

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

ANA PAULA PERON

**Esterases para a análise de variabilidade genética em mandacaru
(Cactaceae)**

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO – 2011

ANA PAULA PERON

**Esterases para a análise de variabilidade genética em mandacaru
(Cactaceae)**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO – 2011

“Mandacaru quando fulora na seca é o
siná que a chuva chega no sertão. Toda
menina que enjoa da boneca é siná que o
amor já chegou no coração” (Zé Dantas e
Luiz Gonzaga).

À minha mãe, Maria José Peron, com todo amor do mundo.
Aos meus avós, Rita e Avelino; e à minha tia, Aparecida, por tantos momentos
de suas vidas a mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu imenso amor e fidelidade em minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá por todo apoio na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida no início do desenvolvimento deste estudo e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela orientação segura, por sua dedicação incansável, por sua nobreza, profissionalismo, apoio e amizade. Espelho-me em ti, Fafá.

À professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela atenção dedicada na análise deste trabalho, pelas valiosas sugestões, amizade e momentos de descontração.

Aos professores do Programa Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), que se empenharam em dividir seus conhecimentos no decorrer das disciplinas.

Ao Secretário do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz, pela ajuda e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética, Sérgio e Leila, pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela companhia e amizade.

Aos meus amigos dos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais e Eletroforese e Genética de Animais, em especial, ao Maycon Bevilaqua e à Letícia Menezes, Paula Martin e Juliana Sala de Faria pela ajuda no desenvolvimento da parte prática deste trabalho, pela grande amizade e alegria proporcionada nos momentos de descontração.

Aos meus amigos e professores da Universidade Federal do Piauí, Iael de Souza, Maria do Socorro Meireles de Deus, Suze da Silva Sales, Leonardo Henrique G. M. Lima e João Marcelo de Castro e Sousa, por todo o incentivo para a conclusão desta etapa tão importante em minha vida. A todos, muito obrigada.

BIOGRAFIA

Ana Paula Peron, filha de Maria José Peron, nasceu em Campo Mourão, estado do Paraná, aos três dias do mês de julho de 1978.

Cursou o Ensino Fundamental, entre 1983 e 1991, e o Ensino Médio, no período compreendido entre 1992 e 1995, no Colégio Estadual Olavo Bilac, na cidade de Peabiru, estado do Paraná.

Graduou-se em Ciências Biológicas, Licenciatura e Bacharelado, em fevereiro de 2000, pela Universidade Estadual de Maringá.

Recebeu o título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração em Melhoramento Genético Vegetal, em maio de 2004, pela Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Doutorado, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Genética Vegetal.

Em janeiro de 2010, tornou-se docente efetiva da Universidade Federal do Piauí.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE QUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Filogenia em cactáceas	3
2.2. Distribuição e classificação do habitat da família Cactaceae.....	5
2.3. Importância econômica das Cactaceae.....	6
2.4. Considerações botânicas e fisiológicas da família Cactaceae e taxonomia do gênero <i>Cereus</i>	6
2.5. <i>Cereus jamacaru</i> De Candolle, o mandacaru do nordeste	7
2.6. <i>Cereus repandus</i> Miller, o mandacaru do sul.....	9
2.7. <i>Cereus hildmannianus</i> K. Schumann, o mandacaru do sudeste.....	10
2.8. Isolamento geográfico	11
2.9. Marcadores genéticos	12
2.9.1. Marcadores morfológicos e marcadores bioquímicos	12
2.9.2. Isozimas esterases em <i>Cereus repandus</i>	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (sistema PAGE: Polyacrilamide Gel Electrophoresis)	16
3.2. Análise dos dados	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Composição de macro e micronutrientes de meio de cultura segundo o protocolo de Knudson.....	17
Quadro 2 - Composição da solução usada na extração das isozimas α - e β - esterases de caules de plântulas de mandacaru.....	18
Quadro 3 - Volumes das soluções-estoque utilizadas para o preparo dos géis de separação para analisar as α - e β - esterases de mandacaru	18
Quadro 4 - Volumes das soluções-estoque utilizadas para o preparo dos géis de empilhamento para analisar as α - e β - esterases de mandacaru	19
Quadro 5 - Distribuição dos alelos nos locos <i>Est-2</i> , <i>Est-4</i> , <i>Est-5</i> , <i>Est-6</i> e <i>Est-14</i> nas populações de plântulas descendentes de plantas de mandacaru localizadas na região de Maringá, Picos e praia da Juréia	25
Quadro 6 - Diversidade genética obtida para cada loco em populações de plantas de mandacaru localizadas na região de Maringá (PR)	26
Quadro 7 - Diversidade genética obtida para cada loco em populações de plantas de mandacaru localizadas na região de Picos (PI)	27
Quadro 8 - Diversidade genética obtida para cada loco em populações de plantas de mandacaru localizadas na praia da Juréia (SP).....	28
Quadro 9 - Comparação da diversidade genética entre populações de plantas localizadas nas regiões de Maringá, Picos e praia da Juréia	28
Quadro 10 - Diferenciação genética entre as populações de mandacaru das regiões de Maringá, Picos e praia da Juréia.....	29
Quadro 11 - Relações de similaridade entre populações das regiões de Maringá, Picos e praia da Juréia	30
Quadro 12 - Análise de populações formadas por plântulas crescidas de sementes produzidas por 14 plantas localizadas na região de Maringá (PR)	32
Quadro 13 - Diferenciação genética entre cinco populações de mandacaru da região de Maringá (PR).....	33
Quadro 14 - Diferenciação genética entre cinco populações de mandacaru da região de Picos (PI)	33
Quadro 15 - Diferenciação genética entre 14 populações de mandacaru provenientes da região de Maringá (PR)	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Planta Cactaceae da subfamília Opuntiadeae.....	4
Figura 2 - Planta Cactaceae da subfamília Pereskiodeae.....	4
Figura 3 - Planta Cactaceae da subfamília Cactoideae.....	5
Figura 4 - Planta <i>Cereus jamacaru</i> De Candolle	8
Figura 5 - Planta <i>Cereus repandus</i> Miller.....	9
Figura 6 - Planta <i>Cereus hildmannianus</i> K. Schumann	10
Figura 7 - Amostra de plântulas do gênero <i>Cereus</i> produzidas a partir de sementes coletadas de uma população de cactos em estudo.....	16
Figura 8 - Fotografia de uma planta de mandacaru localizada na cidade de Maringá, Estado do Paraná, região sul do Brasil.....	21
Figura 9 - Fotografia de uma planta de mandacaru localizada na cidade de Picos, Estado do Piauí, região nordeste Brasil	22
Figura 10 - Isoesterases em gel de poliacrilamida para 17 plântulas de mandacaru, crescidas a partir de sementes coletadas de plantas localizadas na região de Maringá (1 a 6) e na região de Picos (7 a 17).....	23
Figura 11 - Isoesterases avaliadas em gel de poliacrilamida para 16 plântulas de mandacaru, crescidas a partir de sementes coletadas de plantas localizadas na ilha da Juréia (1 a 6) e na região de Picos (7 a 16).....	23

RESUMO

PERON, Ana Paula. D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2011. **Esterases para a análise de variabilidade genética em mandacaru (Cactaceae).** Professora Orientadora: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Coorientadores: Claudete Aparecida Mangolin.

Foram utilizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida para, a partir de α - e β -esterases, estimar e comparar a variabilidade genética entre populações de plantas de mandacaru em três regiões do Brasil: na região de Maringá, estado do Paraná; no Sul do Brasil, região de Picos, Estado do Piauí; no Nordeste do Brasil e na Mata Atlântica (praia da Juréia), estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. As plantas de mandacaru das três regiões têm morfologia semelhante, mas são denominadas como espécies diferentes: *Cereus jamacaru* (região Nordeste), *C. peruvianus* (região Sul), e *C. hildmaniannus* (região Sudeste). As isozimas α - e β -esterases foram propostas como marcadores co-dominantes, adequados para analisar a diversidade genética e a forma como as populações estão geneticamente estruturadas. A detecção de alelos específicos e/ou de alelos com frequências diferentes em diferentes populações foram usados como parâmetros para estimar o nível de diferenciação entre as populações. Os locos *Est-3*, *Est-2*, *Est-5* e *Est-14* foram caracterizados como diagnósticos porque podem ser usados para diferenciar plantas de mandacaru da região nordeste e região sul. Foi observada a presença de alelos exclusivos nas plântulas de mandacaru de Maringá (*Est-3¹*) e de Picos (*Est-2¹*, *Est-2³*, *Est-2⁴*, *Est-5³* e *Est-14⁴*). A frequência diferencial dos vários alelos nas referidas populações determinou uma significativa diferenciação genética ($F_{ST} = 0,2132$) entre as populações de mandacaru. As populações de plantas de mandacaru de Picos mostraram maior diversidade de α - e β -esterases e as relações de similaridade entre as plantas das três regiões apresentaram valores de identidade variando de 0,5992 (entre as plântulas das regiões Sudeste e Nordeste) a 0,7787 (entre as plantas das regiões Sul e Nordeste). Esses resultados indicam que as populações de mandacaru representativas das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil podem ser consideradas como espécies diferentes do gênero *Cereus*: *C. peruvianus*, *C. hildmaniannus*, e *C. jamacaru*, respectivamente.

Palavras-chave: mandacaru, esterases, variabilidade genética.

ABSTRACT

PERON, Ana Paula. D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, February 2011. **Esterases for genetic variability analysis in mandacaru (Cactaceae)**. Adviser: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Committee Member: Claudete Aparecida Mangolin.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis was employed in current investigation to evidence α - and β - esterases in order to estimate and compare the genetic variability among mandacaru populations observed in three Brazilian regions: in Maringá PR, south Brazil; in Picos PI, northeastern Brazil; and in the Atlantic Rain Forest, Juréia beach, SP, southeastern Brazil. Mandacuru plants of the three regions have similar stalk morphology although they are considered different species, or rather, *Cereus jamacaru* (northeastern region), *C. peruvianus* (southern region) and *C. hildmaniannus* (southeastern region). The isozymes α - and β - esterases were considered as co-dominant markers, adequate to analyze the genetic diversity and the manner populations are genetically structured. Consequently, the detection of specific alleles and/or alleles with different frequencies in different populations may be used as parameters to estimate differentiation level in populations. The loci *Est-3*, *Est-2*, *Est-5* and *Est-14* were characterized as diagnostic sites since they may be employed to differentiate mandacaru plants of the northeastern and southern regions. Exclusive alleles were reported in mandacaru plants in Maringá (*Est-3*¹) and in Picos (*EST-2*¹, *Est-2*³, *Est-2*⁴, *Est-5*³ e *Est-14*⁴). The differential frequency of the various alleles in the above mentioned plants determined a significant genetic differentiation ($F_{ST} = 0.2132$) among mandacaru populations. Whereas mandacaru plant populations in Picos had a higher α - and β -esterases diversity, similarity relationships among plants of the three regions showed identity rates varying between 0.5992 (between plants of the southeastern and northeastern regions) and 0.7787 (between plants of the southern and northeastern regions). These factors indicate that mandacaru populations which are representative of the Brazilian southern, southeastern and northeastern regions can be considered as different species of the genus *Cereus*, namely, *C. peruvianus*, *C. hildmaniannus* and *C. jamacaru*, respectively.

Key words: mandacaru, esterases, genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o terceiro maior centro de diversidade da família Cactaceae, sendo superado apenas pelo México e os Estados Unidos. No Brasil, encontra-se em torno de 90 espécies diferentes de cactáceas distribuídas por todo o país (Davet, 2005). Essas plantas estão adaptadas às condições de xerofitismo, são suculentas, com caules carnosos, roliços ou aplainados, constituídas de folhas caducas ou completamente ausentes, modificadas em espinhos. Dentro desta família, encontra-se o gênero *Cereus* que possui grande importância econômica, principalmente pelo valor ornamental e forrageiro. Por toda a extensão do Brasil, as plantas do gênero *Cereus* são denominadas popularmente de mandacaru, mas nas regiões norte e nordeste a espécie é denominada de *Cereus jamacaru* De Candolle, na região sul de *Cereus repandus* Miller e na região sudeste do Brasil as plantas de mandacaru são classificadas como *Cereus hildmannianus* K. Schumann.

As espécies *Cereus repandus* e *Cereus hildmannianus* são consideradas plantas de porte arbóreo, com 6 a 10 metros de altura em média; possuem cladódio multiarticulado e com ramificações. As plantas das duas espécies possuem a constituição morfológica dos caules formados por um número de 4 a 6 costelas por planta, com aréolas armadas, distanciadas entre si de 2 a 6 centímetros com a presença de espinhos rígidos e aciculares de cor escura, variando de castanho a preto. De forma similar, a constituição morfológica das plantas da espécie *Cereus jamacuru* são descritas como sendo plantas com 6 metros de altura, em média, com cladódio multiarticulado e ramificado. O número de costelas por planta varia de 4 a 6, tendo as aréolas armadas, distanciadas entre si por 4 centímetros em média. Possuem grandes quantidades de espinhos rígidos e aciculares, de coloração escura que varia do amarelo ao marrom (Anderson, 2001).

Segundo Britton e Rose (1963), o número de costelas e a disposição de aréolas, bem como o tamanho e a cor dos espinhos são algumas das características usadas para identificar e classificar as espécies do gênero *Cereus*. Neste contexto, as três espécies de mandacaru possuem grande semelhança morfológica. Considerando que a caracterização vegetativa das plantas de mandacaru pode ser insuficiente para

estabelecer diferenças significativas entre as três espécies, o objetivo do presente estudo foi utilizar eletroforese em gel de poliacrilamida (sistema PAGE: *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) para analisar a determinação genética das isozimas α - e β - esterases, no sentido de estimar e comparar a variabilidade genética entre populações de espécies de mandacaru cultivadas em três regiões do Brasil: região de Maringá, estado do Paraná, Sul do Brasil, região de Picos, estado do Piauí, Nordeste do Brasil e praia de Juréia, (Mata Atlântica), cidade de Bertioga, estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.

As isozimas α - e β - esterases são marcadores co-dominantes, adequados para analisar a diversidade genética e a forma como as populações estão geneticamente estruturadas. A detecção de alelos específicos e/ou de alelos com frequências diferentes em diferentes populações pode ser usada como parâmetro para estimar o nível de diferenciação entre as populações. As relações de similaridade entre as plantas de mandacaru em Maringá, Picos e praia da Juréia podem sugerir se tais populações de mandacaru pertencem à mesma espécie, se são de espécies co-genéricas (espécies diferentes do mesmo gênero) ou se são de espécies geograficamente distantes em processo de especiação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Filogenia em cactáceas

A família Cactaceae, pertencente ao Reino Plantae, Divisão Angiospermae, Classe Magnoliophyta e Ordem Caryophyllales, é considerada um grupo altamente especializado, composto por plantas geralmente xerofíticas, com caule e ramos suculentos e folhas muito reduzidas e modificadas em espinhos (Terrazas e Mauseth, 2002). Esta família é endêmica ao Novo Mundo (com exceção da espécie *Rhipsalis baccifera* L.) sua classificação mais recente e abrangente foi proposta por Wallace (1995), que a divide em três subfamílias: Opuntioideae (Figura 1), Pereskioideae (Figura 2) e Cactoideae (Figura 3). A subfamília Cactoideae destaca-se como a maior, em número de espécies, e a mais diversificada em termos de formas e hábitos. Essa subfamília é subdividida em nove tribos (Barthlott e Taylor, 1993; Anderson, 2001). Das nove tribos pertencentes à subfamília Cactoideae, a tribo Cereeae é o grupo mais representativo no Brasil, juntamente com Rhipsalideae, tendo o seu centro de diversidade localizado na região Nordeste, considerada como o terceiro maior centro de diversidade para as Cactaceae no mundo (Taylor, 1997). Somente as tribos Cacteae, Pachycereeae, Browningieae e Notocacteae não apresentam representantes no Brasil (Taylor e Zappi, 2004).

Na subfamília Cactoideae, encontram-se o gênero *Cereus*, pertencente à tribo Cereeae, cujas espécies estão presentes desde as Índias até a América do Sul. Este gênero é bastante expressivo na constituição da flora de vários estados brasileiro e possui grande importância econômica, principalmente na região nordeste do país (Davet, 2005).

Há muitas controvérsias nos esquemas de classificação de plantas da família Cactaceae (Taylor e Zappi, 2004). O reduzido número de características morfológicas, aliado à extrema adaptação de seus representantes, dificulta a escolha de caracteres morfológicos que possam ser adequadamente utilizados para descrever e definir as linhagens evolutivas dentro da família (Taylor, 2000). Neste sentido, a subfamília Cactoideae apresenta problemas na classificação de algumas espécies, dada à grande

diversidade do grupo (Applequist e Wallace, 2002). Desta forma, segundo Anderson (2001), torna-se necessário o uso do maior número de recursos possíveis, como a utilização de marcadores bioquímicos e moleculares, para que a taxonomia do grupo reflita de modo mais acurado as relações filogenéticas entre os seus representantes.



Figura 1 - Planta Cactaceae da subfamília Opuntioideae (Projeto Cactáceas Brasileiras, 2010).



Figura 2 - Planta Cactaceae da subfamília Pereskioideae (Projeto Cactáceas Brasileiras, 2010).



Figura 3 - Planta Cactaceae da subfamília Cactoideae (Projeto Cactáceas Brasileiras, 2010).

2.2. Distribuição e classificação do habitat da família Cactaceae

No Brasil, há dois grupos de Cactaceae distintos, um presente na região nordeste e outro presente nas regiões sul e sudeste, sendo a Bahia o centro de dispersão. Segundo Barroso et al. (2002), as espécies da região nordeste do Brasil possuem semelhanças morfológicas com as do continente norte americano, enquanto as espécies do sul e sudeste do Brasil se assemelham morfológicamente com as do continente sul-americano. No nordeste brasileiro são reconhecidos 24 gêneros e 88 espécies (Zappi et al., 2006), sendo a maioria dos gêneros e das espécies endêmicos à região.

Segundo Davet (2005), as espécies de cactáceas que ocorrem no Brasil podem ser classificadas em cinco grupos, de acordo com o seu ambiente: 1) silvícolas – que habitam florestas pluviais: amazônica e atlântica, com predominância de espécies epífitas; 2) savanicolas – no cerrado; 3) campestre – em campos rupestres de Minas Gerais; 4) litorâneas – no litoral brasileiro; 5) xerófilas – bioma caatinga, habitat este que abrange o maior número de espécies.

2.3. Importância econômica das Cactaceae

Na região nordeste do Brasil, as cactáceas possuem grande importância econômica na atividade forrageira, principalmente na época de estiagem, sendo utilizadas na alimentação de bovinos, caprinos e ovinos (Rocha e Agra, 2002; Santos et al., 2007). O gênero *Cereus* possui grande destaque nesse processo sendo a espécie *Cereus jamacaru*, conhecida como mandacaru em várias regiões do nordeste brasileiro, a principal planta utilizada como alimento para esses animais.

As espécies do gênero *Cereus*, além de serem usadas para a alimentação de animais no nordeste brasileiro, ainda possuem outros destaques econômicos, como na alimentação humana, na cosmetologia para a produção de cremes à base do conteúdo mucilaginoso destas plantas, ornamentação de praças e jardins, fonte de madeira para a fabricação de portas, janelas, ripas e caibros, enchimentos de selas e almofadas, pintura de casas (Andrade et al., 2006) e exportação de seus frutos para países da Ásia para a fabricação de doces (Santos et al., 2007). As plantas dessa família ainda apresentam imensa diversidade de compostos biológicos como classes de alcalóides, esteróides, triterpenos, glicosídeos, óleos e ceras que são aproveitados pela indústria farmacêutica (Davet, 2005).

Em outros países, como o México, as plantas do gênero *Cereus* são amplamente utilizadas na medicina popular como analgésicos, antibióticos, diuréticos, no tratamento de problemas intestinais, tosses, afecções cardíacas e nervosas (Hollis e Sheinvar, 1995). No Brasil, Tourinho (2000) descreve as cactáceas como constituídas de propriedades terapêuticas e citam o mandacaru (*Cereus jamacaru*) como de grande eficiência para tratar de doenças renais. Andrade et al. (2006) ainda relatam que a associação do mandacaru (*Cereus jamacaru*) com as leguminosas *Senna uniflora* L. e *Senna obtusifolia* L., sob a forma de chá, é eficiente para amenizar problemas intestinais.

2.4. Considerações botânicas e fisiológicas da família Cactaceae e taxonomia do gênero *Cereus*

As plantas da família Cactaceae são classificadas como eudicotiledôneas suculentas de diversos hábitos, podendo se apresentar como árvores, arbustos,

trepadeiras, epífitas ou geófitas (Davet, 2005). De modo geral, os caules destas plantas podem ser colunares, roliços, globulares, tuberculados, em forma de costeletas, asas ou achatados, geralmente segmentados, com ou sem folhas e com a presença de espinhos. A maioria das espécies desta família possui adaptações fisiológicas e morfológicas marcantes, como a presença de um caule fotossinteticamente ativo, metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), sistemas radiculares superficiais e extensos, rápida absorção de água pelas raízes depois de uma seca prolongada, alta relação volume/superfície e células parenquimáticas especializadas em armazenar água, cera epicuticular, cutícula espessa, estômatos localizados em depressões da epiderme, hipoderme colenquimática e o desenvolvimento de grandes proporções de tecido parenquimático com células mucilaginosas (Barroso et al., 2002; Dettke e Milaneze-Gutierrez, 2008).

O gênero *Cereus*, que inclui até o momento 40 espécies publicadas, foi primeiramente descrito por Hermann, em 1628, e depois por Miller, em 1754. Segundo Britton e Rose (1963), as plantas deste gênero podem ser arbóreas ou arbustivas de ramos eretos, sendo descrito como constituído por caule do tipo colunar com número e disposição de costelas longitudinais variáveis, onde estão inseridos os botões axilares contendo espinhos (folhas modificadas) conhecidos como aréolas. As espécies mais conhecidas de *Cereus* são: *Cereus adeemani*, *Cereus bicolor*, *Cereus comarapanus*, *Cereus friccie*, *Cereus jamacaru*, *Cereus hildmannianus*, *Cereus repandus*, *Cereus trigonodendron* e *Cereus vargasianus* (Davet, 2005).

2.5. *Cereus jamacaru* De Candolle, o mandacaru do nordeste

O mandacaru (*Cereus jamacaru*) é uma espécie nativa da vegetação da caatinga do nordeste do Brasil. Estas plantas crescem em solos pedregosos e junto a outras espécies de cactáceas formam a paisagem típica da região semi-árida do nordeste. São encontradas nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e norte de Minas Gerais (Figura 4) (Taylor e Zappi, 2004).

As plantas desse gênero são consideradas arbóreas com 6 metros de altura, em média, e possuem o caule multiarticulado com ramificações candelabrifórmes. São

constituídos de 4 a 6 costelas por planta, com aréolas armadas, distanciadas entre si de 2 a 4 centímetros com a presença de espinhos rígidos e aciculares. De acordo com Britton e Rose (1963), o *Cereus jamacaru* possui os seguintes sinônimos científicos: *Cereus glaucus* Salm-Dyck, *Cereus laetevirens* Salm-Dick, *Cereus lividus* Pfeiffer, *Cactus jamacaru* Kosteletzky, *Cereus horribarbis* Otto in Salm-Dick, *Cereus cauchinii* Rebut in Schumann, *Piptanthocereus jamacaru* Riccobono, *Piptanthocereus jamacaru cyaneus* Riccobono e *Piptanthocereus jamacaru glaucus* Riccobono.

As plantas típicas desta espécie no Brasil podem chegar a até 10 metros de altura, dependendo do ambiente. Possuem tronco lenhoso com muitos ramos eretos, dando ao topo do cacto um aspecto compacto. Os ramos novos são azulados e possuem de 4 a 6 costelas de ápices obtusos, separados por sulcos profundos. Quando em áreas abertas, podem apresentar-se apenas com um único ramo. As aréolas são circulares distantes de 2 a 5 cm entre si, sendo maiores no tronco principal. Os espinhos são radiais, medindo de 9 a 30 cm de comprimento, sendo os centrais maiores e podem ter coloração amarela, avermelhada ou marrom (Scheinvar, 1985).



Figura 4 - Planta *Cereus jamacaru* De Candolle (Projeto Cactáceas Brasileiras, 2010).

No nordeste do Brasil, as plantas adultas de *Cereus jamacaru* possuem troncos bastante grossos, cujo cerne fornece lenho que é aproveitado para a fabricação de telhados. Na seca, as poucas pastagens não sobrevivem à falta de água, e o gado tem que recorrer a certas espécies nativas. Assim, o *Cereus jamacaru*, além de servir como alimento para o gado, serve também de alimento para a população local no período de seca prolongada.

2.6. *Cereus repandus* Miller, o mandacaru do sul

O cacto *Cereus repandus* (Figura 5) é cultivado em jardins como planta ornamental e também apresenta interesse econômico e industrial no Brasil e em outros países. Na região de Israel, esta espécie é apreciada e domesticada (Mizrahi e Nerd, 1999), denominada de “fruit crop”; seus frutos são consumidos *in natura* e também servem de matéria-prima para a fabricação de doces. Em razão disso foi implantado um programa de melhoramento genético naquele país, com a finalidade de obter frutos maiores, mais saborosos e que permaneçam mais tempo intactos até o seu amadurecimento para fins de exportação para todo mundo. Na Europa, o fruto de *C. repandus* é bastante aceito pela população, sendo considerado um fruto exótico, o que eleva o seu valor comercial.

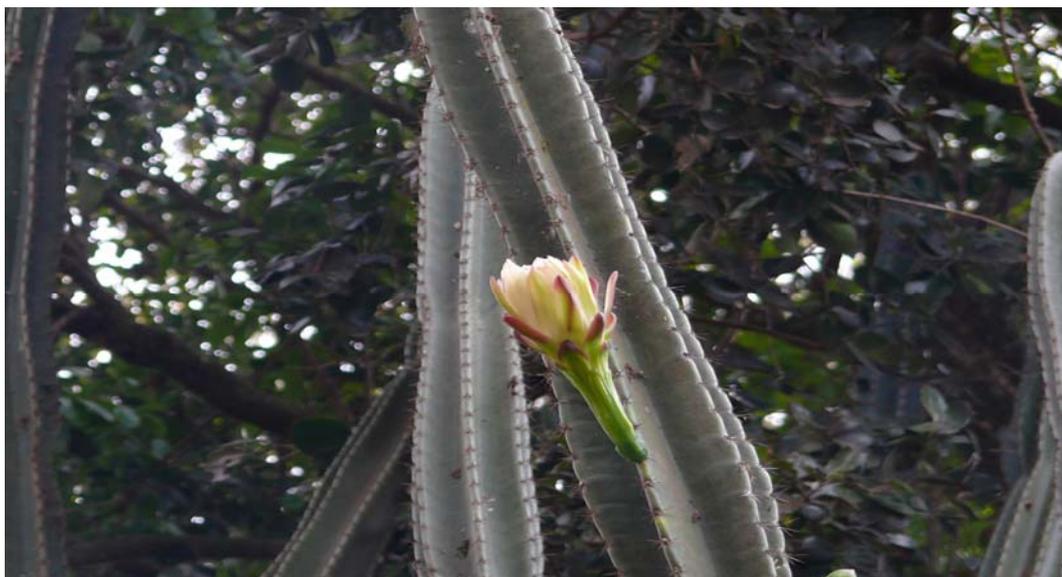


Figura 5 - Planta de *Cereus repandus* Miller (Projeto Cactáceas Brasileiras, 2010).

A espécie *Cereus repandus* produz alcalóides aminos (Oliveira e Machado, 2003; Rocha et al., 2005), ésteres de cera com potencial de aplicação como barreira impermeável (Rezanka e Dembitsky, 1998) e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais (Alvarez et al., 1992, 1995). Além disso, da polpa de *Cereus repandus* são extraídos heteropolissacarídeos que se comportam como polieletrólitos, podendo ser utilizados no tratamento de águas industriais, dada a sua capacidade de flocular partículas coloidais, sem alterar o pH, atuando como coagulantes primários (Nozaki et al., 1993). Os polissacarídeos do tipo arabinogalactanos extraídos de caules de *Cereus repandus* têm sido aplicados como fitoterápicos no tratamento de úlceras gástricas (Tanaka et al., 2010).

2.7. *Cereus hildmannianus* K. Schumann, o mandacaru do sudeste

As plantas mandacaru do sudeste são ditas arbóreas, com 6 metros de altura, em média e com troncos bastante grossos. Possuem caule multiarticulado e com ramificações. Em sua constituição possuem de 4 a 6 costelas por ramo, com aréolas armadas e com a presença de espinhos rígidos e aciculares de coloração escura. O tamanho dos espinhos varia de 10 a 30cm (Ruiz et al., 2010).



Figura 6 - Planta *Cereus hildmannianus* K. Schumann (Projeto Cactáceas Brasileiras, 2010).

Estas plantas, no Brasil, são encontradas em solos arenosos principalmente no Estado de São Paulo e Minas Gerais. O cacto *Cereus hildmannianus*, na região sudeste, é muito utilizado na ornamentação de casas e jardins, como cerca viva em propriedades rurais e como fonte de alimento para algumas comunidades (Costa et al., 2000).

2.8. Isolamento geográfico

De acordo com as considerações de Yamada et al. (2002), a diversidade bioquímica, comportamental e morfológica, dentro de uma população, pode ser interpretada como resultado de modificações na composição genética das populações. Essas modificações podem decorrer da incidência de fatores que geram alelos e/ou genótipos novos, tais como mutação e recombinação gênica, visto que os alelos recém surgidos em uma população podem aumentar sua frequência ou mesmo serem eliminados de uma população por causas determinísticas ou por efeitos estocásticos. Assim, na medida em que as gerações se sucedem, a composição genética de uma população pode ser alterada quando comparada a outras populações intraespecíficas.

Para De Lucca (2006), a composição genética de uma população pode ser alterada devido aos mecanismos de isolamento reprodutivo que acontecem quando há impedimento do fluxo gênico entre populações. Quando uma determinada população se torna reprodutivamente isolada de outras, dentro da mesma espécie, os conjuntos gênicos desses dois grupos passam a divergir devido à atuação particularizada de fatores evolutivos em cada grupo. Segundo Willians (2001), à medida que as gerações acontecem, diferenças substanciais são acumuladas, de modo que o fluxo gênico entre os grupos separados diminui drasticamente ou é cessado. Uma vez que estes mecanismos ocorrem, sugere-se um evento de especiação alopátrica. Este evento pode ocorrer por isolamento geográfico seguido de diversificação genética lenta e conseqüentemente o isolamento reprodutivo das populações ou por divergência genética rápida, por meio do isolamento de fundadores em novos ambientes, chamado de Efeito Fundador.

A distribuição geográfica das plantas da família Cactaceae na América do Sul é descontínua, provavelmente em decorrência de mudanças paleoclimáticas e paleogeomorfológicas a partir do final do período terciário (Vanzolini, 1981). No Brasil, a distribuição geográfica de algumas espécies dessa família é fragmentada e ocorrem em áreas de afloramento rochoso com vegetação de campos rupestres nas regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil. A região sul do Brasil é caracterizada pela ocorrência de diversas áreas fitoecológicas. Esta heterogeneidade de habitat condiciona gradientes ambientais, favorecendo a diferenciação regional. Segundo Robe et al. (2007), a distribuição geográfica das cactáceas na região nordeste e sul do país proporciona a ocorrência de diversas áreas fitoecológicas nessas regiões.

2.9. Marcadores genéticos

2.9.1. Marcadores morfológicos e marcadores bioquímicos

De acordo com os registros de Menezes et al. (2008), até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudo de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos. Em geral, características fenotípicas de variação discreta são utilizadas como marcadores morfológicos desde os tempos de Mendel com fenótipos de fácil identificação visual, como a cor da pétala e morfologia foliar. Os descritores morfológicos são tradicionalmente utilizados na caracterização de cultivares. Porém, o emprego destes descritores apresenta algumas limitações, como o efeito do ambiente, efeitos da ação gênica, pleiotropia e epistasia.

Segundo alguns autores (Patterson et al., 1991; Sousa e Sorrells, 1991; Carvalho et al., 2000), a maioria dos marcadores morfológicos apresenta a desvantagem de identificação porque eles podem ser usados somente em nível de planta inteira ou adulta. Além disso, o ambiente pode modificar a expressão desses marcadores e ocasionar uma interpretação errada dos resultados obtidos. Por isso, alguns marcadores bioquímicos são propostos como alternativa para discriminar geneticamente populações de determinadas espécies. Os marcadores bioquímicos (proteínas, enzimas, ou fragmentos de DNA) podem ser utilizados a partir de amostras de células ou de tecidos de parte de plantas (folhas, embriões, cotilédones, pólen, etc.).

Tais marcadores foram desenvolvidos nas décadas de 60-70 e permitiram que muitas das dificuldades detectadas pelo uso dos marcadores morfológicos fossem resolvidas.

O'donoghue et al. (1994) ressaltaram que as isozimas, freqüentemente usadas como marcadores bioquímicos, compreendem formas moleculares de uma mesma enzima, com funções metabólicas específicas e representam um grupo especializado de proteínas, estando presentes em todos os organismos. Segundo os referidos autores, esses marcadores oferecem vantagens importantes sobre os marcadores morfológicos convencionais. Sua herança é codominante e o heterozigoto é facilmente reconhecido, permitindo que a segregação seja acompanhada de maneira confiável.

No livro texto de Ferreira e Grattapaglia (1995), esses autores explicam que o uso das isozimas, como marcadores genéticos moleculares, baseia-se na premissa de que diferenças na sua mobilidade em um campo elétrico são resultantes de diferenças nas seqüências de DNA que codificam sua seqüência de aminoácidos. Desta forma, estas diferenças são geneticamente herdáveis, já que representam modificações na seqüência do DNA que as codificam. Os autores ressaltam também que o controle genético das isozimas ocorre por meio de vários genes que podem ser alelos de um mesmo loco, ou estar situados em diferentes locos.

Falcão e Contel (1991) destacaram que as variações protéicas e de isozimas são de grande importância nos estudos genéticos como indicadores dos níveis de polimorfismo e relacionamento filogenético, na identificação de raças, espécies e populações, representando, desse modo, uma valiosa ferramenta para estudos evolutivos e taxonômicos. Cavalli-Molina (1984) também destacou que numerosos estudos de locos enzimáticos mostraram a existência de níveis significativos da variação gênica intra e interpopulacional em uma mesma espécie, além de uma diferenciação considerável entre espécies no grau de heterogeneidade isozimática intrapopulacional.

Torggler et al. (1995) e Anti (2000) enfatizaram que, em plantas cujas características de valor adaptativo são, em sua maioria, controladas por muitos genes de pequeno efeito fenotípico, o estabelecimento da correspondência entre variação isozimática e variação fenotípica é difícil de ser compreendido claramente. Nos estudos de DNA, entretanto, essa relação estaria ainda mais distante, além de ser muito

pouco conhecida em plantas. Desse modo, nas décadas de 80-90, postulava-se que o papel das isozimas como marcadores genéticos seria de valor indiscutível para as diversas áreas básicas de pesquisa genética em plantas. Postulava-se ainda que, para o futuro, as isozimas apresentariam um enorme potencial para serem usadas junto com marcadores moleculares (Clegg et al., 1990), monitorando o mapeamento de características quantitativas (Tanksley e Orton, 1983).

Agüero (2002) destacou que numerosos estudos de locos enzimáticos mostraram a existência de níveis significativos da variação gênica intra e interpopulacional em uma mesma espécie, além de uma diferenciação considerável entre espécies no grau de heterogeneidade isozimática intrapopulacional.

2.9.2. Isozimas esterases em *Cereus repandus*

As isozimas esterases apresentam especificidade por substratos diferentes, de modo que o uso destes substratos separadamente ou combinados pode evidenciar vários locos simultaneamente e os respectivos alelos destes locos em uma ou mais populações (Tanksley e Orton, 1983; Soltis e Soltis, 1989). Desta forma, o estudo de variações genéticas nos diferentes locos pode ser analisado simultaneamente.

A eletroforese em gel de poliacrilamida para a análise de isozimas esterases, denominada de sistema PAGE (*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*), foi inicialmente desenvolvida para a classificação bioquímica e funcional das esterases em vertebrados e insetos, particularmente em espécies do gênero *Drosophila* (Healy et al., 1991; Lapenta et al., 1995; 1998). Porém, esta técnica já foi empregada para analisar isozimas α - e β -esterases em diferentes espécies de plantas (Pereira et al., 2001; Carvalho et al., 2003; Orasmo et al., 2007; Frigo et al., 2009).

Recentemente, o sistema PAGE foi aplicado para o estudo de isozimas α - e β -esterases em populações de *Cereus repandus* descendentes de plantas cultivadas e de plantas regeneradas *in vitro* (Faria et al., 2011). Nesse trabalho, foi possível evidenciar 14 locos para as isozimas α - e β -esterases e um polimorfismo em sete locos em populações de *Cereus*, que foi analisado para estimar a diversidade genética e verificar de que forma as populações desta espécie, cultivadas e regeneradas *in vitro*, estão geneticamente estruturadas.

Para a caracterização bioquímica das esterases, utilizando o sistema PAGE, são usados os substratos ésteres de α - e β -naftil acetato, que permitem uma classificação das esterases de acordo com a preferência das isozimas por α - e/ou β -naftil acetate (Johnson et al., 1966; Steiner e Johnson, 1973). Para a caracterização funcional da atividade das isozimas esterases, a literatura recomenda o uso dos inibidores ácido *p*-cloromercuriobenzoato (*p*CMB), organofosforados (OPs) e sulfato de eserina (Holmes e Masters, 1967). O uso desses inibidores permite identificar isozimas acetilesterases, carboxilesterases, arilesterases e colinesterases. As arilesterases são inibidas por *p*CMB; as colinesterases são inibidas por OPs e por sulfato de eserina; as carboxilesterases são inibidas por OPs, mas não inibidas pelo sulfato de eserina; e as arilesterases não são inibidas por estes grupos de substâncias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (sistema PAGE: Polyacrilamide Gel Electrophoresis)

A diversidade genética presente nas plantas de mandacaru do sul, do sudeste e mandacaru do nordeste foi avaliada por meio de marcadores bioquímicos representados, neste trabalho, pelas isozimas α - e β - esterases. Para a extração das isozimas, utilizou-se aproximadamente 200 mg de tecidos de caules de 601 plântulas de mandacaru, sendo 460 plântulas provenientes da germinação de sementes dos frutos de plantas de mandacaru presentes em 14 localidades na região de Maringá, Estado do Paraná, sul do Brasil; 135 plântulas oriundas de sementes de frutos de plantas de mandacaru presentes em 6 localidades na região de Picos, estado do Piauí, no nordeste do Brasil; e de 6 plântulas provenientes de sementes de frutos de uma planta de mandacaru presente em 1 localidade na ilha da Juréia em 1 localidade, Estado de São Paulo, região sudeste do Brasil.



Figura 7 - Amostra de plântulas do gênero *Cereus* produzidas a partir de sementes coletadas de uma população de cactos em estudo.

As sementes coletadas de cada população foram esterilizadas, durante cinco minutos, em detergente comercial, lavadas em água destilada e, posteriormente, incubadas por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial. Após serem esterilizadas, as sementes foram levadas para a câmara de fluxo laminar e lavadas por três vezes em água destilada. Em seguida, foram inoculadas em frascos de vidro contendo meio de cultura preparado segundo o protocolo de Knudson (1946) (Quadro 1). Os frascos foram vedados com filme de PVC e acondicionados durante seis meses, em temperatura ambiente, em estantes no Laboratório de Eletroforese e Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá. As sementes germinaram e, após seis meses, produziram plântulas (Figura 7), as quais foram usadas para representar populações de mandacaru descendentes das plantas regionais.

Quadro 1 - Composição de macro e micronutrientes de meio de cultura segundo o protocolo de Knudson (1946)

Composição	1000 mL de meio de cultura (g/L)
Macronutrientes	
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1,00000
KH ₂ PO ₄	0,25000
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,25000
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50000
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,02500
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0,00750
Complementado com micronutrientes:	
H ₃ BO ₃	0,00056
MoO ₃	0,00016
CuSO ₄	0,00040
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,00331
Sacarose	2%
Ph	5,4

As amostras dos caules das plântulas foram pesadas e homogeneizadas em tubo para microcentrífuga. Em cada tudo, foi usado 20 µL de solução de extração gelada preparada com tampão fosfato de sódio 1,0 M pH 7,0, PVP-40 5%, EDTA 1,0

mM, β -mercaptoetanol 0,5% e glicerol 10% (Quadro 2). As amostras foram maceradas com bastão de vidro em banho de gelo e, em seguida, centrifugadas em centrífuga refrigerada, durante 30 minutos com 14.000 r.p.m. na temperatura de 4°C.

Quadro 2 - Composição da solução usada na extração das isozimas α - e β - esterases de caules de plântulas de mandacaru

Solução de Extração	
Tampão fosfato de sódio 1,0 M pH 7,0	890 μ L
PVP-40 5%	50 mg
EDTA 1,0 mM	10 μ L
B-mercaptoetanol	5 μ L
Glicerol	50 μ L

Os géis de poliacrilamida de separação e empilhamento utilizados neste trabalho foram preparados segundo o protocolo descrito por Faria et al. (2011). Os géis de separação foram preparados com uma concentração de 12% de acrilamida e os volumes das soluções-estoque para o preparo destes géis foram preparados conforme descrito no Quadro 3, e para o preparo dos géis de empilhamento conforme descrito no Quadro 4. Uma alíquota de 45 μ L do sobrenadante de cada amostra foi aplicada em cada poço do gel. Para os eletrodos, foi utilizado tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3. As condições da eletroforese foram adequadas usando como referência os padrões estabelecidos por Pereira et al. (2001), a migração foi realizada por cinco horas a 200 V na fonte.

Quadro 3 - Volumes das soluções-estoque utilizadas para o preparo dos géis de separação para analisar as α - e β -esterases de mandacaru

Solução Estoque	Volume
Solução acrilamida/bisacrilamida*	6,2 mL
Solução Tampão (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8)	4,0 mL
Água destilada	5,7 mL
Persulfato de amônia 2%	0,320 mL
TEMED	25 μ L

* A solução-estoque de acrilamida/bisacrilamida foi filtrada com 30 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida, dissolvidas em 100mL de água destilada.

Após a eletroforese, os géis foram incubados em 50 mL de uma solução tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 6,2, por 30 minutos a temperatura ambiente. Para evidenciar as isozimas α - e β -esterases, os géis foram transferidos para uma solução de 50 mL do mesmo tampão fosfato de sódio acrescida de 40 mg de β - naftil acetato, 40 mg de α -naftil acetato (ésteres dissolvidos em 1 mL de acetona), 60 mg do corante Fast Blue RR salt e 5 mL de N-propanol e, em seguida, incubados por 60 minutos em estufa a 37°C. Após a coloração, os géis foram fixados, em temperatura ambiente, durante 1-24 horas em solução de ácido acético 7,5% e glicerol 1%; e, posteriormente, embebidos com gelatina 5%, acondicionados entre duas folhas esticadas de papel celofane e colocados para secar por 24-48 horas.

Quadro 4 - Volumes das soluções-estoque utilizadas para o preparo dos géis de empilhamento para analisar as α - e β -esterases de mandacaru

Solução Estoque	Volume
Solução acrilamida/bisacrilamida*	3,0 mL
Tampão Tris-HCl 0,24M pH 6,8	3,0 mL
Água destilada	30 μ L
TEMED	3,0 μ L
Persulfato de Amônia 2%	250 μ L

* A solução-estoque de acrilamida/bisacrilamida foi filtrada com 5 g de acrilamida e 0,25 g de bisacrilamida, dissolvidas em 50mL de água destilada.

3.2. Análise dos dados

Após a revelação das regiões de atividade das isozimas α - e β -esterases, foram estimados as frequências dos alelos e os parâmetros de diversidade genética, foram: proporção de locos polimórficos, o número médio de alelos por loco polimórfico, a heterozigosidade média observada (H_o) e a esperada (H_e) para as populações de plântulas de mandacaru provenientes das sementes coletadas de plantas da cidade de Maringá, da cidade de Picos, e da praia da Juréia. O afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi examinado em cada loco polimórfico para cada população. O déficit de heterozigotos (F_{is}), o coeficiente de endogamia (F_{it}), a diversidade genética entre as populações (F_{st}) e o fluxo gênico entre as populações (N_m) foram estimados

empregando-se o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999). Também foram estimadas a identidade genética de Nei e as distâncias entre todos os pares de acessos. Cada loco foi representado pela denominação *Est* acompanhado de um número arábico (ex.: *Est-1* e *Est-2*) e os alelos foram sobrescritos aos seus respectivos loco (ex.: *Est-1¹*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia das plantas adultas de mandacaru da região de Maringá (Figura 8) e da planta da região da praia da Juréia é similar à morfologia das plantas adultas de mandacaru localizadas em Picos (Figura 9), na região nordeste do Brasil, no que se refere ao número de costelas e a disposição das aréolas. Nas 50 plantas de mandacaru de Maringá, na planta da praia da Juréia e nas 45 plantas de mandacaru de Picos, foi observado um número de costelas variando de 4-6, dependendo do estágio de desenvolvimento dos caules. Os caules mais jovens apresentaram 4 costelas e, durante o crescimento desses caules, observou-se que este número aumenta para 5 e finalmente para 6 costelas nos maiores ramos.



Figura 8 - Fotografia de uma planta de mandacaru localizada na cidade de Maringá, Estado do Paraná, região sul do Brasil.

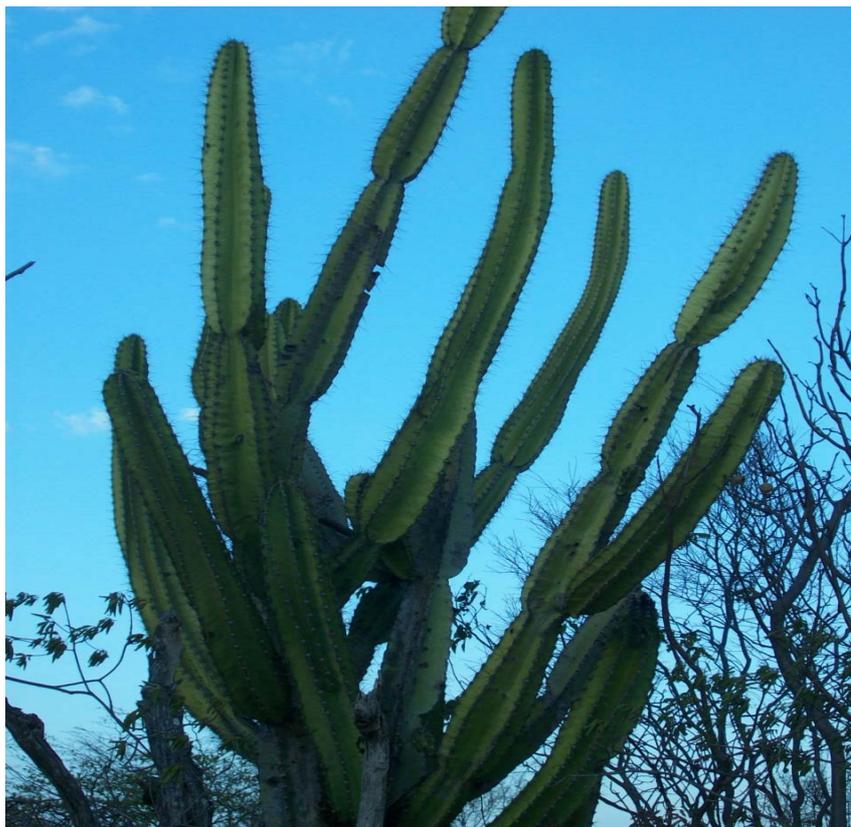


Figura 9 - Fotografia de uma planta de mandacaru localizada na cidade de Picos, Estado do Piauí, região nordeste do Brasil.

A análise das isozimas α - e β -esterases das plântulas de mandacaru formadas a partir das sementes de plantas coletadas nas cidades de Maringá, Picos, e na praia da Juréia, mostraram os 14 locos previamente descritos por Faria et al. (2011) em plântulas cultivadas de *C. repandus*. Os 14 locos foram numerados em ordem decrescente em direção ao ânodo, de modo que o loco menos anódico foi denominado *Est-14* e o mais anódico foi denominado *Est-1* (Figuras 10 e 11). No trabalho de Faria et al. (2011), dos 14 locos obtidos, somente 7 locos foram passíveis de interpretação que foram: *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4*, *Est-5*, *Est-6* e *Est-14*.

Os alelos produtos do loco *Est-1* foram evidentes somente na população de plantas da região de Maringá. Neste loco, foi observado um polimorfismo determinado por 2 alelos no loco *Est-1* das plantas cultivadas no Estado do Paraná, mas o produto do referido loco apresentou uma coloração muito fraca, ou foi ausente, nas plântulas de mandacaru provenientes das regiões nordeste e sudeste. Por isso o polimorfismo do loco *Est-1* não foi analisado no presente estudo.

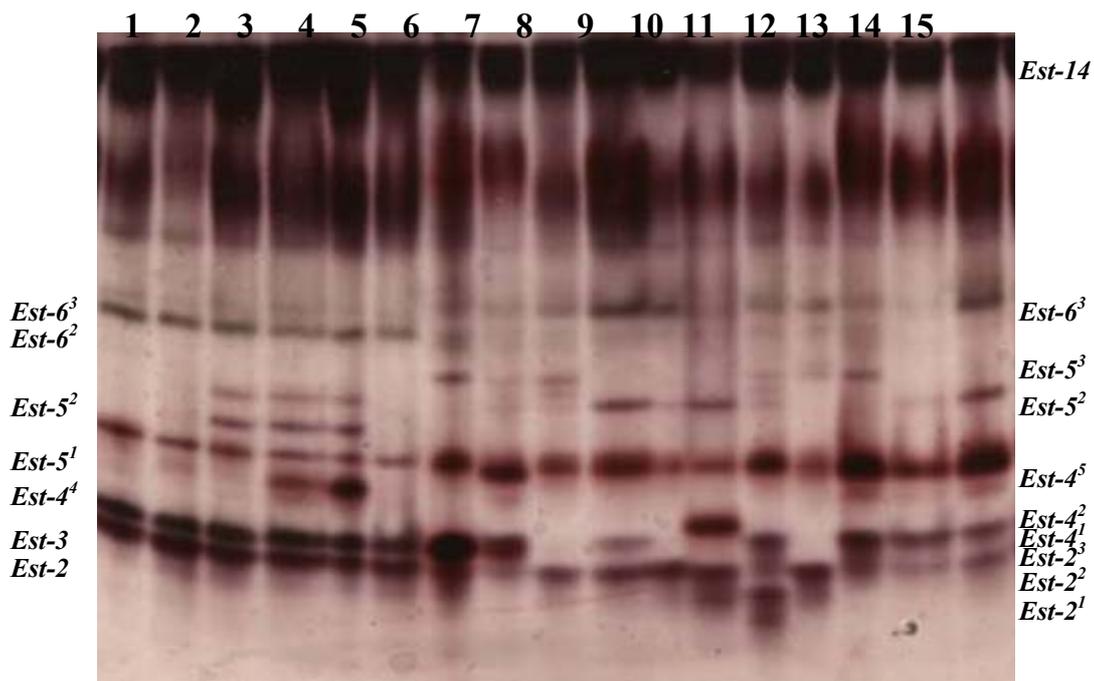


Figura 10 - Isoesterases avaliadas em gel de poliacrilamida para 17 plântulas de mandacaru, crescidas a partir de sementes coletadas de plantas localizadas na região de Maringá (1 a 6) e na região de Picos (7 a 17).

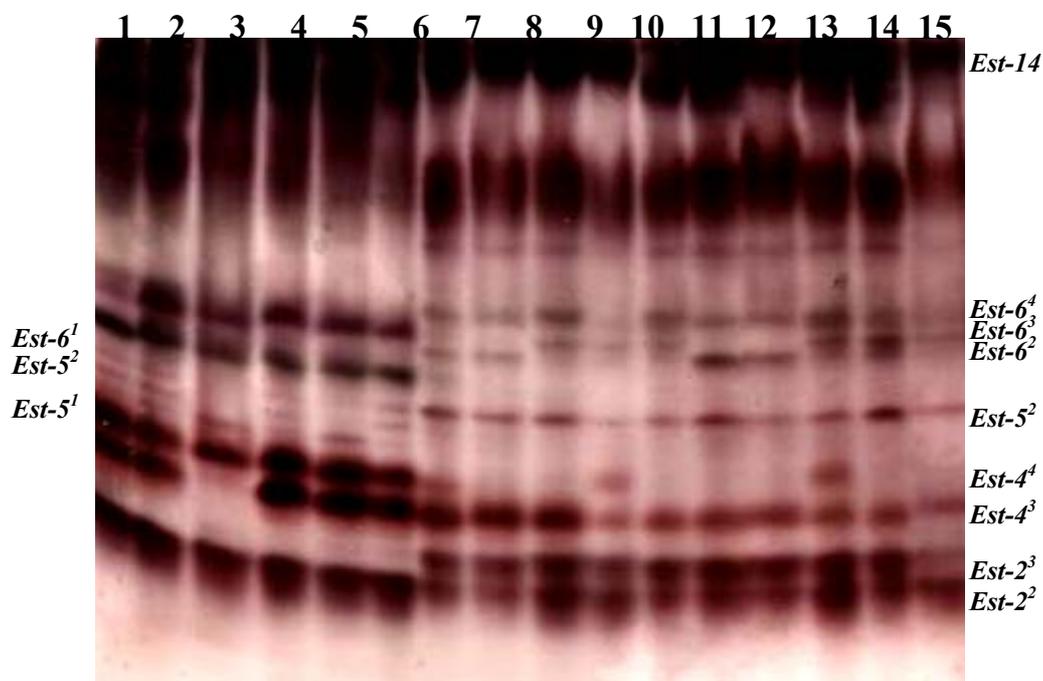


Figura 11 - Isoesterases avaliadas em gel de poliacrilamida para 16 plântulas de mandacaru, crescidas a partir de sementes coletadas de plantas cultivadas na praia da juréia (1 a 6) e na região de Picos (7 a 16).

O produto do loco *Est-3* observado nas plântulas provenientes da cidade de Maringá também não foi encontrado nas amostras provenientes da região de Picos e da praia da Juréia. *Est-3ⁿ* (nulo) foi verificado por Faria et al. (2011) em 10,62% de plantas obtidas *in vitro*. Embora não seja possível decifrar o significado de alelos nulos no loco *Est-3*, tal evidência mostrou que o referido loco também é polimórfico. Desta forma, foi possível verificar nas plântulas do gênero *Cereus* das três regiões, polimorfismos nos locos *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4*, *Est-5*, *Est-6* e *Est-14*. A proporção de locos polimórficos para α - e β -esterases foi de 57,14%. O polimorfismo nos locos *Est-2*, *Est-4*, *Est-5*, *Est-6* e *Est-14*, considerados como claros e bem definidos nas plântulas das três regiões, foram usados para comparar estes três grupos de mandacaru.

As frequências genóticas dos alelos nos locos *Est-2*, *Est-4*, *Est-5*, *Est-6* e *Est-14*, das plântulas das regiões sul, nordeste, e sudeste, estão registradas no Quadro 5. Os alelos *Est-2¹*, *Est-5³* e *Est-14⁴* foram encontrados somente na população de mandacaru proveniente de Picos. Desta forma, os locos *Est-2*, *Est-3*, *Est-5* e *Est-14* podem ser classificados como locos diagnósticos usados para discriminar plantas de mandacaru de Picos das plantas de Maringá.

A maior diversidade genética representada pelos parâmetros, número efetivo de alelos ($N_e = 3,58$) e pelo valor da heterozigiosidade média esperada foi constatada no loco *Est-4* nas populações de mandacaru de Maringá, no Paraná ($H_e = 0,7207$), e de Picos, no Piauí ($H_e = 0,7411$) (Quadro 6, 7 e 8). Na população de plântulas de Maringá, o valor maior de heterozigiosidade média observada foi detectado no loco *Est-14* ($H_o = 0,5812$), e na população de Picos o maior valor foi observado no loco *Est-2* ($H_o = 0,6074$). Os valores negativos de F_{is} nos locos *Est-5* (-0,0257) e *Est-14* (-0,0881) indicam excesso de genótipos heterozigotos nestes locos, enquanto que os valores positivos nos locos *Est-4* (0,4777) e *Est-6* (0,4085) apontam para um déficit de heterozigotos (Quadro 6). Um excesso de genótipos heterozigotos pode ser explicado em razão da auto-incompatibilidade descrita para a espécie *C. repandus*. Silva e Sazima (1995) descreveram a auto-incompatibilidade em plantas de *C. repandus*, e um sistema de polinização cruzada obrigatório foi descrito como essencial para a reprodução nesta espécie (Mizrahi et al., 1997). Por outro lado, o déficit de heterozigotos nos locos *Est-4* e *Est-6* é uma indicação de que genótipos homozigotos

para α - e β -esterases nestes locos podem ter um significado fisiológico importante para a manutenção das plantas, e por isso estariam sendo alvo de seleção natural, ou artificial pelo homem, como resultado de propagação clonal.

Quadro 5 - Distribuição dos alelos nos locos *Est-2*, *Est-4*, *Est-5* e *Est-14* nas populações de plântulas descendentes de plantas de mandacaru localizadas na região de Maringá, Picos e praia da Juréia

Loco	Alelos	Maringá	Picos	Praia da Juréia
<i>Est-2</i>	1	-	0,0444	
	2	1,0000	0,6444	1,0000
	3	-	0,2630	
	4	-	0,0481	
EHW		-	13.660**	-
<i>Est-4</i>	1	0,0139	0,0110	-
	2	0,1051	0,1471	-
	3	0,3707	0,3051	0,4167
	4	0,2691	0,2684	0,5833
	5	0,2413	0,2684	-
EHW		318.4793**	46.7127**	2.3809 ^{NS}
<i>Est-5</i>	1	0,5944	0,1397	0,6667
	2	0,4036	0,7794	0,3333
	3	-	0,0809	-
EHW		0.2789 ^{NS}	53.1752**	1.0714 ^{NS}
<i>Est-6</i>	1	0,0524	-	0,8333
	2	0,7585	0,5376	-
	3	0,1880	0,2594	-
	4	-	0,2680	0,1667
	5	0,0011	-	-
EHW		176,3032**	20,9293**	0,1111 ^{NS}
<i>Est-14</i>	1	0,3668	0,1306	-
	2	0,5598	0,1306	-
	3	0,0534	0,3433	-
	4	-	0,3955	-
EHW		32,7844**	127,2282**	0,1111 ^{NS}

Est – esterase. EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg. **Significativo para $P < 0,05$, indicando a ausência do equilíbrio de Hardy-Weinberg. NS: não significativo, indicando equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As esterases produtos do loco *Est-4* foram classificadas por Faria et al. (2011) como β -esterases preferenciais, por hidrolisar preferencialmente o substrato β -naftil acetato em presença dos substratos α - e β -naftil acetato, e com atividade arilesterases e

carboxilesterases. As esterases do loco *Est-6* foram caracterizadas como sendo α -esterases específicas (hidrolisam especificamente o substrato α -naftil acetato) e mostraram atividade carboxilesterases. A atividade das carboxilesterases em plantas tem sido correlacionadas com processos de diferenciação (Gahan et al., 1983; Melati et al., 1996) e com processos de sinalização celular (Stuhlfelder et al., 2002).

Os ésteres produzidos pelas plantas para atrair polinizadores e/ou para deter herbívoros têm sido sugeridos como os substratos para as carboxilesterases em plantas (Pichersky e Gershenzon, 2002). Os processos de interação planta-patógeno e a supressão da morte celular programada associada com respostas de hipersensibilidade durante ataques por patógenos também foram relacionados com a atividade de carboxilesterases (Marshall et al., 2003). Desta forma, é possível supor que genótipos homozigotos específicos para carboxilesterases dos locos *Est-4* e *Est-6* possam estar sendo preferencialmente selecionados, de acordo com as funções fisiológicas específicas destas isozimas.

Quadro 6 - Diversidade genética obtida para cada loco em populações de plantas de mandacaru localizadas na região de Maringá (PR)

Loco	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{is}
<i>Est-2</i>	1	1	0,0000	0,0000	-
<i>Est-4</i>	5	3,58	0,3764	0,7207	0,4777
<i>Est-5</i>	2	1,93	0,4946	0,4872	-0,0257
<i>Est-6</i>	4	1,63	0,2286	0,3865	0,405
<i>Est-14</i>	3	2,14	0,5812	0,5342	-0,0881
TOTAL	3	2,14	0,3362	0,4247	

N_a - número de alelos, N_e - número efetivo de alelos, H_e - heterozigosidade média esperada, (H_o) - heterozigosidade observada e F_{is} - coeficiente médio de endogamia.

Os locos *Est-2*, *Est-4*, *Est-5*, *Est-6*, e *Est-14* analisados apresentaram 20 alelos, com uma média de 1,42 alelos por loco e 4,2 alelos por loco polimórfico. A proporção de locos polimórficos, o número médio de alelos por locos (N_a), o número efetivo de alelos (N_e) e os valores estimados para a heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) nas plântulas de mandacaru das três regiões do Brasil estão relacionados

no Quadro 9. A diversidade genética maior, traduzida pela proporção de locos polimórficos, pelos valores de N_a e N_e , e valores de H_o e H_e , foi maior na população de plântulas da região de Picos, nordeste do Brasil. A diversidade genética menor foi observada nas plântulas da praia da juréia, sudeste do Brasil. Entretanto, o resultado verificado na população representante de Juréia pode ser considerado questionável e merece investigações adicionais devido ao número de amostras de plântulas reduzido (somente seis plântulas), procedente da referida região. Um excesso de genótipos heterozigotos foi observado apenas nas plântulas da praia da juréia.

Quadro 7 - Diversidade genética obtida para cada loco em populações de plantas de mandacaru localizadas na região de Picos (PI)

Loco	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{is}
<i>Est-2</i>	4	2,04	0,6074	0,5112	-0,1881
<i>Est-4</i>	5	3,86	0,5147	0,7411	0,3055
<i>Est-5</i>	3	1,57	0,3068	0,3665	0,1573
<i>Est-6</i>	3	2,51	0,4511	0,6025	0,2512
<i>Est-14</i>	4	3,24	0,3134	0,6916	0,5468
TOTAL	3,8	2,64	0,4391	0,5826	

N_a - número de alelos, N_e - número efetivo de alelos, H_e - heterozigosidade média esperada, (H_o) - heterozigosidade observada e F_{is} - coeficiente médio de endogamia.

A ocorrência de alelos exclusivos observados nas plântulas de mandacaru de Maringá (*Est-3*) e de Picos (*Est-2¹*, *Est-2³*, *Est-2⁴*, *Est-5³* e *Est-14⁴*) e a frequência diferencial dos vários alelos nas referidas populações, e também na população proveniente de Juréia, determinaram uma significativa diferenciação genética entre as populações de mandacaru. A diferenciação genética entre as plântulas das três regiões brasileiras foi alta ($F_{st} = 0,2132$; Quadro 10). Valores de $F_{st} > 0.20$ indicam um nível de divergência populacional alto (Wright, 1978), ou seja, uma alta diferenciação genética entre as plântulas das três regiões do Brasil. O coeficiente de endogamia (F_{it}) foi igual a 0,2691 e o déficit de heterozigotos (F_{is}) foi de apenas 0,0711. Um excesso de genótipos heterozigotos foi verificado apenas nos locos *Est-2* e *Est-5*. O valor de fluxo gênico também foi baixo ($N_m = 0,9227$) de acordo com uma expectativa em

razão das distâncias geográficas distintas entre as três regiões do Brasil, mais pronunciada entre as regiões sul e nordeste do Brasil.

Quadro 8 - Diversidade genética obtida para cada loco em populações de plantas de mandacaru localizadas na praia da Juréia (SP)

Loco	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{is}
<i>Est-2</i>	1	1,0	0,0000	0,0000	-
<i>Est-4</i>	2	1,94	0,8333	0,4861	-0,7143
<i>Est-5</i>	2	1,80	0,6667	0,4444	-0,5000
<i>Est-6</i>	2	1,38	0,3333	0,2778	-0,2000
<i>Est-14</i>	2	1,38	0,3333	0,2778	0,2000
Total	1,8	1,5	0,4333	0,2972	

N_a - número de alelos, N_e - número efetivo de alelos, H_e - heterozigosidade média esperada, (H_o) - heterozigosidade observada e F_{is} - coeficiente médio de endogamia.

As relações de similaridade entre as plantas das três regiões sul, sudeste, e nordeste apresentaram valores de identidade variando de 0,5992 (entre as plântulas das regiões sudeste e nordeste) a 0,7787 (entre as plantas das regiões Sul e Nordeste) (Quadro 11).

Quadro 9 - Comparação da diversidade genética entre populações de plantas localizadas nas regiões de Maringá, Picos e praia da Juréia

Populações	N	$N_{(pl)}$	%P	N_a	N_e	H_o	H_e
Maringá	460	4	28,57	3,00	2,06	0,3362	0,4247
Picos	135	5	35,71	3,80	2,65	0,4391	0,5826
Juréia	6	4	28,57	1,80	1,50	0,4333	0,2972
TOTAL	601	5	35,71	4,20	2,33	0,3602	0,5020

N – número de plântulas, $N_{(pl)}$ – número de locos polimórficos, %P – proporção de locos polimórficos, N_a - número de alelos, N_e - número efetivo de alelos, H_e - heterozigosidade média esperada e (H_o) - heterozigosidade observada.

O nível de identidade observado para estas populações de plântulas é inferior a 0,85. Conforme descrito por Thorpe e Solé-Cava (1994), valores de identidade

genética inferiores a 0,85 são freqüentemente encontrados para espécies geograficamente distantes em processo de especiação, ou para espécies co-genéricas (espécies diferentes do mesmo gênero). De acordo com este postulado, as plantas de mandacaru encontradas nas regiões de Maringá, Picos e na praia da juréia podem corresponder a espécies diferentes: *C. repandus*, *C. hildmanianus*, e *C. jamacaru*, respectivamente, conforme vem sendo denominado por pesquisadores das referidas regiões, a despeito de apresentarem morfologia similar no que diz respeito ao número de costelas (variando de 4 a 6-7, dependendo da idade e desenvolvimento dos caules) e distribuição dos botões axilares similares.

Quadro 10 - Diferenciação genética entre as populações de mandacaru das regiões de Maringá, Picos e praia da Juréia

Loco	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
<i>Est-2</i>	-0,1881	0,0575	0,2067	0,9592
<i>Est-4</i>	0,1147	0,1691	0,0614	3,8188
<i>Est-5</i>	-0,1369	0,0668	0,1791	1,1455
<i>Est-6</i>	0,2003	0,5097	0,3869	0,3961
<i>Est-14</i>	0,1833	0,4179	0,2872	0,6204
TOTAL	0,0711	0,2691	0,2132	0,9227

F_{it} – coeficiente de endogamia, F_{it} – diversidade entre populações, F_{is} – déficit de heterozigotos e N_m – valor de fluxo gênico.

Segundo Vanzolini (1981), a distribuição de plantas de cactos na América do Sul, onde se inclui o Brasil, é descontínua devido a prováveis mudanças paleoclimáticas e paleogeomorfológicas a partir do final do período terciário. A descontinuidade deve ter levado ao isolamento reprodutivo onde o fluxo gênico diminui gradativamente e, após sucessivas gerações, onde diferenças substanciais são acumuladas, os conjuntos gênicos dos grupos isolados passaram a divergir por ação diferencial de fatores evolutivos em cada grupo (Willians, 2001), resultando em um evento de especiação em mandacaru.

É possível que as diferenças entre as plantas de mandacaru das três regiões brasileiras sejam conseqüências de processos de especiação, devido ao isolamento

geográfico. Por outro lado, as diferenças nos níveis de diversidade genética entre as plantas de mandacaru das referidas regiões podem estar associadas a diferenças na forma primária de propagação, sexual ou clonal (Chung e Epperson 2000; Chung et al., 2000), a fatores históricos (Hamrick e Godt 1996; Nason et al., 2002), a características específicas de regiões (Young, 1995), e/ou à ação evolutiva diferencial (Hamrick et al., 1992). A forma de propagação descrita em *C. repandus* é sexual, por sementes, onde o sistema de polinização cruzada é necessário para a reprodução da espécie (Silva e Sazima, 1995; Mizrahi et al., 1997), ou vegetativa, sendo esta última considerada predominante em populações urbanas. A auto-incompatibilidade também descrita em *C. repandus* (Silva e Sazima, 1995) poderia explicar a significativa proporção de fenótipos heterozigotos.

Quadro 11 - Relações de similaridade entre as populações das regiões de Maringá, Picos e praia da Juréia

População	Maringá	Picos	Juréia
Maringá	****	0,7787	0,6367
Picos	0,2502	****	0,5992
Juréia	0,4514	0,5121	****

As plantas de mandacaru provenientes de Picos apresentaram níveis de diversidade genética maiores, considerando os parâmetros analisados no presente estudo: número de alelos e heterozigosidade média (Quadros 12 e 13). Esta maior diversidade genética encontrada nas plantas de mandacaru de regiões xerófitas (caatinga) poderia ser justificada por uma forma de propagação predominante por sementes; isto resultaria em maior diversidade genética quando comparada com plantas predominantemente propagadas de forma vegetativa. As plantas parentais analisadas na cidade de Maringá são urbanas, cultivadas em jardins, e a forma predominante de propagação parece ser clonal, por mudas que são aleatoriamente distribuídas por seleção artificial do homem.

Por outro lado, a germinação de sementes e manutenção de plântulas em cactos colunar é descrita como sendo fortemente limitada por fatores climáticos, tais

como a umidade de solos (Rojas-Aréchiga e Vázquez-Yanes, 2000; Rojas-Aréchiga et al., 2001) e, neste contexto, as diferenças regionais entre sul e nordeste estariam favorecendo o processo de germinação de sementes de plantas de mandacaru da região sul, caracterizado por maior índice pluviométrico. O clima seco e árido da região da caatinga no nordeste não poderia explicar uma maior proporção de plantas crescidas de sementes, para justificar uma maior diversidade genética nas referidas populações.

Há evidências de que a taxa de germinação das sementes coletadas de plantas mantidas em Maringá e em Picos foi similar após 4 dias em condições de laboratório e o número de sementes germinadas não foi significativamente diferente. Mas, após oito dias da distribuição das sementes nas condições para a germinação, o número de sementes de plantas da região Sul que germinaram foi significativamente maior do que o número de sementes germinadas obtidas de plantas da região nordeste do país (Bevilaqua, 2010).

Quadro 12 - Análise de populações formadas por plântulas crescidas de sementes produzidas por 14 plantas localizadas na região de Maringá (PR)

Populações	N	$N_{(pl)}$	%P	N_a	N_e	H_o	H_e
P1	20	5	35,71	3,20	1,915	0,3800	0,4437
P2	42	5	35,71	3,20	2,35	0,5398	0,5276
P3	21	5	35,71	3,00	1,90	0,3714	0,4175
P4	32	5	35,71	3,80	2,26	0,3796	0,5479
P5	21	5	35,71	3,60	2,11	0,4519	0,5107
TOTAL	135	5	35,71	3,80	2,65	0,4391	0,5826

N – número de plântulas, $N_{(pl)}$ – número de locos polimórficos, %P – proporção de locos polimórficos, N_a - número de alelos, N_e - número efetivo de alelos, H_e - heterozigosidade média esperada e (H_o) - heterozigosidade observada.

As considerações expostas acima parecem contrariar a hipótese de que a reprodução das plantas de mandacaru nas regiões áridas do nordeste seja predominantemente de forma sexuada. Entretanto, é importante ressaltar que, como os testes de germinação das sementes foram feitos em condições *in vitro*, é possível admitir que, em condições naturais e locais específicos, as respostas das sementes às

condições para a germinação não sejam as mesmas das observadas *in vitro*. Assim, é possível que as sementes de mandacaru da região nordeste estejam adaptadas ao clima árido do nordeste e as condições *in vitro* não são as mais adequadas para estimular a germinação destas.

Quadro 13 - Análise de populações formadas por plântulas crescidas de sementes produzidas por 14 plantas localizadas na região de Maringá (PR)

Populações	N	N _(pl)	%P	N _a	N _e	H _o	H _e
P1	32	4	28,57	2,20	1,85	0,3625	0,3582
P2	32	4	28,57	2,40	1,74	0,375	0,3554
P3	30	4	28,57	2,40	1,92	0,4200	0,3857
P4	26	3	21,42	2,00	1,55	0,3231	0,2892
P5	40	3	21,42	1,60	1,46	0,4062	0,2553
P6	34	3	21,42	1,80	1,64	0,1733	0,3083
P7	35	4	28,57	2,80	1,75	0,3771	0,3469
P8	30	4	28,57	2,40	1,94	0,2800	0,4017
P9	35	4	28,57	2,00	1,47	0,4171	0,2831
P10	26	4	28,57	1,80	1,40	0,3769	0,2472
P11	26	4	28,57	2,20	1,75	0,4385	0,3797
P12	35	4	28,57	2,20	2,02	0,3886	0,4390
P13	35	4	28,57	2,60	1,75	0,2686	0,3581
P14	43	4	28,57	2,20	1,64	0,1762	0,3195
TOTAL	460	4	28,57	3,00	2,05	0,3362	0,4247

N – número de plântulas, N_(pl) – número de locos polimórficos, %P – proporção de locos polimórficos, N_a - número de alelos, N_e - número efetivo de alelos, H_e - heterozigosidade média esperada e (H_o) - heterozigosidade observada.

Portanto, é possível admitir que a forma predominante de propagação sexual por sementes de mandacaru de Picos podem explicar a maior diversidade genética encontrada no estudo dos locos das α - e β -esterases destas populações de plantas. Fatores históricos postulados, tais como a região nordeste do país ser o centro de origem das plantas de mandacaru e a ação evolutiva diferencial, imposta por diferenças edafoclimáticas regionais, também poderiam ser usados para justificar uma maior diversidade genética nas plantas de mandacaru encontradas em Picos.

Entretanto, estas são especulações que merecem ser futuramente investigadas. Informações das diferenças históricas e climáticas entre as duas regiões serão necessárias para analisar os possíveis efeitos destes fatores na determinação de mais altos níveis de variabilidade genética em plantas de mandacaru da região nordeste do Brasil.

A análise de populações formadas por plântulas crescidas de sementes produzidas por 5 plantas cultivadas em Picos mostrou que a divergência genética entre as 5 populações formadas ($F_{st} = 0,1475$) é menor que a divergência genética entre populações descendentes de plantas de mandacaru cultivadas na região de Maringá (Quadros 14 e 15). A análise de populações formadas por plântulas crescidas de sementes produzidas por 14 plantas cultivadas em Maringá mostrou que a divergência genética entre as 14 populações formadas é alta ($F_{st} = 0,2021$), enquanto, entre as populações de Picos, a divergência genética pode ser caracterizada como moderada (Wright, 1978).

Quadro 14 - Diferenciação genética entre 14 populações de mandacaru provenientes da região de Picos (PI)

Loco	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
<i>EST-2</i>	-0,2579	-0,1265	0,1044	2,1448
<i>EST-4</i>	0,0842	0,2774	0,2110	0,9346
<i>EST-5</i>	0,0903	0,1555	0,0717	3,2344
<i>EST-6</i>	0,1814	0,2718	0,1105	2,0122
<i>EST-14</i>	0,4619	0,5608	0,1838	1,1105
TOTAL	0,1288	0,2573	0,1475	1,4446

F_{it} – coeficiente de endogamia, F_{is} – déficit de heterozigotos, N_m – valor de fluxo gênico.

A despeito dos mais altos níveis de diversidade genética encontrados nas plântulas de mandacaru de Picos, a base genética estimada a partir dos valores de coeficientes de identidade, ou similaridade (Nei, 1978), também foram menores entre as 5 populações descendentes de Picos; os valores de identidade foram entre 0,7412 e 0,9149, onde somente 10% das comparações mostraram plantas com valores de

identidade superiores a 0,90. Os valores de identidade estimados entre as populações formadas por sementes da região de Maringá estiveram no intervalo entre 0,7193 e 0,9944 onde 36,66% das comparações apresentaram valores de identidade superiores a 0,90.

Quadro 15 - Diferenciação genética entre 14 populações de mandacaru provenientes da região de Maringá (PR)

LOCO	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
<i>EST-2</i>	-	-	0,0000	-
<i>EST-4</i>	0,2853	0,4759	0,2667	0,6872
<i>EST-5</i>	-0,1926	-0,0318	0,1348	1,6050
<i>EST-6</i>	0,0853	0,3836	0,3261	0,5166
<i>EST-14</i>	-0,2020	-0,0987	0,0859	2,6592
TOTAL	-0,0036	0,1993	0,2021	0,9870

F_{it} – coeficiente de endogamia, F_{is} – déficit de heterozigotos, N_m – valor de fluxo gênico.

A maior divergência genética entre as populações formadas a partir das sementes de mandacaru de Maringá pode ser resultado de uma ampla divergência entre plantas parentais de origens diferentes. E essa divergência pode ser determinada por heterogeneidade ambiental, considerando ser a região Sul do Brasil caracterizada pela ocorrência de diversas áreas fitoecológicas (Ramos, 2007), e/ou pela forma de propagação vegetativa predominante na região urbana de Maringá.

5. CONCLUSÃO

- a) As enzimas α - e β -esterases analisadas em gel de poliacrilamida são marcadores bioquímicos/moleculares adequados para diferenciar populações ou espécies de mandacaru.
- b) As populações de plantas de mandacaru de Picos, no estado do Piauí, região nordeste do Brasil, possuem maior diversidade genética de enzimas α - e β -esterases (número maior de alelos e maior heterozigosidade média) que as populações de mandacaru de Maringá, região sul do país.
- c) Em termos práticos, os produtos dos locos *Est-2*, *Est-3*, *Est-5* e *Est-14* podem ser usados como marcadores bioquímicos/moleculares para discriminar as plantas de mandacaru de Picos, nordeste do Brasil, das plantas de mandacaru de Maringá, na região sul do país.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUERO, C.O.P. **Padrões eletroforéticos de cultivares de soja (*Glicine max* (L.) Merrill)**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2002. 36p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes).

ALVAREZ, M.; COSTA, S.C.; HUBER, A.; BARON, M.; FONTANA, J.D. The cuticle of the cactus *Cereus peruvianus* as a source of a homo-D-galacturonan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 51/52: 367-377, 1995.

ALVAREZ, M.; COSTA, S.C.; UTUMI, H.; HUBER, A.; BECK, R.; FONTANA, J.D. The anionic glycan from the cactus *Cereus peruvianus* - structural features and potential uses. **Applied Biochemmistry Biotechnology**, 34:283-295, 1992.

ANDERSON, E.F. **The cactus family**. Portland: Timber Press, 2001. 400p.

ANDRADE, C.T.S.; MARQUES, J.G.W.; ZAPPI, D.C. Utilização de cactáceas por sertanejos baianos. Tipos conexivos para definir categorias utilitárias. **Sitentibus Série Ciências Biológicas**, 6:3-12. 2006.

ANTI, A.B. Caracterização de germoplasma de soja e de feijão através de eletroforese de isozimas da semente. **Bragantia**, 59:139-142, 2000.

APPLEQUIST, W.L.; WALLACE, R.S. Deletions in the plastid trnT-trnL intergenic spacer define clades within Cactaceae subfamily Cactoideae. **Plant Systematic and Evolution**, 231:153-162, 2002.

ARRUDA, M.; MELO-DE-PINNA, G.F.; ALVES, M. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. **Revista Brasil Botânica**, 28:589-601, 2005.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; COSTA, C.G. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 2002. 309p.

BARTHLOTT, W.; TAYLOR, N.P. Notes towards a monograph of Rhipsalideae (Cactaceae). **Bradleya**, 13:43-79, 1993.

BEVILAQUA, M. **Diversidade genética e química de *Cereus peruvianus***. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 2010. 64p. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada).

BRITTON, N.; ROSE, J. **The Cactaceae: descriptions and illustrations of plants of the cactus family**. Nova York: Dover Publications, 1963. 209p.

CARVALHO, M.L.M.; VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.R. Técnicas moleculares em sementes: aplicação de técnicas moleculares no controle da qualidade das sementes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 3:44-47, 2000.

CARVALHO, V.M.; MARQUES, R.M.; LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F.P.S. Functional classification of esterase from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). **Genetic Molecular Biology**, 26:195-198, 2003.

CAVALLI-MOLINA, S. **Variabilidade genética em populações naturais de *Relbunium hypocarpium* (Rubiaceae)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984. 231p. Tese (Doutorado em Agronomia).

CHUNG, M.G.; CHUNG, M.Y.; OH, G.S.; EPPERSON, B.K. Spatial genetic structure in a *Neolitsea sericea* populations (Lauraceae). **Heredity**, 85:490-497, 2000.

CHUNG, M.G.; EPPERSON, B.K. Spatial structure of allozyme polymorphism in a population of *Eurya japonica* (Theaceae). **Silvae Genetica**, 49:1-4, 2000.

CLEGG, M.T.; ALLARD, R.W.; KAHLER, A.L. Is the gene unit of selection? Evidence from two experimental plant population. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 69:2474-2478, 1990.

COSTA, C.T.A.; KUHN, G.C.S.; SENE, F.M. Baixa variação da corte sonora em populações de *D. meridionalis* (Díptera, Drosophilidae) do sul e sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, 60:53-61, 2000.

DAVET, A. **Estudo fitoquímico e biológico do cacto *Cereus jamacaru* De Candolle, Cactaceae**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

DE LUCCA, M. **Análises de seqüências da região intergênica ITS-1 do rDNA em espécies de *Drosophila* do cluster Buzzatii**. São José do Rio Preto: Universidade Estadual de São Paulo, 2006. 83p. Tese (Programa de Pós-graduação em Genética).

DETTKE, G.A.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Anatomia caulinar de espécies epífitas de Cactaceae, subfamília Cactoideae. **Hoehnea**, 35:583-595, 2008.

FALCÃO, T.M.M.A; CONTEL, E.P.B. Genetic variability in populations of Brazilian social bees: III. Electrophoretic data for ME, GPD, SOD, and IDH. **Revista Brasileira de Genética**, 14:61-72, 1991.

FARIA, J.S; MANGOLIN, C.A.; FRANZONI, J.; MACHADO, M.F.P.S. Esterase polymorphism to the analysis of genetic diversity and structure of populations descending from in vitro regenerated plants of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**. **No prelo**.

FRIGO, M.J.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA, J.R.; MACHADO, M.F.P.S. Esterase polymorphism for analysis of genetic diversity and structure of will Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) populations. **Weed Science**, 57:54-60, 2009.

GAHAN, P.B.; RANA, M.A.; PHILLIPS, R. Activation of carboxylesterases in root cortical parenchymal cells of *Pisum sativum* during xylem induction in vitro. **Cell Biochemmistry and Function**, 1:109-111, 1983.

HAMRIK, J.L.; GODT, M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions. Biological Sciences**, 351:1291-1298, 1996.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.; SHERMAN-BROYLES, L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forest**, 4:95-124, 1992.

HEALY, M.J.; DUMANCIC, M.M.; OAKESHOTT, J.G. Biochemical studies in *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetic**, 29:365-388, 1991.

HOLLIS, H.; SCHEINVAR, L. **El interesante mundo de las cactáceas**. México: Fondo de Cultura Econômica, 1995. 235p.

HOLMES, R.S.; MASTER, C.J. The developmental multiplicity and isoenzyme status of esterases. **Biochemical Biophysiology Acta**, 264:435-442, 1967.

JOHNSON, F.M.; KANAPI, C.G.; RICHARDSON, R.H.; WHEELER, M.R.; STONE, W.S. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparison. **Universal Texas Publication**, 6615:517-532, 1966.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional, 1985. 1020p.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, 14:214-217, 1946.

LAPENTA, A.S.; BICUDO, H.E.M.; CERON, C.R.; CORDEIRO, J.A. Esterase patterns and phylogenetic relationships of species and strains included in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, 96:95-107, 1998.

LAPENTA, A.S.; BICUDO, H.E.M.; CERON, C.R.; CORDEIRO, J.A. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, 84:13-29, 1995.

MACHADO, F.A.P.S.A. Polysaccharide from callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Crop Breeding Application Biotechnology**, 4:127-134, 2004.

Mapa de distribuição de famílias. Disponível em: <http://www.omnicyber.org/Bio/Families/FamIndex.html>. Acesso em: 28, dezembro, 2010.

MARSHALL, S.D.G.; PUTTERILL, J.J.; PLUMMER, K.M.; NEWCOMB, R.D. The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Molecular Evolution**, 57:487-500, 2003.

MELATI, M.R.; SCIALABBA, A.; BELLANI, M.L. Carboxylesterase activity in the carrot seed and seedling. **European Journal Histochemistry**, 40:159-166, 1996.

MENEZES, M.; VON PINHO, E.V.R.; PEREIRA, A.M.A.R.; OLIVEIRA, J.A. Identificação de cultivares de milho, feijão, algodão e soja por meio de enzimas e proteínas resistentes ao calor. **Revista Brasileira de Sementes**, 30:111-122, 2008.

MIZRAHI, Y.; NERD, A. Climbing and columnar cacti: new arid land fruit crops. In: J. JANICK (ed.). **Perspectives on New Crops and New Uses**. Alexandria: American Society of Horticultural Science, 1999. 366p.

MIZRAHI, Y.; NERD, A.; NOBEL, P.S. Cacti as crops. **Horticultural Reviews**, 18:292-320, 1997.

NASON, J.D.; HAMRICK, J.L.; FLEMING, T.H. Historical vicariance and post-glacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran desert cactus. **Evolution**, 56:2214-2226, 2002.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.

NOZAKI, J.; MESSERSCHMIDT, I.; RODRIGUES, D.G. Tannery waters cleaning with natural polyelectrolytes: chemical speciation studies of chromium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 36:761-770, 1993.

O'DONOUGHUE, L.S.; SOUZA, E.; TANKSLEY, S.D. Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphisms. **Crop Science**, 34:1251-1258, 1994.

OLIVEIRA, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Applied Biochemical Biotechnology**, 104:149-155, 2003.

ORASMO, G.R.; OLIVEIRA-COLLET, S.A.; LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F.P.S. Biochemical and genetic polymorphism for carboxylesterase and acetyesterase in grapes clones of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) cultivars. **Biochemical Genetic**, 9:663-670, 2007.

PATERSON, A.H.; DAMON, S.; HEWITT, J. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. **Genetics**, 127:181-197, 1991.

PEREIRA, A.J.; VIDIGAL-FILHO, P.S.; LAPENTA, A.S.; MACHADO, M.F.P.S. Differential esterase expression in leaves of *Manihot esculenta*, Crantz infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Biochemical Genetics**, 39:289-296, 2001.

PICHERSKY, E; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, 5:237-243, 2002.

PROJETO CACTACEAS BRASILEIRAS. Mandacaru. Disponível em: www.brcactaceae.org> Acesso em: 24, dezembro, 2010.

REZANKA, T.; DEMBITSKY, V.M. Very-long-chain alkyl esters in *Cereus peruvianus* wax. **Phytochemistry**, 42:1145-1148, 1998.

ROBE, L.J.; VALENTE, V.L.S.; BUDNIK, M.; LORETO, E.L.S. Molecular phylogeny of subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: a nuclear versus mitochondrial gene approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36:623-640, 2007.

ROCHA, L.K.; OLIVEIRA, A.J.B.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Efeito de diferentes componentes no meio de cultura na produção de alcalóides em tecidos de calos de *Cereus peruvianus*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 27:37-41, 2005.

ROCHA, E.A.; AGRA, M.F. Flora do Pico do Jabre, Paraíba, Brasil: Cactaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, 16: 15-21, 2002.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; CASAS, A.; VÁSQUEZ-YANES, C. Seed germination of wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicathan Valley, Central México. **Journal of Arid Environments**, 49:279-287, 2001.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; VASQUEZ-YANES, C. Cactus seed germination: a review. **Journal Arid Environmental**, 44:85-104, 2000.

RUIZ, A.; CANSIAN, A.M.; KUHN, G.C.S.; ALVES, M.A.R.; SENE, F.M. The *Drosophila serido* speciation puzzle: putting new pieces together. **Genética**, 108: 217-227, 2010.

SANTOS, P.R.G. **Aspectos florísticos e vegetacionais de um inselbergue no semiárido de Pernambuco, Brasil**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 2007. 60p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas).

SCHEINVAR, L. **Cactaceae**. México: Universidade Nacional Autônoma do México, 1985. 60p.

SCHWARTZ, D. E1 esterase isozymes of maize: on the nature of the gene-controlled variation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 58: 568-575, 1967.

SILVA, L.R.; ALVES, R.E. Avaliação da composição físico-química de frutos de mandacaru (*Cereus jamacaru*). **Acta Agronômica**, 58:1-10, 2005.

SILVA, W.R.; SAZIMA, M. Hawkmoth pollination in *Cereus peruvianus*, a columnar cactus from southeastern Brazil. **Flora**, 190:339-343, 1995.

SOFFIATTI, P.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Anatomy of Brazilian Cereaceae (subfamily Cactoideae, Cactaceae): Stem of *Arrojadoa* Britton & Rose, *Steph Brasilicereus* Backeberg. **Acta Botanica Brasilica**, 21:813-822, 2007;

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Polyploidy breeding systems and genetic differentiation in homosporous pteridophytes. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. (eds.). **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides Press, 1989. p. 241-258.

SOUZA, E.; SORRELLS, M.E. Relationship among 70 North American oat germplasms: I. Cluster analysis using quantitative characters. **Crop Science**, 3:599-605, 1991.

STEINER, W.; JOHNSON, W.E. Techniques of eletrophoresis of Hawaiian *Drosophila* US-IBP. **Island Ecosystems Technnical Reproduction**, 30:1-21, 1973.

STUHLFELDER, C.; LOTTSPREICH, F.; MUELLER, M.J. Purification and partial amino acid sequence of an esterase from tomato. **Phytochemistry**, 60:233-240, 2002.

TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdan: Elsevier Science, 1983. 516p.

TAYLOR, N.P. **Cactaceae. In Cactus and Succulent Plants. Status Survey and Conservation Action Plan**. Switzerland: Compiled by Sara Oldfield, 1997. 500p.

TAYLOR, N.P. **Taxonomy and Phylogeography of the cactaceae of eastern Brazil**. England: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. 78p.

TAYLOR, N.P.; ZAPPI, D.C. **Cacti of Estearn Brazil**. Richmond: The Royal Botanic Gardens, 2004. 460p.

TERRAZAS, T.; MAUSETH, J.D. Stem anatomy and morphology. In: NOBEL, P.S. (ed.). **The cacti: biology and uses**. Berkeley: University Press, 2002. 60p.

TAYLOR, N.P. **Taxonomy and Phylogeography of the cactaceae of eastern Brazil**. England: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. 78p.

THORPE, J.P.; SOLÉ-CAVA, A.M. The uso of allozyme electrophoresis in invertebrate systematic. **Zoo Ser**, 23:3-18, 1994.

TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. **Isozimas-variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 200p.

TOURINHO, M.J. Abordagem etnofarmacológica das plantas medicinais diuréticas no povoado de Capim Grosso, município do Canindé de São Francisco, Sergipe. **Curitiba**, 3:34-47, 2000.

VANZOLINI, P.E. A quase-historical approach to the natural history of differentiation of reptiles in the tropical geographic isolated. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 34:189-204, 1981.

ZAPPI, D.; ROCHA, E.A.; TAYLOR, N. Cactaceae. In: BARBOSA, M.R.V.; SOTHERS, C.; MAYO, S.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L.; MESQUITA, A.C. **Checklist das Plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas**. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 2006. p. 42-47.

WALLACE, R.S. Molecular systematic study of the Cactaceae: using chloroplast DNA variation to elucidate cactus phylogeny. **Bradleya**, 13:1-12, 1995.

WILLIAMS, H. Assessing scrub buckwheat populations viability in relation to fire using multiple modeling techniques. **Ecological Applications**, 16:1672-1687, 2001.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetic of population, variability within and among natural populations**. Chicago: The University of Chicago, 1978. 200p.

YAMADA, H.; MATSUDA, M.; OGUMA, Y. Genetics of sexual isolation based on courtship song between two sympatric species: *Drosophila ananassa* e and *Drosophila pallidosa*. **Genetica**, 116:225-237, 2002.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Bulletin Journal of Botany**, 24:207-209, 1999.

YOUNG, K.R. Biogeography of the montane forest zone of the eastern slopes of Peru. **Memorias del Museo de Historia Natural**, 21:1-227, 1992.