

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO  
IVONE BATISTA DE OLIVEIRA ELOI

**Divergência genética entre tipos morfológicos de mandacaru (*Cereus*  
*sp.*; Cactaceae) propagados na natureza e regenerados in vitro**

MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
AGOSTO - 2014

IVONE BATISTA DE OLIVEIRA ELOI

**Divergência genética entre tipos morfológicos de mandacaru (*Cereus* sp.; Cactaceae) propagados na natureza e regenerados in vitro**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
AGOSTO - 2014

Página de aprovação

À Lara, minha amada filha.

Ao Eloi, meu amado esposo.

Aos meus pais, Osias Soares de Oliveira e de Ivanilde Batista de Oliveira.

À minha querida irmã, Josiele.

Com amor, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu infinito amor.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade de realizar este Curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

Aos Docentes do PGM e aos Secretários, Francisco José da Cruz e Maria Valquíria Magro, por colaboraram para que o Curso de Doutorado se tornasse uma grande experiência em minha vida.

À professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela orientação, amizade e confiança e pelo exemplo de profissionalismo.

À professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela coorientação, amizade e paciência e pelo auxílio constante no laboratório.

À professora doutora Sandra de Oliveira Collet, pela amizade.

À professora doutora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela valiosa coorientação.

À Leila e Enila e ao Sérgio, pela ajuda nos trabalhos técnicos de laboratório e pelo carinho.

A todos os colegas de Curso, do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais e do Laboratório de Genética Animal, pela contribuição e amizade. Em especial, à minha querida amiga Ana Luisa, pela sua indispensável ajuda, e ao meu querido amigo, Maycon, pela amizade e prontidão em me ajudar.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## BIOGRAFIA

Ivone Batista de Oliveira Eloi, filha de Josias Soares de Oliveira e de Ivanilde Batista de Oliveira, nasceu em Maringá-Paraná no dia dezoito de maio de 1984.

Cursou o ensino Fundamental I, na Escola Municipal Professora Odete Alcântara Rosa. O ensino Fundamental II e o Ensino Médio cursou no Colégio Estadual Branca da Motta Fernandes, ambos os colégios na cidade de Maringá-PR.

Em 2007, concluiu o Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Licenciatura Plena em Biologia, pela Universidade Estadual de Maringá.

Em 2010, concluiu o Curso de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, também na Universidade Estadual de Maringá, obtendo o título de Mestre, com a Dissertação intitulada "*Marcadores SSR (Simple Sequence Repeated)* para a análise da variabilidade genética e da estrutura de populações de genótipos de milho pipoca (*Zea mays* L.)".

Ainda em 2010, ingressou no Curso de Doutorado do mesmo Programa de Pós-Graduação, sob orientação da professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
2.1. Família Cactaceae .....	5
2.2. Importância da família Cactaceae.....	7
2.3. Gênero <i>Cereus</i> .....	10
2.4. Marcadores AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism).....	12
2.5. AFLP em Cactáceas .....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1. Material genético.....	20
3.2. Germinação das sementes .....	23
3.3. Extração do DNA .....	24
3.4. Quantificação do DNA.....	26
3.5. Ensaio de AFLP .....	26
3.5.1. Digestão do DNA.....	27
3.5.2. Ligação de adaptadores .....	27
3.5.3. Pré-amplificação .....	28
3.5.4. Amplificação seletiva .....	28
3.5.5. Preparo dos géis e condições da eletroforese para separação de fragmentos AFLPs .....	30
3.6. Análise dos dados.....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>45</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>46</b>

## RESUMO

ELOI, Ivone Batista de Oliveira. D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, agosto de 2014. **Divergência genética entre tipos morfológicos de mandacaru (*Cereus* sp.; *Cactaceae*) propagados na natureza e regenerados *in vitro*.** Orientadora: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Conselheiros: Claudete Aparecida Mangolin e Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki.

A proposta do presente estudo foi verificar a relação genética em nível molecular entre somaclones de mandacaru com morfologia atípica (monstruoso ou *monstruosus*), regenerados a partir de cultura de calos de *Cereus peruvianus*, e as plantas de mandacaru com fenótipo monstruoso (*C. peruvianus* var. *monstruosus* ou *C. monstruosus*) propagadas na natureza. Para isso, a técnica de AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*) foi utilizada em 51 amostras de mandacaru, propagadas na natureza e regeneradas *in vitro*, com diferentes morfologias de caule. Foram usadas seis combinações de *primers* AFLP que geraram 534 fragmentos, dos quais 503 (94,19%) foram polimórficos, revelando um polimorfismo médio dentro dos morfotipos de 74,98% e diversidade genética média ( $h$ ) de 0,2722. A divergência genética ( $G_{ST}$ ) entre as amostras dos cinco morfotipos de caules de mandacaru foi alta ( $G_{ST} = 0,1957$ ). As relações de similaridade entre as amostras de mandacaru (propagadas natureza e somaclones) indicaram que estas são da mesma espécie (valores de identidade genética entre 0,8747 e 0,9456) e que os tipos morfológicos diferentes podem ser considerados como variedades da espécie *C. peruvianus*. Em nível molecular, a nomenclatura *C. peruvianus* var. *monstruosus* é mais adequada do que *C. monstruosus*. A análise de como os tipos morfológicos de mandacaru estão estruturados geneticamente mostrou que os somaclones *monstruosus* gerados na cultura de calos são geneticamente divergentes em nível molecular das plantas da variedade *C. peruvianus monstruosus* propagadas na natureza.

**Palavras-chave:** Mandacaru, variedades morfológicas, AFLP, somaclones, diversidade genética.

## ABSTRACT

ELOI, Ivone Batista de Oliveira. D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, August, 2014. **Genetic divergence between morphological types of Mandacaru (*Cereus* sp.; Cactaceae) disseminated in nature and regenerated *in vitro*.** Adviser Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Committee Members Claudete Aparecida Mangolin and Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki.

The genetic relationship was evaluated at molecular level between Mandacaru somaclones with atypical morphology (monstrous or *monstruosus*), regenerated from the calus culture of *Cereus peruvianus* and Mandacaru plants with monstrous phenotype (*C. peruvianus* var. *monstruosus* or *C. monstruosus*) disseminated in nature. Amplified Fragments Length Polymorphism (AFLP) technique was employed in 51 samples of Mandacaru disseminated in nature and regenerated *in vitro*, with different stalk morphologies. Six AFLP primers combinations were used, producing 534 fragments of which 503 (94.19%) were polymorphs and revealed mean polymorphism within morphotypes at 74.98% and mean genetic diversity (h) of 0.2722. Genetic divergence ( $G_{ST}$ ) between the samples of the five morphotypes of the mandacaru stalks was high ( $G_{ST} = 0.1957$ ). Similarity relationships between the mandacaru samples (disseminated in nature and by somaclones) proved them to be of the same species (genetic identity rates between 0.8747 and 0.9456) and that the different morphological types may be considered varieties of the species *C. peruvianus*. At the molecular level, the nomenclature *C. peruvianus* var. *monstruosus* is more proper than *C. monstruosus*. Analysis of the manner the morphological types of mandacaru are genetically structured showed that somaclones *monstruosus* produced in the calus culture are genetically divergent, at the molecular levels, of plants of the variety *C. peruvianus monstruosus* disseminated in nature.

**Keywords:** Mandacaru, morphological varieties, AFLP, somaclones, genetic diversity.

## 1. INTRODUÇÃO

*Cereus peruvianus* Mill, conhecida popularmente como mandacaru, é espécie representante da família Cactaceae, a qual pode apresentar indivíduos arbóreo e herbáceos, com caules suculentos e espinhosos. A família tem cerca de 100 gêneros e 1400 espécies, sendo o gênero *Cereus* o sétimo em representatividade, com 40 espécies descritas (Judd et al., 2009). As plantas de mandacaru têm sido destacadas na literatura em razão de sua importância econômica e industrial. Os caules das plantas de *C. peruvianus* são recomendados como fonte de produtos do metabolismo primário e também de metabólitos secundários para a indústria farmacêutica, de alimentos e química. As plantas desta espécie produzem alcalóides amins (Vries, 1971; Oliveira e Machado, 2003), ésteres de cera com potencial de aplicação como barreira impermeável (Dembitsky e Rezanka, 1996; Rezanka e Dembitsky, 1998) e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais (Alvarez et al., 1992; 1995; Nozaki et al., 1993; Barros e Nozaki, 2002). Os estudos de Nozaki et al. (1993) e Barros e Nozaki (2002) mostraram que os heteropolissacarídeos complexos constituintes dos caules de *C. peruvianus* podem substituir à aplicação de polieletrólitos sintéticos usados em processos de tratamento de águas residuais de indústrias.

A proposta de utilizar os caules das plantas de mandacaru para obter os heteropolissacarídeos complexos estimulou o investimento na produção de plantas em larga escala a partir da cultura de tecidos *in vitro*. A micropropagação de plantas de *C. peruvianus* foi um investimento que gerou milhares de plantas, geneticamente uniformes e também com variações somaclonais (Oliveira et al., 1995; Mangolin et al., 1997, 2002; Machado et al., 2000). Cerca de 47,5% das plantas regeneradas *in vitro* a partir de calos (somaclones) mostraram variações na morfologia de seus caules e 62,24% mostraram variações bioquímicas/moleculares (Resende et al., 2007).

As variações morfológicas nos somaclones parecem conferir aos somaclones fenótipos característicos de diferentes variedades da espécie ou de diferentes espécies do gênero. Os caules dos somaclones de *C. peruvianus*, mantidos no campo durante 17 anos (1997-2014), apresentam padrões comumente descritos para as variedades *C. peruvianus* var. *monstrosus*, *C. peruvianus* var.

*tortuosus* ou para as espécies *C. monstuosus*, *C. monstuosus* var. *minor*, *Cereus* sp. var. *knobby monstrose*, *C. hildmannianus* (Britton e Rose, 1963) e *C. jamacaru* (Scheinvar, 1985; Gutman et al., 2001).

O número e a disposição das costelas (*ribs*) contendo as aréolas (meristemas axilares), usadas como características taxonômicas para definir as espécies de *Cereus* e as variedades de *C. peruvianus* (Britton e Rose, 1963), são as variáveis encontradas nos somaclones ou regenerantes clonais de *C. peruvianus*. Somente 20,15% das plantas de somaclones apresentam o fenótipo original (caule colunar e ereto) detectado em plantas obtidas a partir de sementes germinadas na natureza (Resende et al., 2010). Estes somaclones são particularmente interessantes porque apresentam alterações no padrão filotático determinante da morfologia dos caules relacionados com a evolução das cactáceas (Altesor e Ezcurra, 2003) e também porque podem contribuir para introduzir variabilidade genética na espécie *C. peruvianus*. A geração de variabilidade genética nesta espécie é importante porque esta tem sido descrita como apresentando uma base genética limitada (Gutman et al., 2001), necessitando, portanto, de genótipos interessantes que possam ampliá-la e, assim, contribuir com o programa de melhoramento dos frutos que apresentam alto valor comercial no mercado europeu. Nesse sentido, investimentos têm sido feitos em programas de melhoramento para seleção de frutos de *C. peruvianus* (Mizrahi et al. 1997; Mizrahi e Nerd, 1999).

A análise de seis sistemas enzimáticos nos somaclones revelou polimorfismo genético para isozimas esterases (Mangolin et al., 1997; Machado et al., 2000). A análise de RAPD (*Random Amplified Polimorphism DNA*) nos somaclones também revelou que o cultivo *in vitro* dos calos induziu variabilidade genética nas plantas regeneradas (Resende et al., 2010). A base genética dos somaclones no referido estudo foi maior que a base genética detectada em plantas de acessos naturais da espécie, em consequência da variabilidade induzida *in vitro* (17,67%). Este é um aspecto positivo e indicativo de que os somaclones representam um material promissor para compor programas de melhoramento genético, uma vez que as características florais e reprodutivas dos somaclones têm mostrado que estas são análogas às reportadas para plantas de acessos (Ruvolo-Takasusuki et al., 2006) e a análise da formação de gametas nos somaclones também foi similar à de plantas de acessos (Silva et al., 2006).

Por outro lado, a análise de RAPD indicou que o polimorfismo dos fragmentos aleatórios de DNA não está associado à morfologia (típica ou atípica) dos caules dos somaclones. Evidências de não associação entre variações morfológicas e polimorfismos de fragmentos aleatórios de DNA amplificados têm sido registradas por somaclones de outras espécies de plantas (Goto et al., 1998; Chen et al., 1998). Morfologias alteradas em plantas cultivadas *in vitro* têm sido explicadas por eventos de metilação diferencial. Kaeppler e Phillips (1993) foram os autores da proposta de que ocorre metilação diferencial em decorrência da condição de estresse *in vitro*. Eventos de hipometilação foram associados com diferentes fenótipos regenerantes de *Solanum tuberosum* (Joyce e Cassels, 2002) e em regenerantes de *Elaeis guineensis* (Jaligot et al., 2002, Kubis et al., 2003). A reversão fenotípica que determinou a característica de caules com morfologia mista em somaclones de *C. peruvianus* foi verificada em somaclones de outras espécies e foi considerado por Joyce et al. (2003) como indicativo da ocorrência de eventos de metilação.

Frente à suspeita de que eventos de metilação possam estar associados às variações de morfologia dos somaclones de *C. peruvianus*, a proposta no presente estudo é aplicar uma metodologia para a análise de fragmentos de DNA cortados com enzimas de restrição e amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), no sentido de verificar se os somaclones *monstruosus* são geneticamente similares em nível molecular às plantas com fenótipos *monstruosus* (*C. peruvianus* var. *monstrosus*, ou *C. peruvianus* var. *monstruosus*, ou *C. monstruosus* var. *minor*, *Cereus* sp. var. *knobby monstrose*) propagadas na natureza. De acordo com Voz et al. (1995), a metodologia que permite analisar polimorfismos de comprimento de fragmentos de DNA produzidos por enzimas de restrição e amplificados por PCR, referida pelos autores como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), associa a segurança e a especificidade da técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ao potencial do método de amplificação dos fragmentos pela PCR. Segundo os proponentes da metodologia AFLP, sua aplicação permite uma investigação do genoma na ausência de informação prévia das seqüências de genes específicos e o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição especificados pelas enzimas de restrição podem ser analisados simultaneamente em várias amostras individuais do material em estudo. Como são produzidas dezenas de fragmentos de restrição aplicando-se a metodologia AFLP, a expectativa

é detectar fragmentos específicos associados à morfologia típica (caules colunares-erectos) ou atípica (caules monstruosos) dos caules das plantas propagadas na natureza e dos somaclones, de modo a traduzir eventos de metilação específicos decorrentes do cultivo *in vitro*, que podem ser determinantes de variações morfológicas.

A análise do AFLP para a caracterização de plantas propagadas naturalmente e plantas regenerantes clonais de *C. peruvianus* deverá responder se mutações induzidas *in vitro* ou alterações no padrão de metilação de genes são fatores determinantes da morfogênese diferencial dos caules dos regenerantes somaclonais. A hipótese do presente estudo é de que os somaclones *monstruosus* são geneticamente similares em nível molecular às plantas com fenótipos *monstruosus* propagadas na natureza. Além disso, o resultado da relação genética entre as plantas propagadas na natureza e os somaclones com morfologias de caules diferentes (morfotipos) poderá indicar as relações entre as diferentes variedades de *C. peruvianus* e espécies de *Cereus* encontradas na natureza, contribuindo, assim, para fundamentar a alternativa: *C. peruvianus* var. *monstruosus* ou *C. monstruosus*?

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Família Cactaceae

A família Cactaceae apresenta aproximadamente 100 gêneros e 1400 espécies (Judd et al., 2009), que são conhecidas por suas notáveis adaptações morfológicas e fisiológicas à seca (Barthlott e Hunt, 1993). No Brasil, ocorrem cerca de 40 gêneros e aproximadamente 200 espécies (Souza e Lorenzi, 2008). A família pertence à ordem Caryophyllales e tradicionalmente são reconhecidas 3 subfamílias: Cactoideae, Opuntioideae e Pereskioideae (Barthlott e Hunt, 1993; Wallace e Gibson, 2002). Porém, evidências moleculares apóiam o reconhecimento de uma nova subfamília: Maihuenioideae (Anderson, 2001; Griffith, 2004).

Os membros da família Cactaceae, conhecidos como cactos, estão presentes naturalmente na América, do Canadá até ao sul da Patagônia, na Argentina (Speirs, 1982; Kiesling, 1988), possuindo centros de diversidade no México, sudoeste dos EUA, Andes Central (Peru, Bolívia, Sul do Equador, Nordeste do Chile e Noroeste da Argentina), Leste, Norte e Sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. De todas estas regiões, o México destaca-se como o país com maior riqueza de espécies (850 espécies e 54 gêneros) e endemismo (80% das espécies) (Bravo-Hollis e Sánchez-Mejorada, 1978; Arias, 1993; Boyle e Anderson, 2002; Sierra, 2011).

Os cactos são cultivados em mais de 30 países (Wallace e Gibson, 2002), sendo encontrados em outros continentes, por dispersão humana, ou por dispersão natural, como no caso do cacto epífítico *Rhipsalis baccifera*, que também ocorre na África tropical, Madagascar, em ilhas do Oceano Índico e no Sri Lanka, tendo sido disperso do novo mundo para estas áreas por pássaros (Anderson, 2001).

A maioria das espécies de cactos é descrita como diploide ( $2n=2x=22$ ), mas podem ser encontradas poucas espécies (menos de 20%) poliplóides ( $2n>22$ ) (Anderson, 2001). Barthlott e Hunt (1993) e Wallace e Gibson (2002) descreveram a família Cactaceae como sendo representada por plantas eudicotiledôneas, perenes, geralmente suculentas e altamente especializadas, e que apresentam hábito arbóreo, arbustivo, rastejante, epífítico ou geófito.

O caule, normalmente suculento, pode ser articulado, plano, colunar, cilíndrico, globoso, tuberculado, com costelas, alado ou achatado, frequentemente

segmentado, sem folhas e com espinhos, de coloração esverdeada e com função fotossintetizante. As folhas, quando presentes, são grandes e coloridas, arranjas em espiras, simples, inteiras e sem estípulas. As gemas axilares desenvolvem um indumento de tricomas multicelulares (aréola) e folhas geralmente transformadas em espinhos, distribuídos uniformemente no caule ou formando costelas longitudinais. As aréolas são originadas de ramos reduzidos e modificados de onde surgiram tricomas, espinhos e flores (Barthlott e Hunt, 1993; Wallace e Gibson, 2002).

As flores geralmente são vistosas, isoladas ou raramente agrupadas, usualmente sésses nas aréolas, quase sempre bissexuais, usualmente actinomorfas; apresenta receptáculo envolvendo o ovário (pericarpelo), glabro ou revestido com escamas bractiformes e aréolas; as aréolas têm tricomas, pêlos e/ou espinhos; as tépalas são geralmente numerosas, em séries graduais; os estames são frequentemente numerosos em uma ou mais séries de disposição espiralada, inseridos no tubo floral, anteras biloculares, tetrasporangiadas, com deiscência longitudinal; o ovário é ínfero (exceto espécies de *Pereskia*), unilocular, carpelos de 3 a 20, óvulos numerosos, estilete geralmente longo e estigma com 3 a 20 lóbulos. O fruto é uma baga, carnosos, suculento ou seco, glabro, escamoso, tomentoso, cerdoso ou espinhoso, deiscente ou indeiscente. As sementes são numerosas, com endosperma ausente ou presente; os cotilédones são reduzidos ou vestigiais (Barthlott e Hunt, 1993; Wallace e Gibson, 2002).

Barthlott e Hunt (1993) descreveram a subfamília Opuntioideae como sendo constituída de árvores ou arbustos com folhas suculentas e aréolas axilares com espinhos e a subfamília Cactoideae como árvores sem folhas ou com vestígios de folhas, hastes suculentas e com aréolas bem desenvolvidas. As espécies da subfamília Pereskioideae foram descritas com hastes não suculentas, com folhas grandes e aréolas axilares com espinhos.

Zappi e Taylor (2008) descreveram que os cactos têm distribuição quase exclusivamente neotropical, com climas tropical e temperado, com habitats variados, desertos quentes, trechos de areia costeiras, cerrados, florestas decíduas secas, estepes alpinas altas e até mesmo em florestas tropicais. Entretanto, a maior diversidade foi descrita nas regiões áridas e semiáridas, localizadas entre 35° de latitude norte e sul (Bravo-Hollis e Sánchez-Mejorada, 1978; Gibson e Nobel, 1986, Boyle e Anderson, 2002). Essa adaptação é em decorrência dessas plantas

possuírem alta eficiência no uso de água (5-10 vezes maior do que outras plantas), resultando em uma baixa exigência hídrica (Mizrahi e Nerd, 1999).

A alta eficiência no uso de água se deve à forma especial de fotossíntese realizada por esta família, o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM)(Mizrahi et al., 1997). Nas plantas CAM, os estômatos abrem-se somente à noite e capturam o dióxido de carbono quando a transpiração é baixa, evitando a perda de água (Taiz e Zeiger, 2004). A transpiração reduzida é garantida por espessas cutículas hidrofóbicas, revestimento ceroso e células epidérmicas com paredes lignificadas (Rizzini, 1987) e, sendo assim, as trocas gasosas só ocorrem nos estômatos (Nobel, 1999). As cutículas espessas também aumentam a reflexão da radiação solar, resultando em menor temperatura do caule e, portanto, menor transpiração (Nobel, 1999). Essas plantas também possuem em seus tecidos, córtex e medula espessa, que permitem o armazenamento de água (Mauseth, 1999; Nyffeler, 2002) e possuem capacidade de absorver muito rapidamente a água da chuva (Anderson, 2001).

## **2.2. Importância da família Cactaceae**

Os cactos têm sido utilizados nas Américas desde antes da chegada dos europeus (Anderson, 2001). Há diversas utilidades descritas para os mesmos. As cactáceas apresentam imensa diversidade de compostos biológicos, como alcalóides, esteróides, triterpenos, glicosídeos, gorduras, óleos e ceras, que despertam interesses econômicos, devido à aplicação industrial (Whistter, 1963; Mark, 1979; Martindale, 1979; Turbak, 1979; Scheinvar, 1985; Dembitsky e Rezanka, 1996).

As ceras são utilizadas como impermeabilizantes de tintas e vernizes (Whistter, 1963; Mark, 1979; Martindale, 1979; Turbak, 1979; Scheinvar, 1985). As plantas de *Cereus peruvianos* produzem alcalóides aminas (Vries et al. 1971, Oliveira e Machado, 2003), ésteres de cera com impermeabilidade à água e potencial aplicação como barreira impermeável (Dembitsky e Rezanka 1996, Rezanka e Dembitsky 1998) e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais (Alvarez et al. 1992, 1995, Nozaki et al. 1993, Barros e Nozaki 2002); produzem também heteropolissacarídeos complexos, com a capacidade de flocular partículas coloidais, podendo substituir polieletrólitos sintéticos no tratamento de

águas residuais industriais (Nozaki et al., 1993; Barros e Nozaki, 2002; Reis e Nozaki, 2011).

A polpa de *Cereus* também tem importante aplicação na formulação de cosméticos (Alvarez et al., 1992). Na indústria farmacêutica, a polpa também é utilizada devido a suas propriedades geleificante, ligantes de comprimidos/cápsulas, agentes de estabilização, agentes espessantes, emulsificantes, formadoras de filmes para revestimentos de comprimidos/cápsulas e também como agentes de revestimentos para microcápsulas. Tem sido considerada segura para o consumo humano (Girish et al., 2009).

O caule de plantas do gênero *Opuntia* foi utilizado na produção de ácido carmínico, um corante vermelho natural desenvolvido pelo povo indígena pré-colonial do México. Esse corante é produzido por um inseto hemíptera conhecido como cochonilha (*Dactylopius Coccus*), um parasita que infesta várias espécies de cactos pertencentes a dois gêneros proximamente relacionados, o *Opuntia* e o *Nopalea* (Sáenz-Hernández et al., 2002). Esse corante voltou a ter importância, pois a maioria dos corantes artificiais foi considerado cancerígeno (Villaseñor, 2008).

Algumas espécies de cactos têm importância na farmacologia (Oudshoorn, 1975) devido ao potencial fitoterápico, como o uso de Arabinogalactana isolado de goma de *Cereus peruvianus*, que inibiu lesões gástricas em camundongos (Tanaka et al., 2010). Plantas dessa espécie também foram utilizadas como diuréticos, para amenizar problemas cardíacos, bem como nas afecções dos aparelhos respiratório e urinário (Kirchmer et al., 1975).

Quase todos os frutos carnosos de cactos são comestíveis e podem ter propriedades nutracêuticas e antioxidantes (Zampini et al., 2011). Algumas espécies representam recursos alimentares importantes para os seres humanos (Nobel, 2002), sendo muito consumidos por americanos de regiões áridas (Anderson, 2001).

A pêra espinhosa ou cactus pêra (*Opuntia* ssp.) é a cultura mais cultivada de cactos comestíveis no mundo, sendo amplamente distribuída no México e no continente sul-americano (EL-Samahy et al, 2006). A Pitáia-branca (*Hylocereus undatus*), a Pitáia-vermelha (*Hylocereus lemairei*) e a Pitáia-amarela (*Selenicereus megalanthus*) têm seus frutos vendidos *in natura* (Lorenzi, 2006). Frutos de figo-da-Índia (*Opuntia ficus indica*) são muito apreciados (Zampini et al., 2011). Frutos de *Cereus peruvianus* são comercializados em Israel e são apreciados por toda Europa (Mizrahi e Nerd, 1999) e, além de serem consumidos *in natura*, são utilizados para a

fabricação de iogurtes e geléias (Vries et al., 1971; Alvarez et al., 1992; Oliveira e Machado, 2003; Silva et al., 2005; Tanaka et al., 2010). Caules, frescos ou cozidos, são apreciados em diversos pratos, principalmente por mexicanos (Nobel, 2002).

As cactáceas possuem importância econômica também por seu potencial forrageiro (Rocha e Agra, 2002). Plantas de mandacaru (*Cereus jamacaru*) e xiquexique (*Pilosocereus gounellei*) são extensivamente utilizadas como forrageiras no nordeste brasileiro, servindo de alimentos para bovinos, ovinos e caprinos em períodos de seca (Silva et al., 2010; 2011).

Os cactos são um componente típico da vegetação tropical e subtropical da América (Gibson e Nobel, 1986; Barthlott e Hunt, 1993). Nesses ecossistemas, os cactos desempenham papéis importantes, devido às numerosas interações biológicas estabelecidas com outras plantas e animais (Nobel, 2002). Cladódios, flores, frutos e sementes de nopal (tipo de *Opuntia*) são consumidas por uma variedade de vertebrados (répteis, pássaros e mamíferos), podendo afetar ecossistemas inteiros (Anthony, 1954; Janzen, 1986).

Nas caatingas do nordeste brasileiro, algumas espécies de cactos são de grande importância para a sustentabilidade e conservação da biodiversidade de seu bioma, sendo seus frutos fontes de alimentos para pássaros e animais silvestres dessas regiões. Nos períodos de seca prolongada, essas cactáceas são um dos principais suportes forrageiros dos ruminantes, representando uma fonte de suprimento de água e uma alternativa alimentar para os animais (Silva et al., 2005). As cactáceas também podem ser usadas para prevenir degradação de ecossistemas frágeis, pois apresentam bom desenvolvimento em áreas de solos degradadas, podendo repovoar essas áreas (Cavalcanti e Resende, 2007).

Os cactos também são valorizados por suas diversas formas e lindas flores e são cultivados em todo o mundo como plantas ornamentais (Boyle e Anderson, 2002). Os gêneros ornamentais mais comuns são: *Opuntia*, *Caenegiea*, *Cereus*, *Echinopsis*, *Epiphyllum*, *Hylocereus*, *Mammillaria*, *Melocactus*, *Rhipsalis* e *Schlumbergera* (Judd et al., 2009).

Devido à crescente utilização das cactáceas na indústria e comércio, vêm aumentando cada vez mais os investimentos e, conseqüentemente, o número em pesquisas com plantas dessa família, visando a um melhor conhecimento do genoma das mesmas (Machado et al., 1993; 2000; Mangolin et al., 1994a, b; 1997,

1999; Gutman et al., 2001; Otero-Arnaiz et al., 2004, 2005; Terry et al., 2006; Resende et al., 2007; 2010; Hughes et al., 2008; Hardesty et al., 2008).

### 2.3. Gênero *Cereus*

O gênero *Cereus* pertence à subfamília Cactoideae, tribo Cereeae, e é constituído de árvores ou arbustos de caules eretos (Britton e Rose, 1919). O nome do gênero, do latim *cereus*, significa cera, cone de cera, vela ou tocha, referindo à forma desse cacto (Britton e Rose, 1919; Anderson, 2001). Este foi primeiramente descrito por Hermann, em 1698, e depois por Philip Miller, em 1754, e inclui 900 espécies catalogadas (Britton e Rose, 1919;1963; Anderson, 2001). Em 1909, Riccobono dividiu o gênero e criou a denominação *Piptanthocereus*, com 24 espécies. Estas espécies possuem flores, frutos e espinhos semelhantes e estão presentes desde a Índia até a América do Sul (Britton e Rose, 1963). De acordo com Zappi et al. (2014), no Brasil, o gênero ocorre em todos estados brasileiros, exceto no Amazonas, Acre, Rondônia e Amapá.

Vários autores descrevem as espécies do grupo, como cactáceas de caule colunar e ereto, arbóreas com mais de 10 metros de altura, cujo tronco principal pode alcançar 50cm de diâmetro, possuindo um número e disposição de costelas longitudinais variáveis, onde estão inseridos os botões axilares que contêm espinhos (folhas modificadas) conhecidas como aréolas (Britton e Rose, 1963; Morton, 1987; Mizrahi et al., 1997). O mandacaru, cacto mais conhecido e cultivado do gênero *Cereus*, possui morfologia semelhante em todo o Brasil, mas tem denominação diferente. Nas regiões norte e nordeste o mandacaru é denominado de *Cereus jamacaru* De Candolle; na região sul há relatos de mandacaru denominados de *Cereus repandus* Miller e *Cereus peruvianus* Mill e na região sudeste, *Cereus hildmannianus* K. Schumann (Neves, 2013). Segundo Taylor e Zappi (2004) e Zappi et al. (2014), *C. peruvianus* é um nome mal aplicado, sinônimo de *C. hildmannianus*.

*C. hildmannianus* é uma espécie nativa do Brasil e ocorre nas regiões Centro-oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina). *Cereus jamacaru* é uma espécie nativa e endêmica do Brasil e ocorre nas regiões Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe) e Sudeste (Minas Gerais)(Zappi et al., 2014).

Segundo Dr. Leiah Scheinvar, taxonomista de cactos da Universidade Nacional do México (UNAM), *Cereus peruvianus* e *Cereus jamacaru*, nativos do nordeste brasileiro, são muito similares e podem ser a mesma espécie, entretanto plantas originadas de sementes de *C. jamacaru* apresentaram morfologias distintas de *C. peruvianus* (Mizrahi e Nerd, 1999). Segundo Taylor e Zappi (2004), as espécies *C. jamacaru*, *C. hildmannianus* (= *C. peruvianus*) e *C. pernambucensis* possuem identificação muito difícil quando são cultivadas fora da sua área de distribuição natural e estão sem frutos (a deiscência dos frutos maduros é utilizada para distinguir as espécies), mas estes pesquisadores não têm dúvidas de que são espécies distintas.

O mandacaru é muito utilizado como planta ornamental, devido à sua forma e às suas flores (Mizrahi e Nerd, 1999). Em jardins e viveiros são encontrados mandacarus com morfologia do caule bastante distinta do caule típico, que é colunar-ereto. O morfotipo "monstruoso" apresenta caule com costelas formando sulcos irregulares e número variável de aréolas. O morfotipo "tortuoso", conhecido como cacto parafuso ou rosca, possui caule com costelas em espiral (Neves, 2013). O morfotipo monstruoso foi descrito pela primeira vez por De Candolle como *Cereus peruvianus monstrosus*, variedade da espécie *Cereus peruvianus*, também chamada de *Cereus peruvianus monstruosus*, *Cereus peruvianus monstruosus nanus* Shumann (Britton e Rose, 1919; 1963; Ortiz et al., 2008).

Esse morfotipo também já foi classificado como espécie (*Cereus monstrosus minor*, *Cereus monstrosus*, *Cereus monstruosus minor*, *Cereus monstruosus*, *Cactus abnormis* Willdenow (Britton e Rose, 1919; Rowley, 1999; Leuenberger, 2004; Ortiz et al., 2008) e como variedade da espécie *Cereus hildmannianus* (*Cereus hildmannianus* K. Schum. 'Monstrosus') (Rowley, 1999). *Cereus peruvianus monstruosus* é a nomenclatura mais utilizada recentemente (Pereira, 2001; Ortiz, 2003; 2010; Ortiz et al., 2008; Grgurevic, 2009; Bertetti et al., 2011; 2012; 2014; Garibaldi et al. 2011; 2014; Karimi et al. 2012).

A nomenclatura *Cereus peruvianus* var *tortuosus* (Karimi, et al., 2012) e *Cereus tortuosus* Forbes (Radji et al., 2010) é encontrada na literatura. Entretanto, Briton e Rose (1919) afirmam que estes nomes não são aceitos.

O número de costelas, a disposição das aréolas, o tamanho e a cor dos espinhos são algumas características usadas para a identificação de espécies do gênero *Cereus* (Britton e Rose, 1963). A semelhança física das espécies de

mandacaru provoca contradições na sua classificação, assim como na determinação das variedades existentes, indicando uma limitação ou ausência de parâmetros morfológicos suficientes para discriminar essas espécies e suas variedades.

Mangolin et al. (1997) obtiveram diferentes morfotipos de caules de *C. peruvianus* regenerados de cultura de calos (somaclones), os quais apresentaram costelas quebradas, formando sulcos regulares e irregulares e com número variável de aréolas. Resende (2006) propôs que os morfotipos de somaclones diferentes do morfotipo típico podem ser em decorrência de alterações no controle de expansão e no plano de divisão das células, pois, segundo Bolwell (1993), esses eventos são responsáveis pela forma e direcionamento de células vegetais e pela forma definitiva das plantas. A regulação de tais eventos pode ser gerenciada pelo DNA, ou pode ser conduzida *in vitro* por fatores diversos, tais como efeito de nutrientes do meio de cultura, de reguladores de crescimento, condições de manutenção da cultura, dentre outros, usados para promover os eventos de desdiferenciação e diferenciação celular (Resende, 2006).

#### **2.4. Marcadores AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism)**

A partir da determinação da estrutura do DNA, feita por Francis Crick e James Watson, em 1953, e da descoberta das enzimas de restrição e desenvolvimento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), na década de 80, por Kary Mullis, foi possível o desenvolvimento e o avanço das técnicas de Biologia Molecular, tornando possível uma maior manipulação do DNA. Isso culminou com o surgimento de vários tipos de marcadores moleculares, dentre estes o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)(Lopes et al., 2002).

A técnica de AFLP desenvolvida por Zabeau (1993) e por Vos et al. (1995) consiste na amplificação seletiva, via PCR, de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA genômico. A técnica baseia-se na propriedade de certas enzimas de restrição em deixar, após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequências conhecidas. Assim, é possível construir sequências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominadas de adaptadores. Uma vez que as sequências dos adaptadores e dos sítios de restrição são conhecidas, pode-se construir *primers* específicos para estas sequências e realizar a pré-amplificação dos fragmentos de restrição. Os *primers*

são constituídos por uma sequência complementar ao adaptador, seguida de outra específica do sítio de restrição da enzima e de uma extensão de nucleotídeos seletivos no terminal 3' (Vos et al., 1995).

A digestão do DNA genômico é realizada com combinações de enzimas de restrição do tipo II, que clivam o DNA em sítios específicos, sendo uma de corte raro (reconhecem sítios de 6-8 bases, exemplo: *Apal*, *EcoRI*, *HindIII* e *PstI*) e uma de corte frequente (reconhecem sítios de 4 bases, exemplo: *MseI* e *TaqI*). A digestão pode ser simultânea (digestão dupla) ou separada (Lopes et al., 2002).

Como resultado da clivagem do DNA genômico com a combinação de enzimas de corte raro/frequente, é esperado que a maioria dos fragmentos seja de corte frequente/frequente. Fragmentos de corte raro/frequente ocorrem, aproximadamente, em frequência igual a duas vezes o número de sítios de restrição da enzima de corte raro e os fragmentos de corte raro/raro ocorrem em baixa proporção (Borém e Caixeta, 2009). Os fragmentos de corte raro/frequente são preferencialmente amplificados (Vos et al., 1995).

A combinação das enzimas *EcoRI/MseI* é a mais usada, sendo, inclusive, a única combinação oferecida em kits comerciais. No entanto, nem sempre esta combinação resulta nos melhores perfis eletroforéticos, bem como no maior número de locos polimórficos (Lopes et al., 2002). De acordo com Janssen et al. (1996), a combinação *EcoRI/MseI* é mais adequada para os genomas pobres em G+C, *HindIII/MseI* para os genomas com conteúdo de G+C em torno de 40 a 50% e *Apal/TaqI* para os genomas ricos em G+C.

Na amplificação, a adição de apenas um pequeno número de pares de bases, chamadas de nucleotídeos seletivos, no final de cada um dos iniciadores, permite a amplificação de um subconjunto de fragmentos de DNA genômico. Quanto mais complexo o genoma a ser investigado, mais nucleotídeos seletivos devem ser adicionado aos iniciadores, pois à medida que o número de nucleotídeos adicionados à extremidade 3' de cada iniciador é aumentada, a seletividade do iniciador também aumenta. Alguns genomas mais simples podem não requerer qualquer nucleotídeo seletivo. Por outro lado, o desenho do *primer* não requer conhecimento prévio do genoma (Chial et al., 2008). Cada base seletiva reduz em 25% o número de produtos amplificados. Como são 2 sítios de iniciação da PCR, somente 1 em cada 16 (6,25%) fragmentos serão amplificados (Lopes et al., 2002).

Resultados experimentais demonstraram que, para a obtenção de bons padrões de separação dos fragmentos presentes em espécies com genoma complexo, pelo menos três nucleotídeos seletivos devem ser usados em ambos os *primers*, para *EcoRI* e para *MseI*, e que a amplificação seletiva deve ser realizada em duas etapas (pré-amplificação e amplificação seletiva) (Lopes et al., 2002). Portanto, normalmente um nucleotídeo seletivo é usado no terminal 3' dos *primers* na primeira etapa de amplificação, denominada pré-amplificação, e, na segunda fase, a amplificação seletiva, são usados três nucleotídeos seletivos nos terminais 3' dos *primers* (Lopes et al., 2002).

Os alelos dos locos de AFLP (presença ou ausência de um determinado fragmento ou banda) são oriundos da perda ou do ganho de um sítio de restrição, ou da complementaridade ou não das bases seletivas usadas nos terminais 3' dos iniciadores aonde se inicia a PCR com a região que flanqueia o sítio de restrição (Chial et al., 2008).

A eletroforese de alta resolução, normalmente, em gel de poliacrilamida desnaturante, é usada para separar os fragmentos de DNA com base no seu tamanho e carga global negativa, os fragmentos grandes irão migrar mais lentamente e os fragmentos pequenos migrarão mais rapidamente quando expostos a um campo elétrico.

Os fragmentos de DNA resultantes variam em comprimento de 45-800 nucleotídeos. Para visualizar o fragmentos, pode-se usar revelação por nitrato de prata ou com marcação, pois um dos dois iniciadores de PCR é radioativo, usando o  $[g^{33}P]ATP$  e o  $[g^{32}P]ATP$ , ou é marcado por fluorescência, tipicamente o *primer* de corte raro, o que leva à produção de um produto de PCR marcado e que pode ser facilmente detectada (Lopes et al., 2002; Chial et al., 2008). O uso de radioisótopos requer acomodações apropriadas nos laboratórios, licença do CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear), treinamento em proteção radiológica e equipamentos de segurança específicos. A revelação por métodos de coloração com nitrato de prata torna-se mais segura, é prática, eficiente, de baixo custo e não requer equipamentos sofisticados usados na leitura automatizada.

Dependendo da complexidade dos padrões de bandas, pode-se determinar manualmente a presença ou ausência destas, ou pode-se utilizar leituras automatizadas (Chial et al., 2008). A leitura automatizada requer marcação fluorescente e é realizada por analisadores de DNA (*ALFA-Automated Laser*

*Fluorescence Analysis*), que são equipamentos de alto custo e que requerem *softwares* especiais, também de elevado preço (Lopes et al., 2002).

Em estudos usando AFLP, pode-se analisar os padrões de bandas de DNA resultantes para determinar a impressão digital de DNA, associado a uma dada amostra. A técnica detecta marcadores genéticos dominantes, não podendo informar se um indivíduo é homocigoto para um determinado marcador. No entanto, esta técnica permite a amplificação simultânea de múltiplos fragmentos de DNA genômico (geralmente entre 50 e 100 fragmentos dentro de uma única reação da PCR), com elevada especificidade e reprodutibilidade, na ausência de quaisquer dados de sequência de genoma (Spooner et al., 2005; Chial et al., 2008).

A quantidade de marcas que pode ser gerada é virtualmente ilimitada, uma vez que o número de bandas obtidas pode ser aumentado, variando-se as enzimas de restrição e a combinação dos *primers* de natureza diversa, com um número diferente de nucleotídeos seletivos. Essa flexibilidade permite a manipulação direta na geração de fragmentos de AFLP (Borém e Caixeta, 2009; Kumar et al., 2009). As condições rigorosas de PCR empregado sem reações de AFLP leva a resultados altamente reprodutíveis e facilmente comparáveis entre diferentes amostras (Spooner et al., 2005; Chial et al., 2008).

Vários autores descrevem que o polimorfismo gerado por AFLP apresenta herança mendeliana, percorre todo o genoma e pode ser usado para responder uma ampla gama de questões genéticas. Pode ser usado para estudar parentesco, permite indicar se dois organismos são membros da mesma espécie; permite avaliar a variação genética dentro de uma espécie (dentro e entre populações) ou entre espécies intimamente relacionadas; pode ser usado para o mapeamento de genes de interesse, diagnóstico de doenças geneticamente herdadas, análise de *pedigree*, identificação de clones e cultivares, análise de biodiversidade, análise de coleções de germoplasmas e identificação de híbridos (Althoff et al., 2007; Chial et al., 2008; Kumar et al., 2009).

Os marcadores AFLP também foram indicados para outras aplicações, como caracterização da variação somaclonal decorrente da cultura de tecidos e órgãos vegetais (Popescu et al., 2002), identificação de mutantes (Scott et al., 2000) e análise de quimeras (Franks et al., 2002), ratificando a utilidade dessa ferramenta de análise genética. Esta técnica pode ser especialmente útil para responder a

questões genéticas em organismos cuja sequência do genoma ainda não tenha sido determinada, incluindo muitas plantas, fungos e bactérias (Chial et al., 2008).

Além do seu uso difundido em impressões digitais de DNA, abordagens baseadas em AFLP também têm sido utilizadas para produzir impressões digitais de expressão de genes. AFLPs de expressão do gene são gerados utilizando as impressões digitais de cDNA (em vez de DNA genômico) como molde de PCR. Com esta abordagem, pode-se estudar a expressão de genes a partir de múltiplos locos, como um meio de comparação entre dois indivíduos ou populações diferentes. O uso de AFLP continua a evoluir à medida que os investigadores são confrontados com uma lista cada vez maior de questões genéticas complexas (Chial et al., 2008).

## 2.5. AFLP em Cactáceas

Recentemente, alguns estudos utilizando a técnica de AFLP foram realizados em Cactaceae. Labra et al. (2003) utilizaram os marcadores AFLP e cpSSR (*Chloroplastic Simple Sequence Repeat*) para a caracterização de espécies de *Opuntia* e análise das relações entre espécies diferentes. Os resultados mostraram que a combinação de marcadores cpSSR e AFLP forneceu uma estimativa quantitativa das relações genéticas entre 11 espécies de *Opuntia*. Os ensaios de AFLP realizados com quatro combinações de *primers* revelaram 169 bandas, sendo 77,51% polimórficas, o que permitiu que espécies muito próximas fossem distinguidas, mas não permitiu a caracterização de espécies com alta dissimilaridade genética.

As análises demonstraram que indivíduos de diferentes populações, das espécies *O. ficus-indica* e *O. megacantha*, possuem uma constituição genômica e morfológica muito semelhante, claramente distintas de todos os outros acessos analisados, sugerindo que ambas sejam uma mesma espécie, sendo o *O. ficus-indica* uma forma domesticada. Os resultados revelaram a importância da revisão da classificação realizada por Britton e Rose (1919), utilizando novas e eficazes ferramentas, como o AFLP e cpSSR que provaram ser úteis para a realização de *fingerprint* genético e para a definição de relações interespecíficas.

O marcador AFLP também foi utilizado por Nilsen et al. (2005) para avaliar espécies cultivadas e silvestres de seis formas de *O. pilifera* e *O. velutina*, presentes na região do vale Tehuacán-Cuicatlán, México, usadas como alimento pelos

indígenas Popoloca em San Juan Atzingo. O conhecimento tradicional de como distinguir essas formas é preservado na comunidade local, com base no sabor do fruto, na cor, no tamanho e no número de espinhos nos frutos e cladódios. O estudo de classificação morfológica, baseado nos mesmos critérios utilizados pelo índios Popolocas e o estudo da diversidade genética com o AFLP, foi realizado em 67 acessos de *O. pilifera* e em 17 de *O. velutina*. Para os 84 acessos de *Opuntia*, foram realizados ensaios com três combinações distintas de *primers* AFLP, que produziram 129 bandas, sendo 86% polimórficas. O polimorfismo dentro de *O. velutina* foi de apenas 28%.

As marcas de AFLP distinguiram facilmente os 67 indivíduos de *O. pilifera* dos 17 indivíduos silvestres de *O. velutina*, os quais constituíram um grupo separado. Entretanto, a análise da diversidade genética revelada pelo AFLP não se relacionou com a morfológica. Os autores justificaram que isso se deve, provavelmente, ao fato de que a classificação tradicional é baseada apenas em aspectos morfológicos, como cor, forma e quantidade de espinhos, que são características altamente dependentes de fatores ambientais, o que dificulta sua relação com marcas genéticas (Nilsen et al., 2005).

García-Zambrano et al. (2009) utilizaram AFLP para estimar a diversidade genética de nopal (*Opuntia* spp.), do banco de germoplasma da Faculdade de Agronomia da Universidade Autónoma de Nuevo León, e confirmaram a ausência de duplicidade entre os doze acessos do gênero presentes no banco. A análise AFLP dos acessos foi realizada com 64 combinações de *primer* EcoRI e MseI em 32 dúplex (amplificação utilizando um *primer* MseI com dois *primers* EcoRI).

Cisneros e Tel-Zur (2010) utilizaram o marcador AFLP para confirmar a formação de híbridos entre as espécies *Hylocereus polyrhizus* e *H. undatus*. Eles utilizaram 12 plantas escolhidas ao acaso (possíveis híbridos) e seus pais. O número total de bandas analisadas com três combinações de *primers* (E-ACT com M-CTC, M-CAT e M-CTG) variou de 145 a 233. A porcentagem de bandas polimórficas presente em um dos pais variou entre 29% e 35% em todas as amostras, com um número semelhante de bandas monomórficas do parental. A porcentagem de novas bandas variaram de 15% a 26%. Bandas polimórficas forneceram evidência da formação de híbridos e novas bandas confirmaram a ocorrência de novas combinações de genoma que vieram de ambos os progenitores.

A técnica de AFLP foi utilizada por Faria-Tavares et al. (2013) para estimar a diversidade genética entre 17 acessos de mandacaru (gênero *Cereus*) cultivados em diversas regiões do Brasil. Os seis pares de *primers* utilizados amplificaram 348 marcadores AFLP, dos quais 282 (81%) foram polimórficos. A porcentagem de fragmentos polimórficos variou entre 62,5% para a combinação de *primer* E-AAC/MCAG e 91,7% para o E-ACT/M-CAC. O maior número de marcadores informativos (67) foi detectado usando a combinação de *primer* E-ACA/ M-CAG, enquanto a combinação E-AGC/M-CTC revelou o menor número de fragmentos polimórficos (46) em plântulas de mandacaru.

O valor da identidade de Nei entre os acessos de mandacaru foi de 0,6348 a 0,8343 para plantas das regiões sul e nordeste; 0,6348 a 0,6529 entre acessos das regiões sudoeste e nordeste; e 0,6193 a 0,6944 entre acessos das regiões sul e sudoeste. O índice de similaridade entre as amostras das regiões sul, nordeste e sudoeste indicou que as plantas das três regiões podem ser espécies diferentes do gênero *Cereus*: *C. peruvianus* ou *C. repandus* (região sul), *C. jamacaru* (região nordeste) e *C. hildmaniannus* (região sudoeste), ou que, alternativamente, os acessos podem pertencer a uma espécie em processo de especiação.

Monteiro (2013) utilizou AFLP para estimar a diversidade e similaridade genética em amostras de populações de *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) dos estados do Piauí, Bahia e Rio Grande do Norte. As sete combinações de *primers* AFLP usadas geraram 703 fragmentos, dos quais 700 (99,21%) foram polimórficos entre 21 amostras analisadas. A porcentagem média de locos polimórficos entre as combinações utilizadas variou de 95,3%, para a combinação E-AAG/M-CTT; a 100%, para as combinações EACC/M-CAT, E-ACC/M-CAA, EAGC/M-CAG, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTA e EAGG/M-CTG. O maior número de locos informativos (126) foi detectado com a combinação E-AAC/M-CTA, enquanto a combinação E-AAG/M-CTT revelou o menor número de bandas informativas (48).

O baixo valor do  $G_{ST}$  (0,1353) e o alto valor de fluxo gênico (3,1968) indicaram que a diferenciação gênica dentro das populações é maior que entre as populações dos três Estados. No dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, as amostras foram distribuídas em dois grupos. No grupo 1, reuniu quase todas as amostras dos três estados. No grupo 2, mais dissimilares, foi encontrada uma amostra de cada estado. Por meio deste agrupamento, ficou clara a existência de maior similaridade entre os três estados e menor similaridade dentro

dos mesmos. Os marcadores AFLP foram eficientes para a caracterização genética de *P. gounellei*, gerando alto polimorfismo nas amostras das três populações analisadas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material genético

As plantas e frutos de mandacaru dos morfotipos colunar-ereto (típico), monstruoso e tortuoso foram adquiridos em floriculturas e em jardins de residências, em Maringá (PR), Marialva (PR), Goioerê (PR), São Pedro do Iguaçu (PR), Iepê (SP) e Pardinho (SP). O DNA de plantas e plântulas (proveniente da germinação de sementes) foi utilizado para procurar estabelecer a relação genética molecular entre variedades morfológicas naturais (Figura 1) e variedades morfológicas de somaclones de mandacaru regenerados *in vitro* (Figura 2).



Figura 1 - Variedades morfológicas naturais de mandacaru: colunar-ereto (A), monstruoso (B) e tortuoso (C) do Laboratório de cultura de tecidos e eletroforese vegetal (DBC-UEM). Fotografia: Ivone Eloi.

Os somaclones de mandacaru foram regenerados *in vitro* a partir de cultura de calos (Oliveira et al., 1995). Os calos foram obtidos de tecidos de hipocótilos de plântulas de mandacaru com caule colunar-ereto, os quais foram originalmente designados como sendo da espécie *Cereus peruvianus* (Oliveira et al., 1995; Mangolin et al., 1994; 1997). Entretanto, no presente estudo, estas plantas regeneradas *in vitro* são designadas simplesmente de somaclones de mandacaru com morfologia colunar-ereta e morfologia de monstruosos. Os somaclones com

morfologia colunar-ereta e morfologia monstrosos foram comparados com as plantas de variedades morfológicas naturais de mandacaru, utilizando a técnica de AFLP (Quadro 1).



Figura 2 - Somaclones de mandacaru regenerados *in vitro* a partir de cultura de calos, apresentando morfologia colunar-ereto (A) e monstroso (B). Jardim Experimental-UEM. Fotografia: Ivone Eloi.

Quadro 1 - Morfotipos e local de coleta utilizados no estudo da diversidade genética de variedades morfológicas de mandacaru

Morfotipo	Amostra	Origem / cidade (Estado)
Colunar-ereto	c-1	pPac-1 / Zona 6/ Maringá (PR)
	c-2	pPac-1 / Zona 6/ Maringá (PR)
	c-3	pPac-2 / Zona 7/ Maringá (PR)
	c-4	pPac-2 / Zona 7/ Maringá (PR)
	c-5	pPac-3 / Horto de Plantas Mediciniais - UEM / Maringá (PR)
	c-6	pPac-3 / Horto de Plantas Mediciniais - UEM / Maringá (PR)
	c-7	pPac-4 / Zona 7/ Maringá (PR)
	c-8	pPac-4 / Zona 7/ Maringá (PR)
Monstruoso	m-9	pPAm-1 / Zona 02 / Maringá (PR)
	m-10	pPAm-2 / Zona 04 / Maringá (PR)
Monstruoso	m-11	pPAm-3 / São Pedro do Iguazu (PR)
	m-12	pPAm-4 / Zona 05 / Maringá (PR)
	m-13	pPAm-5 / Zona 01 / Maringá (PR)

Quadro 1, cont.

	m-14	pPAm-6 / Zona 02 / Maringá (PR)
	m-15	pPAm-6 / Zona 02 / Maringá (PR)
	m-16	pPAm-6 / Zona 02 / Maringá (PR)
	m-17	pPAm-7 / Zona 02 / Maringá (PR)
	m-18	pPAm-8 / Horto de Plantas Mediciniais - UEM / Maringá (PR)
	m-19	pPAm-9 / Rod. Castelo Branco Km 191/ Pardinho (SP)
	m-20	pPAm-10 / Zona 04 / Maringá (PR)
	m-21	PAm-21 / Viveiro de mudas-UEM / Maringá (PR)
	m-22	PAm-22 / Viveiro Verde / Maringá (PR)
	m-23	PAm-23 / Zona 07 / Maringá (PR)
	m-24	PAm-24 / Zona 24 / Maringá (PR)
	m-25	PAm-25 / Iepê (SP)
	m-26	PAm-26 / Zona 37 / Maringá (PR)
	m-27	PAm-27 / Viveiro / Maringá (PR)
Tortuoso	t-28	pPAAt-1 / Zona 08 / Maringá (PR)
	t-29	pPAAt-1 / Zona 08 / Maringá (PR)
	t-30	pPAAt-2 / Zona 08 / Maringá (PR)
	t-31	pPAAt-2 / Zona 08 / Maringá (PR)
	t-32	pPAAt-3 / Zona 08 / Maringá (PR)
	t-33	pPAAt-4 / BR 376 Km 188 / Marialva (PR)
	t-34	PAAt-4 / BR 376 Km 188 / Marialva (PR)
	t-35	PAAt-35 / BR 376 Km 188 / Marialva (PR)
	t-36	PAAt-36 / Goioerê (PR)
	t-37	PAAt-37 / Viveiro Expomudas / Maringá (PR)
	t-38	PAAt-38 / Viveiro Ecocentro / Maringá (PR)
Somaclone colunar-ereto	sc-39	PAsc-39 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sc-40	PAsc-40 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sc-41	PAsc-41 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sc-42	PAsc-42 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sc-43	PAsc-43 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
Somaclone monstuoso	sm-44	PAsm-44 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sm-45	PAsm-45 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sm-46	PAsm-46 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sm-47	PAsm-47 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sm-48	PAsm-48 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sm-49	PAsm-49 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sm-50	PAsm-41 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)
	sm-51	PAsm-51 / Jardim Experimental-UEM / Maringá (PR)

pPac = plântula de planta adulta colunar, pPAm = plântula de planta adulta monstuoso, pPAAt = plântula de planta adulta tortuoso, Pac = planta adulta colunar, pAm = planta adulta monstuoso, pAt = planta adulta tortuoso, Sc = somaclone colunar, Sm = somaclone monstuoso.

### 3.2. Germinação das sementes

Para a germinação das sementes coletadas de frutos de mandacaru, aproximadamente 20 sementes de cada fruto foram mantidas em água por 24 horas, para quebra da dormência, como descrito por Carvalho et al. (2008). Estas sementes foram mantidas em agitação periódica, por 15 minutos, em uma solução aquosa de detergente comercial (15 gotas/0,5L), para a quebra da tensão superficial da água, promovendo uma hidratação mais eficiente das sementes. Em seguida, as sementes foram enxaguadas em água destilada autoclavada. Estas foram esterilizadas em solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial (1:1), por 1 hora, e enxaguadas em água destilada autoclavada. Por fim, foram inoculadas em frasco de vidro estéril, contendo meio Knudson (1946) (Quadro 2).

Quadro 2 - Composição do meio Knudson utilizado para germinação de sementes e obtenção de plântulas de mandacaru

Composição	g/L
Macronutrientes	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1,00000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25000
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,25000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,50000
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02500
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,00750
Micronutrientes	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00056
MoO <sub>3</sub>	0,00016
CuSO <sub>4</sub>	0,00040
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,00331
Sacarose	20
Ágar	6
pH	5,6 - 5,8

Os frascos foram vedados em filme PVC e mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 12h a 30°C. Após a germinação, plântulas com

aproximadamente 5cm (Figura 3) foram utilizadas para a extração do DNA genômico.



Figura 3 - Plântulas de mandacaru crescidas a partir de sementes coletadas na Zona 02, Maringá (PR), em meio Knudson.

### 3.3. Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico das plântulas, estas foram retiradas do meio de cultura com aproximadamente 5cm de altura, forma lavadas e tiveram suas raízes retiradas. Para a extração do DNA genômico de plantas adultas, foram cortadas secções do caule jovem e retirado suas aréolas e cutícula. As 51 amostras de mandacaru (Quadro 1) foram extraídas individualmente, utilizando o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999), com modificações para extração de plantas adultas, descritas no Quadro 3. As plântulas de mandacaru foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido, utilizando cadinho e pistilo. O pó obtido foi transferido para um microtubo (2mL) e foram adicionados 300µL de tampão de extração, 100µL de N-Lauril Sarcosina 5%, 100µL de PVP-40 10% e 100µL de CTAB 20%. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria, durante 1 hora, a 65°C, realizando-se agitações suaves a cada 15 minutos. Os microtubos foram retirados do banho-maria e mantidos em temperatura ambiente por cinco minutos.

Após o resfriamento, foram adicionados 600µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 e os microtubos foram agitados suavemente durante cinco minutos. As amostras foram centrifugadas, por

10 minutos, com 10.000r.p.m. em temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi recuperado e transferido para outro microtubo e foram adicionados 2,5µL de RNase (10mg/mL). Estes microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por duas horas para a digestão do RNA. Após o período de incubação com RNase, foi realizado uma nova purificação usando 600µL de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1; os microtubos foram agitados durante cinco minutos e centrifugados nas condições já descritas (Aljanabi et al.,1999).

Quadro 3- Protocolo utilizado para a extração de DNA de plântulas e de plantas adultas de mandacaru, adequado a partir do protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999)

Tampão de extração	Plântulas	Planta adulta
Tris-HCL	200 mmol/L pH 8,0	200 mmol/L pH 8,0
EDTA	50 mmol/L pH 8,0	50 mmol/L pH 8,0
NaCl	2,2 mol/L	5 mol/L
CTAB	2%	2%
Sulfito de Sódio	0,06%	0,06%
Reagentes de solubilização das membranas e antioxidantes		
CTAB	20%	20%
N-Lauril Sarcosina	05%	05%
PVP-40	10%	10%
Reagentes de purificação		
Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1)	600 µL	900 µL
RNase (10mg/mL)	0,1 ng/µL	0,1 ng/µL
Clorofórmio: Álcool isoamílico (24:1)	600 µL	900 µL
Reagentes de precipitação		
Isopropanol gelado	1 volume	0,6 volume
NaCl (5 mol/L)	0,16 volume	0,06 volume
Lavagem do precipitado		
Etanol 70% (2x)	-	500 µL
Etanol absoluto (2x)	500 µL	-

O sobrenadante foi novamente coletado e transferido para outro microtubo (1,5mL) e, para precipitação do DNA, foi adicionado isopropanol gelado (1X do volume recuperado) e cloreto de sódio 5M (0,16X do volume recuperado). Os tubos foram mantidos *overnight* em -20°C. Após este período, foi efetuada uma centrifugação por 20 minutos, com 10.000 r.p.m e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 500µL de etanol absoluto gelado, por duas vezes, em condições de centrifugações descritas acima. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em 40µL de TE (10mM Tris/HCl pH 8,0 e 1mM EDTA). Os tubos foram vedados com filme plástico e armazenados em geladeira com 4°C (Aljanabi et al.,1999).

Para extração do DNA genômico de plantas adultas, que contêm maiores concentrações de polissacarídeos, foram aumentados a concentração de cloreto de sódio do tampão de extração e o volume (900µL) das soluções de purificação (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e clorofórmio:álcool isoamílico). O DNA foi precipitado com isopropanol gelado (0,6X do volume recuperado) e cloreto de sódio 5M (0,06X do volume recuperado). As lavagens do DNA precipitado foram realizadas com 500 µL de etanol 70%.

### **3.4. Quantificação do DNA**

A quantificação do DNA foi feita por comparação visual via eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris-HCl1M, Acetato de Sódio 1M, EDTA 0,5M, pH 8,0) e 80 Volts por aproximadamente 1 h (Hoisington et al., 1994). A concentração do DNA extraído de cada amostra foi estimada por comparação visual com concentrações conhecidas e gradativas de DNA padrão (Fago  $\lambda$ ): 50, 100, e 150ng. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,5µg/mL e a imagem foi capturada em sistema de fotodocumentação L-PIX HE, Locus biotecnologia.

### **3.5. Ensaio de AFLP**

Os ensaios de AFLP foram realizados em etapas: i) digestão do DNA genômico, ii) ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos de

DNA gerados pela clivagem, iii) pré-amplificação dos fragmentos de restrição utilizando *primers* com um nucleotídeo seletivo, e iv) amplificação seletiva de fragmentos com *primers*, possuindo três bases seletivas. Foram utilizados os kits *AFLP® Analysis System I* e *AFLP® Starter Primer Kit* da *Invitrogen*. Após a clivagem e amplificação do DNA, foi realizada eletroforese para a separação dos fragmentos de DNA amplificados em gel de poliacrilamida.

### 3.5.1. Digestão do DNA

Para a digestão do DNA, foi utilizado 252ng do DNA genômico extraído de cada planta. Estas amostras de DNA foram duplamente e simultaneamente digeridas, utilizando uma enzima de corte raro (*EcoRI*) e uma enzima de corte freqüente (*Msel*). Os sítios de restrição destas enzimas estão apresentados no Quadro 4. A digestão foi realizada em termociclador (Techne TC-512), em 37°C por 3 horas, 15 minutos de extensão, a 70°C, e imersão em 10 °C. A solução de restrição foi preparada com 6µL do tampão de reação 5X [Tris-HCl 50mM (pH 7,5), acetato de magnésio 50mM, acetato de potássio 205mM], 2µL das enzimas *EcoRI/Msel* [1,25U/µL cada em Tris-HCl 10mM (pH 7,4), NaCl 50mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, 0,1mg/mL BSA, glicerol 50% (v/v), 0,1% Triton®X-100], 1,0µL de água destilada e 21,0µL de DNA (12ng/µL), totalizando um volume de 30µL. Após a clivagem do DNA, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%, com tampão TBE 0,5X (89 mmol/L Tris, 89 mmol/L Ácido Bórico e 2 mmol/L EDTA), em 60 Volts, por aproximadamente 3 horas, para confirmar a digestão.

### 3.5.2. Ligação de adaptadores

Após a digestão do DNA genômico, realizou-se a ligação dos adaptadores aos fragmentos. As seqüências nucleotídicas dos adaptadores são apresentadas no Quadro 4.

A ligação foi realizada adicionando-se aos 30µL de DNA digerido e proveniente da etapa anterior: 28,8µL da solução ligante do adaptador [Adaptadores *EcoRI/Msel*, ATP 0,4mM, Tris-HCl 10mM (pH 7,5), acetato de magnésio 10mM, acetato de potássio 50mM] e 1,2µL da enzima *T<sub>4</sub>* Dna ligase [1U/µL em 10mM Tris-HCl (pH 7,5), DTT 1mM, KCl 50 mM, glicerol 50% (v/v)]. Após uma delicada

agitação, esta mistura foi colocada em termociclador (Techne TC-512), a 20°C, por 2 horas, e imersão em 4°C. Após a ligação dos adaptadores, foi realizada uma diluição (1:4) com TE (10mM Tris/HCl pH 8,0 e 1mM EDTA).

Quadro 4 - Sítios de restrição das endonucleases, seqüências dos adaptadores e dos *primers* pré-seletivos complementares aos adaptadores, utilizados na realização da técnica AFLP em plantas de mandacaru

Enzima	Sítios de restrição	Adaptadores	Primers pré-seletivos
<i>EcoRI</i>	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5.	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'	5'-GACTGCGTACCAATTC E-3'
<i>MseI</i>	5'...T↓TAA...3' 3'...AAT↑T...5.	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5.	5'-GATGAGTCCTGAGTAA E-3'

E: nucleotídeo arbitrário usado na pré-amplificação.

### 3.5.3. Pré-amplificação

A reação de amplificação pré-seletiva ou pré-amplificação foi realizada utilizando-se *primers* pré-seletivos complementares à sequência dos adaptadores e com um nucleotídeo seletivo (Quadro 5).

Quadro 5 - Programa utilizado para amplificação do DNA de mandacaru com os *primers* pré-seletivos (Labra et al., 2003)

Seqüência	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	95°C	120 s
2	Desnaturação	94°C	45 s
3	Anelamento	52°C	60 s
4	Extensão	72°C	60 s
5	Voltar aos passos 2, 3 e 4 por 19 vezes		
6	Extensão final	72 °C	600 s
7	Imersão	10°C	∞

### 3.5.4. Amplificação seletiva

As reações de amplificação seletiva foram realizadas utilizando-se seis combinações de *primers*, contendo três nucleotídeos seletivos. As combinações de

*primers* utilizadas para as reações de amplificação seletiva estão apresentadas no Quadro 6.

Quadro 6 - Combinações e seqüências dos *primers* seletivos utilizados para as reações de amplificação seletiva das amostras de DNA de plantas de mandacaru

Combinações de <i>primers</i>	Nucl. Seletivo	Seqüência dos <i>primers</i>
E36M47	E-ACC	5'-GACTGCGTACCAAT <b>CACC</b> -3'
	M-CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC <b>CAA</b> -3'
E38M48	E-ACT	5'-GACTGCGTACCAAT <b>CACT</b> -3'
	M-CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC <b>CAC</b> -3'
E38M60	E-ACT	5'-GACTGCGTACCAAT <b>CACT</b> -3'
	M-CTC	5'-GATGAGTCCTGAGTA <b>ACTC</b> -3'
E38M61	E-ACT	5'-GACTGCGTACCAAT <b>CACT</b> -3'
	M-CTG	5'-GATGAGTCCTGAGTA <b>ACTG</b> -3'
E40M60	E-AGC	5'-GACTGCGTACCAAT <b>CAGC</b> -3'
	M-CTC	5'-GATGAGTCCTGAGTA <b>ACTC</b> -3'
E41M60	E-AGG	5'-GACTGCGTACCAAT <b>CAGG</b> -3'
	M-CTC	5'-GATGAGTCCTGAGTA <b>ACTC</b> -3'

E: *primers* complementares ao sítio de restrição da enzima *EcoRI*.

M: *primers* complementares ao sítio de restrição da enzima *MseI*.

Para cada par de *primer* escolhido, foram preparadas duas soluções *Mix*. Para a solução *Mix I* foram utilizados 0,25µL de *primer EcoRI*, 2,25µL do *primer MseI*, totalizando 2,5µL para cada amostra. Na solução *Mix II*, foram utilizados 3,95µL de água destilada, 1µL do tampão PCR plus Mg (10X), 0,05µL de *Taq-platinum* DNA polimerase (5U/µL), totalizando 5µL para cada amostra. Para cada uma das 51 amostras de mandacaru, a reação de amplificação seletiva foi realizada utilizando 2,5µL da solução *Mix I*, 5µL da solução *Mix II* e 2,5µL de cada amostra de DNA pré-amplificada e diluída (1:5) em TE, totalizando 10µL. Estas reações de

amplificação seletiva foram realizadas em termociclador (TechneTC-512) com programa descrito no Quadro 7, de acordo com o protocolo do kit utilizado.

Quadro 7 - Programa utilizado para amplificação seletiva das amostras de DNA de mandacaru

Seqüência	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94°C	60 s
2	Desnaturação	94°C	30 s
3	Anelamento	54°C	30 s
4	Extensão	72°C	60 s
5	Voltar ao passo 2,3 e 4 por 29 vezes		
6	Extensão final	72 °C	600 s
7	Imersão	10°C	∞

A separação dos fragmentos de DNA foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida e estes foram visualizados corando-se os géis com nitrato de prata.

### 3.5.5. Preparo dos géis e condições da eletroforese para separação de fragmentos AFLPs

Os géis foram preparados, utilizando-se duas placas de vidro de tamanhos diferentes, a maior com 35cm x 43,5cm e a menor com 35cm x 41,5cm, contendo "orelhas". As placas foram limpas com álcool e, posteriormente, a placa maior foi tratada com 25µL de *Bind Silane* em 1ml de solução etanol acídica (Etanol 95%, Ácido acético 0,5%). Este tratamento foi realizado para aderir o gel à placa e evitar que esse se desprendesse durante as manipulações de coloração. A placa menor foi tratada com *Repel Silane*, para que esta se desprendesse uniformemente do gel após a eletroforese. Entre as placas, foram colocados espaçadores com 0,4mm de espessura; as laterais e a base foram vedadas com agarose 0,8% e presas com presilhas de papel, deixando-se apenas a parte superior aberta para que a solução de preparo do gel pudesse ser vertida entre as duas placas.

A solução estoque para a preparação do gel de poliacrilamida desnaturante foi feita segundo Creste et al. (2001). Os constituintes desta solução estão apresentados no Quadro 8. Esta solução estoque foi preparada e armazenada em frasco escuro em 4°C.

Quadro 8 - Volumes dos reagentes utilizados para o preparo da solução estoque dos géis de poli(acrilamida) segundo Creste et al. (2001)

Solução Estoque	Volume
Solução Acrilamida/bisacrilamida 30%	117mL
Tampão TBE (5x)	100 mL
Uréia	210 g
Água MilliQ	Até completar 500 mL

A solução de acrilamida/bisacrilamida (30%) foi preparada com 29g de acrilamida e 1g de bisacrilamida dissolvidas em 100mL de água ultrapura. Após a dissolução dos reagentes, o volume foi acertado e esta solução foi filtrada em papel de filtro.

O preparo de cada gel de poli(acrilamida) desnaturante 7% e com 7M de ureia foi realizado utilizando 80mL da solução estoque de poli(acrilamida), 320 $\mu$ L de Persulfato de Amônia 10% e 134 $\mu$ L de TEMED. Depois do preparo, esta solução foi acondicionada entre as placas com o auxílio de uma seringa de 50mL. Este procedimento foi realizado de forma contínua e cuidadosa para não ocorrer a formação de bolhas. Após o completo preenchimento desta solução entre as placas, foi introduzido um pente para a formação de poços, onde posteriormente foram aplicadas as amostras.

Após a polimerização do gel, foi realizada uma pré-corrida em cuba de eletroforese vertical (Fisher Scientific-FB-SEQ-3445), sem o pente, com tampão TBE 1X (89mM Tri-Base, 89mM de ácido bórico e 2mM EDTA, pH 8), ligada a uma fonte de alta voltagem com 1700V, 65W e 50mA por 1 hora. Após a pré-corrida, os poços foram limpos de resíduos de géis e ureia, injetando tampão TBE 1X com auxílio de uma seringa.

Antes de aplicar as amostras amplificadas no gel de poli(acrilamida), estas foram desnaturadas, utilizando 5 $\mu$ L de cada amostra, com 2,5 $\mu$ L de tampão desnaturante [EDTA 10mM (pH 8,0), 1mg/mL de xileno cianol e 1mg/mL de azul de bromophenol, 12,5% de sacarose, em Formamida], a 94°C, por 3 minutos, em termociclador Techne TC-512. As amostras foram imediatamente resfriadas em gelo e aplicadas no gel.

As amostras foram submetidas à corrida eletroforética por aproximadamente 160 minutos (20 minutos após a saída do segundo frente de azul), nas mesmas condições da pré-corrida. Após esse tempo, as placas foram separadas, o gel foi mantido preso na placa maior (tratada com *Bind Silane*), mantendo-se, assim, por todo o processo de coloração. As bandas foram reveladas, utilizando coloração com nitrato de prata (Quadro 9) segundo Bassam et al. (1991).

### 3.6. Análise dos dados

Para os fragmentos clivados com as enzimas *EcoRI* e *MseI*, amplificados com seis combinações de *primers* seletivos e evidenciados em géis de poliacrilamida, foi construído um matriz binária codificado por 1 (presença) e 0 (ausência).

A diversidade genética entre os acessos foi determinada pela porcentagem de locos polimórficos. A diversidade genética entre as 51 plantas analisadas foi estimada pelo coeficiente de diferenciação genética ( $G_{st}$ ), diversidade genética total entre os acessos ( $H_t$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ). Para o cálculo dessas análises, foi utilizado o programa Popgene 1.32 (Yeh et al., 1999).

Quadro 9 - Coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata, segundo Bassam et al. (1991)

Procedimento	Solução	Tempo
Fixação	Ácido acético 10%	20 min.
Enxágue	Água destilada	02 min. (3x)
Impregnação	0,2% nitrato de prata; 0,15% Formaldeído 37%	25 min.
Enxágue	Água destilada	20 s
Revelação	3% $Na_2CO_3$ ; 0,15% de Formaldeído 37%; 0,0002% $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	7 min.
Finalização	Ácido acético 10%	5 min.
Conservação	Água destilada	

A matriz de similaridade foi submetida a uma análise de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Usingan Arithmetic Average*) para construção de um dendrograma, a fim de representar graficamente a distância

genética das plantas analisadas. Para esta análise, foi utilizado o programa NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*), (Rohlf, 1989), baseado no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e o programa Popgene 1.32 (Yeh et al., 1999), que utiliza o complemento aritmético da distância genética de Nei (1978).

A análise de estruturação genética de mandacaru foi realizada pelo agrupamento (*Bar Plot*), utilizando a estatística Bayesiana, realizada pelo programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). O número  $k$  de grupos foi determinado pelo método de Evanno et al. (2005) e os resultados do STRUCTURE foram apresentados pelo software DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de extração de DNA, adaptado de Aljanabi et al. (1999), foi eficiente para a extração de DNA de mandacaru (*Cereus peruvianus*), sendo possível realizar uma extração livre de polissacarídeos, com qualidade para o corte com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* e ampliações com *primers* AFLP. As concentrações de DNA variaram de 10 a 100 ng·μL<sup>-1</sup> (Figura 4).

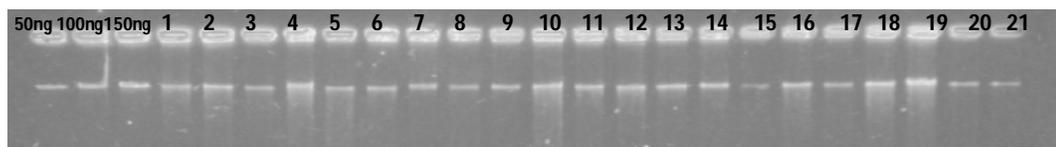


Figura 4 - Gel de agarose 0,8% utilizado para a quantificação das amostras de DNA de mandacaru. Amostras 1, 2 e 3 são de DNA de fago  $\lambda$  com concentrações conhecidas (50, 100, 150ng, respectivamente). As amostras de 1 a 21 são de DNA de mandacaru.

O DNA genômico das 51 amostras de mandacaru com morfotipos colunar-ereto e monstruoso foi analisado com seis combinações de *primers* para AFLP, que resultaram em 534 fragmentos de DNA amplificados, dos quais 503 (94,19%) foram polimórficos (Quadro 10). A porcentagem média de fragmentos polimórficos entre as combinações utilizadas variou de 91,25%, para a combinação E38M48, a 96,19%, para a combinação E36M47. Com a combinação E36M47, foi detectado o maior número de fragmentos (105), enquanto a combinação E38M61 revelou o menor número de fragmentos (53) entre as amostras de mandacaru analisadas (Quadro 10).

Quadro 10 - Número de fragmentos amplificados (NF), número de fragmentos polimórficos (NFp), número de fragmentos monomórficos (NFm) e porcentagem de polimorfismo para cada combinação de *primer* AFLP nas 51 amostras de mandacaru

Combinações de <i>primers</i>	NF	NFp	NFm	% P
E36M47 (E-ACC, M-CAA)	105	101	04	96,19
E38M60 (E-ACT, M-CTC)	81	76	05	93,82
E41M60 (E-AGG, M-CTC)	109	103	06	94,49
E40M60 (E-AGC, M-CTC)	103	97	06	94,17
E38M48 (E-ACT, M-CAC)	80	73	07	91,25
E38M61 (E-ACT, M-CTG)	56	53	03	94,64
Total	534	503	31	94,19

Na Figura 5, estão demonstrados os perfis eletroforéticos para as amostras de mandacaru obtidos com a combinação de *primers* AFLP E38M60 e E41M60.

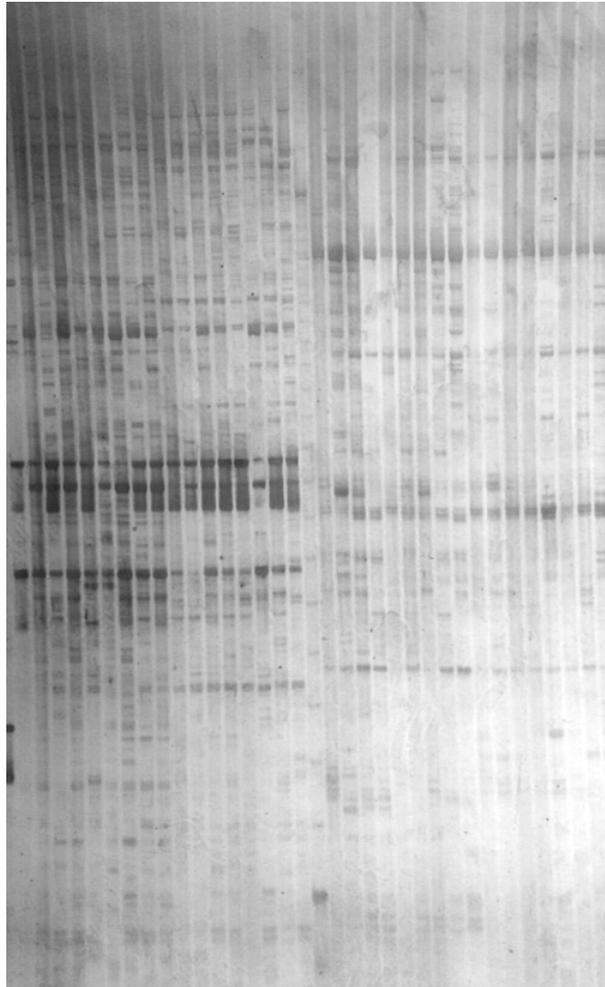


Figura 5 - Gel (7% de poliacrilamida e 7M de uréia) utilizado para separar o produto da amplificação seletiva de DNA de amostras de mandacaru com as combinações de *primers* AFLP E38M60 (E-ACT e M-CTC) e E41M60 (E-AGG e M-CTC).

O número de fragmentos amplificados (534) e o número de fragmentos polimórficos (503; 94,19%), obtidos com as seis combinações de *primers* AFLP para as 51 amostras de mandacaru, foram proporcionalmente maiores do que os valores obtidos na maioria dos estudos com AFLP em espécies de cactáceas. Labra et al. (2003) analisaram 11 espécies de *Opuntia* com quatro combinações de *primers* AFLP e obtiveram 169 bandas e 77,51% destas foram polimórficas. Nilsen et al. (2005), ao analisar 84 acessos de *Opuntia* com três outras combinações de *primers*

AFLP, obtiveram um total de 129 bandas, sendo que 86% destas foram polimórficas. Faria-Tavares et al. (2013) estimaram a diversidade genética entre 17 acessos de mandacaru com seis pares de *primers* AFLP e obtiveram 348 marcadores, dos quais 282 (81%) foram polimórficos. Por outro lado, valores mais altos do que os identificados no presente trabalho foram observados por Monteiro (2013), que utilizou AFLP para estimar a diversidade e similaridade genética em 21 amostras de populações de *Pilosocereus gounellei* (xique-xique), com 7 combinações de *primers* AFLP, e que geraram 703 fragmentos, dos quais 700 (99,21%) foram polimórficos. O alto polimorfismo detectado pela técnica AFLP se deve ao fato desta metodologia explorar simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição (Wünsch e Hormaza, 2002), associado à ocorrência ou não de amplificação a partir de seqüências arbitrárias, conseguindo, assim, flexibilidade significativa na obtenção de polimorfismos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A proporção de marcadores AFLP polimórficos nos diferentes morfotipos de mandacaru revelou um polimorfismo médio de 74,98% e diversidade genética média de 0,2722. O morfotipo monstruoso apresentou maior polimorfismo (89,33%) e diversidade genética ( $h = 0,3180$ ); as plantas de somaclones colunares-erectos apresentaram o menor polimorfismo (63,11%) e diversidade genética ( $h = 0,2406$ ) (Quadro 11).

Quadro 11 - Número de locos polimórficos (NLp), estimativas da porcentagem de polimorfismos (%P) e valores de diversidade genética (h) (Nei, 1973) para os morfotipos de mandacaru analisados com o marcador AFLP

Morfotipos	Indivíduos (n)	NLp / Total de locos	%P	h
Colunar-ereto	8	396/534	74,16 %	0,2504
Monstruoso	19	477/534	89,33 %	0,3180
Tortuoso	11	395/534	73,97 %	0,2653
Somaclone colunar-ereto	5	337/534	63,11 %	0,2406
Somaclone monstruoso	8	397/534	74,34 %	0,2868
Total/Média	51	-	74,98%	0,2722

O maior polimorfismo e a maior diversidade genética foram encontrados nos morfotipos monstruosos propagados na natureza e nos somaclones monstruosos

originados na cultura *in vitro*, que são plantas com maior diversidade na morfologia de caules.

O fenótipo monstruoso, usado para designar variedade (*C. peruvianus monstruosus*) ou espécie do gênero *Cereus* (*C. monstruosus* ou *C. monstrosus*), recebeu esta denominação justamente por apresentar morfologia variada de caules e ausência de um padrão definido, como os padrões que podem ser observados nos caules colunares-erectos ou nos caules tortuosos da espécie designada *C. tortuosus*. Assim, é possível que a maior diversidade morfológica de caules nos fenótipos monstruosos possa ser decorrente de maior variação em nível de DNA das plantas com caules monstruosos. Meijer e Murray (2001) e Muller (2012) sugerem que a divisão celular e morfogênese são intimamente interligadas e que a arquitetura global de um órgão (caule, por exemplo) é determinada por genes de padronização e a elaboração e execução de programas de desenvolvimento requerem um controle adequado do ciclo de divisão celular, envolvendo um intrincado mecanismo proteico.

Segundo Katsir et al. (2011), no desenvolvimento das plantas, os peptídeos sinais transmitem informações para coordenar a proliferação e a diferenciação celular e salientaram que esses peptídeos sinais são geralmente codificados por uma família de genes que se ligam às famílias de receptores correspondentes. Katsir et al. (2011) ainda discutem que, durante o desenvolvimento, ocorre uma precisa expressão espaço temporal de sinais e seus receptores, ocorrendo mudanças bioquímicas na expressão ao longo da evolução, contribuindo para o refinamento e manutenção da complexidade dos programas de desenvolvimento. No desenvolvimento do morfotipo monstruoso, a forma mais diversificada das plantas de mandacaru, é possível que a divergência ou ausência de peptídios sinais específicos esteja relacionada com a morfologia mais diversificada. A ausência de determinados peptídeos que determinam um padrão uniforme, e bem determinado, para os caules das plantas pode ser devido a variações na sequência de bases do DNA (de genes que codificam peptídeos sinais) que determinaram o polimorfismo no comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP).

O polimorfismo médio (74,98%) e a diversidade genética média (0,2722) obtidos no presente estudo foram maiores do que os valores estimados por Tavares (2011), que descreveu um polimorfismo médio de 10,42% e diversidade genética média de 0,2001 em 17 acessos de mandacaru utilizando AFLP. Valores maiores de polimorfismo e diversidade genética que os estimados para os morfotipos de

mandacaru usando a técnica AFLP foram descritos por Monteiro (2013), que detectou polimorfismo médio de 75,39% e diversidade genética média de 0,2650 em 21 amostras de populações de *P. gounellei* (xique-xique) com marcadores AFLP.

A estimativa da diversidade genética de Nei (1973) ( $H_t$ ), do coeficiente de diferenciação genética de Nei (1973) ( $G_{ST}$ ) e do fluxo gênico ( $N_m$ ) para os tipos morfológicos de mandacaru estão apresentados no Quadro 12. A divergência genética ( $G_{ST}$ ) entre as amostras dos cinco morfotipos de caules de mandacaru foi alta ( $G_{ST} = 0,1957$ ), indicando grande diferenciação genética entre os mesmos. O parâmetro  $G_{ST}$  de Nei (1973) é equivalente ao coeficiente  $F_{ST}$  de Wright (1965, 1978) e pode ser chamado de coeficiente de diferenciação genética, se há somente dois alelos nos locos (Nei, 1973). De acordo com Wright (1978), valores de  $F_{ST}$  entre 0,05 e 0,15 indicam divergência genética moderada entre as amostras de populações, enquanto valores de  $F_{ST}$  entre 0,15 e 0,25 indicam diferenciação genética alta entre as populações comparadas.

Quadro 12 - Estimativas da diversidade genética de Nei (1973) ( $H_t$ ), coeficiente de diferenciação genética de Nei (1973, 1978) ( $G_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ) para os tipos morfológicos de mandacaru

Parâmetros	$H_t$	$G_{ST}$	$N_m$
Média	0,3382	0,1957	2,0549
Desvio padrão	0,0225	-	-

$N_m = 0,5(1 - G_{ST})/G_{ST}$

O fluxo gênico também foi alto ( $N_m = 2,0549$ ) (Quadro 12). Segundo Govindaraju (1989), valores de  $N_m$  menores que 0,25 indicam fluxo gênico baixo, valores entre 0,25 e 0,99 indicam fluxo gênico intermediário e valores maiores que 1 indicam um fluxo gênico alto. Portanto, o valor de fluxo gênico entre os morfotipos de mandacaru indica que pode haver trocas de alelos entre os morfotipos de mandacaru. Segundo Loveless e Hamrick (1984), o fluxo gênico pode ser atribuído pelo fluxo de pólen e dispersão de sementes. Os cactos colunares são polinizados por pássaros e morcegos, que apresentam grande potencial para dispersão de pólen (Hamrick et al., 2001). O valor alto do fluxo gênico entre os morfotipos pode ser também devido ao fato dessas plantas serem ornamentais, principalmente de jardins urbanos, e a dispersão ser normalmente influenciada pelo homem.

As relações de similaridade entre as 51 amostras de mandacaru, baseadas nos valores de distância genética de Nei (1978), apresentaram valores de identidade que variaram de 0,8747 (entre plantas colunares-eretos e somaclones monstruoso) a 0,9456 (entre plantas do morfotipo monstruoso e colunar-ereto). A identidade genética foi similar entre plantas colunares-eretos e somaclones colunares-eretos (0,8789) e plantas colunares-eretos e somaclones monstruoso (0,8747), evidenciando que a diferenciação genética é em decorrência da origem da planta (natural ou produzida *in vitro*) e provavelmente provocada por variações somaclonais decorrentes do meio de cultura (Quadro 13).

Quadro 13 - Coeficiente de similaridade e distância genética de Nei entre os morfotipos de mandacaru analisadas com marcador AFLP

Morfotipos	Colunar-ereto	Monstruoso	Tortuoso	Somaclone colunar-ereto	Somaclone monstruoso
Colunar-ereto	*****	0,9456	0,8960	0,8789	0,8747
Monstruoso	0,0559	*****	0,9288	0,9120	0,9032
Tortuoso	0,1098	0,0738	*****	0,9096	0,8980
Somaclone colunar-ereto	0,1290	0,0921	0,0948	*****	0,9141
Somaclone monstruoso	0,1338	0,1018	0,1076	0,0898	*****

Identidade genética de Nei (I) (acima da diagonal) e Distância genética (D) Abaixo da diagonal.

Valores de identidade genética menores que 0,85 foram descritos por Thorpe e Solé-Cava (1994) como sendo encontrados para populações geograficamente distantes, em processo de especiação, ou para espécies diferentes do mesmo gênero. Desta forma, os valores de identidade baseados na distância genética de Nei (1978) sugerem que plantas do morfotipo colunar, monstruosas e tortuosas são da mesma espécie e os morfotipos podem ser considerados como variedades. Em nível molecular, a nomenclatura *C. peruvianus* var. *monstruosus* é mais adequada do que *C. monstruosus*.

Os coeficientes de similaridade entre as 51 amostras de mandacaru com diferentes morfotipos foram utilizados para a formação de um dendrograma, baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), formando 2

grupos. O grupo 1 foi formado por plantas com morfotipos colunar-ereto, monstruoso e tortuoso; o grupo 2 foi formado por plantas somaclones, com morfotipos colunar-ereto e monstruoso (Figura 6).

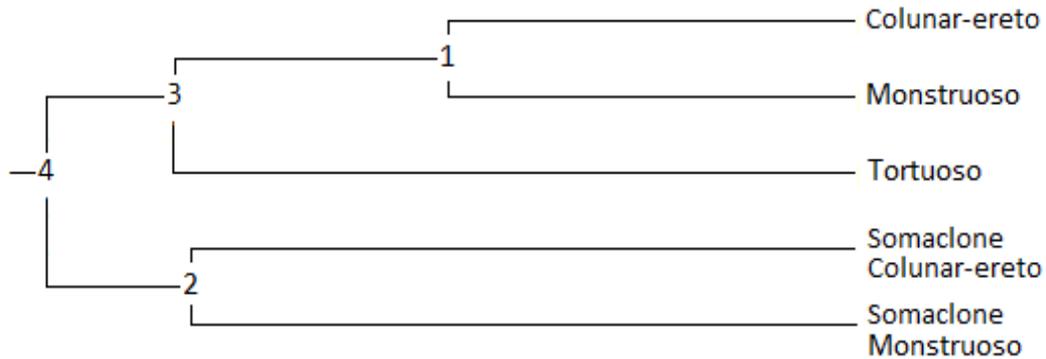


Figura 6 - Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), obtido com os dados de marcadores AFLP nas 51 amostras de mandacaru. A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA empregando o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999).

O dendrograma, baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), sugere que os valores de similaridade entre as 51 amostras de mandacaru não estão relacionados à forma do caule do mandacaru, mas sim à origem das plantas, originadas de populações naturais ou de cultura *in vitro*.

O agrupamento, baseado no índice de similaridade de Jaccard (Figura 7), mostra a análise individual das plantas, em análise global, e corrobora o dendrograma baseado no complemento aritmético de Nei (1978), o qual demonstra o agrupamento em nível de morfotipos (Figura 6). Este dendrograma agrupa o morfotipo colunar-ereto no grupo 1; o morfotipo monstruoso, tortuoso, somaclone colunar-ereto e somaclone monstruoso são agrupados no grupo 2. O grupo 3 é composto de plantas monstruoso e colunar-ereto; e o grupo 4 é composto por plantas monstruoso e somaclone colunare-ereto. Essa análise mostra a grande variação genética entre as plantas dos diferentes morfotipos, onde a menor similaridade foi de 0,311, observada entre as plantas sm-45 (somaclone monstruoso) e m-17 (monstruoso). A maior similaridade foi igual a 0,7335, entre a amostra m-21 e m-22, ambas de morfotipo monstruoso. Essa alta similaridade pode ser em decorrência de parentesco, pois ambas as amostras são provenientes de viveiros de mudas.

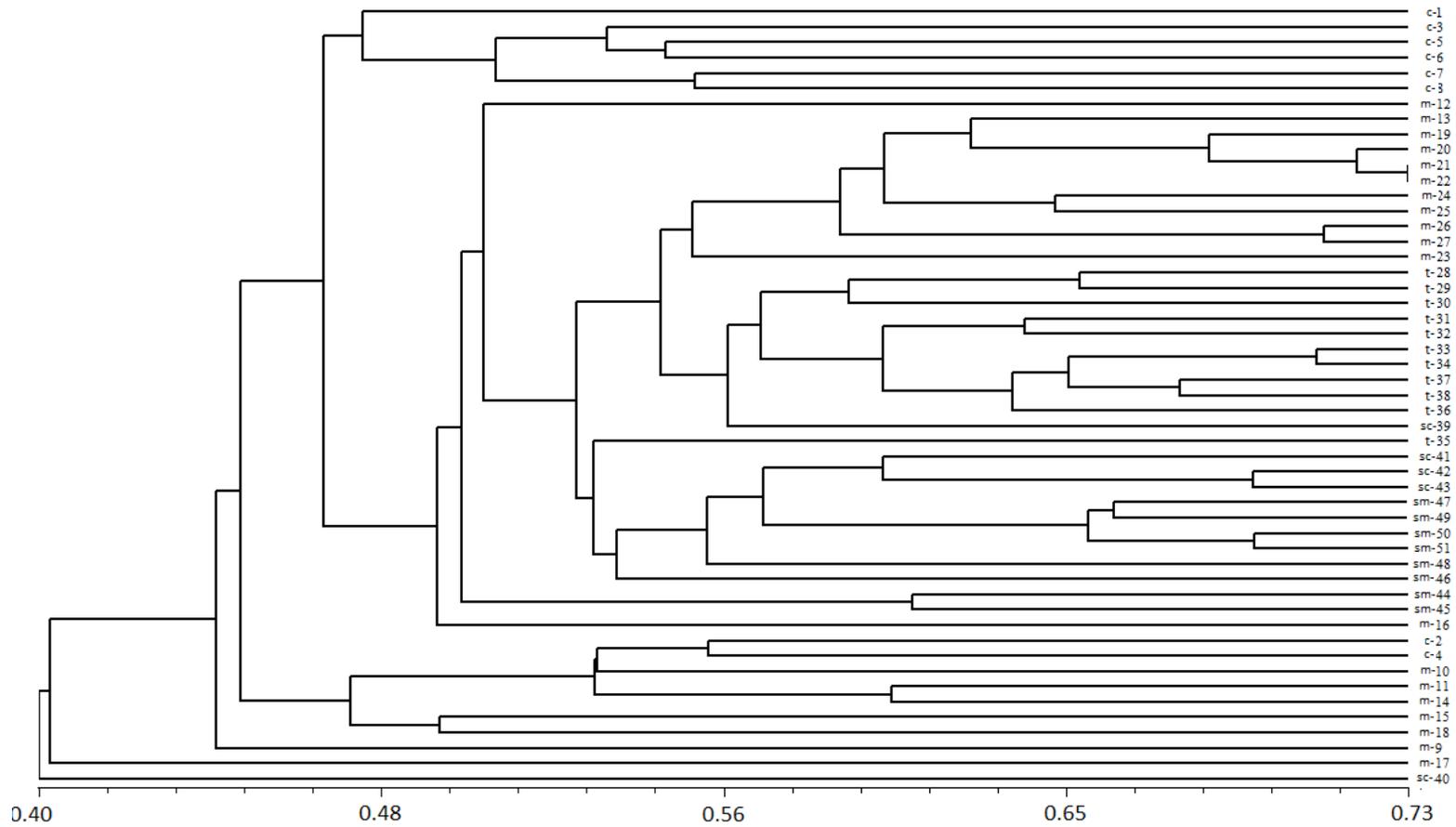


Figura 7 - Dendrograma baseado no complemento aritmético de Jaccard, obtido por marcadores AFLP nas 51 amostras de mandacaru. A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA empregando o *programa* NTSYS 2.02 (Rohlf, 1989). c: colunar-ereto, m: monstruoso, t: tortuoso, sm: somaclone monstruoso, sc: somaclone tortuoso.

A análise Bayesiana indicou que o valor ótimo de K foi de 4 grupos ( $\Delta K2 = 0,00$ ;  $\Delta K3 = 2,0610$ ;  $\Delta K4 = 17,6844$ ;  $\Delta K5 = 0,2826$ ;  $\Delta K6 = 0,2355$ ;  $\Delta K7 = 6,7896$ ;  $\Delta K8 = 0,0000$ ), para relacionar geneticamente e individualmente os 51 genótipos (Figura 8). As quatro cores representam os diferentes grupos, correspondentes à proporção diferencial de marcadores AFLP em cada planta. Cada barra no gráfico representa uma planta e a sua proporção de mistura de marcadores AFLP de diferentes populações ou grupos.

Os resultados foram consistentes com o *bar plot* obtido, pois há plantas com material genético proveniente de um único grupo e plantas com indicativo de hibridação, com material genético proveniente de 2, 3 e 4 grupos diferentes.

A proporção dos cinco morfotipos de plantas em cada grupo está representada no Quadro 14.

Quadro 14 - Morfotipos de plantas do gênero *Cereus* (mandacaru), proporção de plantas distribuídas em cada grupo e número de plantas de cada morfotipo

Morfotipos	Grupos				Nº. de plantas
	Vermelho	Verde	Azul	Amarelo	
Colunar-ereto	0,222	0,715	0,042	0,018	8
Monstruoso	0,357	0,110	0,058	0,475	19
Tortuoso	0,065	0,159	0,555	0,221	11
Somaclone colunar-ereto	0,086	0,172	0,718	0,023	5
Somaclone monstruoso	0,061	0,109	0,804	0,026	8
Média/Total	0,158	0,253	0,435	0,153	51

A análise da distribuição dos cinco morfotipos de plantas mostrou que as plantas de somaclones monstruosos compartilham apenas 2,6% de material genético do grupo amarelo, enquanto as plantas monstruosas propagadas na natureza, compartilham 47,5% do material genético desse grupo. Observando o grupo azul, os somaclones monstruosos compartilham 80,4% do material genético desse grupo, enquanto, nos somaclones propagados na natureza, compartilham apenas 5,8% do material genético do grupo azul. Isso indica uma relação genética baixa entre os somaclones monstruosos e as plantas de *C. monstruosus* propagadas na natureza. A mesma observação pode ser estendida para a relação entre os somaclones colunares (71,8% do material genético no grupo azul) e plantas colunares propagadas na natureza (4,2%).

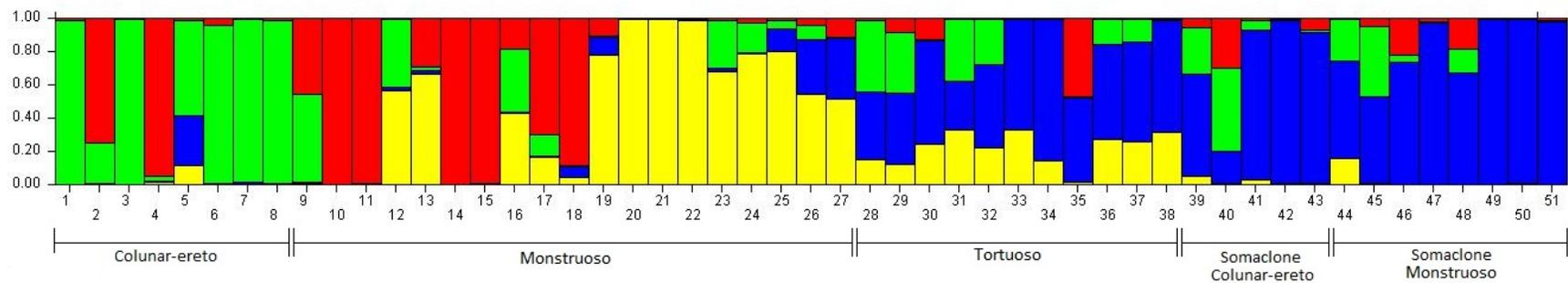


Figura 8 - *Bar plot* das 51 amostras de mandacaru (Morfotipo colunar-ereto, monstruoso, tortuoso, somaclone colunar-ereto e somaclone monstruoso) divididas em quatro grupos inferidas com base no valor de  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005), utilizando o programa STRUCTURE 2.3.4. Cada cor (vermelho, azul, verde e amarelo) representa a proporção de genótipos de cada grupo.

As plantas somaclones (colunar-ereto e monstruoso) e tortuosos propagados na natureza possuem os maiores índices de compartilhamento do material genético do grupo azul (71,8; 8,4 e 55,5% respectivamente), indicando que há uma origem em comum entre eles e não uma consequência do cultivo *in vitro*.

Os índices de compartilhamento genético diferencial das plantas propagadas na natureza entre os quatro grupos (plantas com caule colunar com 71,5% no grupo verde, monstruoso com 47,5%, no grupo amarelo, e tortuoso com 55,5%, no grupo azul), indicam marcante diferenciação genética em nível molecular, além da variação morfológica dos caules destas plantas propagados na natureza.

A forma de propagação vegetativa predominante na natureza para estas variedades do gênero *Cereus* parece conduzir a uma diferenciação molecular alta. Neves (2013) analisou o polimorfismo em 12 locos microssatélites de morfotipos do gênero *Cereus*. O alelo *Pchi47<sup>A</sup>* apresentou fixação nas plantas com caules eretos e colunares (uniformes) e com caules “tortuosus” (*C. peruvianus* var. *tortuosus*) e também indicou que processos de seleção artificial pode estar conduzindo para maior diferenciação genética em nível molecular (especiação) entre as plantas das variedades *C. peruvianus* var. *tortuosus* e *C. peruvianus* var. *monstruosus*.

A maior proporção de material genético compartilhado nos somaclones (colunar-ereto e monstruoso) no grupo azul é uma evidência da amplificação de genótipos pouco frequentes (menos do que 5,0%) nas amostras de plantas com caules colunares-eretos propagadas na natureza. O cultivo *in vitro* de tecidos de plantas com caules colunares-eretos pode ter selecionado grupos de células que formaram calos que regeneraram somaclones geneticamente divergente, em nível molecular, das plantas propagadas na natureza.

Os cactos com caule colunar-ereto propagados na natureza são geneticamente divergentes dos cactos somaclones com caules colunares-eretos, da mesma forma que os cactos com morfologia monstruoso propagados na natureza são divergentes dos somaclones com morfologia monstruosa. Desta forma, a cultura de calos de *C. peruvianus* gerou plantas com morfologia monstruosa, que são, em nível molecular, geneticamente divergentes das plantas da variedade *C. peruvianus monstruosus* propagadas na natureza. A cultura de calos de *C. peruvianus* gerou uma outra variedade de *monstruosus*, que é divergente em nível molecular das plantas da variedade *C. peruvianus monstruosus* propagadas na natureza.

## 5. CONCLUSÕES

a) A cultura de calos de mandacaru (*Cereus peruvianus*) gerou plantas com morfologia *monstruosus* geneticamente divergentes, em nível molecular, das plantas da variedade *C. peruvianus monstruosus* (ou espécie *C. monstruosus*) propagadas na natureza.

b) A análise do polimorfismo de 534 fragmentos de DNA cortados com enzimas de restrição e amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reation*) (marcadores de AFLP) indicou que as 51 plantas de mandacaru analisadas (propagadas natureza e somaclones) são da mesma espécie, e os morfotipos podem ser considerados como variedades; em nível molecular, a nomenclatura *C. peruvianus var. monstruosus* é mais adequada do que *C. monstruosus*.

c) A análise de marcadores AFLP mostrou que somaclones de mandacaru regenerados *in vitro* apresentam um polimorfismo menor de fragmentos de DNA cortados com enzimas de restrição e amplificados por PCR, do que o polimorfismo destes fragmentos em plantas de mandacaru propagadas na natureza. Os somaclones são amostras geneticamente divergentes (nível de divergência genética alta) das plantas de mandacaru propagadas na natureza.

d) Os somaclones de mandacaru regenerados *in vitro* são divergentes em nível molecular das plantas de mandacaru propagadas na natureza, formando um grupo heterogêneo de plantas (com potencial heterótico) que podem ser usadas em cruzamentos para aumentar a base genética da espécie para atender programas de melhoramento.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJANABI, S.M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, 17:1-8, 1999.

ALTESOR, A.; EZCURRA, E. Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti. **Journal of Arid Environments**, 53:557-567, 2003.

ALTHOFF, D.M.; GITZENDANNER, M.A.; SEGRAVES, K.A. The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. **Systematic Biology**, 56:477-484, 2007.

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 potencial uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 34/35:283-295, 1992.

ANDERSON, E.F. **The cactus family**. Oregon: Timber Press, 2001. 776p.

ANTHONY, M. Ecology of the *Opuntiae* in the Big Bend region of Texas. **Ecology**, 35:334–347, 1954.

ARIAS, S. Cactáceas: Conservación y diversidad en México. **Revista Mexicana de Historia Natural**, 44:109–115, 1993.

BARROS, M.J.; NOZAKI, J. Pollutants abatement from effluents of paper and pulp industries by flocculation/coagulation and photochemical degradation. **Quimica Nova**, 25:736-740, 2002.

BARTHLOTT, W.; HUNT, D.R. **Cactaceae**. In: KUBITZKI, K. (ed.) The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p. 61–197.

BASSAM, B.J.; CAETANOANOLLES, G.; GRESHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 196:80–83, 1991.

BERTETTI, D.; PENSA, P.; POLI, A.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. First report of a vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* on *Cereus peruvianus monstruosus* cultivated in Italy. **Protezione delle Colture**, 4:84-86, 2011

BERTETTI, D.; PENSA, P.; POLI, A.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. *Fusarium oxysporum*, new pathogen of *Crassula ovata* and *Cereus peruvianus monstruosus* grown in Italy. **Protezione delle Colture**, 2:31-32, 2012.

BERTETTI, D.; PENSA, P.; POLI, A.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. First report of stem rot caused by *Bipolaris cactivora* (Petr.) Alcorn on *Cereus peruvianus monstruosus* cultivated in Italy. **Journal Protezione delle Colture**, 1:25-27, 2014.

BOLWELL, G.P. Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. **International Review of Cytology**, 146:261-323, 1993.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532p.

BOYLE, T.H.; ANDERSON, E. Biodiversidade e Conservação. In: NOBEL, P.S. (ed.), **Cacti Biology and Uses**. Los Angeles: University of California Press, 2002. p. 125-141.

BRAVO-HOLLIS, H.; SÁNCHEZ-MEJORADA, H. **Las cactáceas de México**. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1978. 743p.

BRITTON, N.L.; ROSE, J.N. **The Cactaceae**. Washington: Carnegie Institute, 1919. 230p.

BRITTON, N.L.; ROSE, J.N. **The cactaceae: description and illustrations of plants of the cactus family**, New York: Dover, 1963. 460p.

SILVA, J.G.M.; MELO, A.A.S.; RÊGO, M.M.T.; LIMA, G.F.C.; AGUIAR, E.M. Cactáceas nativas associadas a fenos de flor de seda e sabiá na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Caatinga**, 24:158-164, 2011.

CAVALCANTI, N.B.; RESENDE, G.M. Efeito de diferentes substratos no desenvolvimento de mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.), facheiro (*Pilosocereus pachycladus* RITTER), xiquexique [*Pilosocereus gounellei* (A. WEBER EX K. SCHUM.) BYL. EX ROWL.], e coroa-de-frade (*Melocactus bahiensis* Britton e Rose). **Revista Caatinga**, 20:28-35, 2007.

CHEN, R.Z.; PETTERSSON, U.; BEARD, C.; JACKSON-GRUSBY, L.; JAENISCH, R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. **Nature**, 395:89-93, 1998.

CHIAL, H. DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphisms (AFLP): No genome sequence required. **Nature Education**, 1:176, 2008.

CISNEROS, A.; TEL-ZUR, N. Embryo rescue and plant regeneration following interspecific crosses in the genus *Hylocereus* (Cactaceae). **Euphytica**, 174:73–82, 2010.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant molecular Biology Reporter**, 19:299-306, 2001.

DEMBITSKY, M.V.; REZANKA, T. Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. **Phytochemistry**, 42:1075-1080, 1996.

EL-SAMAHY, S.K.; ABD EL-HADY, E.A.; HABIBA, R.A.; MOUSSA, T.E. Chemical and Rheological Characteristics of Orange-Yellow Cactus-Pear Pulp from Egypt. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, 8:39-51, 2006.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, 14:2611-2620, 2005.

FARIA-TAVARES, J.S.; MARTIN, P.G.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA-COLLET, S.A.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic relationships among accessions of mandacaru (*Cereus* spp.: Cactaceae) using amplified fragment length polymorphisms (AFLP). **Biochemical Systematics and Ecology**, 48:12–19, 2013.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 220p.

FRANKS, T.; BOTTA, R.; THOMAS, M.R. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, 104:192-199, 2002.

GARCIA-ZAMBRANO, E.A.; ZAVALA-GARCÍA, F.; GUTIÉRREZ-DIEZ, A.; OJEDA-ZACARÍAS, M.C.; CERDA-HURTADO, I. Estimación de la diversidad genética del Nopal, usando marcadores moleculares tipo AFLP. **Phyton**, 78:117-120, 2009.

GARIBALDI, A.; BERTETTI, D.; PENSA, P.; POLI, S.; GULLINO, M.L. First Report of Stem Rot on *Cereus peruvianus monstrosus* Caused by *Bipolaris cactivora* (Petr.) Alcorn in Italy. **Plant Disease**, 98:159-159, 2014.

GARIBALDI, A.; PENSA, P.; BERTETTI, D.; POLI, S.; GULLINO, M.L. First Report of Basal Stem Rot of Apple Cactus (*Cereus peruvianus monstrosus*) Caused by *Fusarium oxysporum* in Italy. **Plant Disease**, 95: 877-877, 2011.

GIBSON, C.A.; NOBEL, P.S. **The cactus primer**. Cambridge: Harvard University Press, 1986. 234p.

GIRISH, K.J.; DHIREN, P.S.; VIPUL, D.P.; VINEET, C.J. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. **Gums and mucilages/Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 4:309-323, 2009.

GOTO, S.; THAKUR, R.C.; ISHII, K. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. **Plant Cell Reports**, 3-4:193-197, 1998.

GOVINDARAJU, K. Compilation of working values and sample description for 272 geostandards. **Geostand Newslett**, 13:1-113, 1989.

GRGUREVIĆ, D. Sukulente (mesnatice–tustike) na jadranskoj obali i uporaba u parkovima. **Šumarski list br.**, 7:439-446, 2009.

GRIFFITH, M.P. What did the first cactus look like? An attempt to reconcile the morphological and molecular evidence. **Taxon**, 53:493–499, 2004.

GUTMAN, F.; BAR-ZVI, D.; NERD, A.; MIZRAHI, Y. Molecular typing of *Cereus peruvianus* clones and their genetic relationship with other *Cereus peruvianus* species evaluated by RAPD analysis. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 76:709-713, 2001.

HAMRICK, J.L.; NASON, J.D.; FLEMING, T.H.; NASSAR, J.M. Genetic diversity in columnar cacti. In: FLEMING, T.H.; VALIENTE-BANUET, A. (eds.). **Columnar cacti and their mutualists: evolution, ecology and conservation**. Arizona: University of Arizona Press, 2001. p. 122-133.

HARDESTY, B.D.; HUGHES, S.L.; RODRIGUEZ, V.M.; HAWKINS, J.A. Characterization of microsatellite *loci* for the critically endangered cactus *Echinocactus grusonii*, and their cross-species utilization. **Molecular Ecology Notes**, 8:164-167, 2008.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. **Laboratory Protocols**. Mexico: CIMMYT, 1994. 50p.

HUGHES, S.L.; RODRIGUEZ, V.M.; HARDESTY, B.D.; LUNA, R.T.B.; HERNÁNDEZ, H.M.; ROBSON, R.M.; HAWKINS, J.A. Characterization of microsatellite *loci* for the critically endangered cactus *Ariocarpus bravoanus*. **Molecular Ecology Notes**, 8:1068-1070, 2008.

HUNT, D. **The New Cactus Lexicon: Descriptions and Illustrations of the Cactus Family**. Milborne Port: DH Books, 2006. 526p.

JALIGOT, E.; BEULÉ, T.; RIVAL, A. Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, 104:1263–1269, 2002.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; JEAN SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, 142:1881-1893, 1996.

JANZEN, D.H. Chihuahuan Desert nopaleras: Defaunated big mammal vegetation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 17:595–636, 1986.

JOYCE, S.M.; CASSELLS, A.C.; JAIN, S.M. Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 74:103–121, 2003.

JOYCE, S.M.; CASSELLS, A.C. Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 70:125-137, 2002.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática vegetal – um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2009. 612p.

KAEPLER, S.M.; PHILLIPS, R.L. DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 29:125-130, 1993.

KARIMI, N.; KIANAMIRI, S.; MOUSAVI, E.; BARKHORDAR, M. Study of genotype effect, different media and time of explanting on callus induction in *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae). **Trakia Journal of Sciences**, 10:19-22, 2012.

KATSIR, L.; DAVIES, K.A.; BERGMANN, D.C.; LAUX, T. Peptide signaling in plant development. **Current Biology**, 21: 356-364, 2011.

KIESLING, R. Cactaceae. In: CORREA, M.N. (ed.). **Flora patagónica 5, Dicotiledoneas dialipétalas (Oxalidaceae a Cornaceae)**. Buenos Aires: Coleccion Científica del INTA, INTA 8, 1988. p. 218-243.

KIRCHMER, J.C.; ARBOLEDA, J.; CASTRO, M. **Polímeros naturales y su aplicación como ayudantes de floculación**. Lima: -CEPIS-OMS, 1975. 6p. (Documento Técnico, 02).

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

KUBIS, S.E.; CASTILHO, A.M.; VERSHININ, A.V.; HESLOP-HARRISON, J.S. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. **Plant Molecular Biology**, 52:69-79, 2003.

- KUMAR, P.; GUPTA, V.K.; MISRA, A.K.; MODI, D.R.; PANDEY, B.K. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. **Plant Omics Journal**, 2:141-162, 2009.
- LABRA, M.; GRASSI, F.; BARDINI, M.; IMAZIO, S.; GUIGGI, A.; CITTERIO, S.; BANFI, E.; SGORBATI, S. Genetic relationship in *Opuntia* Mill. Genus (Cactaceae) detected by molecular marker. **Plant Science**, 165:1129-1136, 2003.
- LEUENBERGER, B.E. The Cactaceae of the Willdenow herbarium, and of Willdenow (1813). **Willdenowia - Annals of the Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem**, 34: 309-322, 2004.
- LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; OLIVEIRA, A.V.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (Rapid e Aflp). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 29:56-61, 2002.
- LORENZI, H.; CACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Plantas brasileiras e exóticas cultivadas: (de consumo *in natura*)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006, 527p.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 15:65-95, 1984.
- MACHADO, M.F.P.S.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA-COLLET, S.A. Somatic crossing-over can induce isozyme variation in somaclones of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Haseltonia**, 7:77-80, 2000.
- MACHADO, M.F.P.S.; PRIOLI, A.J.; MANGOLIN, C.A. Malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissue and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 31:167, 1993.
- MANGOLIN, C.A.; OTTOBONI, L.M.M.; MACHADO, M.F.P.S. RAPD markers to evaluated callus tissue of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) maintained in different growth regulator combinations. **Biochemical Genetics**, 40:351-358, 2002.
- MANGOLIN, C.A.; OTTOBONI, L.M.M.; MACHADO, M.F.P.S. Two-dimentional electrophoresis of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) callus tissue proteins. **Electrophoresis**, 20:626-629, 1999.

MANGOLIN, C.A.; PRIOLI, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. . Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) isozymes as markers at 2,4-dichlorophenoxyacetic acid x kinetin combinations in callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 32:191-200, 1994a.

MANGOLIN, C.A.; PRIOLI, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 32:237-247, 1994b.

MANGOLIN, C.A.; PRIOLI, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 35:189-204, 1997.

MARK, H.F. Biopolymers. In: MARK, H.F. **Encyclopedia of chemical technology**. New York: Kirk-Othmer, 1979. p. 23-35.

MARTINDALE, M. **The extra pharmacopeia pharmaceutical**. London: London Press, 1979. 2025p.

MAUSETH, J.D. Anatomical adaptations to xeric conditions in *Maihuenia* (Cactaceae), a relictual, leaf-bearing cactus. **Journal of Plant Research**, 112:307-315, 1999.

MEIJER, M.; MURRAY, A.H.J. Cell cycle controls and the development of plant form. **Current Opinion in Plant Biology**, 4:44-49, 2001.

MIZRAHI, Y.; NERD, A. Climbing and columnar cacti: new arid land fruit crops. In: JANICK, J. (ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria, Virginia: American Society of Horticultural Science, 1999. p. 358-366.

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

MONTEIRO, E.R. **Diversidade genética em xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl.) utilizando marcadores SSR e AFLP**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2013. 107. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

MORTON, J.F. Cactaceae, strawberry pear. In: MORTON, J.F. (ed.). **Fruits of warm climates**. GRS Press Winterville, 1987. p. 347-348.

MÜLLER, S. Universal rules for division plane selection in plants. **Protoplasma**, 249:239-253, 2012.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 70:3321-332, 1973.

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

NEVES, A.F. **Caracterização genética de variedades morfológicas de *Cereus peruvianus* utilizando marcadores microssatélites**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2013. 86p. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada).

NILSEN, L.B.; DHILLION, S.S.; CAMARGO-RICALDE, S.L.; RENDÓN-AGUILAR, B.; HEUN, M. Traditional knowledge and genetic diversity of *Opuntia pilifera* (Cactaceae) in the Tehuacán-Cuicatlán valley, México. **Economic Botany**, 59:366-376, 2005.

NOBEL, P.S. Cacti. Biology and uses. Los Angeles: University of California Press, 2002. 290p.

**NOBEL, P.S. Physicochemical and environmental plant physiology. San Diego, California: Academic Press, 1999. NUMERO DE PÁGINAS TOTAL**

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

NYFFELER, R. Phylogenetic relationships in the cactus family (cactaceae) based on evidence from trnk/ matk and trnl-trnf sequences. **American Journal of Botany**, 89:312–326, 2002.

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

- OLIVEIRA, S.A.; MACHADO, M.F.P.S.; MANGOLIN, C.A.; PRIOLI, A.J. . *In vitro* micropropagation of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 31: 47-50, 1995.
- ORTIZ, D.G. Sobre la presencia de 17 taxones de la familia Cactaceae en la Comunidad Valenciana. **Flora Montiberica**, 24:6-13, 2003.
- ORTIZ, D.G. The first cultivar database in Spain. **Journal of Horticulture and Forestry**, 2:196-213, 2010.
- ORTIZ, D.G.; LUMBRERAS, E.L.; PÉREZ, J.J.H.B. Algunas plantas suculentas monstruosas o crestadas en la provincia de Valencia. **Bouteloua**, 3:29-38, 2008.
- OTERO-ARNAIZ, A.; CASAS, A.; HAMRICK, J.L.; CRUSE-SANDERS, J. Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central Mexico. **Molecular Ecology**, 14:1603-1611, 2005.
- OTERO-ARNAIZ, A.; CRUSE-SANDERS, J.; CASAS, A.; HAMRICK, J.L. Isolation and characterization of microsatellites in the columnar cactus: *Polaskia chichipe* and cross-species amplification within the Tribe Pachycereeae (Cactaceae). **Molecular Ecology Notes**, 4:265-267, 2004.
- OUDSHOORN, W. **Os livros dos cactos**. Lisboa: Presença Ltda, 1975. 250p.
- PEREIRA, D.D.; MOURA, A.B.; SILVA, E.G.; KUNZLER, D.P. Cactus (*Cereus peruvianus monstruosus*), a new *Ralstonia solanacearum* host. **Revista Científica Rural**, 6:22-26, 2001.
- POPESCU, C.F.; FALK, A.; GLIMELIUS, K. Application of AFLPs to characterize somaclonal variation in anther-derived grapevines. **Vitis**, 41:177–182, 2002.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945–959, 2000.
- RADJI, R.; KOKOU, K.; AKPAGANA, K. Etude diagnostique de la flore ornementale togolaise. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, 4:491-508, 2010.

REIS, E.M.; NOZAKI, J. **Tratamento biológico de efluentes de indústrias de papel após floculação e coagulação com sais de alumínio e polieletrólitos naturais**. Disponível em:<<http://www.tratamentodeagua.com.br/r10>>. Acesso em: 25, julho, 2011.

RESENDE, A.G. **Polimorfismo de DNA em plantas regeneradas *in vitro* e nos descendentes RF1 de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 46p. Tese (Doutorado em Biologia Celular).

RESENDE, A.G.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic diversity in F1 descendents of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) somaclones regenerated in south region of Brazil. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, 7:193-199, 2007.

RESENDE, A.G.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Somaclonal Variation in *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae): its potential to generate new varieties and broaden the species genetic basis. **Journal of Basic and Applied Genetics**, 21:33-42, 2010.

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

RICCOBONO, V. Studii sulle Cattede del R. Orto Botanico di Palermo. **Orto Botanico di Palermo**, 8:215-265, 1909.

RIZZINI, C.T. Cactáceas: Os segredos da Sobrevivência. **Ciência Hoje**, 62-72, 1987.

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

ROHLF, F.J. **NTSYS-Pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Exeter Publishers, 1989. 146p.

ROSENBERG, N.A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, 4:137-138, 2004.

ROWLEY, G.D. Salm-Dyck's cactus paintings. **Bradleya**, 17:1-26, 1999.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Somaclones of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) may contribute towards the broadening of the species genetic basis. **Research Journal of Botany**, 1:19-23, 2006.

SÁENZ-HERNÁNDEZ, C.; CORRALES-GARCÍA, J.; AQUINO-PÉREZ, G. Nopalitos, mucilage, fiber, and cochineal. In: NOBEL, P.S. **Cacti: biology and uses**. Berkeley e Los Angeles: University of California Press. 2002. p. 212-234.

SCHEINVAR, L. **Cactaceae**. México: Universidade Nacional Autônoma do México, 1985. 60p. Monografia (Curso de Graduação em Biologia).

SCOTT, K.D.; ABLETT, E.M.; LEE, L.S.; HENRY, R.J. AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. **Euphytica**, 113:245-249, 2000.

SIERRA, C.L.J. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. **Revista Digital Universitaria**, 12:1-23, 2011.

SILVA, J.G.M.; LIMA, G.F.C.; PAZ, L.G.; MATOS, M.M.S.; BARRETO, M.F.P. Utilização de cactáceas nativas associadas à silagem de sorgo na alimentação de bovinos. **Revista Eletrônica Científica Centauro**, 1:1-9, 2010.

SILVA, J.G.M.; SILVA, D.S.; FERREIRA, M.A.; LIMA, G.F.C.; MELO, A.A.S.; DINIZ, M.C.N.M. Xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. ex Rowl.) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 34:1408-1417, 2005.

SILVA, N.; MACHADO, M.F.P.S.; MANGOLIN, C.A.; PAGLIARINI, M.S. Microsporogenesis in somaclones of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Journal of Plant Sciences**, 1:8-13, 2006.

SOUZA, V.; CASTRO, I.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 703p.

SPEIRS, D.C. The cacti of western Canada (part 3). **National Cactus and Succulent Journal**, 37:53-54, 1982.

SPOONER, D.; VAN TREUREN, R.; VICENTE, M.C. **Molecular markers for genebank management**. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 2005. 126p. (Technical Bulletin, 10).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 722p.

TANAKA, L.Y.A.; OLIVEIRA, A.J.B.; GONÇALVES, J.E.; CIPRIANI, T.R.; SOUZA, L.M.; MARQUES, M.C.A.; WERNER, M.F.P.; BAGGIO, C.H.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, 82:714–721, 2010.

TAYLOR, N.; ZAPPI, D. **Cacti of Eastern Brazil**. Kew: The Royal Botanic Gardens, 2004. 499p.

TERRY, M.; PEPPER, A.E.; MANHART, J.R. Development and characterization of microsatellite loci in endangered *Astrophytum asterias* (Cactaceae). **Molecular Ecology Notes**, 6:865-866, 2006.

THORPE, J.P.; SOLÉ-CAVA, A.M. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. **Zoologica Scripta**, 23:3–18, 1994.

TURBAK, A.F. Cellulose. In: TURBAK, A.F. Cellulose. **Encyclopedia of chemical technology**. New York: Kirk-Othmer, 1979. p. 60-72.

VILLASEÑOR, M.A.A. **Efecto del método de extracción em las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*Opuntia ficus indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible**. Valência: Universidade Politécnica de Valência, 2008. 244p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos).

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23:4407-4414, 1995.

VRIES, J.X.; MOYNA, P.; DIAZ, V. Alkaloides cactus Uruguay. **Revista Latinoamericana de Química**, 3:21-23, 1971.

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

WALLACE, R.S.; GIBSON, A.C. Evolution and systematics. In: PARK S. **Cacti: Biology and uses**. Califórnia: University of California Press, 2002. 280p.

WHISTTER, R.L. **Methods of carbohydrate chemistry**. London: Academic Press, 1963. 477p.

WRIGHT. S. **Variability within and among populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 580p.

WÜNSCH, A.; HORMAZA, J.I. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. **Euphytica**, 15:59-67, 2002.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application, No\_0534858**, 1993. REVISTA? REVEJA

ZAMPINI, I.C.; ORDOÑEZ, R.; GIANNINI, N.P.; BLENDINGER, P.G.; ISLA, N.I. Nutraceutical properties and toxicity studies of fruits from four Cactaceae species grown in Argentine Northwestern. **Food Research International**, 44:2345–2351, 2011.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; Diversidade e endemismo das Cactaceae na Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, 4:15-23, 2008.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; SANTOS, M.R.; LAROCCA, J. *Cactaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB27746>>. Acesso em: 28, julho, 2014.