentração, totalizando 28 formigas por tratamento. Pelo menos sete concentrações diferentes foram usadas para cada tratamento junto com um grupo controle com apenas acetona para estabelecer as curvas de concentração-mortalidade.

As formigas foram manuseadas cuidadosamente com o auxílio de pinças de ponta curvada. As unidades experimentais consistiram em frascos de vidro (250 mL) revestidos ao fundo de papel filtro umedecido com 0,5 mL de água destilada. Todos os tratamentos contendo óleo essencial foram diluídos em acetona (Panreac-UVIR-HPLC-GPC PAI-ACS, 99,9% de pureza) e aplicados com uma microseringa Hamilton® de 10 μ L em 1 cm² de papel filtro, fixado por uma linha na parte inferior da tampa de vidro.

O papel de filtro foi mantido no centro do frasco (espalhador volátil), fora do alcance das formigas, impedindo o contato direto. Os frascos foram selados hermeticamente com filme de PVC e a tampa de plástico, mantidas em uma câmara BOD a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e <70% de umidade relativa. Nos frascos do grupo controle, apenas o solvente acetona foi aplicado no espalhador volátil. A mortalidade foi avaliada 48 horas após a implementação dos bioensaios. Os indivíduos que permaneceram estáticos e não reagiram aos estímulos realizados foram considerados mortos. A toxicidade dos compostos majoritários e dos óleos essenciais de *C. tetradenius* foi determinada usando o mesmo procedimento realizado para os óleos essenciais.

Para determinar os tempos letais (curvas de sobrevivência e TL₅₀), foram realizados bioensaios de fumigação utilizando os valores de CL₉₅, que foram determinados nos bioensaios anteriores. Dez repetições, cada uma composta por 7 formigas por frasco, foram utilizadas nos experimentos, totalizando 70 formigas por tratamento. A mortalidade foi avaliada em intervalos de 30 minutos por 6 h; em intervalos de 1 h, das 6 às 20 h; e depois em intervalos de 6 horas, de 20 a 114 horas, totalizando cinco dias de avaliação.

5.2.4 Bioensaios comportamentais

Os efeitos comportamentais do óleo essencial de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários sobre *A. balzani* foram divididos em dois bioensaios: arena totalmente tratada e arena parcialmente tratada. Os bioensaios com arenas totalmente tratadas foram realizados com placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo papel de filtro na parte inferior. Os tratamentos consistiram nos cinco óleos essenciais das plantas de *C. tetradenius* e seus cinco compostos majoritários, todos diluídos em acetona a 1%, além do grupo controle (acetona). Uma alíquota de 0,4 mL da solução de cada tratamento foi aplicada nos discos de papel de filtro, que foram então colocados no exaustor por 5 minutos para evaporação do solvente. Uma única formiga operária de *A. balzani* foi colocada no centro das arenas. O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições independentes por tratamento, totalizando 200 arenas. O movimento de cada inseto dentro da arena foi gravado usando uma câmera de vídeo (WVCP504, Panasonic SD5 SuperDynamic) equipada com uma lente (Spacecom, 1/3" 3–8 mm) e acoplado a um computador. Seu movimento foi gravado por 10 minutos ininterruptamente usando o software EthoVision® XT versão 8.5 (Noldus Integration System, Sterling, VA, EUA) (Oliveira et al., 2017). As seguintes variáveis foram avaliadas: distância total percorrida, velocidade de caminamento, velocidade angular e tempo de imobilidade das formigas.

Nos bioensaios com arenas parcialmente tratadas com óleos essenciais ou compostos majoritários, foram utilizadas placas de Petri (9 cm de diâmetro) e os tratamentos foram os

mesmos que os aplicados no bioensaio anterior. Os discos de papel filtro foram previamente cortados em duas partes idênticas e colados no fundo da placa, sendo que cada parte foi identificada como um lado tratado com óleos essenciais ou compostos majoritários e o outro lado apenas com acetona. No lado tratado, foram aplicados 0,2 mL de solução do tratamento (1%), enquanto o lado não tratado recebeu 0,2 mL de acetona. Uma única operária adulta de *A. balzani* foi colocada no centro das arenas. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 30 repetições. As imagens de vídeo das arenas foram divididas em duas zonas simétricas. A trajetória de cada inseto foi registrada com base no bioensaio de toda placa. Repelência e irritabilidade foram avaliadas com base no tempo em que as formigas permaneceram no lado tratado ou não tratado.

5.2.5 Análises estatísticas

Os resultados de mortalidade dos bioensaios de toxicidade aguda via fumigação, para determinar as CLs, foram corrigidos em relação à mortalidade do grupo controle, usando a fórmula desenvolvida por Abbott (1925). As curvas de concentração-mortalidade dos óleos essenciais e compostos majoritários de *C. tetradenius* em *A. balzani* foram submetidas à análise Probit. Foram aceitas curvas com probabilidade ($P > 0,05$) de aceitação de hipótese nula pelo teste do χ^2 . Com base nessas curvas, foram obtidas as concentrações letais (CL_{50} e CL_{95}) e seus respectivos limites de confiança no nível de probabilidade de 95%, usando o software SAEG.

Os resultados do bioensaio de tempo letal (TL) foram submetidos à análise de sobrevivência usando o software SigmaPlot. Este procedimento fornece uma estimativa das curvas de sobrevivência obtidas com estimadores de Kaplan-Meier pelo teste Log-Rank gerado com base na proporção de insetos que sobreviveram até o final do experimento. As diferenças entre as curvas de sobrevivência foram verificadas usando o teste de comparação múltipla Holm-Sidak ($P < 0,05$). O tempo necessário para a mortalidade atingir 50% da população de *A. balzani* foi registrado para cada tratamento.

A análise de variância foi aplicada aos resultados dos bioensaios comportamentais. Os dados das arenas totalmente tratadas e parcialmente tratadas foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR.

5.3. Resultados

5.3.1. Caracterização dos óleos essenciais

Foram identificados 34 compostos químicos nos óleos essenciais de *C. tetradenius*, com quantidades superiores a 1% e comuns nas cinco plantas estudadas. Identificamos 17 compostos nas plantas CRT013 e 18 nas plantas CRT023, CRT031, CRT042 e CRT052 (Tabela 2).

Os compostos *p*-cimeno (20,07%) e isoascaridol (19,92%) foram encontrados em maiores proporções no óleo essencial de CRT013. Para CRT023, CRT031 e CRT052, o composto encontrado na maior proporção foi *p*-cimeno (13,33, 18,94 e 19,02%, respectivamente); para CRT042, o composto majoritário encontrado foi (*E*)-pinocarveol (15,31%). Nesse mesmo óleo essencial, observamos uma proporção menor dos compostos α -pineno (11,42%) e pinocarvona (11,71%) (Tabela 2).

Tabela 2: Composição química (%) dos óleos essenciais de plantas de *Croton tetradenius* de populações naturais no estado de Sergipe, Brasil.

Compostos químicos	IRR-o	IRR-l	Plantas de populações naturais de <i>C. tetradenius</i>				
			CRT013	CRT023	CRT031	CRT042	CRT052
α -pineno	929	932	2,44	9,00	2,83	11,42	559
mirreno	986	988	2,56	2,20	3,77	1,54	3,26
α -felandreno	1002	1002	1,65	3,51	4,19	3,08	7,10
α -terpineno	1013	1014	2,80	3,59	7,22	2,20	3,91
<i>p</i> -cimeno	1023	1022	20,07	13,33	18,94	9,94	19,02
limoneno	1026	1024	3,12	2,81	3,30	2,27	3,62
1,8-cineol	1028	1026	8,59	6,05	7,46	6,68	4,65
γ -terpineno	1055	1054	5,07	3,36	6,63	2,80	5,19
Linalol	1096	1095	1,71	1,71	2,00	1,57	2,63
(<i>E</i>)-pinocarveol	1037	1135	0,62	9,25	1,25	15,31	3,68
Cânfora	1143	1141	9,62	10,63	6,94	7,67	7,63
pinocarvona	1159	1160	0,00	6,95	0,83	11,71	3,19
terpinen-4-ol	1175	1174	2,14	1,82	2,35	1,76	2,03
α -terpineol	1188	1186	1,98	1,31	2,12	1,22	1,39
ascaridol	1236	1234	7,16	2,99	4,91	1,71	3,64
acetato de bornil	1283	1284	1,57	1,87	0,83	2,27	0,72
isoascaridol	1308	1307	19,92	7,90	14,41	4,62	10,54
acetato de mirtenil	1323	1324	0,75	1,80	0,81	2,15	0,90

IRR-o: Índice de Retenção Relativo - observado; IRR-l: Índice de Retenção Relativo - literatura.

5.3.2 Toxicidade aguda via fumigação

Os óleos essenciais de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários apresentaram atividade formicida contra operárias de *A. balzani* via fumigação (Tabela 3). As concentrações necessárias para causar 50% de mortalidade variaram de 1,47 a 2,40 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para os óleos essenciais e 0,45 a 11,20 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para os compostos majoritários.

Tabela 3: Toxicidade de óleos essenciais de plantas de *Croton tetradenius* de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários sobre operárias de *Acromyrmex balzani*, via fumigação, após 48 horas de exposição.

Tratamento	Nº de insetos ¹	CL ₅₀ (95% IC) ² ($\mu\text{L.L}^{-1}$)	CL ₉₅ (95% IC) ² ($\mu\text{L.L}^{-1}$)	Inclinação $\pm$ EP ³	χ^2 ⁴	P
CRT013	196	1,47 (1,32 – 1,61)	3,54 (3,13-4,15)	4,29	4,27	0,11
CRT023	140	1,75 (1,63-1,88)	3,77 (3,28 – 4,58)	4,93	0,80	0,67
CRT031	252	1,73 (1,61-1,86)	3,51 (3,16-4,01)	5,37	2,92	0,23
CRT042	140	1,94 (1,81-2,07)	3,66 (3,33-4,14)	5,94	1,88	0,61
CRT052	168	2,40 (2,28-2,54)	4,33 (3,90-5,00)	6,41	0,43	0,81
Cânfora	280	0,45 (0,41-0,48)	0,92 (0,80-1,13)	5,24	0,93	0,66
(<i>E</i>)-pinocarveol	168	1,56 (1,40-1,75)	4,84 (4,09-5,99)	3,34	1,73	0,57
1,8-cineol	392	3,84 (3,50-4,10)	7,23 (6,61-8,27)	5,96	3,56	0,16
<i>p</i> -cimeno	196	6,93 (6,47-7,36)	14,80 (12,80-18,65)	4,97	1,74	0,57
α -pineno	224	11,20 (10,67-11,73)	21,99 (20,26-24,35)	5,59	5,83	0,32

¹ Número total de insetos usados.

² Microlitro de óleo essencial ou composto majoritário por litro de ar.

³ Curva de inclinação $\pm$ erro padrão.

⁴ Qui-quadrado.

O óleo essencial CRT013 foi o mais tóxico, possuindo menor CL₅₀ (1,47 $\mu\text{L.L}^{-1}$), seguido do CRT031 (1,73 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e CRT023 (1,75 $\mu\text{L.L}^{-1}$), que não diferiram entre si. Os óleos essenciais de CRT042 (1,94 $\mu\text{L.L}^{-1}$) e CRT052 (2,40 $\mu\text{L.L}^{-1}$) tiveram os maiores valores de CL₅₀.

A cânfora foi o composto majoritário mais tóxico (0,45 $\mu\text{L.L}^{-1}$), com valores mais baixos de toxicidade do que o óleo essencial mais tóxico testado. O (*E*)-pinocarveol (1,56 $\mu\text{L.L}^{-1}$) obteve valores de toxicidade próximos aos do óleo essencial CRT013, que não foram

estatisticamente diferentes. Com um CL_{50} de $3,84 \mu L.L^{-1}$, o 1,8-cineol foi quase duas vezes mais tóxico que o *p*-cimeno ($6,93 \mu L.L^{-1}$), enquanto o α -pineno foi o composto menos tóxico nos experimentos ($11,20 \mu L.L^{-1}$) (Tabela 3).

A sobrevivência das operárias de *A. balzani* diminuiu significativamente ao longo do tempo (teste de Logrank: $\chi^2 = 1418,970$; gl = 10; $P < 0,001$) (Fig. 1). Dos óleos essenciais testados, o CRT013 obteve, além do menor CL_{50} , o menor tempo para matar metade da população de *A. balzani* ($TL_{50} = 19,38$ h), seguido por CRT023 ($TL_{50} = 23,94$ h), CRT023 ($TL_{50} = 23,98$ h), CRT031 ($TL_{50} = 32,23$ h) e CRT042 ($TL_{50} = 42,91$ h). O composto majoritário α -pineno teve uma ação mais rápida que os óleos essenciais ($TL_{50} = 2,18$ h). Seguido por 1,8-cineol ($TL_{50} = 13,22$ h), cânfora ($TL_{50} = 22,27$ h), *p*-cimeno ($TL_{50} = 25,8$ h) e (*E*)-pinocarveol ($TL_{50} = 33,38$ h). Nenhum dos compostos majoritários atingiu o valor de TL_{50} observado com os óleos essenciais (42,91 h) (Fig. 1) (Tabela 4).

Análise de Sobrevivência

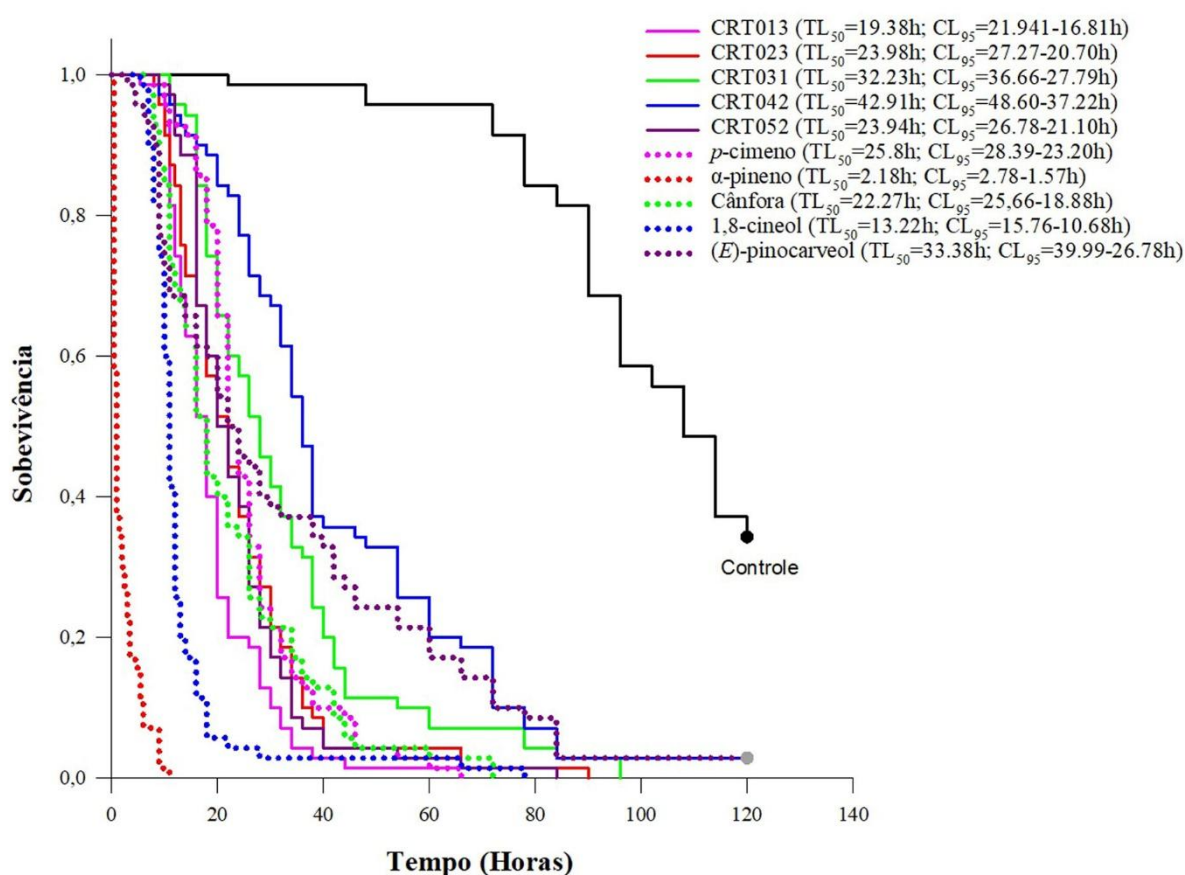


Fig. 1. Curvas de sobrevivência e tempo letal médio (TL_{50}) (intervalo de confiança de $\pm 95\%$) das operárias de *Acromyrmex balzani* expostas via fumigação, aos óleos essenciais de plantas de *Croton tetradenius* de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários por 70 horas.

Tabela 4: Tempo letal (TL₅₀) das operárias de *Acromyrmex balzani* expostas via fumigação, ao óleo essencial de plantas de *Croton tetradenius* de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários.

Tratamento	Nº de insetos ¹	CL ₉₅ (µL.L ⁻¹) ²	TL ₅₀ (h) ³	Limite inferior de TL ₅₀	Limite superior de TL ₅₀	E.P. ⁴	P ⁵
CRT013	70	3,54	19,38	16,81	21,94	1,31	<0,001
CRT023	70	3,77	23,98	20,70	27,27	1,68	<0,001
CRT031	70	3,51	32,23	27,79	36,66	2,26	<0,001
CRT042	70	3,66	42,91	37,22	48,60	2,90	<0,001
CRT052	70	4,33	23,94	21,10	26,78	1,44	<0,001
Cânfora	70	0,92	22,27	18,88	25,66	1,73	<0,001
(E)-pinocarveol	70	4,84	33,38	26,78	39,99	3,37	<0,001
1,8-cineol	70	7,23	13,22	10,68	15,76	1,30	<0,001
p-cimeno	70	14,80	25,80	23,20	28,39	1,33	<0,001
α-pineno	70	21,99	2,18	1,57	2,78	0,31	<0,001

¹ Número total de insetos usados.

² Concentração letal usada.

³ Tempo letal (horas).

⁴ Erro padrão.

⁵ Probabilidade (95%).

5.3.3 Bioensaios comportamentais em arenas totalmente tratadas

Diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos para a distância total percorrida ($F = 11,26$, $gl = 10$, 319 , $P < 0,001$), velocidade de caminamento ($F = 8,16$, $gl = 10$, 319 , $P < 0,001$), velocidade angular ($F = 13,65$, $gl = 10$, 319 , $P < 0,001$) e tempo imóvel ($F = 15,74$, $gl = 10$, 319 , $P < 0,001$) exposto aos tratamentos ($P < 0,05$) (Fig. 2). As distâncias de caminamento mais longas foram observadas quando as formigas foram expostas a 1,8-cineol, α -pineno, cânfora, p -cimeno e grupo controle. As menores distâncias no caminamento foram observadas quando as formigas foram expostas aos tratamentos CRT031, CRT042, CRT023 e (*E*)-pinocarveol (Fig. 2A). A maior velocidade de caminamento foi observada para o controle e os compostos 1,8-cineol, enquanto a menor velocidade foi observada para todos os óleos essenciais de *C. tetradenius* e o composto (*E*)-pinocarveol (Fig. 2B). Todos os óleos essenciais e os compostos 1,8-cineol, α -pineno e (*E*)-pinocarveol exibiram velocidade angular superior ao controle (Fig. 2C). As formigas submetidas aos óleos essenciais de *C. tetradenius* e ao composto (*E*)-pinocarveol permaneceram imóveis por mais tempo quando comparadas ao controle (Fig. 2D).

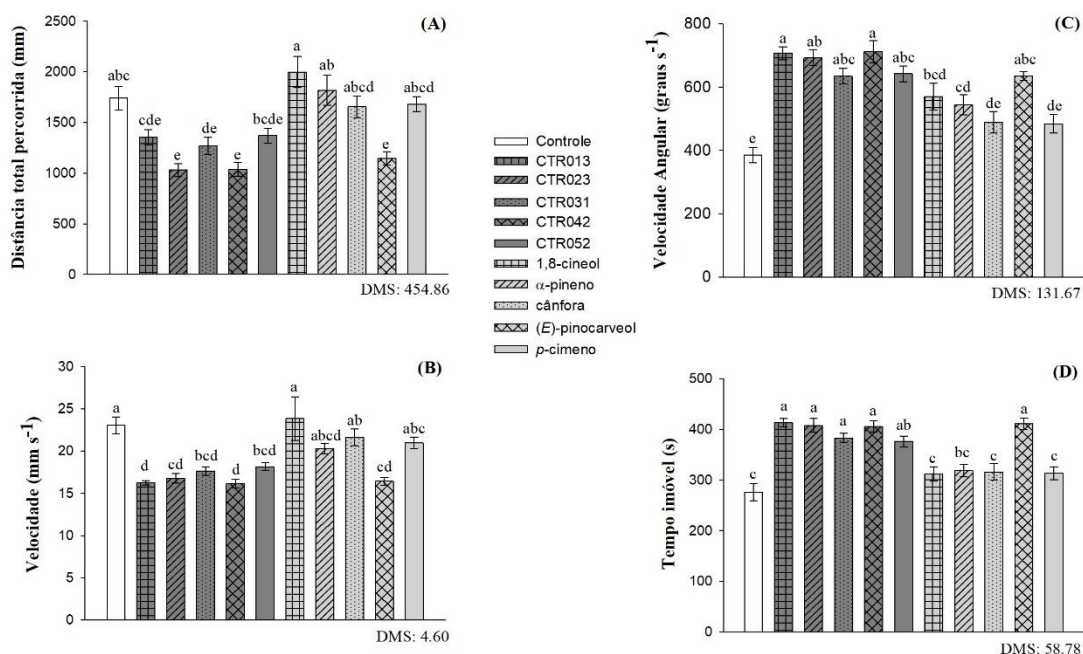
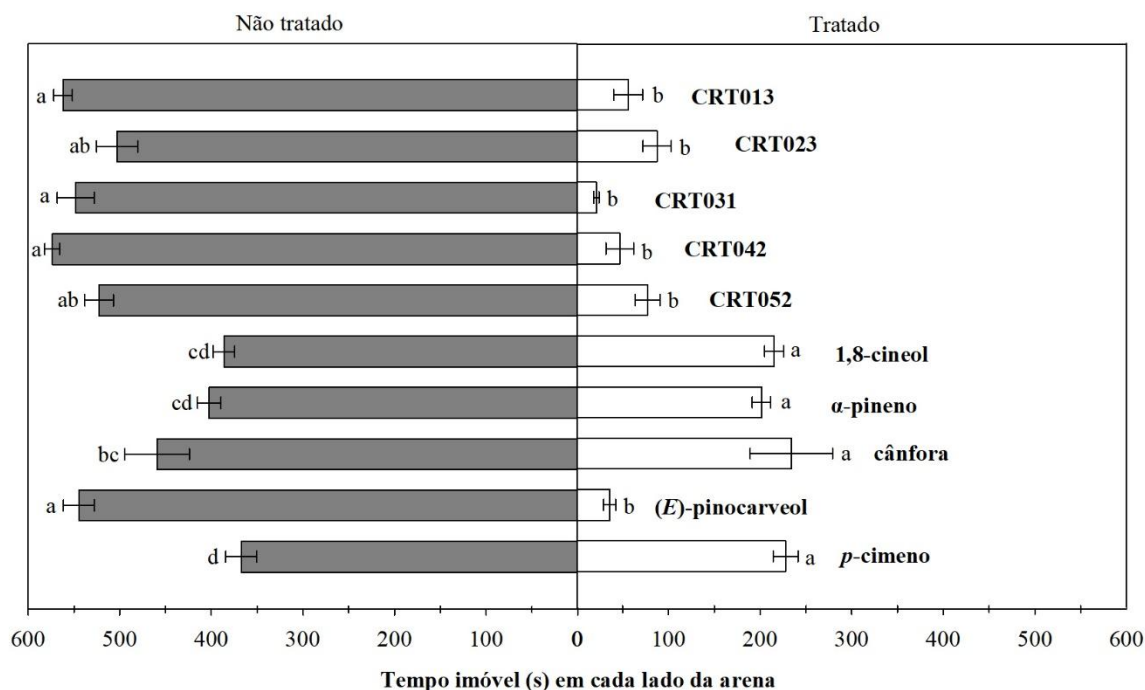


Fig. 2. Distância total percorrida (mm) (A), velocidade (mm s⁻¹) (B), velocidade angular (graus s⁻¹) (C) e tempo imóvel (s) (D) ($\pm$ erro padrão) das operárias de *Acromyrmex balzani* em arenas tratadas com óleos essenciais de plantas de *Croton tetradenius* de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários. Os tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.3.4 Bioensaios comportamentais em arenas parcialmente tratadas

Embora o efeito do tratamento não tenha sido significativo ($F = 1,69$, $gl = 9$, 580 , $P > 0,05$), o tempo em repouso foi significativamente afetado pela zona ($F = 971,43$, $gl = 1$, 580 , $P < 0,001$) e pela interação ($F = 38,57$, $gl = 9$, 580 , $P < 0,001$). Pelas médias entre os tratamentos, as formigas passaram mais tempo do lado não tratado (Fig. 3). No entanto, como indicado pela interação significativa, o efeito do tratamento variou com a zona. Todos os óleos essenciais e o

composto (*E*)-pinocarveol exibiram maior repelência contra *A. balzani*, pois permanecem a maior parte do tempo no lado não tratado.



DMS: 58.77

Fig. 3. Tempo (s) de imobilidade ($\pm$ erro padrão) das operárias de *Acromyrmex balzani* em arenas parcialmente tratadas com óleos essenciais de plantas de *Croton tetradenius* de populações naturais do estado de Sergipe, Brasil, e seus compostos majoritários. Os tratamentos seguidos pela mesma letra em cada zona, tratadas e não tratada, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.4. Discussão

Os resultados sobre a composição química dos óleos essenciais revelaram variações entre as plantas, embora sejam da mesma espécie (*C. tetradenius*). Isso pode ocorrer devido a vários fatores, principalmente genéticos e ambientais. O óleo essencial de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários exibiram atividade formicida via fumigação, demonstrando o potencial desses compostos no controle de formigas cortadeiras. Até o momento, estudos elucidaram apenas a atividade inseticida dessa espécie contra larvas e adultos de *Aedes aegypti* (Carvalho et al., 2016).

O modo de ação dos óleos essenciais nos insetos é tipicamente por meio do efeito neurotóxico que envolve vários mecanismos, por exemplo, GABA, sinapses de octopamina e inibição da acetilcolinesterase (AChE) (Regnault-Roger et al., 2012). Os óleos essenciais de *C. tetradenius* usados neste estudo são compostos principalmente de monoterpenos, que demonstraram atuar em vários alvos no sistema nervoso do inseto, incluindo acetilcolinesterase (AChE), adenosina trifosfatases (ATPases) e GABA-T (Abdelgaleil et al., 2019; Taktak e Badawy, 2019). Outras plantas aromáticas já exibiram atividade formicida contra *A. balzani*, como *Eplingiella fruticosa* e *Hyptis pectinata* (Feitosa-Alcantara et al., 2017; Silva et al., 2019).

Os óleos essenciais das cinco plantas de *C. tetradenius* testados foram tóxicos para as operárias de *A. balzani* em baixas concentrações. Comparando a toxicidade observada em CTR013 e CTR023 [(concentrações mais altas de *p*-cimeno (20,07%) e cânfora (10,63%)] com a de seus compostos majoritários separadamente, o *p*-cimeno foi menos tóxico que o óleo

essencial, enquanto que a cânfora foi o composto mais tóxico testado. As diferenças podem ter ocorrido devido à presença de outros compostos em porcentagens mais baixas nos óleos essenciais. Tais compostos minoritários podem potencializar ou diminuir o efeito tóxico dos compostos presentes em concentrações mais altas, devido ao sinergismo (Tak et al., 2015) ou interações antagônicas. A cânfora é um monoterpene que atua diretamente na inibição da acetilcolinesterase (AChE), e estudos comprovaram sua atividade contra pragas de insetos de grãos armazenados (Herrera et al., 2015; Kotan et al., 2008) e até mesmo em *A. balzani* (Silva et al., 2019).

Os óleos essenciais CRT013, CRT023 e CRT052 exibiram a menor TL_{50} e maior quantidade dos compostos *p*-cimeno e cânfora. O α -pineno foi o composto com a ação mais rápida na mortalidade das operárias de *A. balzani* usando os valores de CL_{95} , embora também tenha sido o composto menos tóxico entre os tratamentos com base nos valores de CL_{50} . Isso pode ter ocorrido devido à sua menor massa molar (136,23 g/mol), que faz com que esse composto se volatilize mais rápido, agindo também rapidamente na mortalidade de insetos.

Os ensaios comportamentais revelaram que os óleos essenciais de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários tiveram efeitos subletais sobre *A. balzani*. Quando as formigas não tinham chance de escolha, foram observadas mudanças de comportamento. A velocidade de caminamento foi maior na presença de 1,8-cineol. As formigas exibiram uma estratégia para evitar o contato com as substâncias em que tentavam escapar da arena. A motilidade das formigas foi maior em quase todos os tratamentos com óleos essenciais e o composto (*E*)-pinocarveol, porque passaram menos tempo imóveis. Ao expor as formigas aos óleos essenciais das plantas CRT023, CRT042 e o composto (*E*)-pinocarveol, foram observadas distâncias mais curtas e menor velocidade de caminamento. Caminhos circulares, observados com base na velocidade angular, indicam que as formigas estariam desorientadas quando expostas a diferentes tipos de substâncias (Silva et al., 2019), o que pode reduzir sua atenção durante as atividades de forrageamento, observadas no óleo essencial da planta CRT042.

Apesar da ausência de mudanças no comportamento das formigas operárias quando expostas a alguns tratamentos, sempre que havia possibilidade de escolha, estas preferiram permanecer do lado não tratado. O efeito repelente foi observado, causado pelo comportamento de fuga, o que sugere a detecção dos compostos voláteis e uma tentativa de evitá-los. As formigas cortadeiras são insetos eusociais cujas atividades e comportamentos são baseados na manutenção e na sobrevivência da colônia. Esses insetos são capazes de perceber estímulos físicos e químicos com as sensilas olfativas (Morgan, 2009; Le Conte e Hefetz, 2008; Leal, 2013). O uso de inseticidas à base de óleos essenciais chamou a atenção da comunidade científica para o desenvolvimento de inseticidas botânicos. O óleo essencial de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários são provavelmente favoráveis ao meio ambiente e podem ser utilizados como matéria-prima na síntese de produtos naturais, ajudando a controlar *A. balzani*, que ainda não possui produtos específicos registrados para seu controle.

5.5. Conclusões

Foi verificada a atividade formicida dos óleos essenciais de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários em operárias de *A. balzani*. No geral, os óleos essenciais causaram maior toxicidade do que seus compostos majoritários, exceto a cânfora, que foi o mais tóxico dos compostos testados. Além da toxicidade, os tratamentos tiveram efeito repelente contra as formigas cortadeiras. Nossos resultados sugerem que os óleos essenciais de *C. tetradenius* e seus compostos majoritários monoterpênicos são alternativas promissoras para o manejo de *A. balzani*, pois são tóxicos para estes insetos e alteram seu comportamento. Assim, eles podem constituir um produto natural para ser usado em culturas afetadas por esta praga.

5.6. Referências Bibliográficas

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265–267.
- Abdelgaleil, S.A.M., Badawy, M.E.I., Mahmoud, N.F., Marei, A.E.S.M., 2019. Acaricidal activity, biochemical effects and molecular docking of some monoterpenes against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Pestic. Biochem. Physiol.* 156, 105–115.
- Adams, R.P., 2007. In: Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, fourth ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Alexander, I.C., Pascoe, K.O., Manchard, P., Lawrence, A.D.W., 1991. Insecticidal diterpene from *Croton linearis*. *Phytochemistry* 30, 1801–1803.
- Almeida, R., Peñaflores, M., Simote, S., Bueno, O., Hebling, M., Pagnocca, F., Fernandes, J., Vieira, P., Silva, M., 2007. Toxicity of Substances Isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the Leaf-cutting Ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *BioAssay*. 2:2.
- Anjum, A., Wright, D., 2016. Relative toxicity of insecticides to the crucifer pests *Plutella xylostella* and *Myzus persicae* and their natural enemies. *Crop Prot.* 88, 131–136.
- Berry, P.E., Hipp, A.L., Wurdack, K.J., Van E.V., Riina, R., 2005. 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.
- Blank, A.F., Almeida, C.S., Alves, R.P., Sampaio, T.S., Feitosa-Alcântara, R. S., Melo, J.O., Pinto, V.S., Silva, J.H.S., Brito, F.A., Arrigoni-Blank, M.F., Gagliardi, P.R., Nunes, R.S., Lima, A.D., Nogueira, P.C.R., 2017. Formulação fungicida à base de óleo essencial de *Croton tetradenius* para controlar ou eliminar o fitopatógeno *Fusarium solani*. Patent BR-10-2017-000272-1. INPI, Rio de Janeiro.
- Carneiro-Torres, D.S., 2009. Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga. Doctoral dissertations, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. http://www2.uefs.br/ppgbot/pdf_dissertacoes_teses/doutorado/2009/Carneiro-Torres2009_Tese_Doutorado.pdf.
- Carvalho, K.S., Silva, S.L.C., Souza, I.A., Gualberto, S.A., Cruz, R.C.D., 2016. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. *Parasitol. Res.* 115, 3441–3448.
- Feitosa-Alcântara, R.B., Bacci, L., Blank, A.F., Alves, P.B., Silva, I.M.A., Soares, C.A., Sampaio, T.S., Nogueira, P.C.L., Arrigoni-Blank, M.F., 2017. Essential Oils of *Hyptis pectinata* Chemotypes: Isolation, Binary Mixtures and Acute Toxicity on Leaf-Cutting Ants, *Molecules* 22, 1–13.
- Flora do Brasil 2020 em construção, 2019. *Euphorbiaceae*. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113>. (Accessed on 3rd of June 2019).
- Herrera, J.M., Zunino, M.P., Dambolena, J.S., Pizzolitto, R.P., Ganan, N.A., Lucini, E.I., Zygadlo, J.A., 2015. *Sitophilus zeamais*: Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Ind. Crop. Prod.* 70, 435–442.
- Holldobler, B., Wilson, E.O., 1990. The Ants, Harvard University Press, Cambridge.
- Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A., Kesdek, M., Kaya, Y., Kilic, H., 2008. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Biochem. Syst. Ecol.* 36, 360–368.
- Leal, W.W., 2013. Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 373–391.
- Le Conte, Y., Hefetz, A., 2008. Primer Pheromones in Social Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 523–42.

- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., Calle, Z., 2012. Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control. *Int. J. Pest Manag.* 58, 225–247.
- Morgan, E.D., 2009. Trail pheromones of ants. *Physiol. Entomol.* 34, 1–17.
- Nascimento, M.R., Silva, G.S., Conceição, G.M., 2017. Euphorbiaceae: *checklist* de uma coleção botânica, Maranhão, Brasil. *Enci. Bio.* 14, 1353–1361.
- Oliveira, B.M.S., Melo, C.R., Alves, P.B., Santos, A.A., Santos, A.C.C., Santana, A.S., Araújo, A.P.A., Nascimento, P.E.S., Blank, A.F., Bacci, L., 2017. Essential oil of *Aristolochia trilobata*: synthesis, routes of exposure, acute toxicity, binary mixtures and behavioral effects on leaf-cutting ants. *Molecules* 22, 1–17.
- Pavela, R., 2015. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. *Ind. Crops Prod.* 76, 174–187.
- Pavela, R., 2016. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects – a review. *Plant. Prot. Sci.* 52, 229–241.
- Pavela, R., Benelli, G., 2016. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant. Sci.* 21, 1000–1007.
- Pereira, P.C., Lucia, T.M.C.D., Mayhé-Nunes, A.J., 1999. Levantamento de attini (Hymenoptera; Formicidae) em povoamentos de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden em Minas Gerais. *Rev. Árvore* 23, 341–349.
- Pimenta, L.B., Araújo, M.S., Lima, L., Silva, J.M.S., Naves, V.G.O., 2007. Dinâmica de forrageamento e caracterização de colônias de *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente de cerrado goiano. *Rev. Cient. Elet. Eng. Florestal.* 9.
- Queiroz, M.M.F., Queiroz, E.F., Zeraik, M.L., Marti, G., Favre-Godal, Q., Simões-Pires, C., Marcourt, L., Carrupt, P.A., Cuendet, M., Paulo, M.Q., Bolzani, V.S., Wolfender, J.L., 2014. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. *Phytochem. Lett.* 10, lxxxviii–xciii.
- Rajkumar, V., Gunasekaran, C., Christy, I.K., Dharmaraj, J., Chinnaraj, P., Paul, C.A., 2019. Toxicity, antifeedant and biochemical efficacy of *Mentha piperita* L. essential oil and their major constituents against stored grain pest. *Pestic. Biochem. Phys.* 156, 138–144.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., Arnason, J.T., 2012. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes word. *Annu. Rev. Entomol.* 57, 405–424.
- Rizk, A.F.M., 1987. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 94, 293–326.
- Silva, D.C., Arrigoni-Blank, M.F., Bacci, L., Blank, A.F., Faro, R.R.N., Pinto, J.P.O., Pereira, K.L.G., 2019. Toxicity and behavioral alterations of essential oils of *Eplingiella fruticosa* genotypes and their major compounds to *Acromyrmex balzani*. *J. Crop. Prot.* 116, 181–187.
- Silva, I.M.A., Martins, G.F., Melo, C.R., Santana, A.S., Faro, R.R.N., Blank, A.F., Alves, P.B., Picanço, M.C., Cristaldo, P.F., Araújo, A.P.A., Bacci, L., 2018. Alternative control of *Aedes aegypti* resistant to pyrethroids: lethal and sublethal effects of monoterpenes bioinsecticides. *Pest. Manag. Sci.* 74, 1001–1012.
- Tak, J.H., Jovel, E., Isman, M.B., 2015. Contact, fumigant, and cytotoxic activities of thyme and lemongrass essential oils against larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Pest. Manag. Sci.* 89, 183–193.
- Taktak, N.E.M., Badawy, M.E.I., 2019. Potential of hydrocarbon and oxygenated monoterpenes against *Culex pipiens* larvae: Toxicity, biochemical, pharmacophore modeling and molecular docking studies. *Pestic. Biochem. Phys.* 158, 156–165.
- Van den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11, 463–471.

- Vasanth-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Ponsankar, A., Thanigaivel, A., Chellappandian, M., Edwin, E.S., Selin-Rani, S., Kalaivani, K., Hunter, W.B., Duraipandiyan, V., Al-Dhabi, N.A., 2018. Acute toxicity of chemical pesticides and plant-derived essential oil on the behavior and development of earthworms, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) and *Eisenia fetida* (Savigny). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 10371–10382.
- Wijesundara, S.A.D.T.L., Kannangara, B.T.S.D.P., Abeywickrama, K., 2016. Antifungal Activity of *Croton aromaticus* L. in vitro: against post-harvest fungal pathogens isolated from tropical fruits. *J. Agric. Sci.* 11, 105–117.
- Zoubiri, S., Baaliouamer, A., 2014. Potentiality of plants as source of insecticide Principles.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A baixa diversidade e estruturação da variabilidade genética entre populações de *C. tetradenius* analisadas forneceram uma base importante para as estratégias de conservação dessa espécie no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas (BAG) da Universidade Federal de Sergipe. Serão necessárias novas coletas para fazer a introdução de plantas representativas de cada uma das quatro localidades estudadas em Sergipe, bem como a prospecção e coleta em outras regiões de ocorrência, visando ampliar a diversidade genética da coleção a ser implementada no BAG.

É evidente estudos sobre o potencial das espécies bioativas no controle de insetos-praga. A biodiversidade da flora brasileira permite esforços na prospecção de compostos bioativos que podem contribuir no controle de formigas-cortadeiras. Foi verificado, com os experimentos realizados, o potencial formicida dos óleos essenciais de genótipos de *C. tetradenius* sobre *A. balzani*. Sendo tóxicos em baixas concentrações, causando também alterações comportamentais. Resultados satisfatórios para o manejo alternativo, podendo OE's de *C. tetradenius* serem usados como matéria prima para compor um produto natural inovador, suprimindo demandas para segurança alimentar e ambiental.

ANEXOS

Crop Protection 137 (2020) 105259



Contents lists available at ScienceDirect

Crop Protection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cropro

Toxicity and behavioral alterations caused by essential oils of *Croton tetradenius* and their major compounds on *Acromyrmex balzani*

Fabiany de Andrade Brito ^a, Leandro Bacci ^a, Alisson da Silva Santana ^a, Jefferson Elias da Silva ^a, Daniela Aparecida de Castro Nizio ^a, Paulo Cesar de Lima Nogueira ^b, Maria de Fátima Arrigoni-Blank ^a, Carlisson Ramos Melo ^a, Juliana Oliveira de Melo ^a, Arie Fitzgerald Blank ^{a,*}

^a Department of Agronomic Engineering, Universidade Federal de Sergipe, Cidade Universitária Professor José Alotário de Campos, Avenida Marechal Rondon s/n, Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

^b Department of Chemistry, Universidade Federal de Sergipe, Cidade Universitária Professor José Alotário de Campos, Avenida Marechal Rondon s/n, Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Euphorbiaceae
Volatile oils
Botanic insecticides
Formicidal activity
Sublethal effects

ABSTRACT

Leafcutter ant *Acromyrmex balzani* is a species responsible for causing important losses in agricultural crops, pastures and forest plantations. *Croton tetradenius*, an aromatic plant of wide occurrence in northeastern Brazil, is a plant that has great potential as a botanical insecticide for control of leafcutter ants. The present study evaluates the toxicity and sublethal effects of essential oils of *C. tetradenius* plants from natural populations in the state of Sergipe, Brazil, and their major compounds, applied by fumigation, on *A. balzani* workers. The essential oils used in the study were obtained from five plants of *C. tetradenius* and their major compounds - 1,8-cineole, α -pinene, camphor, (*E*)-pinocarveol and *p*-cymene-, acquired commercially. All treatments exhibited formicidal activity, with LC₅₀ values ranging from 1.47 to 2.40 $\mu\text{L L}^{-1}$ for the essential oils and 0.45–11.20 $\mu\text{L L}^{-1}$ for the major compounds. Camphor was the most toxic tested compound. After exposure, there was a reduction in the survival of *A. balzani*. The highest observed LT₅₀ was 42.91 h for essential oils of plant CRT042. The essential oils and their major compounds repelled and affected the walking behavior of *A. balzani* workers. The formicidal activity of *C. tetradenius* essential oil and its major compounds was verified, and we demonstrated that it has potential as a natural insecticide to control *A. balzani*.