

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

VANESSA NEVES DE AZEVEDO FERNANDES

**Estrutura genética de amostras de mandacaru usando locos
heterólogos de microssatélites**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO 2013

VANESSA NEVES DE AZEVEDO FERNANDES

Estrutura genética de amostras de mandacaru usando locos heterólogos de microssatélites

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudete Aparecida Mangolin.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO 2013

À minha família, pelo incentivo e apoio em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento (PGM) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida e pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela orientação segura e competente deste trabalho, por sua dedicação incansável, pelo seu apoio e incentivo.

À professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela sabedoria e atenção dedicadas durante a realização deste trabalho e a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pela transmissão de conhecimentos e apoio.

Aos professores do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais e do Laboratório de Genética Animal, Erasmo Renesto, Maria Claudia Takasusuki e Sandra Collet, pelo carinho e amizade. Também à Leila Frota e ao Sérgio Luiz, pela ajuda nas rotinas do laboratório.

À minha família, especialmente ao meu pai, Antonio Luiz Fernandes, à minha mãe, Isaura Maria Neves de Azevedo Fernandes, e ao meu irmão, Luiz Eduardo, por todo carinho, apoio, incentivo e por tantos momentos de suas vidas dedicados a mim. Com muito carinho, agradeço também à minha segunda mãe, Vó Lélia, pela torcida e todas as orações.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais e do Laboratório de Genética Animal, especialmente à Andréa, Liriana e Danuza, ao Maycon e Raphael, pelo companheirismo, apoio, incentivo e por proporcionar momentos de diversão em meio a tanto trabalho, tornando essa caminhada mais suave. Também um agradecimento especial à Eliane, Paula Garcia e Ana Luisa, pelos ensinamentos e grande ajuda no desenvolvimento do projeto.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação e a tantos outros amigos. Obrigada por fazer parte de minha caminhada.

Ao companheiro de todas as horas, Laio, obrigada pela paciência, apoio e incentivo.

BIOGRAFIA

VANESSA NEVES DE AZEVEDO FERNANDES, filha de Antonio Luiz Fernandes e de Isaura Maria Neves de Azevedo Fernandes, nasceu em Loanda, estado do Paraná, aos treze dias do mês de fevereiro de 1987.

Em dezembro de 2001, concluiu o Ensino Fundamental, no Colégio XI de Agosto, na cidade de Pereira Barreto-SP. No ano de 2004, na mesma Instituição de Ensino, concluiu o Ensino Médio.

Concluiu, em janeiro de 2001, o Curso de Graduação Ciências Biológicas – Licenciatura e Bacharelado, na Universidade Estadual de Maringá. Para a conclusão do Bacharelado, apresentou, em dezembro de 2010, o trabalho de monografia intitulado “Diversidade genética entre populações de *Euphorbia heterophylla* L.” sob orientação da Prof^a Dr^a Claudete Aparecida Mangolin.

Em março de 2011, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Análise Genética Vegetal.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Família Cactaceae, distribuição e importância econômica.	4
2.2. O gênero <i>Cereus</i>	5
2.3. Marcadores moleculares	8
2.4. Microssatélites ou marcadores SSR	11
2.5. Microssatélites em Cactaceae	13
2.6. Transferibilidade de locos em microssatélites.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Material vegetal.....	19
3.2. Germinação das sementes	21
3.3. Extração e quantificação do DNA	23
3.4. Testes de amplificação dos microssatélites	25
3.5. Análise dos dados.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Quantificação	29
4.2. Transferibilidade.....	29
4.3. Diversidade Genética.....	32
5. CONCLUSÕES	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	72

RESUMO

FERNANDES, Vanessa Neves de Azevedo. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2013. **Estrutura genética de amostras de Mandacaru usando locos heterólogos de microssatélites.** Professora Orientadora: Claudete Aparecida Mangolin. Professores Conselheiros: Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Maria Cláudia Ruvolo Takasusuki.

Cereus, gênero de cacto ornamental conhecido como mandacaru, é cultivado em jardins e reservas, com importância ecológica, econômica e industrial, devido à diversidade de compostos que produz. O objetivo do trabalho foi estimar a transferibilidade de marcadores microssatélites de outras espécies de cactáceas para mandacaru e com eles analisar a diversidade genética para estabelecer relações de similaridade ou divergência genética entre as diferentes amostras cultivadas nas regiões Nordeste, Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil. Para a seleção de marcadores microssatélites, foram avaliados 33 pares de *primers*, desenvolvidos para diferentes espécies de cactáceas. Dessa avaliação, foram selecionados 10 pares de *primers* desenvolvidos a partir de *Polaskia chichipe*, *Ariocarpus bravoanus*, *Astrophytum asterias* e *Echinocactus grusonii*, obtendo uma transferibilidade de 30,30% para o mandacaru. Dois dos *primers* analisados forneceram informação para 2 locos. Foram avaliados doze locos heterólogos de microssatélites em 21 amostras de mandacaru. O polimorfismo médio para as amostras foi de 58,33%; os locos avaliados apresentaram 31 alelos, com média de 2,58 alelos por loco. A análise das frequências genotípicas indica distorção na segregação para 68 locos e suas frequências não apresentam distribuição de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O valor médio de Fis (0,0407) indica déficit de heterozigotos para os locos estudados. A frequência diferencial de determinados alelos nas amostras resultou em grande divergência genética ($F_{st} = 0,4914$). As relações de similaridade e dissimilaridade entre as amostras apresentam valores de identidade variando de 0,2249 a 0,9749. Estas foram organizadas em um dendrograma formando três grupos, sendo dois formados por diferentes amostras coletadas no estado do Paraná, São Paulo, Piauí e Bahia e o terceiro grupo constituído apenas por amostras coletadas no estado do Mato Grosso do Sul. As análises forneceram uma percentagem de variação de 55% entre as amostras e, dentro destas, de 45%. As relações genéticas entre os genótipos individuais indicam, também, a formação de 3 grupos diferentes, com o isolamento do grupo

composto pelos indivíduos da região Centro Oeste. Além disso, o baixo valor obtido para o teste de mantel $r^2=0,06$ mostrou que a diferenciação entre as amostras não está relacionada à distância geográfica que as separam. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem um processo de especiação do gênero *Cereus*, sendo que as plantas que crescem nas quatro regiões podem corresponder a diferentes espécies do gênero ou podem se tratar de um grupo em processo de especiação.

Palavras-chave: Mandacaru, microssatélites, transferibilidade.

ABSTRACT

FERNANDES, Vanessa Neves de Azevedo. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2013. **Genetic structure of samples of mandacaru using heterologous loci microsatellite.** Adviser: Claudete Aparecida Mangolin. Committee Members: Maria de Fátima Pires da Silva Machado and Maria Cláudia Ruvolo Takasusuki.

Cereus is an ornamental cactus, popularly called “*mandacaru*” in Brazil, cultivated in gardens and in biological preservation areas. The species is ecologically, economically and industrially important due to the great variety of compounds it produces. This current research estimates the transferability of microsatellite markers of other cactus species to “*mandacaru*” and analyzes the specie's genetic variability establishing a relation of similarity or divergence between different samples grown in regions Northeast, South, Southeast and Central of Brazil. Thirty-three pairs of *primers* developed from different cactus species were evaluated for characterized the microsatellite markers. From the evaluation were selected ten pairs of primers developed from *Polaskia chichipe*, *Ariocarpus bravoanus* and *Echinocactus grusonii* giving a 30.30% transferability of these primers to “*mandacaru*”. Two of the microsatellites provided information for 2 loci, by this way were evaluated 12 microsatellite heterologous *loci* in 21 “*mandacaru*” samples. The polymorphism for the 21 samples reached 58,33%, evaluated loci showed 31 alleles at an average of 2.58 alleles per locus. Analysis of genotype frequency suggests a segregation distortion for 68 *loci* in which their frequency failed to present a Hardy-Weinberg equilibrium distribution. The average Fis value rate (0.0407) indicated a deficit of heterozygotes for the *loci* under analysis. Differential frequency of certain alleles in the different samples produced high genetic divergence ($F_{st} = 0.4914$) among them. Analyzes revealed greater genetic diversity between samples than within them, corroborating the intermediate gene flow ($N_m = 0.2588$). The relations of similarity and dissimilarity among the 21 samples ranged between 0.2249 and 0.9749, and produced a three-group dendrogram, two groups were made up from different samples collected in the state of Paraná, São Paulo, Piauí and Bahia whereas the third one was formed by samples collected in the state of Mato Grosso do Sul. The analysis provided a percentage variation between the samples of 55%, and within these 45%. The genetic relationships among individual genotypes also indicate formation of three different groups with the insulation from the group consisting for

individuals from the region of Pantanal. The low values obtained for the test mantel $r^2 = 0.06$ shows that differentiation between samples is not related to the geographical distance separating. The results obtained in this study suggest a process of speciation of the genus *Cereus*, so the plants that grow in the four regions in analyzes are plants that may correspond to different species of the grup in the process of speciation.

Keywords: Cactus, microsatellite and transferability.

1. INTRODUÇÃO

As Cactaceae dominam as regiões áridas e semiáridas no Novo Mundo (Figueredo et al., 2010), com uma vasta distribuição que abrange desde o Canadá ao extremo sul da América do Sul. Estas podem ser encontradas em habitats que variam de exuberantes a desertos extremamente secos. As espécies adaptadas às condições de deserto tornam-se o único recurso de alimento em um ambiente crescentemente quente e propenso à seca (Prado et al., 2010). Essa ampla diversidade de habitats resultou em diversas formas e tamanhos de cactos (Anderson, 2001).

Cereus peruvianus Mill., conhecida como mandacaru em grande parte das regiões brasileiras, tem sido alvo de investigações desde a década de 1990 (Mangolin et al., 1994a; Mangolin et al., 1994b; Torquato et al., 1995). O fator que estimulou os estudos iniciais foi principalmente a utilização dos caules das plantas de *C. peruvianus* 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 a aplicação de polieletrólitos sintéticos usados em processos de tratamento de águas residuais de indústrias.

Além do interesse econômico, industrial e fitoterápico, *C. peruvianus* vem sendo domesticada a partir da década de 1990, na região de Israel (Nerd et al., 1993; Weiss et al., 1993; Mizrahi e Nerd, 1999), onde é caracterizada como um *fruit crop*, sendo plantada comercialmente ainda em pequena escala. Devido ao valor comercial de seus frutos, foi implementado em Israel um programa de melhoramento genético, visando a obter frutos maiores, mais saborosos e que permaneçam intactos (sem rachaduras precoces) até o seu completo amadurecimento. Este programa de melhoramento genético para a obtenção de frutos comercializáveis de *C. peruvianus* foi apontado como sendo limitado pela baixa diversidade genética

encontrada nos clones que vêm sendo cultivados com tal finalidade (Gutman et al., 2001).

Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, as plantas de mandacaru são frequentemente cultivadas como plantas ornamentais, na região Nordeste elas também são usadas como plantas forrageiras para pastagens em época de seca intensa. As plantas de mandacaru das três regiões brasileiras têm morfologia semelhante, mas são denominadas como espécies diferentes: *Cereus jamacaru* (região Nordeste), *C. peruvianus* (região Sul), e *C. hildmannianus* (região Sudeste). Apesar das diferentes denominações para as plantas de mandacaru, os seus caules são constituídos por uma mucilagem específica, formada por heteropolissacarídeos complexos, que retêm água, permitindo suportar solos secos e áridos, servindo, assim, de alimento para os animais silvestres e domesticados de pequeno e grande porte (Cavalcanti e Resende, 2006). Além disso, suas flores e frutos podem servir de alimentos para insetos e pássaros silvestres.

O centro de diversidade da família Cactaceae é o México (Prado et al., 2010), onde são encontradas diversas espécies, muitas de importância econômica para o mercado interno, como para o internacional (Hughes et al., 2008). A diversidade genética tem sido examinada para poucas espécies de cactáceas e, no entanto, esses estudos mostram alta variação genética, mesmo para aquelas de distribuição restrita. Muitas espécies de cactáceas estão correndo o risco de extinção, o que vem aumentando o interesse em se obter um maior conhecimento do genoma destas, isso porque tais informações poderão auxiliar os programas de conservação (Otero-Arnaiz et al., 2004, 2005; Terry et al., 2006; Hughes et al., 2008; Hardesty et al., 2008). Pesquisas envolvendo diversidade genética de espécies da família Cactaceae, que apresentam diferentes combinações de história e características ecológicas, poderão ajudar a identificar grupos particularmente vulneráveis aos fatores responsáveis pela erosão da diversidade genética (Figueredo et al., 2010).

Para analisar a estrutura genética das populações, é recomendado utilizar marcadores moleculares com tipo de herança codominante, tais como as isozimas, ou baseado em DNA, usando, por exemplo, locos de sequências simples repetidas (SSR; *Simple Sequence Repeated*), também denominadas de microssatélites, uma classe de marcadores moleculares baseada em PCR (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989).

Os microssatélites são repetições de poucos pares de bases de DNA (2 – 6 pb) em sequências, onde as repetições mais abundantes são os dinucleotídeos (repetições de 2 pares de bases). Estas sequências repetidas são distribuídas aleatoriamente no genoma (Jacob et al., 1991; Agarwall et al., 2008). Em plantas, os microssatélites estão amplamente distribuídos nos cromossomos, com frequência média de um a cada cinquenta mil pares de base (Litt e Luty, 1989).

O objetivo do presente estudo foi utilizar marcadores microssatélites, desenvolvidos a partir do genoma de diferentes espécies de cactáceas para estudar as plantas de mandacaru cultivadas em regiões diferentes do Brasil a fim de evidenciar de que forma essas populações estão estruturadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Cactaceae, distribuição e importância econômica

A família Cactaceae é composta por espécies dicotiledôneas pertencentes à divisão Magnophyta. Nativas do Novo Mundo, foram certamente dispersas para outras localidades, principalmente por pássaros e outros dispersores como macacos e lagartos. São plantas endêmicas das Américas e se distribuem desde o Norte do Canadá até a Patagônia Argentina, suportando os frios das planícies norte-americanas e as intensas secas e elevadas temperaturas dos desertos sul-americanos. A espécie também pode ser encontrada na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, África do Sul, Índia, Tailândia e Austrália (Britton e Rose, 1919; Anderson, 2001; Wallace e Gibson, 2002).

Entre as plantas vasculares, a família Cactaceae é a segunda quanto ao número de espécies, apresentando aproximadamente 125 gêneros (Areces, 2004) e mais de 1.300 espécies (Hunt et al., 2006), com grande variedade de formas e adaptações (Rizzini, 1987). A família encontra-se subdividida em três subfamílias: Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae (Barthlott e Hunt 1993) e, mais recentemente, foi proposta uma nova subfamília, a Mahiuenioideae (Anderson 2001). No Brasil, segundo Veloso et al., (1991), a família das cactáceas possui representantes ocupando cada um dos seis domínios fitogeográficos do país (Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampas, Pantanal e Amazônia). De acordo com Zappi et al., (2011) o Brasil apresenta um total de 37 gêneros nativos de cactáceas, o que corresponde a cerca de 30% dos gêneros existentes no Novo Mundo.

Segundo Rizzini (1987), as espécies de cactáceas que ocorrem no Brasil podem ser classificadas em cinco grupos, de acordo com o seu habitat: 1) silvícolas, que habitam as florestas pluviais amazônica e atlântica, com predominância de espécies epífitas; 2) savanícolas, que habitam o cerrado; 3) campestres, que habitam campos os rupestres de Minas Gerais; 4) litorâneas que habitam o litoral brasileiro; 5) xerófilas, encontradas no bioma caatinga, abrangendo maior número de espécies.

As espécies encontradas em regiões tropicais e temperadas distribuem-se em uma ampla variedade de habitats, desde regiões áridas até florestas úmidas (Hunt e Taylor, 1990). Essa diversidade de habitat resultou em cactos de diversas

formas e tamanhos, com flores e frutos das mais variadas cores e de beleza incontestável (Anderson, 2011). Por ser uma família cujos representantes ocorrem, predominantemente, em regiões áridas, alguns de seus caracteres podem ser interpretados como adaptativos (Gibson 1986, Mauseth e Ross 1988, Sajeve e Mauseth 1991, Mauseth e Sajeve 1992, Mauseth 1993a, b, Mauseth e Plesmons-Rodriguez 1998, Soffiatti e Angyalossy 2003).

A família Cactaceae é caracterizada por plantas suculentas, com caules carnosos, roliços, aplanados, globulares, tuberculados, em forma de costelas, asas ou achatados, podendo apresentar folhas caducas ou completamente ausentes, sendo geralmente segmentados e com espinhos (Hunt 1999, Gola et al, 1965). A morfologia dos caules nas cactáceas pode ser considerada uma característica marcante, sendo usada há mais de quatro décadas para discriminar gêneros e espécies de cactos (Britton e Rose, 1963; Altesor e Ezcurra, 2003). Elas apresentam uma grande variedade de formas e adaptações, sendo em sua grande maioria terrestres, mas existem algumas espécies epífitas. Vários trabalhos foram realizados utilizando a morfologia como importante ferramenta na taxonomia da família, entre eles os de Britton e Rose (1937), Zappi (1994), Taylor (2000) e Rocha e Agra (2002).

Alguns aspectos anatômicos têm se revelado úteis em termos diagnósticos, como o padrão de espessamento das paredes celulares da hipoderme, o tipo de espinhos nas aréolas, a ocorrência de feixes vasculares corticais e medulares e o tipo e a localização de estruturas secretoras (Conde 1975, Mauseth 1989, 1999, Silva e Alves 1999, Soffiatti e Angyalossy 2003).

2.2. O gênero *Cereus*

O gênero *Cereus* foi primeiramente descrito por Hermann, em 1698, e depois por Miller, em 1754, e inclui 900 espécies publicadas. Em 1909, Riccobono dividiu o gênero e criou a denominação *Piptanthocereus*, hoje 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 as descrições de Morton (1987) e Mizrahi et al. (1997), as espécies do gênero *Cereus*, pertencente à subfamília Ceroideae, são cactáceas com caule ereto, arbóreas com mais de 10 metros de altura, cujo tronco principal pode alcançar 50 cm de diâmetro, com um número e disposição de costelas longitudinais variáveis, onde estão

inseridos os botões axilares que contêm espinhos (folhas modificadas), conhecidos como aréolas (Figura 01). De acordo com as evidências de Morton (1987), Mizrahi et al. (1997) Ruvolo-Takasusuki et al. (2006), as flores de *C. peruvianus* (Figura 02) são noturnas e autoincompatíveis, requerendo polinização cruzada, que geralmente é realizada por insetos como mariposas e abelhas.



Figura 1 - Planta de mandacaru. Fonte: <http://bahcedekor.blogspot.com.br>

Os frutos são produzidos cerca de dois a três anos após a propagação por mudas ou de três a cinco anos após a germinação de sementes. Estes são grandes e apresentam uma pele lisa com coloração variando de amarelo a vermelho e polpa branca que contém pequenas e numerosas sementes pretas (Figura 03). Possuem formato elipsoide ou arredondado, com cerca de 20cm de comprimento e 12cm de diâmetro. A origem da espécie *Cereus peruvianus* ainda não está esclarecida, mas alguns autores acreditam ser originária do Brasil (Mizrahi e Nerd, 1999).

Além de ornamentais, por possuírem flores bonitas e perfumadas, as plantas da espécie *Cereus* possuem valor ecológico em regiões xerófitas por armazenarem

grandes quantidades de água. Em época de seca, são utilizadas como ração para os animais. As raízes e o caule do mandacaru são poderosos diuréticos e também são usados para resolver problemas cardíacos. A planta, como um todo, é ainda usada nas afecções do aparelho respiratório, como bronquites, tosses rebeldes e problemas de bexiga. Da polpa de *C. peruvianus*, bem como de outras espécies de cactos, são extraídos heteropolissacarídeos que são substâncias solúveis em água, com a capacidade de flocular partículas coloidais, sem alterar o pH, atuando como coagulantes primários e comportando-se como polieletrólitos, úteis no tratamento de águas industriais (Kirchmer et al., 1965). As plantas desta espécie também produzem alcaloides amins (Vries et al., 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). Existe também sugestão para o uso potencial em processos fitoterápicos (Tanaka et al., 2010). Além disso, a polpa tem importante aplicação na formulação de cosméticos (Alvarez et al., 1992).

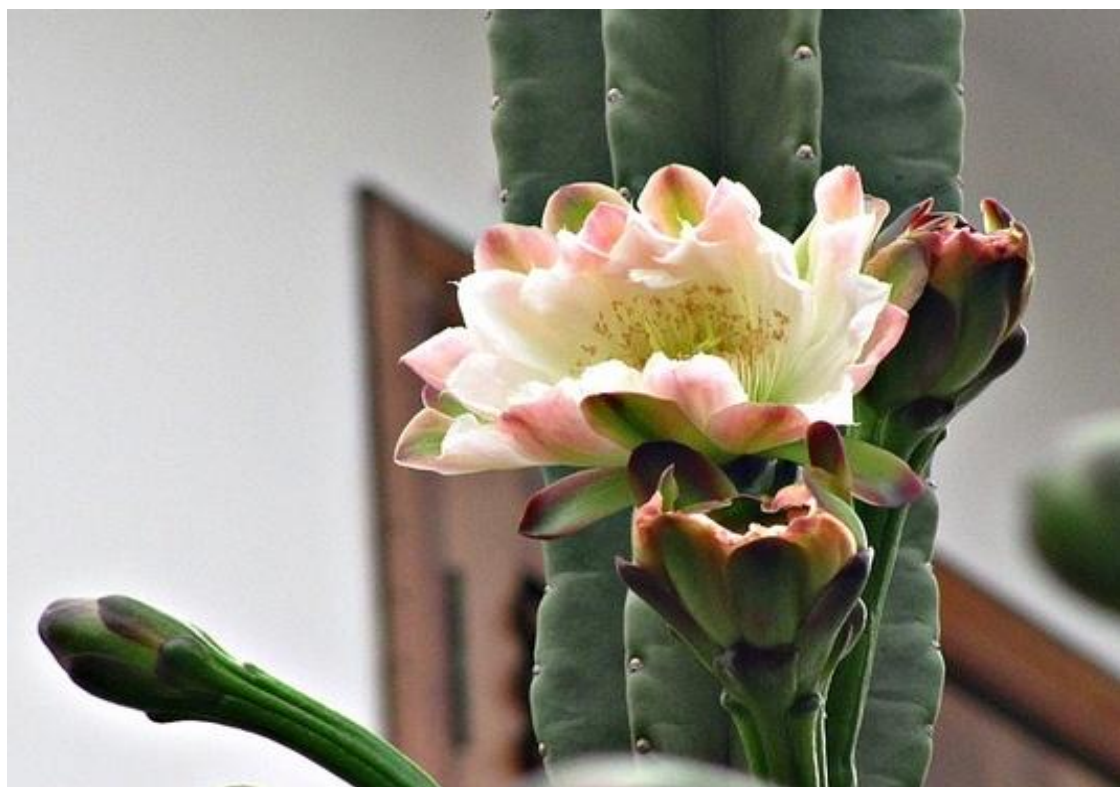


Figura 2 - Flor de mandacaru.



Figura 3 - Anatomia, coloração e parte interna do fruto de mandacaru. Fonte: www.projectnoah.org.

Paralento à crescente utilização das cactáceas na indústria e comércio, vêm aumentando cada vez mais os investimentos e, conseqüentemente, o número de pesquisas com plantas dessa família visando a um melhor conhecimento do seu genoma (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; Hughes et al., 2008; Hardesty et al., 2008). As informações genéticas também poderão ser utilizadas para solucionar problemas na taxonomia complexa de cactáceas e auxiliar nos programas de conservação e restauração, fornecendo dados sobre a maneira como as populações estão estruturadas e como se encontra a distribuição da diversidade genética, além de possibilitar a análise do fluxo gênico entre as populações e a avaliação dos efeitos da fragmentação em relação à diversidade genética. Estas informações serão importantes para a escolha de populações que farão parte de programas de restauração e conservação da espécie (Frankham et al., 2008).

2.3. Marcadores moleculares

Os estudos de polimorfismos nas populações, até o final da década de 1960, eram baseados em avaliações de diferentes fenótipos morfológicos dos organismos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Entretanto, o pequeno número de parâmetros fenotípicos morfológicos disponíveis, classificava as populações como geneticamente homogêneas (Futuyma, 1992). Apesar de suas limitações, os marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o estabelecimento

dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica. No entanto, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica, os efeitos deletérios das mutações e a influência ambiental restringiram sua utilização (Guimarães e Moreira, 1999).

Um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente da expressão de um gene, como no caso de proteínas, caracteres morfológicos, ou de um segmento específico de DNA (correspondentes a regiões expressas ou não do genoma), cuja sequência e função podem ou não ser conhecidas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os marcadores moleculares apresentam várias vantagens sobre os marcadores morfológicos. Por fornecerem um número ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma e também por serem independentes dos efeitos ambientais e do estado fisiológico da planta, permitem a identificação precisa e precoce dos genótipos de interesse (Guimarães e Moreira, 1999).

Um dos primeiros estudos de variação genética foi a técnica de eletroforese de proteínas. A técnica permitiu observar que cerca de 30% dos locos em cinco populações de *Drosophila pseudoobscura* eram polimórficos (Lewontin e Hubby, 1966). A partir de então, a técnica de eletroforese, desenvolvida por Smithies (1955), foi amplamente utilizada em estudos populacionais para vários tipos de organismos, com a finalidade de quantificar a variação genética em populações de um modo geral (Hunter e Markert, 1957).

A habilidade de separar proteínas pelo ponto isoelétrico e peso molecular pode ser útil na caracterização de proteínas e na distinção entre indivíduos. As isoenzimas compreendem diferentes formas moleculares de uma mesma enzima, com funções metabólicas específicas e representam um grupo especializado de proteínas, estando presentes em todos os organismos. Scandalios (1975) já relatava que o uso de isoenzimas como marcadores genéticos havia aumentado significativamente no período de uma década, salientando que as isoenzimas ofereceriam vantagens importantes sobre os marcadores morfológicos convencionais. O estudo de isoenzimas em plantas tornou-se comum nos últimos anos. As isoenzimas são, de maneira geral, marcadores excelentes, pois, como sua herança é codominante, o heterozigoto é facilmente reconhecido e a segregação pode ser acompanhada de maneira confiável.

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular tornou possível a manipulação do DNA, culminando com o surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares. Na década de 80, ocorreu o desenvolvimento de um método de amplificação de sequência de DNA que revolucionou a análise genética nos últimos anos: a reação da polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) (Mullis e Faloona, 1987; Saiki, et al., 1988). A técnica de PCR baseia-se na capacidade da enzima polimerase replicar sequências de DNA em certas condições laboratoriais, a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores da fita molde (*primers*) que flanqueiam a sequência que se deseja amplificar. Por meio de variações alternadas e cíclicas de temperatura, permite a desnaturação, o anelamento de *primer* e a extensão de uma determinada sequência de DNA, que é amplificada, ciclo após ciclo, em progressão geométrica, o que torna possível sua visualização em gel, em forma de uma banda, após a sua separação por eletroforese. As principais vantagens dos marcadores moleculares de DNA sobre os demais marcadores é o fato de serem em geral neutros em relação a efeitos fenotípicos e possuírem maior quantidade de informação genética por loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Com a evolução do conhecimento das técnicas, os marcadores moleculares de DNA passaram a ser classificados em dois grupos: os de hibridização e os de amplificação de DNA. Dentre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Entre os marcadores obtidos por amplificação, estão os RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e o microssatélite (ou SSR - *Simple Sequence Repeats*).

A escolha do marcador molecular a ser utilizado depende de uma série de fatores, como: o conhecimento dos tipos de marcadores, suas vantagens e desvantagens, a verificação sobre a disponibilidade dos marcadores para a espécie em estudo e a análise do objetivo do trabalho. Segundo Borém e Miranda (2005), os marcadores podem complementar o melhoramento de forma distinta, fornecendo uma medida confiável da diversidade genética, que pode ser utilizada para a determinação do grau de parentesco entre linhagens e variedades. Além disso, pode contribuir, por meio de seu ligamento com alelos de interesse, no primeiro passo, para o entendimento da biologia e da estrutura de muitas características, especialmente quantitativas. Assim, o uso de marcadores moleculares tem sido

bastante útil em estudos de diversidade genética, sendo capaz de detectar polimorfismos em várias espécies (Waldschmidt et al., 2002).

2.4. Microssatélites ou marcadores SSR

Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados em grande variedade de aplicações, incluindo determinação do grau de parentesco entre os indivíduos, mapeamento de genes úteis, seleção assistida por marcadores, retrocruzamento, genética de populações e estudos filogenéticos. Os marcadores SSR constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares atualmente disponíveis. Muito frequentes e distribuídos ao acaso, eles permitem a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. Todas estas características reunidas fazem com que os marcadores baseados em SSR sejam ideais para o mapeamento genético e físico de genomas, bem como para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os microssatélites, também conhecidos por locos de sequências simples repetidas (SSR), ou repetições curtas em *tandem* (STR), são repetições de 1 a 6 pares de bases (pb), distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos e procariotos (Jacob et al., 1991). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de *primers* específicos que amplificam via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (Schlötterer, 2000). O polimorfismo é detectado quando existe diferença no comprimento do segmento, sendo que cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco. O produto da amplificação é separado, por eletroforese, em géis de agarose de alta resolução, ou em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata (Borém et al., 2009).

Os SSRs foram classificados de diversas formas, dependendo de seu tamanho, tipo de unidade de repetição e de sua localização no genoma. Dependendo do número de nucleotídeos por unidade de repetição, são classificadas como mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ou hexanucleotídeos (Rajwant et al., 2011). Os microssatélites também podem ser classificados em três famílias: de repetições puras, compostas, e interrompidas. Nas repetições puras, os locos de microssatélites são formados por um único motivo repetido; nas repetições

compostas, mais de um motivo compõe o microssatélite; e nas repetições interrompidas os motivos são intercalados por nucleotídeos que não fazem parte da unidade de repetição (Pinto et al., 2009). Com base em sua localização no genoma, os microssatélites podem ser classificados como nucleares (nuSSR), mitocondriais (mtSSR) ou cloroplasmáticos (cpSSR). A maioria dos SSRs genômicos são SSRs nucleares, no entanto, microssatélites são também distribuídos em mitocôndrias e cloroplastos (Rajwant et al., 2011).

Tais marcadores são considerados como altamente susceptíveis a mutações e quase invariavelmente apresentam um polimorfismo extensivo, resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetitivos. A variabilidade de tamanho observada nos locos de microssatélites, normalmente, deve-se à adição ou à deleção do número de cópias das unidades repetitivas. Essa alta taxa de mutação permite extensiva variação alélica e altos níveis de heterozigosidade (Carvalho e Pitcher, 1995). Diversos mecanismos foram sugeridos para explicar a elevada taxa de mutação dos microssatélites, podendo ocorrer, durante a recombinação, *crossing-over* desiguais e derrapagem das DNA polimerases durante a replicação ou o reparo do DNA (Strand et al., 1993).

Independentemente da origem da variação e do elemento repetitivo, cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia de PCR e o seu caráter codominante, fazem desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudo de genes eucarióticos (Borém et al., 2009).

Os microssatélites vêm sendo empregados com sucesso na discriminação de acessos e cultivares de bancos de germoplasma, detectando duplicações, mistura de sementes, bem como a ação de deriva genética e de cruzamentos não controlados (Olufowote et al., 1997; Melo, 2000; Souza, 2002). Também têm sido úteis na determinação do grau de parentesco entre indivíduos (Yang et al., 1994; Melo, 2000), no esclarecimento sobre a estrutura genética ou a divisão da variação entre indivíduos, populações e espécies (Dayanandan et al., 1997; Dayanandan et al., 1999; White et al., 1997; Collevatti et al., 2001), além de possibilitar a construção de mapas genéticos (Wu e Tanksley, 1993; Bell e Ecker, 1994; Akkaya et al., 1995; Cregan et al., 1999).

No Brasil, o desenvolvimento e o uso de marcadores microssatélites de plantas são mais recentes e estão sendo empregados em estudos de espécies florestais, como *Caryocar brasiliensis* (Collevatti et al., 1999), *Ceiba pentandra* (Brondani et al., 2003), *Oenocarpus bacaba* (Lepsch-Cunha et al., 2003), *Swietenia macrophylla* (Lemes et al., 2002), *Copaifera langsdorffi* (Ciampi et al., 2000; Gonela, 2005), *Hymenaea courbaril* (Alzate-Marin et al., 2006; Feres et al., 2006; Guidugli et al., 2006), *Eugenia uniflora* (Ferreira-Ramos et al., 2006; Ferreira-Ramos et al., 2008), *Cariniana estrellensis* e *Cariana legalis* (Guidugli et al., 2007).

2.5. Microssatélites em Cactaceae

A técnica de marcadores moleculares de microssatélites também está sendo empregada em cactáceas. Os trabalhos são recentes e apresentam resultados satisfatórios, conforme o objetivo de cada autor (Schawabe et al., 2013, Butterworth et al., 2011, Perez et al., 2011, Solórzano et al., 2009, Hughes et al., 2008; Hardesty et al., 2008; Otero-Arnaiz et al., 2004, 2005,).

Estudos com marcadores SSR em cactáceas são mais restritos, concentrando-se somente em alguns gêneros. O primeiro conjunto de marcadores microssatélites desenvolvido para o estudo populacional e Cactaceae foi desenvolvido por Otero-Arnaiz et al. (2004) que desenvolveram dez marcadores microssatélites para o cacto colunar *Polaskia chichipe*, espécie de grande importância ecológica e econômica para o México Central. Sete destes locos apresentaram polimorfismo, com número de alelos variando de dois a oito. O potencial destes *primers* polimórficos também foi testado para amplificar locos SSRs das espécies *Carnigea gigantea*, *Lophocereus schottii*, *Pachycereus pringeli*, *Pilocereus lanuginosus*, *Subpilocereus reandus*, *Stenocereus thurberii*, e *S. stellatus*. O *primer* para o loco *Pchi25* de *Polaskia chichipe* foi efetivo para amplificar o DNA de cinco das sete espécies analisadas e todos os sete *primers* polimórficos de *P. chichipe* também foram eficientes para amplificar e identificar os mesmos locos em *Lophocereus schottii*.

As espécies do gênero *Opuntia* pertencentes à família Cactaceae integram a lista de espécies em extinção (Campbell e Donlan, 2005). Com a intenção de estudar a estrutura genética de suas populações, seus aspectos evolucionários e também de fornecer ferramentas para futuras pesquisas de conservação da espécie,

Helsen et al. (2007) isolaram e caracterizaram 16 locos microssatélites de algumas destas espécies (*O. echios*, *O. zacana*, *O. galapageia* var. *macrocarpa*, *O. saxicola*, e *O. megasperma*). Os locos analisados demonstraram um alto nível de polimorfismo, indicando que estes marcadores podem ser adequados não só para o estudo da estrutura genética de outras variedades de *Opuntia*, mas também para outras espécies do gênero.

Terry et al. (2006), visando a estimar parâmetros de diversidade genética que auxiliem na conservação de *Astrophytum asterias*, espécie ameaçada de extinção, desenvolveram e utilizaram marcadores SSRs para quatro populações desta espécie, todas localizadas no sul do Texas. Seis locos de microssatélites, com média de 8,5 alelos por loco, foram utilizados para amplificar o DNA genômico de 96 indivíduos. A amplificação foi consistente em 94 indivíduos. Estes foram os primeiros marcadores baseados em microssatélites relatados para o gênero *Astrophytum* com uma proposta de serem usados para estimar os parâmetros genéticos da população, tais como estrutura genética e o grau de endogamia em amostras pequenas e fragmentadas existentes atualmente.

Outro gênero de cactácea com espécies ameaçadas de extinção é o *Haageocereus*, um dos gêneros taxonomicamente mais complexos da família das cactáceas, composto por 20 espécies encontradas na região oeste dos Andes. Arakaki et al. (2010) desenvolveram e caracterizaram 19 locos de microssatélites, que foram utilizados para o estudo da diversidade genética das espécies. Os parâmetros de diversidade genética analisados com SSRs mostraram um alto potencial deste marcador para a análise de parentesco e diferenciação em *Haageocereus*.

Hardesty et al. (2008) desenvolveram 12 locos polimórficos de microssatélites para *Echinocactus grusonii*, uma vez que ainda não tinham sido descritos marcadores SSR para qualquer espécie de *Echinocactus*. Estes autores indicaram, também, a utilização dos mesmos *primers* para outras quatro espécies do gênero *Echinocactus* (*E. pentalophus*, *E. platyacanthus*, *E. polycephalus*, *E. texensis*) e alguns destes para outras 23 espécies de outros gêneros da família Cactaceae (*Acanthocereus occidentalis*, *Ariocarpus retusus*, *Astrophytum capricorne*, *Coryphanta werdermannii*, *Epithelantha micromeris*, *Escobaria dasyacantha*, *Ferocactus echidne*, *F. hamatacanthus*, *F. hystrix*, *F. wislizenii*, *Grusonia aggeria*, *Hylocereus trigonus*, *Isolatocereus dumontieri*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Nopalea*

karwinskiana, *Pachycereus pectin-aboriginoum*, *Pelecypora adelliformis*, *Peniocereus cuixmalensis*, *Sclerocactus uncinatus*, *Stenocactus coptonogonus*, *Stenocereus standleyi*, *Strombocactus disciformis*, e *Turbincarpus flaviflorum*). Estes marcadores foram considerados úteis para análise da estrutura genética das populações de *E. grussoni*, visando à conservação da espécie.

Butterworth (2011) realizou um estudo, relatando e caracterizando 10 *primers* polimórficos de microssatélites para a espécie *Coryphantha robustispina*, subespécie *robustispina* (Cactaceae), espécie essa considerada em extinção e de taxologia historicamente confusa. O estudo foi realizado com 30 indivíduos, apresentando 79 alelos, com uma média de 7 alelos por loco. O uso destes marcadores moleculares SSR desenvolvidos podem ajudar na orientação dos processos de conservação e revelar os limites taxonômicos dos membros da espécie.

Pilosocereus machrisii é aracterizada por ser um cacto colunar, com uma distribuição desigual, restrito aos cumes de colinas isoladas ou afloramentos rochosos, e suas populações estão associadas principalmente à vegetação seca do campo (Giulietti et al., 1997). Perez (2011) promoveu o isolamento e a avaliação de *primers* para 11 locos de microssatélites para *P. machrisii* e estes foram caracterizados em 51 indivíduos de 2 populações naturais. O número de alelos por locos variou de 1 a 8, com um total de 57 alelos para os indivíduos analisados. O uso destes mesmos *primers* também foi feito para outras quatro espécies pertencentes ao mesmo gênero: *P. jauruensis*, *P. aurisetus* , *P. vilaboensis* e *P. aureispinus*.

O gênero *Sclerocactus* gênero (Cactaceae) consiste em 15 espécies, que possuem uma história taxonômica confusa devido às semelhanças morfológicas e à sobreposição de distribuição. A perda de habitat e a hibridação têm motivado investigações genéticas para entender o gênero e desenvolver estratégias de conservação (Hochstatter, 1989; Heil and Porter, 2004). Schwabe et al. (2013) identificaram treze locos microssatélites, utilizando *S. glaucus* e *S. parviflorus*, que foram testados em três outras espécies: *S. wetlandicus*, *S. brevispinus* e *S. cloverii*. O número médio de alelos por loco obtido variou de 2 a 11, com uma média de 6,6 alelos por loco.

O cacto *Mammillaria crucigera* é uma espécie ameaçada endêmica da região central do México (DOF 2002). Como meio de avaliar o estado de genética de

populações destas espécies, Solórzano (2009) desenvolveu oito marcadores microssatélites. Estes foram testadas em 40 indivíduos de duas populações selvagens e também em outras espécies de *Mammillaria* e a maioria mostrou uma amplificação bem sucedida.

Possivelmente, o número restrito de análises genéticas em cactáceas com marcadores microssatélites deve-se à dificuldade na obtenção de SSRs específicos. As dificuldades para o desenvolvimento de marcadores SSRs envolvem algumas etapas, como a construção de bibliotecas genômicas e sequenciamento do DNA, sendo estas etapas laboriosas e muito demoradas. Estão descritos até o momento 111 microssatélites desenvolvidos para as diferentes espécies de cactáceas (Quadro 1 - Anexo).

2.6. Transferibilidade de locos em microssatélites

Vários trabalhos têm mostrado que alguns marcadores microssatélites desenvolvidos para uma espécie podem ser utilizados com sucesso em outras espécies (Hu et al., 2004, Gao et al., 2003, Cordeiro et al., 2001). A transferência de marcadores microssatélites para espécies diferentes faz com que eles tenham grande potencial no mapeamento comparativo e na clonagem de genes interespecíficos. O sucesso de amplificação dos marcadores microssatélites entre espécies, associado à natureza de locos únicos desses marcadores de DNA, garante sua validação como conectores para uma futura consolidação de mapas de fenótipos de interesse e também proporciona a oportunidade do uso desses marcadores para investigar a diversidade genética existente em uma elevada gama de espécies selvagens relacionadas (Borém et al., 2009).

A amplificação de locos SSRs entre espécies depende da conservação das sequências flanqueadoras às regiões repetitivas e que são utilizadas como *primers*; de sua origem e dispersão dentro do genoma; e também da manutenção de arranjos por tempo suficiente para promover polimorfismos (Ekué, et al., 2009; Pollegioni et al., 2009). Segundo Zuchi et al. (2002), a chance de sucesso da amplificação heteróloga entre duas espécies é inversamente relacionada à distância evolutiva entre as mesmas.

Fitzsimmons et al. (1995) afirmam que é possível conseguir uma eficiência de transferibilidade superior a 50% em espécies que apresentem um tempo de

divergência entre 15-25 milhões de anos, comparada a apenas 6,2% para um tempo de divergência entre 80-100 milhões de anos. Apesar disso, cerca de 50% dos *primers* desenvolvidos para pássaros foram transferíveis para bovinos, que divergiram há cerca de 100 milhões de anos. Isso confirma que a eficiência no uso de *primers* heterólogos está mais relacionada à taxa de evolução molecular que ao tempo de divergência entre as espécies (Moore et al., 1991; Primmer et al., 1996).

A transferibilidade de locos heterólogos pode ser extremamente alta quando realizada em espécies ou gêneros taxonomicamente relacionados. Dependendo de sua localização (se o loco está ou não presente em uma região codante do genoma), esta taxa pode ser ainda maior (Oliveira et al., 2003). Quando as espécies envolvidas na transferibilidade são proximamente relacionadas, há maiores possibilidades de partilhar sítio de ligação de *primers* microssatélites que em espécies menos próximas, mas é possível transferir *primers* funcionais mesmo entre espécies mais distantes (Lorieux et al., 2000).

A transferibilidade de *primers* para microssatélites é uma alternativa para quando não existe *primers* específicos para a espécie de interesse, uma vez que esta reduz consideravelmente os custos e o tempo para as investigações genéticas. Esta técnica, também conhecida como amplificação heteróloga ou transposição de marcadores (Nassi et al., 2005), consiste na viabilidade do uso de *primers* desenvolvidos a partir de uma espécie para outras espécies; em sentido estrito significa que, para um *primer* SSR ser transferível, ele tem que amplificar um loco ou poucos locos e ser polimórfico em outras espécies (Mnejja et al., 2010).

A transposição de *primers* microssatélites permite estudos genéticos comparativos dentro de gênero e espécie e pode elucidar a evolução de diferentes espécies do gênero. Segundo Gong et al. (2008), a alta transferibilidade entre espécies e a excelente reprodutibilidade dos marcadores SSR permitem que esses sejam facilmente utilizados na integração de mapas em diferentes espécies e na clonagem de genes interespecíficos, onde a variabilidade genética pode ser utilizada em programas de melhoramento.

Resultados satisfatórios com a utilização de *primers* heterólogos entre espécies do mesmo gênero foram observados em diversos trabalhos, (Cipriani et al., 1999; Collevatti et al., 1999; Roa et al., 2000; Yamamoto et al., 2001; Alves, 2002; Decroocq et al., 2003; Guidugli et al., 2007) ou entre espécies de gêneros diferentes (Rossetto et al., 2000; Zuchi, 2002). Collevatti et al. (1999) obtiveram sucesso na

transferibilidade de *primers* desenvolvidos para *Caryocar brasilienses* para análise de *Caryocar coriaceum*, *C. edule*, *C. glabrum*, *C. pallidum* e *C. villosum*. Medeiros et al. (2006) obtiveram sucesso na transferência de *primers* para SSR de *Tabebuia aurea* para *T. ochracea*, *T. serratifolia*, *T. impetiginos* e *T. roceo-alba*. Ciampi et al. (2008) desenvolveram microssatélites para *Hymenaea courbaril* e utilizaram com sucesso em *Hymenaea stigonocarpa*.

Vários autores utilizaram *primers* heterólogos em espécies de cactáceas. Hardesty et al. (2008), ao caracterizarem locos polimórficos de SSR a partir de *Echinocactus grusonii*, obtiveram uma taxa de transferibilidade variando de 7,4% a 81% em 27 espécies distintas de cactos. Otero-Arnaiz et al. (2004) obtiveram uma transferibilidade entre 28,5% a 71,4% em seis gêneros distintos de cactos, a partir de *primers* microssatélites desenvolvidos e caracterizados em *Polaskia chichipe*. Ao analisar a diversidade entre diferentes espécies de *Opuntia*, Caruso et al. (2010) também observaram um alto grau de transferibilidade entre diferentes genótipos, tornando evidente a importância dos SSRs em estudos filogenéticos de cactáceas. Peres et al. (2011) confirmaram a transferibilidade de *primers* microssatélites da espécie *Pilosocereus machrisii* para quatro outras espécies (*P. jauruensis*, *P. aurisetus*, *P. vilaboensis* e *P. aureispinus*). Sala (2010) encontrou uma alta taxa de transferibilidade de microssatélites desenvolvidos a partir de três diferentes gêneros de cactáceas (*Polaskia chichipe*, *Ariocarpus bravoanus* e *Echinocactus grusonii*) para *C. peruvianus* por volta de 15,15%. Estudos realizados por Martin (2010) indicou que a transferibilidade de *primers* de microssatélites desenvolvidos para diferentes gêneros de cactáceas (*Polaskia chichipe*, *Ariocarpus bravoanus*, *Echinocactus grusonii* e *Astrophytum asterias*) são promissoras para o estudo de diversidade e de estrutura genética de populações de *C. peruvianus*. O estudo apontou uma taxa ainda maior de transferibilidade (27,27%).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

As amostras de Mandacaru da região Sul foram formadas por plântulas obtidas de sementes germinadas in vitro, cujos frutos foram coletados de plantas cultivadas em jardins experimentais, jardins de residências, ruas e matas da cidade de Maringá, no Estado do Paraná. Nesta região, foram coletados frutos de seis plantas localizadas em seis pontos diferentes, especificados no Quadro 2.

As amostras da região Sudeste do país foram formadas por plântulas obtidas de sementes de uma planta localizada na cidade de Pardinho- SP (Rodovia Presidente Castelo Branco, KM 191) e por caules de 14 plantas adultas coletadas na cidade de Torre de Pedra, município de Porangaba (Rodovia Presidente Castelo Branco, KM 167).

No nordeste do país, os frutos foram coletados em plantas mantidas nos setores rurais e urbanos das cidades de Picos (uma planta) e Teresina (quatro plantas), ambas no Estado do Piauí, e também em Queimada Nova no Estado da Bahia (uma planta).

Finalmente, as amostras do Planalto Central do Brasil foram formadas por plântulas obtidas de sementes de frutos coletados de plantas mantidas na Fazenda Experimental da Embrapa Pantanal (cinco plantas), na cidade de Corumbá, Estado do Mato Grosso do Sul. Os locais de coleta dos frutos estão apresentados no Quadro 2 e na Figura 4.

Quadro 2 - Locais de coleta dos frutos de mandacaru, dos quais foram obtidas as amostras utilizadas para a avaliação da diversidade genética com o marcador molecular microssatélite

Cidade/Estado	Local / Coordenada	Nº de Plântulas (ou plantas*)	de Amostra
Torre de Pedra (SP)	Bairro Centro Latitude 23°14'52"Longitude 48°11'32"	14(*)	SP1
São Paulo (SP)	Porangaba/Pardinho Latitude 23°5'3"Longitude 48°22'38"	05	SP-2
Maringá (PR)	Av. Itororó Latitude 23°25'38"Longitude 51°56'15"	05	PR1
Maringá (PR)	Av. Pedro Taques Latitude 23°25'38"Longitude 51°56'15"	05	PR2

Quadro 2, Cont..

Maringá (PR)	Horto Florestal Latitude 23°25'38" Longitude 51°56'15"	05	PR3
Maringá (PR)	Rua Cananéia Latitude 23°25'38" Longitude 51°56'15"	05	PR4
Maringá (PR)	Planta 1- Horto UEM Latitude 23°25'38" Longitude 51°56'15"	05	PR5
Maringá (PR)	Planta 2- Horto UEM Latitude 23°25'38" Longitude 51°56'15"	05	PR6
Maringá (PR)	Planta 3- Horto UEM Latitude 23°25'38" Longitude 51°56'15"	05	PR7
Maringá (PR)	Avenida Brasil Latitude 23°25'38" Longitude 51°56'15"	05	PR8
Bahia (BA)	Queimada Nova Latitude: 12°18'49" Longitude: 42°53'42"	03	BA
Picos (PI)	Bairro Centro Latitude: 07°04'37" Longitude: 41°28'01"	05	PI1
Teresina (PI)	Planta 1- Latitude: 5°5'20" Longitude: 42°48'07"	05	PI2
Teresina (PI)	Planta 2 Latitude: 5°5'20" Longitude: 42°48'07"	05	PI3
Teresina (PI)	Planta 3 Latitude: 5°5'20" Longitude: 42°48'07"	05	PI4
Teresina (PI)	Planta 4 Latitude: 5°5'20" Longitude: 42°48'07"	05	PI5
Pantanal (MS)	Fazenda Experimental da Embrapa Latitude 18°59'474" Longitude 56°37'583"	05	MS1
Pantanal (MS)	Fazenda Experimental da Embrapa Latitude 18°59'286" Longitude 56°38'440"	05	MS2
Pantanal (MS)	Fazenda Experimental da Embrapa Latitude 18°59'218" Longitude 56°39'169"	05	MS3
Pantanal (MS)	Fazenda Experimental da Embrapa Latitude 19°00'373" Longitude 56°39'201"	05	MS4
Pantanal (MS)	Fazenda Experimental da Embrapa Latitude 19°00'236" Longitude 56°39'131"	05	2MS5
Total		112	

As amostras de Torre de Pedra foram coletadas de plantas adultas, as demais amostras foram plântulas provenientes de frutos coletados, dos quais foram retiradas as sementes, que foram esterilizadas e germinadas em meio de cultura.

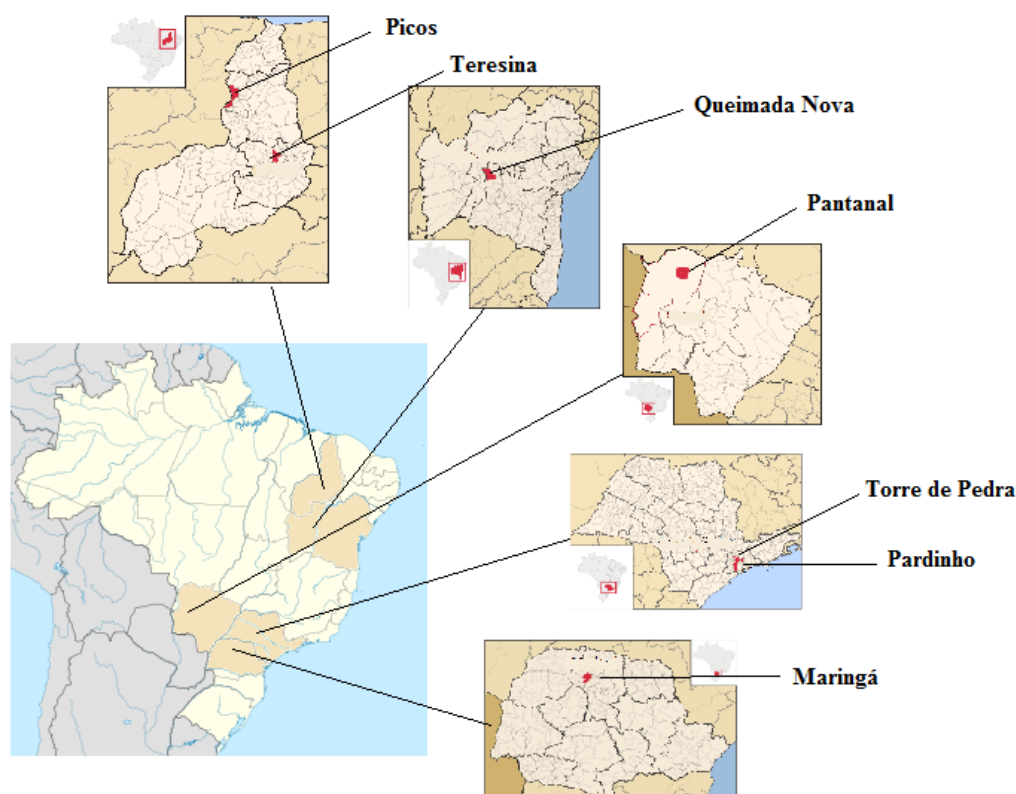


Figura 4 - Locais de coleta dos frutos de mandacaru utilizados para formar as amostras de plântulas para a avaliação da diversidade genética com o marcador molecular microssatélite.

3.2. Germinação das sementes

Aproximadamente 20 sementes de cada fruto de mandacaru coletado foram embebidas em água destilada, por um período de 24 horas, a fim de facilitar a quebra da dormência, como descrito por Carvalho et al. (2008). Após este período, visando a promover a quebra da tensão superficial, as sementes foram esterilizadas, inicialmente, utilizando detergente comercial neutro, durante 25 minutos. Em seguida, foram realizados três enxágues com água destilada autoclavada e, posteriormente, as sementes foram incubadas em uma solução de hipoclorito de sódio comercial 1:1 durante aproximadamente 1 hora. Após a esterilização, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada e filtradas em papel filtro. Com o auxílio de uma pinça esterilizada, estas sementes foram inoculadas em frascos de vidro estéril, contendo o meio de cultura descrito por Knudson (1946) (Quadro 3).

Quadro 3 - Composição do meio de cultura Knudson utilizado para a germinação de sementes e obtenção de plântulas de mandacaru

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

Ao meio de cultura, foi acrescido 20 g de sacarose/L (2%) e 5,6 gramas de ágar e o pH foi acertado para 5,6 – 5,8. Após o preparo, o meio de cultura foi autoclavado e distribuído em frascos previamente esterilizados, os quais foram vedados com plástico PVC.

Após o preparo, as sementes foram inoculados nos frascos contendo meio de cultura e mantidos em câmara de aclimatação, sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 30°C. As sementes germinaram, produzindo plântulas que foram coletadas e utilizadas para a extração de DNA genômico e posterior análise com os *primers* para SSR (Figura 05).



Figura 5 - Plântulas de mandacaru crescidas por dez meses em meio de cultura Knudson. Fonte: arquivo pessoal.

3.3. Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico das 112 amostras de mandacaru, sendo 14 plantas de cactos adultos e 98 plântulas (Quadro 2) cultivadas em meio de cultura Knudson, foi extraído utilizando o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999), com modificações (Quadro 4). As plântulas foram previamente macerados com nitrogênio líquido e após este procedimento foram colocadas em microtubos (2 mL), sendo adicionados 300 µL de tampão de extração e 100 µL de cada um dos reagentes de solubilização de membranas e antioxidantes (Quadro 4). De acordo com Resende et al. (2007), as plantas maiores e mais velhas possuem maior concentração de polissacarídeo no seu caule e requerem maiores concentrações de NaCl na solução para a extração do DNA. Assim, para melhorar a qualidade do DNA extraído livre de polissacarídeo, para as plântulas, FOI utilizado 2,2 mol/L de NaCl e para os caules adultos 5,0 mol/L de NaCl. Os microtubos foram agitados para homogeneização e incubados em banho-maria durante, 1 hora, a 65 °C, realizando agitações suaves a cada 15 minutos. Após serem retirados da incubação, os microtubos foram deixados por cinco minutos em temperatura ambiente para esfriar. Em seguida, foi adicionada uma solução preparada com 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, a 10.000 r.p.m., em temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi recuperado e transferido para um microtubo (1,5 mL) e adicionado 2,5 µL de RNase (10mg/mL). Estes foram mantidos em temperatura ambiente por duas horas para a digestão do RNA. Após o período de incubação com RNase, foi acrescentado 600 µL de uma mistura preparada com clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1, e os microtubos foram agitados durante cinco minutos, repetindo-se o mesmo procedimento de centrifugação descrito anteriormente. O sobrenadante foi novamente coletado e transferido para outro microtubo (1,5 mL), no qual foram adicionados isopropanol e cloreto de sódio, a fim de precipitar o DNA, sendo o volume do primeiro igual ao do sobrenadante recuperado e o segundo igual a 1/6 do volume do sobrenadante. Em seguida, os tubos foram mantidos *overnight* a -20°C. Após este período, foi efetuada uma centrifugação, por 20 minutos, a 10.000 r.p.m e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com etanol absoluto gelado por duas vezes. Após a segunda lavagem com etanol absoluto, o sobrenadante foi descartado e o DNA

precipitado foi seco e ressuspendido em 40 μ L de TE (0,0004 M Tris/HCl e 0,0002M EDTA). Os tubos foram vedados com filme plástico e armazenados em geladeira com 4 °C.

Quadro 4 - Protocolo utilizado para a extração de DNA de tecidos de caules de plântulas e plantas de mandacaru, segundo Aljanabi et al. (1999)

Tampão de extração	Concentração/Quantidade
Tris-HCL	200 mmol/L pH 8,0
EDTA	50 mmol/L pH 8,0
NaCl	2,2 mol/L para plântulas e 5,0 mol/L para
CTAB	2%
Sulfito de sódio	0,06%
Reagentes de solubilização das membranas e antioxidante	
CTAB	20%
N-Lauril Sarcosina	5%
PVP-40	10%
Reagentes de Purificação	
Fenol:clorofórmio:álcool Isoamílico	600 μ L
RNAse (10mg/mL)	0,1 ng/ μ L
Clorofórmio: Álcool isoamílico (24:1)	600 μ L
Reagentes de precipitação	
Isopropanol gelado	1 volume
NaCl (5 mol/L)	1/6 volume
Lavagem do precipitado	
Álcool absoluto (repetir 2x)	500 μ L

A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris-Acetato 0,04M e EDTA 0,001M) submetido a 80 Volts por aproximadamente 1 hora (Hoisington et al., 1994). O DNA extraído de cada população foi comparado com soluções de DNA padrão (Fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas de 50 ng e 150 ng. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio contendo 0,5 μ g mL⁻¹ e a imagem capturada em sistema de foto documentação L-PIX HE, Loccus biotecnologia. Foi realizada uma certificação da quantificação, na qual os DNAs das amostras foram

diluídos para uma concentração de 10 ng/μL, sendo aplicado um volume de 10 μL de cada DNA em gel de agarose 0,8%, conforme procedimento descrito acima, acrescentando-se a concentração de 100 ng do Fago λ. Dessa forma, todas as amostras quantificadas corretamente ficaram com uma concentração final de 100 ng.

3.4 Testes de amplificação dos microssatélites

Foram testados 33 pares de *primers* heterólogos mapeados para diferentes espécies de cactáceas. Sete pares de *primers* foram isolados da espécie *Polaskia chichipe*, seis de *Astrophytum asterias*, oito de *Ariocarpus bravoanus* e doze de *Echinocactus grusonii*, totalizando assim 33 pares de *primers* (Quadro 6). Inicialmente, todos os pares de *primers* foram amplificados de acordo com o programa de ciclos e temperaturas padrão descrito por Albert e Schmitz (2002) (Quadro 5), mas as temperaturas de anelamento utilizadas para cada par de *primer* foram aquelas descritas e utilizadas nos artigos que descrevem o isolamento destes. Os *primers* que não amplificaram produtos nítidos foram novamente amplificados com o mesmo programa, alterando a temperatura de anelamento, visando a obter maior aproveitamento e nitidez dos produtos da amplificação (Quadro 6).

Após os testes com diferentes programas e temperaturas de anelamento, dez pares de *primers* foram selecionados, pois amplificaram regiões específicas e com indícios de polimorfismo. Os *primers* que após estes testes não amplificaram fragmentos específicos foram descartados do experimento.

Quadro 5 - Sequência do programa segundo Albert e Schmitz (2002), com modificações nas temperaturas de anelamento de cada *primer*, utilizada para amplificação do DNA de mandacaru com todos os *primers*

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	95°C	240s
2	Desnaturação	94°C	30 s
3	Anelamento	Variável para cada <i>primer</i>	60 s
4	Extensão	72°C	60 s
5	Voltar aos passos 2, 3 e 4 por 35 vezes		
6	Extensão final	72°C	600s
7	Imersão	4°C	∞

Quadro 6 - Condições de amplificação testadas para os 33 pares de *primers* de cactáceas, nas amostras de mandacaru, utilizando diferentes temperaturas de anelamento

Primer	Autores	Testes com diferentes temperaturas de anelamento
Pchi5 AY147840	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C, 58°C, 57°C *
Pchi9 AY147838	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C, 58°C, 57°C.
Pchi21 AY147837	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C*
Pchi25 AY147836	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C, 58°C, 57°C.
Pchi44 AY147834	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 59°C*
Pchi47 AY147832	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C*
Pchi54 AY147831	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C.
AaB6	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 64°C*
AaH11	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 63°C.
AaA3	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 64°C, 62°C, 60°C.
AaC3	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 63°C, 61°C, 58,5°C.
AaD9	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 64°C, 62°C, 60°C, 59°C*
AaG3	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 64°C, 62°C, 60°C.
mAbR05	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C*
mAbR28	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 53,8 C*
mAbR40	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C, 50°C.
mAbR42	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C.
mAbR77	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C, 52°C.
mAbR82	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C, 50°C.
mAbR86	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C*
mAbR91	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C
mEgR02	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C.
mEgR17	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°.
mEgR39	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C.
mEgR63	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C, 58,5°C.
mEgR76	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C.
mEgR73	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C.
mEgR78	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58° C*
mEgR98	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C, 58,5°C.
mEgR99	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59,5°C.
mEgR51	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C, 50°C.
mEgR68	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C.
mEgR70	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C, 52°C.

*Temperatura de anelamento que utilizadas por amplificarem produtos nítidos.

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foi realizada em termociclador Techne TC-512. As reações de amplificação foram preparadas com 10 ng de DNA, tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl), 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 1U de *Taq-DNA Polimerase* (Invitrogen) e 0,5 µM de cada um dos *primers Forward* e *Reverse*, em volume final de 20 µL (Quadro 7).

Quadro 7 - Concentrações dos reagentes estoques utilizados nas reações de amplificação

Reagentes	Concentração estoque dos reagentes	Concentração final dos reagentes/reação	µL/20 µL de reação
H ₂ O			12,0
Tampão	10 X	1 X	2,0
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,0
dNTPs	2,5m M/cada	0,1 mM/cada	0,8
<i>Primer</i> (F)	10 µM	0,5 µM	1,0
<i>Primer</i> (R)	10 µM	0,5 µM	1,0
<i>Taq-DNA Polimerase</i>	5 U/ µL	1 U	0.2
DNA	10 ng/ µL	10ng	1,0
Total			20µL

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose Metaphor (4%), usando tampão TBE 0,5X (44,5mM Tris, 44,5mM ácido bórico e 1mM EDTA). O gel foi preparado com 50% de agarose Metaphor e 50% de agarose comum. A eletroforese foi realizada a 60 Volts, por um tempo médio de 3 horas e 30 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução contendo 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídio e a imagem foi capturada em transluminador L-PIX HE, Loccus biotecnologia. *DNA Ladder* (Invitrogen) de 100pb foi utilizado como padrão para a definição do tamanho dos fragmentos amplificados.

3.5. Análise dos dados

A análise do polimorfismo nos locos SSRs foi feita estimando-se o número médio de alelos por loco, a heterozigosidade média observada (H_o) e a heterozigosidade média esperada (H_e), o número de alelos por loco (N_a), o número efetivo de alelos por loco polimórfico (N_e) e a proporção de locos polimórficos (%P).

O afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi examinado para cada loco e para cada amostra de mandacaru. O coeficiente de endogamia (F_{IS}), déficit de heterozigotos (F_{IT}) e a diversidade genética entre as amostras (F_{ST}) foram estimados com auxílio do programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999). A matriz de similaridade genética, assim como os agrupamentos em dendrograma, foi obtida mediante utilização do método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*). A análise foi conduzida mediante utilização do programa POPGENE 1.32 (Yeh, et al., 1999), sendo utilizado o complemento aritmético da distância genética de Nei (Nei, 1972). Os valores para a identidade genética (Nei 1973) e distâncias entre os grupos de plantas das populações das regiões Nordeste, Sul, Sudeste, e Central do Brasil foram calculados usando o agrupamento UPGMA (Yeh et al., 1999). O programa GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse 2012) foi utilizado para calcular a percentagem de variância molecular dentro e entre as populações, por meio da análise da variância molecular (AMOVA). Com este programa, também foram construídas as matrizes de distância genética e a de distância geográfica. A correlação entre estas matrizes foi calculada utilizando o teste de Mantel. O agrupamento (Bar Plot), utilizando estatística Bayesiana, foi implementado pelo programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Quantificação

A quantificação do DNA genômico extraído das plântulas de mandacaru foi realizada pela comparação visual da intensidade das bandas com o DNA fago λ em gel de agarose. A metodologia utilizada para a extração do DNA foi eficiente, possibilitando realizar uma extração livre de polissacarídeos e de qualidade para a amplificação, cuja concentração variou de 10 a 100 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ (Figura 06).

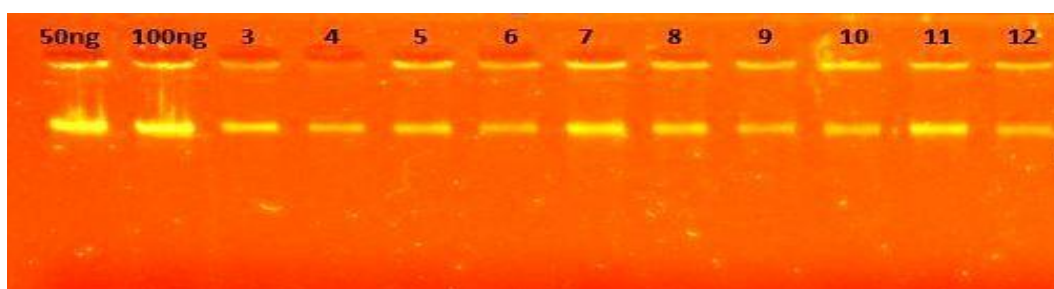


Figura 6 - Gel de Agarose 0,8% utilizado para quantificação das amostras de DNA de mandacaru. Amostras 1, 2 são DNAs de fago λ utilizadas como padrão de concentração com 50, 100. As amostras de 3 a 12 são de DNAs das plântulas obtidas de diversas localidades.

4.2. Transferibilidade

Dentre os 33 pares de *primers* analisados, 12 não amplificaram em nenhuma das condições testadas, 11 geraram fragmentos inespecíficos e 10 pares de *primers* amplificaram regiões específicas e foram polimórficos (Quadro 6). A transferibilidade média de microssatélites desenvolvidos para diferentes gêneros de cactáceas para o mandacaru foi de 30,30%.

Dos sete *primers* de microssatélites desenvolvidos para a espécie *Polaskia chichipe* e testados, quatro amplificaram os DNAs das diferentes amostras de mandacaru (*Pchi5*, *Pchi21*, *Pchi44* e *Pchi47*), obtendo, assim, uma taxa de transferibilidade de 57,14% (Quadro 8). O *primer Pchi5* identificou para esta espécie apenas um loco com 3 alelos, enquanto para mandacaru este *primer* amplificou dois locos, um com três alelos e outro com dois alelos. Este loco também foi transferível para outras três espécies de cactos colunares, como *Lophocereus schottii*, *Pachycereus pringeli* e *Subpilocereus repandus* (Otero-Arnaiz et al., 2004). O *primer*

Pchi21 também foi transferível para cinco outras espécies de cactáceas, entre elas *Carnegiea gigantea*, *Lophocereus schottii*, *Subpilocereus repandus*, *Stenocereus thurberri* e *S. stellatus* (Otero-Arnaiz et al., 2004). O *primer Pchi 44*, até o momento, foi transferível apenas para as cactáceas do grupo mandacaru. E, por fim, o *primer Pchi47* foi transferível para *C. gigantea* e *L. schottii* (Otero-Arnaiz et al., 2004).

Dos microssatélites desenvolvidos para *Ariocarpus bravoanus*, oito pares de *primers* foram testados e três (*mAbR05*, *mAbR28* e *mAbR86*) amplificaram o DNA de mandacaru, conferindo 37,5% de transferibilidade. Dois dos seis *primers* de *Astrophytum asterias* (*AaB6* e *AaD9*) foram transferidos para mandacaru (transferibilidade de 33,33%). Dentre os seis *primers* de *Echinocactus grusonii*, apenas 1 (*mEgR78*) amplificou o DNA de mandacaru, apresentando assim uma taxa de transferibilidade de apenas 16,66% (Quadro 8). Essa transferibilidade foi semelhante à observada quando o mesmo conjunto de *primers* foi utilizado para amplificar o DNA de *Astrophytum capricorne*, *Echinocactus texensis*, *Epithelantha micromeris* e *Escobaria dasyacantha* (Hardesty et al., 2008).

Quadro 8 - Conjunto dos *primers* para microssatélites desenvolvidos para quatro espécies de cactáceas, número de alelos obtidos para a espécie original, número de alelos detectados para cada *primer* em populações de mandacaru e porcentagem de transferibilidade

Espécie	<i>Primers</i> polimórficos	Número de alelos obtidos para a espécie original	Número de alelos obtidos para mandacaru	Porcentagem de transferibilidade
<i>Polaskia chichipe</i>	<i>Pchi5</i>	3	5	57,14%
	<i>Pchi21</i>	6	2	
	<i>Pchi44</i>	4	2	
	<i>Pchi47</i>	2	3	
	<i>mAbR05</i>	5	6	
<i>Ariocarpus bravoanus</i>	<i>mAbR28</i>	6	3	37,5%
	<i>mAbR86</i>	8	2	
	<i>Astrophytum asterias</i>	<i>AaB6</i>	7	
<i>AaD9</i>	6	3		
<i>Echinocactus grusonii</i>	<i>mEgR78</i>	2	2	8,33%.
TOTAL				30,30%

A maior porcentagem de transferibilidade para mandacaru (57,14,4%) foi observada usando os *primers* provenientes de *P. chichipe*, uma espécie endêmica do México Central. Assim como o mandacaru, é um cacto colunar, com alta

importância econômica devido aos seus frutos comestíveis, com grande interesse para a indústria de alimentos (Casas et al., 2006). As espécies *Ariocarpus bravoanus*, *Astrophytum asterias* e *Echinocactus grusonii*, onde foram observadas as taxas de transferibilidades de 37,5, 33,33% e 8,33%, respectivamente, também são originárias do México, mas apresentam uma morfologia bem diferenciada do mandacru. O cacto *A. bravoanus* tem o caule em forma de roseta, *A. asterias* possui forma geométrica e as plantas de *E. grusonii* têm o caule em forma de barril ou globular. Embora não seja possível estabelecer alguma relação entre morfologia de plantas e uma maior ou menor taxa de transferibilidade de *primers* para locos *SSR* em cactos, a espécie *P. chichipe* apresenta várias sinonímias, dentre elas *Cereus chichipe* e *Cereus mixtecensis*. Isso justifica o fato de *P. chichipe* ter sido classificada por alguns autores como do gênero *Cereus* e, portanto, da maior proximidade entre as espécies *P. chichipe* e as espécies descritas como mandacaru. Esta maior proximidade de mandacaru com *P. chichipe* poderia justificar a maior transferibilidade dos *primers* *SSR* de *P. chichipe*, quando comparada com a menor transferibilidade dos *primers* de *A. bravoanus*, *A. asterias* e de *E. grusonii*, para mandacaru.

As frequências de amplificação heterólogas dentro da família Cactaceae são bem maiores que as frequências de transferibilidade de locos *SSRs* dentro da família Myrtaceae, que foi de apenas 2,9% de *Eucalyptus* spp. para *Eugenia dysenterica* (Zuchi et al., 2002). Mas a transferibilidade observada no presente trabalho foi bem menor que a obtida para a família Sapindaceae, que foi de 58,3% (Ekué, et al., 2009), para a família Fagaceae que foi de 47% (Barreneche et al., 2004) e para Meliaceae que foi de 68,2% (Zuchi et al., 2002). Segundo Barbará (2007), em geral, a transferibilidade difere muito entre as espécies, especialmente para aquelas que florescem com um forte indicativo de que a transferibilidade é mais elevada em espécies perenes e com sistemas de fecundação cruzada. Mesmo com diferentes taxas de transferibilidade, evidências do sucesso de amplificação entre espécies podem ser observadas tanto em plantas como em animais. Wu e Tanksley (1993) encontraram conservação de sequências entre subespécies de arroz cultivadas e espécies selvagens relacionadas. Thomas e Scoot (1993) encontraram conservação similar de sequências em espécies de uva. Conservação de sequências também foi observada em *Brassica carinata* e espécies relacionadas (Marquez-Lema et al., 2010) e também em *Phyllostachys pubescens* e seis espécies relacionadas (Tang et

al., 2010). Segundo Varshney (2005) uma melhor estratégia de transferibilidade é desenvolver microssatélites de regiões transcritas, pois estes marcadores são mais robustos, apresentam resolução alélica superior e maior transferibilidade interespecífica e intergenérica, aumentando assim a eficiência deste marcador.

Embora apenas uma baixa porcentagem de *primers* SSRs seja transferível entre gêneros diferentes, cerca de 35,2%, como descrito por Weising et al. (2005), nossos resultados indicam que a transferência de 30,30% entre gêneros distintos pertencentes à família Cactaceae é importante, uma vez que existem grandes dificuldades para o desenvolvimento de microssatélites para esta família. O desenvolvimento de microssatélites é um processo que requer algumas etapas laboriosas e demoradas, como a construção de bibliotecas genômicas e sequenciamento do DNA.

4.3. Diversidade genética

Após os testes de transferibilidade dos microssatélites, dez pares de *primers*, que amplificaram doze locos, foram selecionados para a avaliação da diversidade genética e da estruturação genética das amostras de mandacaru, pois amplificaram bandas nítidas com indícios de polimorfismos. Estes pares de *primers*, suas sequências e número dos alelos produzidos, o número de alelos para cada loco produzido originalmente para a espécie de onde foram isolados, a variação do tamanho dos alelos (pb) na população original e em mandacaru estão apresentados no Quadro 9.

A análise dos doze locos microssatélites em plântulas das 21 amostras de diferentes localidades de mandacaru resultaram na amplificação de 31 alelos, com uma média de 2,58 alelos por loco polimórfico. Para os *primers* *Pchi 5* e *mAbR05*, foram amplificados dois locos, cada um contendo 6 e 5 alelos, respectivamente. Os demais *primers* amplificaram somente um loco. Dois alelos foram identificados usando os *primers* *Pchi21*, *Pchi44*, *mAbR86* e *mEgR78* e três alelos usando os *primers* *Pchi47*, *mAbR28*, *AaB6* e *AaD9*. O tamanho dos alelos amplificados para os microssatélites transferidos para mandacaru variou de 30 pb para o loco *mAbR05* a 150pb para o loco *Pchi5* (Quadro 9). Todos os 12 locos analisados, exceto o loco *AaB6*, apresentaram alelos com menor número de pares de bases que a espécie de origem (Quadro 9).

Quadro 9 - Sequências de nucleotídeos dos *primers* para microssatélites, número de locos e número de alelos, variação do tamanho dos alelos detectados nas amostras de mandacaru, número de alelos obtidos para a espécie original e variação do tamanho dos alelos na população original

<i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i> (5'-3')	Número de loco	Número de alelos	Variação do tamanho dos alelos (pb)	Variação do tamanho dos alelos (pb)	
					Mandacaru	População Original
<i>Pchi5</i>	F: CAAGAAAAAGGAAGCCCACA R: GGTGCCATATCCCCTGTGTA	2	5	67-150	3	221
<i>Pchi21</i>	F: CGTTTAGCCCCTCTTTCTCC R: GTTCCCAACTGACCGACAAC	1	2	107-117	6	124
<i>Pchi44</i>	F: ATTCAAACAGGCCACACAG R:GGGTGTTAGAAGGAATAATAGCTTG	1	2	78-136	4	137
<i>Pchi47</i>	F: GTCCTTGTGGCTAGCCCTTT R: CCATTTCTCTCGCCATCTG	1	3	90-95	2	120
<i>mAbR05</i>	F: AATAGGGACAGTGAGGGATT R: TCTTCTCATGAGCCTTGTCG	2	6	30-130	5	293-300
<i>mAbR28</i>	F: CCATAAGCTGTGGTGGGTCT R: ATTTTAAAGCTCCCCCTCCA	1	3	61-73	6	207-222
<i>mAbR86</i>	F: TTGCAACTTGGGCATCAGTA R: GGCAGCTCAACTCCAGAGAC	1	2	79-82	8	432-452
<i>AaB6</i>	F:ATGCGAACAGATTGAAAAGAGGG R: CTCAGGAAAGACTTACACCATGG	1	3	90-101	7	83-99
<i>AaD9</i>	F: CTGTTTAGTTCTCTCGTCTTCACC R: CTCCGCTTTTACTGCTAGCACC	1	3	92-100	6	135-143
<i>mEgR78</i>	F: AGCCCAAAGCCCAACTTATT R: TGCATGCAATCATAAGGTTTTTC	1	2	57-64	2	148-242
Total		12	31		52	

O número médio de alelos por loco encontrado nas amostras de mandacaru (2,58 por loco polimórfico) é um número relativamente pequeno, quando comparado a outras espécies de cactáceas já analisadas com microssatélites, porque este é um valor muito próximo ao encontrado por Faria-Tavares (2011). Em seu trabalho, o pesquisador observou 2,83 alelos em 6 locos heterólogos utilizados para estudar 13 amostras diferentes de *C. peruvianus* coletadas em diferentes regiões do Paraná. Em *Opuntia*, analisada com 19 *primers* para SSRs, o número médio de alelos por loco foi de 16,9 (Caruso et al., 2010); em *Astrophytum asterias*, foi observada uma média de 8,5 alelos por loco (Terry et al., 2006); em *Polaskia chichipe*, a média de alelos observados por loco analisado foi de 5,28 (Otero-Arnaiz, et al., 2004); em *Ariocarpus bravoanus*, a quantidade média de alelos por loco foi de 5,62 (Hughes et al., 2008); em *Echinocactus grusonii*, foi observado uma média de apenas 3,33 alelos por loco (Hardesty et al., 2008); nos trabalhos realizados com *Coryphantha robustispina* a média foi encontrada foi de 7 alelos por loco (Butterworth et al., 2010) e o número de alelos por loco em *Pilosocereus machrisi* variou de 1 a 8 (Perez et al., 2011).

A frequência de alelos para os diferentes locos variou em todas as 21 amostras analisadas (Quadro 10). Dentre os doze locos estudados, o *mAbR05-1* foi o único que apresentou quatro alelos, sendo o alelo *d* encontrado apenas nas amostras PR 4 e PR 5, localizadas em diferentes regiões de Maringá-PR. O alelo *a* do loco *Pchi5-1* (*Pchi5-1^a*) foi encontrado somente nas cinco amostras coletadas na região do Pantanal. O par de *primer* para o loco *Pchi44* não encontrou homologia para o genoma das populações coletadas de diferentes regiões de Maringá, de São Paulo, Picos, Teresina e Bahia e, portanto, esta sequência não foi amplificada. Quando analisamos o loco *Pchi21*, observamos que todos os indivíduos das amostras SP 1, BA, PR 1, PR 2, PI 1, PI 2, PI 3, PI 4, PI 5, MS 1, MS 2, MS 3, MS 4 e MS 5 são heterozigotos, mas, para as seis amostras de Maringá e na amostra de plântulas das sementes coletadas na região de Pardinho-SP, observamos a fixação do alelo *a*. No loco *mAbR05-2* o alelo *mAbR05-2^b*, também se encontra fixado em 42,8% das amostras, com exceção das amostras SP 1, PR 1, PR 2, PR 8 e em todas as amostras da região do Pantanal (MS 1 - MS 5). Os alelos *mAbR28^b* e *mAbR86^b* foram encontrados fixados nas amostras do Pantanal (MS 1 - MS 5) e nas amostras da região Nordeste do país (PI 1 – PI 5), respectivamente. Os demais locos, *AaB6*, *AaD9*, *mEgR78* e *Pchi47*, têm seus alelos bem distribuídos em todas as amostras de mandacaru analisadas.

Quadro 10 - Frequência dos alelos para os diferentes locos de microssatélites analisados para as amostras de mandacaru

LOCOS	SP1	SP2	PR1	PR2	PR3	PR4	PR5	PR6	PR	PR8	BA	PI 1	PI 2	PI 3	PI 4	PI 5	MS1	MS	MS3	MS4	MS5
<i>Pchi5-1</i>																					
Alelo A	1	0,70	0,60	0,50	0,40
Alelo B	0,64	0,80	0,80	1	0,60	0,40	0,80	1	0,60	0,20	0,40	0,30
Alelo C	0,36	0,20	1	0,20	0,40	1	1	0,60	1	1	0,20	0,40	1	1	0,30	0,20	0,10	0,30
<i>Pchi5-2</i>																					
Alelo A	0,28	0,40	0,20	0,50	0,30	0,30	0,40	0,20	0,50	0,40	0,33	0,20	0,30	0,60	0,60	0,50	0,70	0,40	0,50	0,50	0,40
Alelo B	0,71	0,70	0,80	0,50	0,70	0,70	0,60	0,80	0,50	0,60	0,67	0,80	0,70	0,40	0,40	0,50	0,30	0,60	0,50	0,50	0,60
<i>Pchi21</i>																					
Alelo A	0,71	1	0,80	0,90	1	1	1	1	1	1	0,83	0,80	0,70	0,70	0,80	0,80	0,50	0,50	0,50	0,60	0,60
Alelo B	0,28	0,20	0,1	0,17	0,20	0,30	0,30	0,20	0,20	0,50	0,50	0,50	0,40	0,40
<i>Pchi44</i>																					
Alelo A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,20
Alelo B	1	1	1	1	0,80
<i>Pchi47</i>																					
Alelo A	0,03	0,1	0,1	0,90	0,20	0,1	0,20	0,40	0,70	0,50	0,90	0,80
Alelo B	0,42	0,80	1	0,60	0,70	0,80	0,80	1	0,80	1	1	1	1	1	0,80	0,40
Alelo C	0,53	0,1	0,40	0,30	0,1	0,1	0,1	0,20	0,30	0,50	0,1	0,20
<i>mAbR05-1</i>																					
Alelo A	1	1	1	1	0,80
Alelo B	0,11	0,50	0,50	0,40	0,50	0,80	0,50	0,40	0,50	0,50	1	1	1	0,90	1	0,90	0,1
Alelo C	0,89	0,50	0,50	0,60	0,50	0,1	0,40	0,60	0,50	0,50	0,1	0,1	0,1
Alelo D	0,1	0,1

Quadro 10, continuação...

Locos	SP 1	SP	PR	PR2	PR	PR	PR5	PR	PR	PR8	BA	PI 1	PI 2	PI 3	PI 4	PI 5	MS1	MS2	MS	MS	MS
<i>mAbR05-2</i>																					
<i>Alelo A</i>	0,03	0,20	0,40	0,40	1	0,50	0,50	0,50	0,50	0,20
<i>Alelo B</i>	0,96	1	0,80	0,60	1	1	1	1	1	0,60	1	1	1	1	1	0,50	0,50	0,50	0,50	0,80
<i>mAbR28</i>																					
<i>Alelo A</i>	0,03	0,1	0,20	0,20	0,40	0,1	0,50	0,1	0,1
<i>Alelo B</i>	0,61	0,60	0,50	0,40	0,20	0,20	0,50	0,60	0,60	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Alelo C</i>	0,35	0,30	0,30	0,40	0,40	1	0,70	0,50	0,40	0,30	1	1	0,40
<i>mAbR86</i>																					
<i>Alelo A</i>	0,75	0,30	0,80	1	0,60	0,80	0,60	0,90	1	0,67	1	0,20	0,90
<i>Alelo B</i>	0,25	0,70	0,20	0,40	1	0,20	0,40	0,1	0,33	1	1	1	1	1	1	0,80	0,1	1
<i>AaB6</i>																					
<i>Alelo A</i>	0,2857	1	0,20	0,80	0,1	0,33	0,30	0,1	0,1
<i>Alelo B</i>	0,6786	1	0,60	0,90	0,40	0,40	0,20	0,90	0,67	0,20	0,50	0,40	0,30	0,30	1	0,70	1	0,40
<i>Alelo C</i>	0,0357	1	0,40	0,1	0,60	0,40	0,50	0,40	0,60	0,60	1	0,70	0,30	0,60
<i>AaD9</i>																					
<i>Alelo A</i>	0,57	1	0,20	0,40	0,70	0,30
<i>Alelo B</i>	0,43	0,80	0,30	0,60	1	1	1	0,30	0,80	0,70	0,80	0,80	0,40	1	0,80	0,80	1	1
<i>Alelo C</i>	0,20	0,50	0,40	0,60	1	0,20	0,20	0,20	0,60	0,20	0,20
<i>mEgR78</i>																					
<i>Alelo A</i>	0,46	1	0,70	0,40	0,60	0,1	0,40	0,20	0,20	0,67	0,40	0,60	0,50	1	0,20	0,80	0,60	0,70
<i>Alelo B</i>	0,53	0,30	0,60	0,40	1	0,90	0,60	0,80	0,80	0,33	1	0,60	1	0,40	0,50	0,80	0,20	0,40	0,30

Apesar da maioria das amostras apresentarem frequências alélicas bastantes distintas, algumas apresentam frequências alélicas similares e, em amostras onde há a fixação de alguns alelos, notamos a tendência desta em se manter em homozigose. Foi possível observar também o aparecimento de novos alelos e de alelos exclusivos nas amostras do Pantanal, o que caracteriza seu isolamento e sua diferenciação das demais amostras de mandacaru.

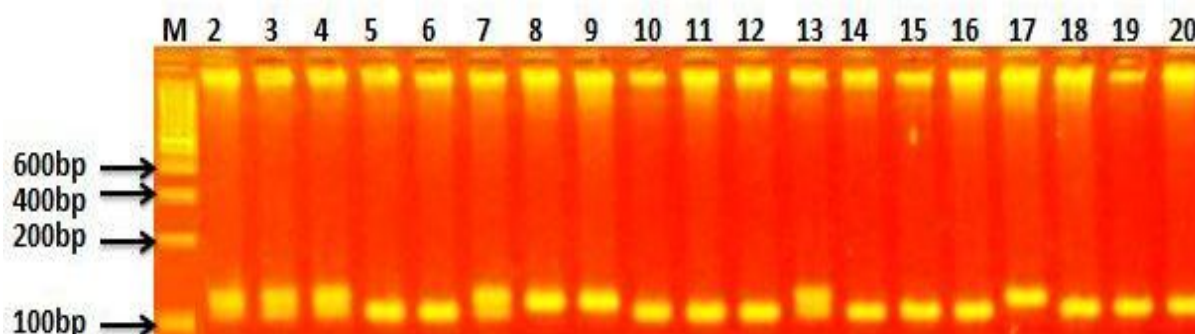


Figura 7 - Gel de agarose concentrado 4% (50% agarose comum e 50% agarose MS-8) para separar o produto da amplificação dos DNAs de diferentes plântulas das amostras de mandacaru com o *primer Pchi47*. A primeira amostra (M) do gel indica o *ladder* 100 pb (Invitrogen), as demais amostras indicam os alelos (homozigotos e heterozigotos) presentes na população.

O polimorfismo entre as 21 amostras analisadas variou de 41,67% a 91,67%. A amostra mais polimórfica foi a amostra SP 1, coletada no município de Torre de Pedra-SP, com 91,67% de locos polimórficos, seguida das amostras PR 2, MS 3 e MS 5, com 75,0%. As amostras PR 8 e PR 3 apresentaram 66,67% de polimorfismo e as amostras PR 1, PR 5, PR 6, PR 7, SP 2, MS 2 e MS 4 apresentaram o mesmo polimorfismo (58,33%). As amostras PR 4, PI 2, PI 3, e PI 5 apresentaram 50% de polimorfismo e as amostras BA, PI 1, PI 4 e MS 1 foram as menos polimórficas, com 41,67% de polimorfismo (Quadro 11).

A frequência dos alelos *a*, *b*, *c* e *d* para os doze locos SSR estudados conferiram uma baixa proporção de plântulas heterozigotas em todas as amostras estudadas. A heterozigosidade média observada variou de 0,0278, na amostra BA, a 0,3667 na amostra MS 2. A heterozigosidade esperada variou de 0,1759 (amostra PI 1) a 0,3870 (amostra PR 2). Portanto, a heterozigosidade média observada é muito menor que a esperada (Quadro 12).

Quadro 11 - Estimativas do número de locos polimórficos N(lp); número de locos monomórficos N(lm) e porcentagem de polimorfismo (%P) para as 21 amostras de mandacaru

Populações	N(lp)	N(lm)	%P
SP 1	11	1	91,67%
BA	5	7	41,67%
PR 1	7	5	58,33%
PR 2	9	3	75,00%
PR 3	8	4	66,67%
PR 4	6	6	50,00%
PR 5	7	5	58,33%
PR 6	7	5	58,33%
PR 7	7	5	58,33%
PR 8	8	4	66,67%
SP 2	7	5	58,33%
PI 1	5	7	41,67%
PI 2	6	6	50,00%
PI 3	6	6	50,00%
PI 4	5	7	41,67%
PI 5	6	6	50,0%
MS 1	5	7	41,67%
MS 2	7	5	58,33%
MS 3	9	3	75,00%
MS 4	7	5	58,33%
MS 5	9	3	75,00%
Média			58,33%

O valor médio de H_o para as 21 amostras de mandacaru estudadas foi de 0,2405 (Quadro 12), valor este menor que os observados nas diferentes populações descritas na literatura para *C. peruvianus* e para outras espécies de cactáceas. Sala et al. (2011), utilizando isoenzimas α - e β - esterases para a caracterização de populações de *Cereus peruvianus*, obtiveram uma heterozigosidade observada entre 0,2528 e 0,6175. Otero-Arnaiz et al., (2005), em seu estudo com populações selvagens, manejadas e cultivadas de *Polaskia chichipe*, encontraram uma heterozigosidade média observada de 0,6310, 0,5050 e 0,5600, respectivamente, valores esses duas ou mais vezes superiores aos descritos neste estudo com as amostras de mandacaru. Ao analisar cinco locos polimórficos em *Haageocereus*, Arakaky et al. (2010) obtiveram uma heterozigosidade observada variando de 0,4780 a 0,8710. Butterworth et al. (2011), ao realizarem a caracterização de 10 pares de *primers* a partir de *Coryphantha robustispina*, obtiveram uma H_o de 0,1300

a 0,8700 e em *Pilosocereus machrisii* a heterozigosidade encontrada variou entre 0,1000 a 0,9050 (Peres et al. 2011).

A heterozigosidade média esperada para as amostras de mandacaru foi de 0,2681 (Quadro 12). O intervalo dos valores da heterozigosidade esperada nas 21 amostras de mandacaru (0,0278 – 0,3667) também foi menor que o obtido para outras cactáceas. Otero-Arnaiz et al. (2004), ao analisarem sete locos polimórficos em *Polaskia chichipe*, obtiveram uma heterozigosidade entre 0,188 e 0,797. Na análise de 12 locos SSRs polimórficos em 30 indivíduos de *Echinocactus grusonii*, a heterozigosidade esteve entre 0,235 e 0,785 (Hardesty et al., 2008). Hughes et al. (2008), ao estudarem 8 locos polimórficos em populações de *Ariocarpus bravoanus*, obtiveram uma heterozigosidade esperada entre 0,201 e 0,688. Butterworth et al. (2011), ao realizarem a caracterização de 10 pares de *primers* a partir de *Coryphantha robustispina* obtiveram uma He de 0,130 a 0,880. Peres et al. (2011) analisaram 11 locos de 51 indivíduos de *Pilosocereus machrisii*, obtendo uma heterozigosidade média esperada entre 0 a 0,789, o maior intervalo encontrado na literatura.

A pequena quantidade de plântulas heterozigotas encontradas nas amostras de mandacaru analisadas com os doze locos para microssatélites, em relação aos valores estimados para as outras espécies de cactos colunares, pode ser justificada pela forma convencional usada na região para a fundação das populações, que consiste na multiplicação vegetativa de exemplares das plantas, principalmente aquelas que compõem jardins ornamentados por cactos. As plântulas analisadas, no presente estudo, são em sua maioria descendentes de locais na zona urbana, seguramente estruturadas pelo homem. É possível que as estimativas de indivíduos heterozigotos sejam maiores em populações casualmente estabelecidas na natureza a partir de sementes dispersas por pássaros ou abelhas, por exemplo. Outra possível explicação para o excesso de homozigotos seria a ocorrência de alelos nulos, uma vez que a probabilidade desse evento ocorrer é maior quando se utiliza *primers* heterólogos (Pépin et al., 1995). É possível observar que a maior diferença entre a heterozigosidade observada e esperada foi registrada para as plântulas das amostras SP 1, BA, PR 4, SP 2, PI 2, PI 3 e MS 5, coletadas nas localidades Torre de Pedra, Queimada Nova, Maringá, Pardinho, dois locais de Teresina e uma na região do Pantanal. As amostras MS1, MS2, MS3 e MS4, descendentes de plantas da região do Pantanal, apresentam valores de H_o superiores aos valores de H_e

(Quadro 12). Estas plantas parecem ter sido estabelecidas de forma casual no ambiente, por meio da dispersão de sementes por animais, uma vez que se encontram na Fazenda Experimental da Embrapa Pantanal. Este resultado mostra que plantas coletadas de jardins, em regiões urbanas, diferentemente de plantas naturalmente estabelecidas na natureza, apresentam distorções quanto à heterozigosidade. Além disso, as distorções nos valores encontrados podem se dar devido ao fato de as amostras serem provenientes de plantas de uma mesma mãe, ou seja, cada semente compartilha apenas 50% dos genes.

Quadro 12 - Parâmetros médios de diversidade genética avaliados para as 21 amostras de Mandacaru e obtidos mediante análise dos doze locos SSRs, onde Na= número médio de alelos observados; Ne=número efetivos médio de alelos; Ho=heterozigosidade média observada; He=heterozigosidade média esperada

	Na	Ne	Ho	He
SP 1	2,1667	1,6715	0,1607	0,3790
SP 2	1,7500	1,4398	0,1667	0,2704
PR 1	1,6667	1,4365	0,2333	0,2611
PR 2	1,9167	1,7326	0,3500	0,3870
PR 3	1,7500	1,6599	0,3167	0,3611
PR 4	1,6667	1,3183	0,1167	0,2074
PR 5	1,7500	1,4157	0,2333	0,2481
PR 6	1,6667	1,5407	0,3167	0,2981
PR 7	1,6667	1,4554	0,2167	0,2667
PR 8	1,8333	1,4958	0,2833	0,3019
BA	1,4167	1,2987	0,0278	0,2056
PI 1	1,5000	1,2928	0,1500	0,1759
PI 2	1,5833	1,4500	0,1833	0,2593
PI 3	1,5000	1,3486	0,1333	0,2185
PI 4	1,5000	1,3301	0,2000	0,1981
PI 5	1,5000	1,3403	0,2167	0,2130
MS 1	1,5000	1,4355	0,2667	0,2296
MS 2	1,5833	1,4427	0,3667	0,2741
MS 3	1,8333	1,6174	0,3833	0,3648
MS 4	1,6667	1,4722	0,3833	0,2685
MS 5	1,9167	1,6135	0,2667	0,3537
Média	1,6825	2,8007	0,2405	0,2681

A análise dos polimorfismos nos locos SSR das 21 amostras de mandacaru evidenciou que os locos *Pchi21*, *mAbR05-1*, *mAbR05-2* e *Pchi5-2* apresentaram valores negativos para o coeficiente de endogamia (Fis), indicando um excesso de heterozigotos para os referidos locos (Quadro 13). O valor médio de Fis para os doze locos estudados foi 0,0407, indicando um pequeno déficit de heterozigotos. O valor médio de Fis foi menor que os valores já descritos para outros cactos autoincompatíveis, polinizados por insetos ou pássaros. Para *Pereskia gamacho*, polinizada por insetos, o valor de Fis foi 0,116 (Nassar et al., 2002). As espécies polinizadas por morcegos, tais como *Stenocereus griseus* (Fis = 0,145), *Cereus repandus* (Fis = 0,182), e *Pilosocereus laguginosus* (Fis=0,176), também apresentaram valores maiores. Para *Stenocereus gummosus*, polinado por mariposa, o valor de Fis foi de 0,672 (Clark-Tapia e Molina-Freaner, 2003). Os valores mais altos e positivos de Fis encontrados nos demais locos em análise (Quadro13) podem ser explicados pela ocorrência de eventos, tais como endocruzamentos biparentais dentro de populações relativamente pequenas e parcialmente isoladas, pela vantagem adaptativa de homozigotos, ou pela estrutura clonal das populações (Moraes et al., 2005).

A análise da divergência genética entre as amostras de mandacaru ($F_{st} = 0,4914$) foi muito alta (Quadro 13), de acordo com o índice ($F_{st} > 0,15$) estabelecido por Wright (1978). Na literatura, a diferenciação entre populações de cactos colunares está associada ao potencial dos vetores de dispersão de pólen (Hamrick et al. 2001). Um nível alto de diferenciação entre populações de *Lophocereus schottii* tem sido atribuído à limitada capacidade de dispersão do seu polinizador, a mariposa *Upiga virescens* (Fleming e Holland, 1998). A alta diversidade gênica e consequentemente o baixo grau de parentesco entre as amostras de mandacaru, analisadas no presente estudo, podem ter sido favorecidos pela grande distância geográfica que as separam (Figura 04) e também pela dificuldade em dispersão do pólen, que é realizada principalmente por insetos que não conseguem alcançar grandes distâncias.

O consumo e dispersão dos frutos realizados por pássaros e morcegos que podem percorrer longas distâncias podem ter contribuído para determinar um valor para o fluxo gênico ($N_m = 0,2588$), considerado dentro dos parâmetros intermediário ($0,25 < N_m < 0,99$), de acordo com Govindajaru (1989). Outros cactos colunares polinizados por vetores que apresentam grande potencial para dispersão de pólen

(morcegos e pássaros) exibem baixa diferenciação entre as populações (Hamrick et al., 2001). Segundo Young et al. (1994), a fragmentação das populações e sua ampla distribuição geográfica podem reduzir o tamanho populacional e aumentar a diferenciação entre populações por elevar a deriva genética e a endogamia e restringir o fluxo gênico entre elas.

Quadro 13 - Estimativa do tamanho da amostra (N), número de alelos observados (Na) e efetivos (Ne), coeficiente de endogamia (Fis), déficit de heterozigotos (Fit), proporção de diversidade gênica entre as amostras (Fst), fluxo gênico entre as amostras (Nm), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) nas 21 amostras de mandacaru

Locos	N	Na	Ne	Fis	Fit	Fst	Nm	Ho	He
<i>AaB6</i>	224	3,0000	2,5278	0,2242	0,5900	0,4715	0,2802	0,2500	0,6071
<i>mEgR78</i>	224	2,0000	1,9809	0,6268	0,7626	0,3639	0,4370	0,1161	0,4974
<i>Pchi47</i>	224	3,0000	2,2555	0,3109	0,6728	0,5252	0,2260	0,1696	0,5591
<i>Pchi21</i>	224	2,0000	1,4961	-0,5617	-0,2539	0,1971	1,0186	0,4196	0,3331
<i>AaD9</i>	224	3,0000	2,0398	0,5857	0,7897	0,4925	0,2576	0,0982	0,5121
<i>Pchi44</i>	224	2,0000	1,5077	1,0000	1,0000	0,9568	0,0113	0,0000	0,3382
<i>mAbR05-1</i>	224	4,0000	2,7838	-0,6721	0,3301	0,5994	0,1671	0,4107	0,6437
<i>mAbR05-2</i>	224	2,0000	1,3355	-0,7639	-0,1821	0,3298	0,5080	0,2946	0,2524
<i>mAbR86</i>	224	2,0000	1,9943	0,2004	0,7296	0,6618	0,1277	0,1429	0,5008
<i>Pchi5-1</i>	224	3,0000	2,5577	0,3700	0,7499	0,6030	0,1646	0,1429	0,6117
<i>Pchi5-2</i>	224	2,0000	1,9191	-0,3075	-0,2076	0,0764	3,0222	0,5804	0,4811
<i>mAbR28</i>	224	3,0000	2,1496	0,2601	0,6425	0,5169	0,2337	0,1875	0,5372
Média	224	2,5833	2,0456	0,0407	0,5121	0,4914	0,2588	0,2344	0,4895

A análise das frequências genotípicas também indica distorção na segregação para vários locos, pois a maioria das frequências dos alelos não apresenta uma distribuição de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Quadro 14). Ao comparar as heterozigosidades esperadas e observadas, fica claro que esses desvios foram causados pelo excesso de homozigotos, apontado também pelos índices de Fis e Fit. Os valores de Ho foram menores que os valores de heterozigosidades esperada, o que comprova mais uma vez o excesso de homozigotos nas populações estudadas. O desvio das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg pode ser devido a vários fatores evolutivos, como deriva genética, seleção, cruzamentos entre parentes, efeito de Wahlund (redução da heterozigosidade devido à população estar estruturada em subpopulações) e a presença de alelos nulos (Hamrick, 1982). Nas amostras de mandacaru analisadas,

tal fato pode ser reflexo da forma de multiplicação vegetativa (seleção artificial) e efeito do fundador.

As frequências genóticas nos locos *AaB6* (amostras PR 3, PR 4, PR 5, PR 7, PR 8, PI 2, PI 4, MS 1 e MS 3), *mEgR78* (amostras PR 1, PR 2, PR 5, PI 2 PI 5, MS 4 e MS 5), *Pchi47* (amostras PR 2, PR 3, PR 5, MS 2, MS 3, MS 4), *Pchi21* (amostras SP 1, BA, PR 1, PR 2, PI 1, PI 2, PI 3, PI 4, PI 5, MS 4 e MS 5), *AaD9* (amostras PR 4, PR 8, PI 2, PI 4, PI 5 e MS 2), *mAbR05-1* (amostra SP 1, PR 2, PR 4, PR 6, PI 3 e PI 5), *mAbR05-2* (amostras SP 1, PR 1, PR 2, PR 8 e MS 5), *mAbR86* (amostras SP 1, SP 2, PR 3, PR 5, PR 6, PR 7, MS 3 e MS 4), *Pchi5-1* (amostras PI 4, MS 2 e MS 3), *Pchi5-2* (amostras SP 1, SP 2, PR 1, PR 2, PR 3, PR 4, PR 5, PR 6, PR 7, PR 8, cPI 1, PI 2, PI 3, MS 1, MS 2 e MS 5), *mAbR28* (amostra PR 7) ainda atendem às expectativas de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Quadro 14).

As amostras de mandacaru apresentaram valores de identidade variando de 0,2249 (entre as plântulas das amostras PR 4 e MS 1) à 0,9749 (entre as plântulas das amostras PI 4 e PI 5). Entre as plântulas originadas de sementes do Pantanal foram encontrados altos valores de similaridade genética variando de 0,7445 (amostras MS 1 e MS 2) a 0,9554 (amostras MS 2 e MS 3) demonstrando assim a similaridade entre as amostras do Pantanal. As amostras PI 4 e PI 5 que apresentaram os maiores valores de similaridade genética são provenientes da mesma região, Teresina-Piauí, enquanto as amostras mais distantes são de regiões diferentes, Maringá (PR) e Teresina (PI) (Quadro 15, Figura 8).

O agrupamento apresentado no dendrograma da Figura 8 mostra a formação de três grandes grupos. As amostras SP 1 e SP 2 provenientes de diferentes regiões do estado de São Paulo encontram-se em grupos distintos. A amostra da Bahia (BA) está isolada, porém mais próxima das amostras PR 4 e PI 1, provenientes da região de Maringá e Picos, respectivamente. As amostras de mandacaru originadas de diferentes localidades da cidade de Maringá, encontram-se próximas. A determinação das relações de similaridade e diversidade entre as amostras é importante para conhecer os genótipos de cada uma delas no sentido de orientar o manejo destas, quer para organizar reservas de biodiversidade para a espécie selecionando sementes dos locais que apresentaram maior polimorfismo, quer para programar cruzamentos entre exemplares geneticamente mais distantes, e principalmente, para ilustrar o amplo intervalo de diversidade (de 0,2249 a 0,9749) encontrado na espécie.

Quadro 14 - Teste do χ^2 -quadrado para verificar o equilíbrio de Hardy–Weinberg para os doze locos de microssatélites analisados nas 21 amostras de mandacaru

Locos	AaB6	mEgR78	Pchi47	Pchi21	AaD9	Pchi44	mAbR05-1	mAbR05-2	mAbR86	Pchi5-1	Pchi5-2	mAbR28
Amostras												
SP1	6,9154	11,2000	15,1272	1,9157*	15,1273	0,1300*	0,0000*	3,2102*	15,2941	0,0024*	15,2941
BA	5,3333	5,3333	0,0000*	5,3333	5,3333
PR1	2,2857*	0,1428*	4,0000	0,1428*	9,1429	0,1428*	4,0000
PR2	0,4000*	1,6000*	0,0000*	11,2000	1,600*	1,6000*	9,1429	0,0400*	7,0000
PR3	0,4000*	6,4000	0,5714*	6,4000	4,0000	0,4000*	0,5714*	13,0000
PR4	0,0000*	9,1429	0,4000*	0,1428*	6,4000	2,2857*
PR5	0,4000*	0,0000*	0,0000*	4,0000	0,1428*	0,4000*	9,1429
PR6	13,000	6,4000	9,1429	1,600*	1,6000*	0,1428*	4,0000
PR7	0,1428*	9,1429	4,0000	0,0000*	6,4000	2,5600*	2,2000*
PR8	0,0000*	9,1429	9,1429	2,2857*	4,0000	1,6000*	1,6000*	6,4000
SP2	9,1429	9,1429	4,0000	2,2857*	9,1429	0,4000*	6,4000
PI 1	4,0000	0,1428*	9,1429	9,1429	0,1428*
PI 2	2,8000*	0,4000*	0,5714*	2,2857*	0,5714*	6,4000
PI 3	6,4000	0,5714*	9,1429	0,0000*	6,4000	1,6000*
PI 4	1,6000*	6,4000	0,1428*	0,1428*	1,6000*
PI 5	0,0400*	9,1429	0,1428*	0,4000*	0,0000*	4,0000
MS1	2,2857*	7,0000	4,0000	4,0000	0,5714*
MS2	9,1429	0,5714*	4,0000	0,1428*	4,0000	0,5714*	1,6000*
MS3	2,2857*	9,1429	2,5600*	4,0000	9,1429	4,0000	0,1428*	1,6000*	4,0000
MS4	0,4000*	0,0000*	1,6000*	4,0000	0,0000*	4,0000	4,0000
MS5	6,4000	2,2857*	9,1429	1,6000*	9,1429	9,1429	0,1428*	5,5000	1,6000*

*Loco em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Após a análise e comparando todas as amostras coletadas nas diferentes regiões do Brasil (Sul, Sudeste, Centro Oeste, e Nordeste), o F_{st} obtido foi de 0,2634, indicando também uma alta diferenciação para as amostras (Figura 9). Podemos observar a formação de 2 grupos. No primeiro, foram agrupadas as amostras das regiões Sul, Sudeste e Nordeste; no segundo grupo, estão as amostras coletadas na região Centro Oeste (Quadro 16). A similaridade entre as amostras das regiões Sudeste e Sul foi de 0,9277, sugerindo que as amostras destas duas regiões podem ser a mesma espécie. Para as amostras coletadas nas regiões Nordeste e Sudeste e Nordeste e Sul, a similaridade foi de 0,8258 e 0,8839, respectivamente, e também podemos sugerir que as amostras coletadas nas regiões Nordeste e Sul pertençam à mesma espécie. As amostras coletadas na região Centro Oeste apresentaram, respectivamente, similaridades de 0,6034, 0,5615 e 0,5646 com as amostras coletadas nas regiões Sudeste, Sul e Nordeste.

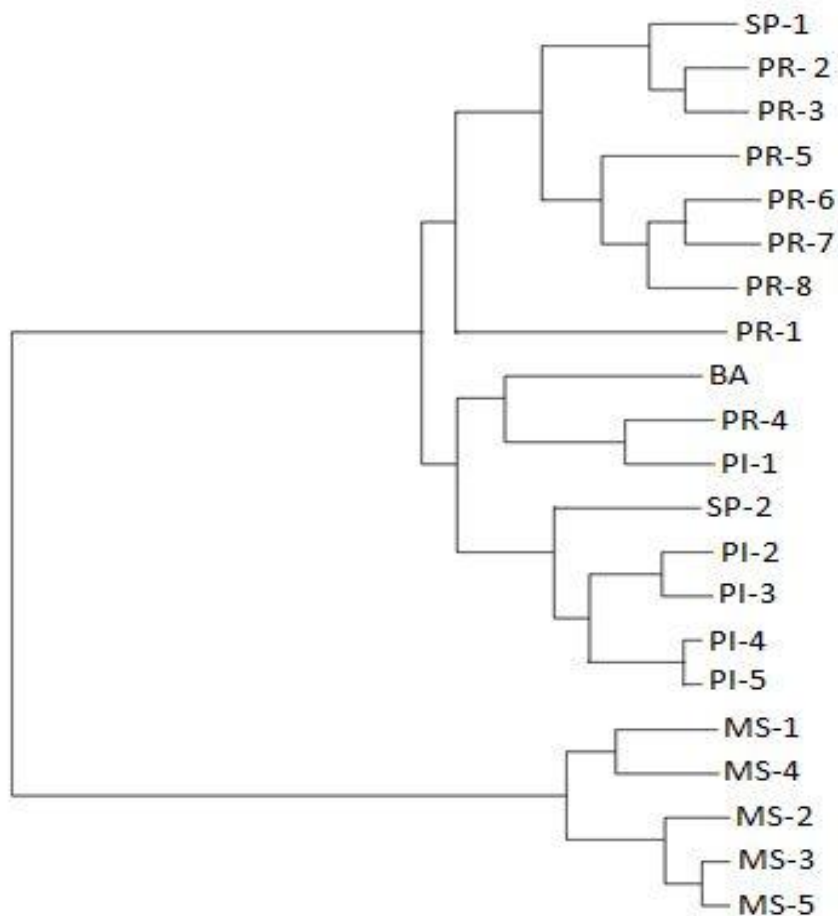


Figura 8 - Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), entre as 21 amostras de mandacaru. O agrupamento foi realizado por meio do método UPGMA, empregando o programa POPGENE 1.32 (Yeh, et al., 1999).

Quadro 15 - Coeficiente de similaridade e distância de Nei entre as 21 amostras de mandacaru

Amostras	SP1	BA	PR1	PR2	PR3	PR4	PR5	PR6	PR7	PR8	SP2	PI 1	PI 2	PI 3	PI 4	PI 5	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5
SP 1	****	0,71	0,82	0,92	0,89	0,75	0,76	0,82	0,86	0,85	0,78	0,70	0,78	0,73	0,69	0,65	0,50	0,52	0,55	0,59	0,60
BA	0,35	****	0,79	0,79	0,78	0,85	0,72	0,81	0,78	0,83	0,69	0,77	0,72	0,68	0,77	0,76	0,35	0,37	0,38	0,37	0,42
PR 1	0,20	0,24	****	0,71	0,69	0,65	0,65	0,80	0,83	0,79	0,68	0,63	0,67	0,62	0,72	0,70	0,41	0,33	0,37	0,38	0,43
PR 2	0,08	0,24	0,34	****	0,93	0,79	0,74	0,78	0,83	0,91	0,74	0,70	0,75	0,71	0,65	0,62	0,50	0,48	0,52	0,61	0,50
PR 3	0,12	0,25	0,37	0,07	****	0,83	0,76	0,86	0,85	0,81	0,92	0,84	0,89	0,81	0,75	0,73	0,49	0,46	0,53	0,54	0,61
PR 4	0,29	0,16	0,43	0,24	0,19	****	0,71	0,76	0,72	0,74	0,69	0,91	0,87	0,81	0,73	0,73	0,22	0,49	0,41	0,36	0,50
PR 5	0,27	0,33	0,42	0,31	0,28	0,34	****	0,91	0,83	0,86	0,72	0,73	0,66	0,72	0,73	0,73	0,48	0,53	0,50	0,58	0,64
PR 6	0,20	0,21	0,22	0,25	0,15	0,27	0,09	****	0,91	0,90	0,82	0,81	0,76	0,77	0,82	0,78	0,46	0,48	0,47	0,49	0,60
PR 7	0,15	0,25	0,18	0,18	0,16	0,33	0,19	0,09	****	0,91	0,78	0,80	0,79	0,81	0,79	0,72	0,50	0,44	0,44	0,53	0,54
PR 8	0,17	0,19	0,24	0,09	0,22	0,30	0,15	0,10	0,10	****	0,69	0,69	0,70	0,76	0,78	0,73	0,51	0,54	0,51	0,61	0,53
SP 2	0,24	0,37	0,38	0,30	0,08	0,37	0,33	0,20	0,24	0,37	****	0,80	0,88	0,83	0,85	0,85	0,57	0,43	0,57	0,49	0,71
PI 1	0,36	0,26	0,47	0,36	0,17	0,09	0,31	0,21	0,22	0,37	0,23	****	0,94	0,88	0,79	0,77	0,31	0,46	0,41	0,36	0,56
PI 2	0,25	0,33	0,41	0,28	0,12	0,14	0,41	0,27	0,24	0,36	0,13	0,06	****	0,94	0,86	0,82	0,43	0,53	0,54	0,48	0,67
PI 3	0,32	0,39	0,48	0,34	0,21	0,21	0,33	0,26	0,21	0,27	0,19	0,13	0,06	****	0,93	0,91	0,45	0,60	0,56	0,49	0,69
PI 4	0,38	0,27	0,33	0,44	0,29	0,31	0,32	0,20	0,24	0,25	0,16	0,24	0,15	0,07	****	0,97	0,51	0,56	0,59	0,47	0,71
PI 5	0,43	0,28	0,36	0,48	0,32	0,31	0,31	0,25	0,32	0,31	0,16	0,26	0,20	0,10	0,03	****	0,47	0,53	0,56	0,41	0,70
MS 1	0,70	1,04	0,89	0,69	0,71	1,49	0,73	0,77	0,70	0,67	0,56	1,18	0,85	0,79	0,68	0,75	****	0,74	0,89	0,89	0,82
MS 2	0,66	1,00	1,11	0,72	0,78	0,70	0,63	0,74	0,81	0,61	0,84	0,78	0,63	0,52	0,58	0,64	0,30	****	0,96	0,88	0,91
MS 3	0,59	0,96	0,99	0,66	0,64	0,89	0,69	0,75	0,81	0,68	0,56	0,88	0,61	0,58	0,53	0,58	0,12	0,05	****	0,92	0,97
MS 4	0,53	0,98	0,96	0,49	0,62	1,01	0,54	0,70	0,63	0,49	0,71	1,02	0,73	0,71	0,76	0,88	0,11	0,12	0,08	****	0,86
MS 5	0,51	0,88	0,84	0,70	0,50	0,70	0,44	0,51	0,62	0,63	0,34	0,58	0,40	0,37	0,34	0,36	0,20	0,09	0,04	0,15	****

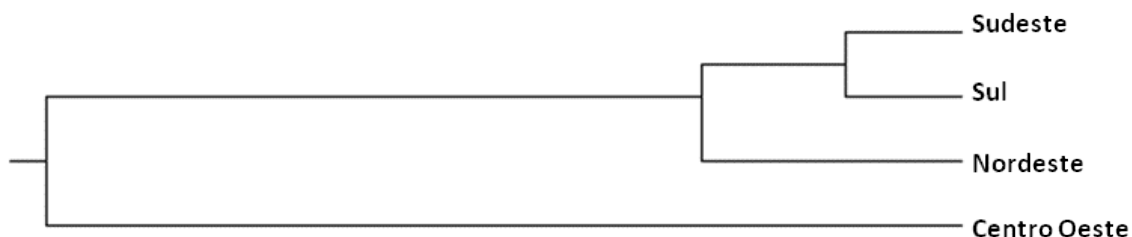


Figura 9 - Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), calculada entre as amostras de mandacaru coletadas nas regiões Sul, Sudeste, Centro Oeste e Nordeste. O agrupamento foi realizado por meio do método UPGMA, empregando o programa POPGENE 1.32 (Yeh, et al., 1999).

Quadro 16 - Coeficiente de similaridade e distância de Nei entre as amostras de mandacaru coletadas nas quatro diferentes regiões

Amostras	Sudeste	Sul	Nordeste	Centro-Oeste
Sudeste	****	0,9277	0,8258	0,6034
Sul	0,0751	****	0,8839	0,5615
Nordeste	0,1914	0,1234	****	0,5646
Centro Oeste	0,5052	0,5772	0,5717	****

A análise dos dados realizada no programa GenAlEx 6.5 mostrou a porcentagem de variância molecular dentro e entre as amostras de mandacaru (Quadro 17). As porcentagens de variação entre as 21 amostras de mandacaru foi de 55%, maior que a observada dentro das populações que foi de 45%.

Quadro 17 - Análise da variância molecular (AMOVA), valores de grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), variância e porcentagem de variância molecular dentro e entre as amostras de mandacaru

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	%
Entre as Amostras	20	617,747	30,887	55%
Dentro das Amostras	91	377,119	4,144	45%
Total	111	994,866		100%

As relações genéticas entre os genótipos individuais por meio de um agrupamento bayesiano implementado pelo programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) também foram exploradas neste trabalho. Para cada uma das 3 mil corridas, foram realizadas 30.000 repetições e o grupo mais apropriado foi selecionado por meio do método proposto por Evanno et al. (2005), que sugeriram um valor ideal de aglomerados para o conjunto de todas as populações com um delta k = 10,715448. Este valor de delta k sugere a formação de 3 grupos (K=3) (Figura 10), ou seja, todas as 21 amostras utilizadas nesta análise foram agrupadas em 3 grupos. Os valores de Fst médio para os três grupos formados foram de 0,5490 para o grupo 1; 0,2835 para o grupo 2 e 0,221 para o grupo 3. Estes valores mostram que as plântulas em cada grupo são altamente diferenciadas.

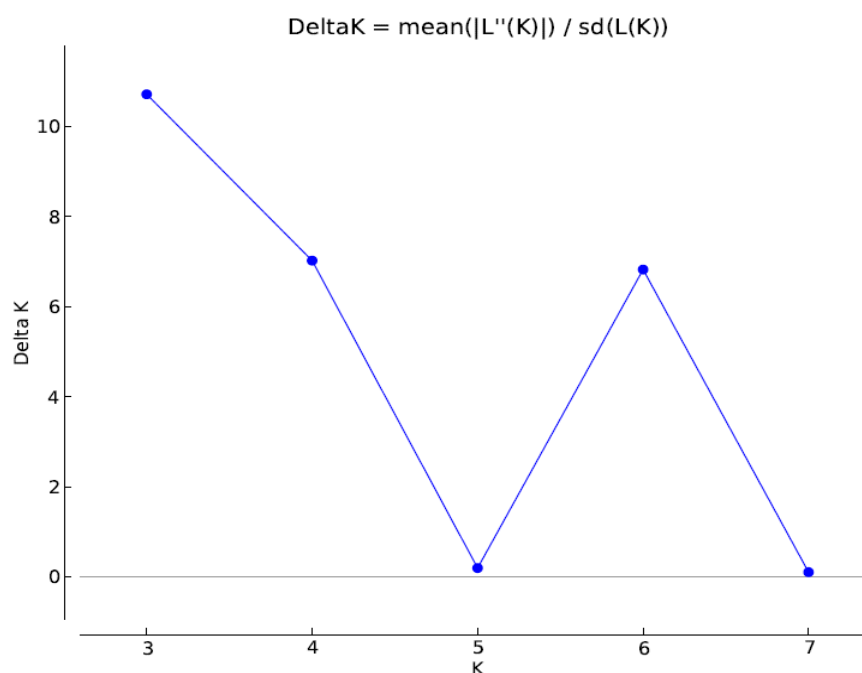


Figura 10 - Análise do delta K sugerindo a formação de 3 grupos.

A análise do *bar plot* (Figura 11) indica a divisão das amostras, de acordo com suas relações genéticas. As amostras MS 1, MS 2, MS 3, MS 4 e MS 5 encontram-se juntas e pertencem a um só grupo na cor vermelha (grupo 1). As demais amostras se encontram mescladas nos dois outros grupos nas cores verde e azul (grupo 2 e 3 respectivamente). As amostras SP 1, PR 5 e PI 3, apesar de apresentarem divididas entre os dois grupos, 2 e 3, foram consideradas pertencentes ao grupo 2, onde se encontram as maiores proporções de plântulas (Quadro 18). As amostras BA, PR 3, PR 4, PI 1, PI 2 se encontram agrupadas no

grupo 2, enquanto as demais amostras (PR 1, PR 2, PR 6, PR 7, PR 8, SP 2, PI 4 e PI 5) pertencem ao grupo 3. A árvore que representa a distância genética entre os três grupos (Figura 12) mostra uma grande distância do grupo 1, representado pelas amostras de sementes coletadas no Pantanal.

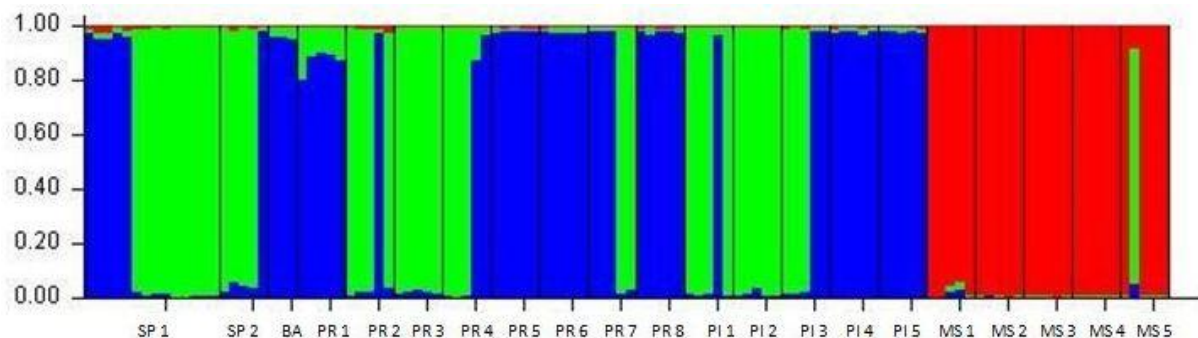


Figura 11 - *Bar plot* das 21 amostras agrupadas em 3 grupos. Grupo 1 (vermelho), grupo 2 (verde) e grupo 3 (azul).

Quadro 18 - Número de amostras, proporção de plântulas distribuídas em cada grupo e número de plântulas em cada amostra

Amostras	Grupos			Número de plântulas (*)
	1	2	3	
SP 1	0,010	0,638	0,353	14(*)
SP2	0,009	0,761	0,230	5
PR 1	0,003	0,121	0,876	5
PR 2	0,011	0,774	0,215	5
PR 3	0,004	0,971	0,025	5
PR 4	0,003	0,622	0,374	5
PR 5	0,008	0,011	0,981	5
PR 6	0,004	0,019	0,976	5
PR 7	0,003	0,397	0,600	5
PR 8	0,007	0,017	0,976	5
BA	0,003	0,039	0,958	3
PI 1	0,003	0,793	0,204	5
PI 2	0,005	0,978	0,017	5
PI 3	0,006	0,590	0,404	5
PI 4	0,007	0,016	0,977	5
PI 5	0,007	0,015	0,978	5
MS 1	0,974	0,011	0,014	5
MS 2	0,990	0,004	0,006	5
MS 3	0,991	0,005	0,004	5
MS 4	0,991	0,005	0,004	5
MS 5	0,809	0,177	0,014	5

(*) caules de plantas adultas.

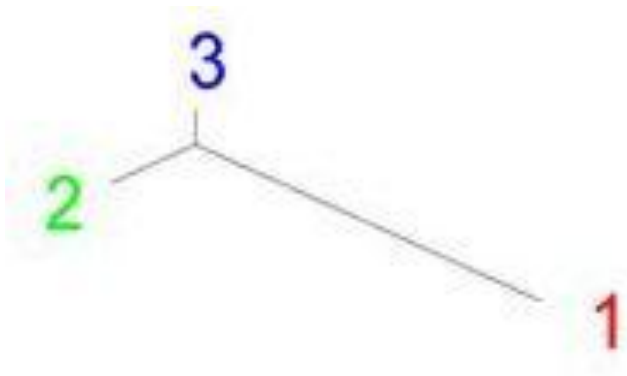


Figura 12 - Árvore que representa a distância genética entre os três grupos formados por meio de um agrupamento bayesiano.

O baixo valor obtido para o teste de mantel $r^2=0,06$, realizado com o programa GenAlEx 6.5, foi obtido comparando a matriz de distância genética e a de distância geográfica. O resultado obtido mostra que a diferenciação encontrada para as 21 amostras não está relacionada com a distância geográfica que separa as mesmas, sugerindo que esta diferenciação possa estar associada com processo de especiação ou com a avaliação de diferentes espécies do gênero *Cereus* presentes nas diferentes regiões do Brasil (Sul, Sudeste, Centro Oeste, e Nordeste). Esta indicação sustenta a hipótese de que as plantas de mandacaru distribuídas nas quatro regiões do Brasil correspondem a espécies diferentes do gênero *Cereus*. Na região nordeste, a espécie tem sido denominada de *Cereus jamacaru* De Candolle, na região sul de *Cereus repandus* Miller (= *C. peruvianus* Mill.); na região sudeste do Brasil; as plantas de mandacaru são denominadas *Cereus hildmannianus* K. Schumann e, na região do pantanal, *Cereus kroenleinii*. A ocorrência de espécies diferentes de mandacaru nestas quatro regiões do Brasil pode ser sustentada pela baixa identidade entre as plantas das diferentes regiões e pelo alto valor de F_{st} (0,4914) obtido no presente estudo.

5. CONCLUSÕES

a) Os melhores *primers* para amplificar e estudar o genoma de mandacaru no presente trabalho foram os *Pchi5* e *mAbR05*, que amplificaram 2 locos com 5 e 6 alelos, respectivamente. Estes marcadores poderão ser utilizados em trabalhos posteriores.

b) As amostras mais polimórficas foram as coletadas na região, no município de Torre de Pedra-SP. Para esta população, foi observado que 91,67% dos locos são polimórficos. As plantas desta região podem ser recomendadas para a formação de populações utilizadas em conservação *in situ* e para a extração de sementes que compoem bancos de germoplasma.

c) As amostras PR 2, PR 3, PR 6, MS 2, MS 3 e MS 4 foram as que apresentaram a maior heterozigosidade média observada, sendo as indicadas para compor os programas de melhoramento. Estas amostras são também as mais indicadas para a extração de linhagens.

d) As amostras de mandacaru analisadas no presente trabalho estão geneticamente estruturadas, sugerindo a ocorrência de espécies diferentes para as regiões Centro Oeste, Sudeste e Nordeste do Brasil.

e) Podemos sugerir que as amostras coletadas nas regiões Sul e Sudeste são parte de uma mesma espécie de mandacaru.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWALL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, 27:617–631, 2008.
- AKKAYA, M.S.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into soybean linkage map. **Crop Science**, 35: 1439-1445, 1995.
- ALBERT, S.; SCHMITZ, J. Characterization of major royal jelly protein-like DNA sequences in *Apis dorsata*. **Journal of Apicultural Research**, 41:75-85, 2002.
- 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.
- 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. **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* - estrutural features and potential uses. **Biochemistry and Biotechnology**, 34/35:283-295, 1992.
- ALVES, R.M. **Caracterização genética de populações de cupuazeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos**. Piracicaba: Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, 2002. 146p. Tese (Doutorado em Genética).
- ALZATE-MARIN, A.L.; GUIDUGLI, M.C.; FERES, J.M.; CANAS, M.C.T.; PIMENTEL, A.L.; CIAMPI, A.Y.; SILVA, A.J.; MESTRINER, M.A. Análises alélicas visando conservação *in situ* da espécie florestal *Hymenaea courbaril* no Noroeste de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 52. Foz do Iguaçu, 2006. **Resumos...** Foz do Iguaçu: SBG, 2006. Disponível em CD-ROM.
- ANDERSON, E.F. **The cactus family**. Oregon: Timber Press, 2001. 776p.

ANDRADE-LIMA, D. Cactaceae de Pernambuco. In: XI CONGRESSO INTERNACIONAL DE PASTAGENS. São Paulo, 1996. **Resumos...** São Paulo: SESI/SENAI, 1996. p. 1453-1458,1966.

ARAKAKI, M.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; SPERANZA, P.R. Characterization of polymorphic microsatellite locos In *Haageocereus* (Trichocereae, Cactaceae). **American Journal of Botany**, 17-19, 2010.

ARECES, A. SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, W.D.; HEALD, S.V. Cactaceae. In: MITH, S.A.; MORI, A.; HENDERSON, W.D.; STEVENSON, S.V. (eds.). **Heald flowering plants of the neotropics**. Oxford: Princeton and Oxford University Press, 2004. p. 73-76.

AUTRIQUE, E.; NACHIT, M.M.; MONNEVEUX, P.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphological traits and coefficient of parentage. **Crop Science**, 36:735-742, 1996.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, M.F.C.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, 16:3759-3767, 2007.

BARBOSA, M.; MAYO, S.; CASTRO, A.; FREITAS, G.; PEREIRA, M.; NETO, P.; MOREIRA, H. Checklist preliminar das angiospermas. In: SAMPAIO, E.; MAYO, S.; BARBOSA, M. (eds.). **Pesquisa botânica nordestina: Progresso e perspectivas**. Recife: Pesquisa SBB, 1996. p. 253-415.

BARRENECHE, T.; CASASOLI, M.; RUSSEL, K.; AKKAK, A.; MEDDOUR, H.; PLOMION, C.; VILLANI, F.; KREMER, A. Comparative mapping between *Quercus* and *Castanea* using simple-sequence repeats (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, 108:558-566, 2004.

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

BARROSO, G.; GUIMARÃES, E.; ICHASO, C.; COSTA, C.; PEIXOTO, A. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. São Paulo: Edusp, 1978. 309p.

BARTHLOTT, W.; HUNT, D.R. Cactaceae. In: KUBITZKI, K. (ed.). **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p. 161-197.

- BELL, C.J.; ECKER, J.R. Assignment of 30 microsatellite locos to the linkage map of *Arabidopsis*. **Genomics**, 19:137-144. 1994.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2005. 525p.
- BRITTON, N.L.; ROSE, J.N. **The Cactaceae**. Washington: Carnegie Institute, 1919. 491p.
- BRITTON, N.L.; ROSE, J.N. **The Cactaceae. Descriptions and illustrations of plants of the cactus family**. Washington: Carnegie Institute of Washington, 1937. 248p.
- BRITTON, N.L.; ROSE, J.N. **The Cactaceae: description and illustrations of plants of the cactus family**. New York: Dover, 1963. 264p.
- BRONDANI, R.P.V.; GAIOTO, F.A.; MISSIAGGIA, A.A.; GRIBEL, R.; GRATTATAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), na endangered tree species of the amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, 3:177-179, 2003.
- BUTTERWORTH, A.C. Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellite *loci* in *Coryphantha robustispina* ssp. *robustispina*. **Conservation Genetics Resour** 3:247–249, 2010.
- CAMPBELL, K.; DONLAN, C.J. Feral goat eradications on islands. **Conservation Biology**, 19:1362–1374, 2005.
- CARUSO, M.; CURRÒ, S.; LAS CASAS, G.; LA MALFA, S.; GENTILE, A. Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus indica* cultivated genotypes and their relation with related species. **Plant Systematics and Evoution**, 290:85-97, 2010.
- CARVALHO, G.R.; PITCHER, T.J. **Molecular genetics in fisheries**. London: Chapman & Hall, 1995. 399p.
- CARVALHO, V.M.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Seed germination of the *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) somaclones follows a relatively simple protocol. **Seed Science and Technology**, 36:595-560, 2008.

- CASAS, A.; CRUSE, J.; MORALES, E.; OTERO-ARNAIZ, A.; VALIENTE-BANUET, A. Maintenance of phenotypic and genotypic diversity of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) by indigenous peoples in Central México. **Biodiversity and Conservation**, 15:879-898, 2006.
- CAVALCANTI, N.B.; RESENDE, G.M. Consumo do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.) por caprinos na época da seca no semi-árido de Pernambuco. **Caatinga**, 19:402-408, 2006.
- CIAMP, A.Y.; AZEVEDO, V.C.R.; GAIOTTO, F.A.; RAMOS, A.C.S.; LOVATO, M.B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, 8:1074-1077, 2008.
- CIAMP, A.Y.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. **Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorfii* Desf. (Copaiba) Leguminosae-Caesalpinioideae**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 40p.
- CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W.G.; MARAZZO, M.T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in Prunu. **Theoretical and Applied Genetics**, 99:65-72, 1999.
- CLARK-TAPIA, R.; CORRADO, C.A.; MANDUJANO, M.C.; MOLINA-FREANER, F. Reproductive consequences of clonal growth in *Stenocereus eruca*, a rare clonal cactus of the Sonoran desert. **Evolutionary Ecology**, 20:131-142, 2006.
- CLARK-TAPIA, R.; MOLINA-FREANER, F. The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. **Heredity**, 90:443-450, 2003.
- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, 83:748-756, 1999.

- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, 10:349-356, 2001.
- CONDE, L. Anatomical comparisons of five species of *Opuntia* (Cactaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 62:425-473, 1975.
- CORDEIRO, G.M.; CASU, R.; MCINTYRE, C.L.; MANNERS, J.M.; HENR, R.J. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. **Plant Science**, 160:1115-1123, 2001.
- CREGAN, P.B.; JARKIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, 39:1464-1490, 1999.
- DAYANANDAN, S.; BAWA, K.S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminisae). **American Journal of Botany**, 84:1658-1663, 1997.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, 10:1585-1592, 1999.
- DECROOCQ, V.; FAVE, M.G.; HAGEN, L.; BORDENAVE, L.; DECROOCQ, S. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. **Theoretical and Applied Genetics**, 106: 912-922, 2003.
- DEMBITSKY, V.M.; REZANKA, T. Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. **Phytochemistry**, 42:1075-1080, 1996.
- DOF (Diário Oficial). **Norma oficial mexicana nom-059-ecol-2001**. México: Diário Oficial de La Federación, 06 de marzo de 2002.
- EKUÉ, M.R.M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. Transferability of Simple Sequence Repeat (SSR) markers developed in *Litchi chinensis* to *Blighia sapida* (Sapindaceae). **Plant Molecular Biology Reports**, 27:570-574, 2009.
- FARIA-TAVARES, J.S. **Estudo da variabilidade genética em acessos de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 55p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

FERES, J.M. **Estudos genéticos de progênies de *Hymenaea courbaril* conservadas no banco de germoplasma da floresta da USP/RP através do uso de marcadores SSR**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2006. 57p. Monografia (Especialização em Genética).

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

FERREIRA-RAMOS, R.; GUIDUGLI, M.C.; CANAS, M.C.T.; PIMENTEL, A.L.; SILVA, A.J.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. Transferibilidade de marcadores microssatélites heterólogos para eugenia uniflora, uma espécie arbórea ameaçada na região de Ribeirão Preto. In: 52 CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. **Resumos...** Foz do Iguaçu, 2006. Foz do Iguaçu: SBG, 2006. Disponível em CD-ROM.

FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P.R.; SANTOS, M.O.; MAYOR, M.S.; MESTRINER, M.A.; SOUZA, A.P.; ALZATE-MARIN, A.L. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, 9:1281-1285, 2008.

FIELD, D.; WILLS, C. Abundant microsatellite polymorphism in *S. cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in prokaryotes and eukaryotes, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 95:1647-52, 1998.

FIGUEIREDO, C.C.; RESCK, D.V.S.; CARNEIRO M.A.C. Labile and stable fractions of soil organic matter under management systems and native Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 34:907-916, 2010.

FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ, C.; MOORE, S.S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology & Evolution**, 12:432-440, 1995

FLEMING, T.H.; HOLLAND, J.N.; The evolution of obligate mutualisms: the sentia and senita moth. **Oecologia**, 114:368-378, 1998.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos da genética da conservação**. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008. 259p.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.

GAIOTTO, F.A. **Inferências sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. utilizando marcadores microssatélites**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001. 122p. Tese (Doutorado em Genética).

GAO, L.; TANG, J.; LI, H.; JIA, J. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. **Molecular Breeding**, 12:245-261, 2003.

GEBHARDT, C.; BLOMENDAHL, C.; SCHACHTSCHABEL, U.; DEBENER, T.; SALAMINI, F.; RITTER, E. Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum*, ssp. *tuberosum*) with RFLP fingerprints. **Theoretical and Applied Genetics**, 78:16-22, 1989.

GIBSON, A.C.; NOBEL, P. **The cactus primer**. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1986. 286p.

GIULIETTI, A.M.; PIRANI, J.R.; HARLEY, R.M. Espinhaço range region, eastern Brazil. Centres of plant diversity. A guide and strategy for their conservation, **The Americas**, 3: 397-404, 1997.

GOLA, G.; NEGRI, J.; CAPALLETTI, C. **Tratado de botânica**. Barcelona: Labor, 1965. 1160p.

GONELA, A. **Análise da estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais e respectivas progênes de *Copaifera langsdorffii* Desfontaines, utilizando marcadores microssatélites**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2005. 83p. Tese (Pós-Doutorado em Genética).

GONG, L.; STIFT, G.; KOFLER, R.; PACHNER, M.; LELLEY, T. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. **Theoretical Applied Genetics**, 117: 37-48, 2008.

GOVINDAJARU, R.D. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. **Journal of Evolutionary Biology**, 2:173-181, 1989.

GUIDUGLI, M.C. **Estudos de estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Hymenaea courbaril* L. utilizando marcadores moleculares SSR e**

RAPD. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2007. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências).

GUIDUGLI, M.C.; HILDEBRAND H.S.; CANAS, M.C.T.; PIMENTEL, A.L.; CIAMPI, A.Y.; MESTRINER, M.A.; SILVA, A.J.; ALZATE- MARIN, A.L. Diversidade genética de populações naturais da espécie florestal *Hymenaea courbaril* no Noroeste de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 52. Foz do Iguaçu, 2006. **Resumos...** Foz do Iguaçu: SBG, 2006. p. 1002. Disponível em CD-ROM.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 715-740.

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. Plant population genetic and evolution. **American journal of Botany**, 69:1685-1693, 1982.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (eds.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1989. p. 43-63.

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.

HEIL, K.D.; PORTER, J.M. *Sclerocactus*. In: HEIL, K.D.; PORTER, J.M. (eds.). **Magnoliophyta: Caryophyllidae**. New York: Oxford University Press, 2004. p. 197–207.

HELSEN, P.; VERDYCK, A.; DESENDER, K.; VAN HOUTTE, N.; VAN DONGEN, S. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in Galapagos prickly pear (*Opuntia*) cactus species. **Molecular Ecology Notes**, 7:454-456, 2007.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. From the Cover: Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy Sciences**, 103:11206-11210, 2006.

HOCHSTÄTTER, F. Nieubeschrijving *Sclerocactus wetlandicus* species nova-Een nieuwe *Sclerocactus* uit Uintah County, Utah, USA. **Succulenta**, 68:123–126, 1989.

[v1]HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. **Laboratory Protocols**: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. México: CIMMYT, 1994. 50p.

HU, J.; NAKATANI, M.; LALUSIN, A.G.; FUJIMURA, T. New microsatellite markers developed from reported *Ipomoea trifida* sequences and their application to sweetpotato and its related wild species. **Scientia Horticulturae**, 102:375-386, 2004.

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 Resources**, 8:1068–1070, 2008.

HUNT, D. **CITES Cactaceae checklist**. Zürich: Royal Botanic Gardens, 1999. 315p.

HUNT, D.; TAYLOR, N.P. The genera of Cactaceae - Progress toward consensus. **Bradleya**, 8:85-107, 1990.

HUNT, D.R.; TAYLOR, N.P.; CHARLES, G. **The new cactus lexicon**. Milborne Port: Dh books, (Text & Atlas, 2), 2006. 899p.

HUNTER, R.L.; MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, 125:1294-1295, 1957.

JACOB, H.J.; LINDPAINTER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, YI-PEI; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, 67:213-224, 1991

- 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.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, 316:76-79, 1985.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. **American orchid society Bulletin**, 14:214-217, 1946.
- KUN-SHENG, W.; TANKSLEY, S.D. Abundance, Polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular Genetics and Genomic**, 241:225-235, 1993.
- LEMES, M.R.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* king (Meleaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity**, 93:287-291, 2002.
- LEPSCH-CUNHA, N.; LUND, C.A.; HAMILTON, M.B.; Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in the tropical arboreal palm *Oenocarpus bacaba* (Ateaceae). **Molecular Ecology Notes**, 3:435-437, 2003.
- LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, 54:595- 609, 1966.
- LITT, M.; LUTTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genetics*, 44:398-401, 1989.
- LORIEUX, M.; NDJIONDJOP, M.N.; GHESQUIÈRE, A. A first interespecific *Oryza sativa* & *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, 100:593-601, 2000.
- 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. Malato dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissue and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 31:167-172, 1993.
- MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Effect of 5-aminouracil on callus tissue growth and Mdh genes expression in *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Cytologia**, 62:283-289, 1997.
- MANGOLIN, C.A.; OTTOBONI, L.M.M.; MACHADO, M.F.P.S. Two-dimensional 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 isozymes as markers at 2,4-D x kin combinations in callus and regenerated plants of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 32:191-200, 1994.
- MANGOLIN, C.A.; PRIOLI, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. Isozymes patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 32:237-247, 1994a.
- 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.
- MARQUEZ-LEMA, A.; VELASCO, L.; PEREZ-VICH, B. Transferability, amplification quality, and genome specificity of microsatellites in *Brassica carinata* and related species. **Journal Applied Genetics**, 51:123-13, 2010.
- MARTINS, K. **Diversidade genética e fluxo gênico via pólen e semente em populações de *Solanum lycocarpum* St. Hil Solanaceae no sudeste de Goiás**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. 143p. Tese (Doutorado em Genética).
- MAUSETH, J. Comparative anatomy of *Espositoa*, *Pseudoespositoa*, *Thrixanthocereus* and *Vatricania*. **Bradleya**, 17:27-37, 1999.

- MAUSETH, J. Comparative structure-function studies within a strongly dimorphic plant, *Melocactus inortus* (Cactaceae). **Bradleya**, 7:1-12, 1989.
- MAUSETH, J. Medulary bundles and the evolution of cacti. **American Journal of Botany**, 80:928-932, 1993b.
- MAUSETH, J. Water-storing and cavitation-preventing adaptations in wood of Cacti. **Annals of Botany**, 72:81-89, 1993a.
- MAUSETH, J.; PLEMONS-RODRIGUEZ, B. Evolution of extreme xeromorphic characteres in woody a study of nine evolutionary lines in Cactaceae. **American Journal of Botany**, 85:209-218, 1998.
- MAUSETH, J.; ROSS, R. Systematic anatomy of the primitive cereoid cactus *Leptocereus quadricostatus*. **Bradleya**, 6:49-64, 1988.
- MAUSETH, J.; SAJEVA, M. Cortical bundles in the persistent, photosynthetic stems of cacti. **Annals of Botany**, 70:317-324, 1992.
- MEDEIROS, A.C.B.; PEREIRA, R.W.; COLLEVATTI, R.G. Transferabilidade de primers microssatélites de *Tabebuia áurea* para outras espécies do gênero e desenvolvimento de sistema de genotipagem múltipléx. **Resumos...** In: 52 CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. Foz do Iguaçu, 2006. Foz do Iguaçu: SBG, 2006. 1420p. Disponível em CD-ROM.
- MELO, V.J.R. **Determinação de paternidade em pomares de sementes de *Eucalyptus* com marcadores microssatélites**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2000. 183p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).
- MILLACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998a. 141p.
- MIZRAHI, Y.; NERD, A. Climbing and columnar cacti: new arid fruit crops. In: JANICK, J. (ed.). **Perspectives on new crop and new uses**. Alexandria, Virginia: American Society of Horticultural Science, 1999. p. 1:358-366.
- MIZRAHI, Y.; NERD, A.; NOBEL, P.S. Cacti as crops. **Horticultural Research**, 18:292-320, 1997.

- MNEJJA, M.; GARCIA-MAS, J.; AUDERGON, J.M.; ARÚS, P. *Prunus* microsatellite marker transferability across rosaceous crops. **Tree Genetics & Genomes**, 6:689-700, 2010.
- MOORE, S.S.; SARGLANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL, J.S.; The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, 10:654-660, 1991.
- MORAES, E.M.; ABREU A.G.; ANDRADE, S.C.S.; SENE, F.M.; SOLFERINI, V.N. Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil. **Genetica**, 125:311-323, 2005.
- MORTON, J.F. Cactaceae, strawberry pear. In: MORTON, J.F. (ed.). **Fruits of warm climates**. Winterville: GRS Press, 1987. p. 347-348.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, 155:335-350, 1987.
- NASON, J.D.; HAMRICK, J.L.; FLEMING, T.H. Historical vicariance and post-glacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran desert cactus. **Evolution**, 56:2214-2226, 2002.
- NASSAR, J.M.; HAMRICK, J.L.; FLEMING, T.H. Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae]). **The American Genetic Association**, 93:193-200, 2002.
- NASSAR, J.M.; HAMRICK, J.L.; FLEMING, T.H. Genetic Variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). **Heredity**, 87:69-79, 2001.
- NASSAR, J.M.; HAMRICK, J.L.; FLEMING, T.H. Population genetic structure of Venezuelan chiropterophilous *Colummar cacti* (Cactacea). **American Journal of Botany**, 90:1628-1637, 2003.
- NASSI, F.L.; SANTOS, L.S.; TURCHETTO, A.C.; ZANANDREA, I.; RIBEIRO, M.V.; BRAGA, E.J.B.; BONOW, S.; PETERS, J.A. Transferibilidade de primers para análise de locos microssatélites (SSR) entre arroz e trigo. In: XIV CIC-CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. Pelotas, 2005. **Resumos...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005. p. 127. Disponível em CD-ROM.

- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National. **Academy of Sciences of the United States of America**, 70:3321-3323, 1973.
- NEI, M. Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. **Theoretical Population Biology**, 3:460-465, 1972.
- NERD, A.; RAVEH, E.; MIZRAHI, Y. Adaptation of five columnar cactus species to various conditions in the Negev Desert of Israel. **Economic Botany**, 47:304-311, 1993.
- 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.
- O'DONOUGHUE, L.S.; SOUZA, E.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphisms. **Crop Science**, 34:1251-1258, 1994.
- 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.
- OLUFOWOTE, J.O.; XU, Y.B.; CHEN, X.L.; PARK, W.D.; BEACHELL, H.M.; DILDAY, R.H.; GOTO, M.; MCCOUCH, S.R. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oriza sativa* L) using microsatellite and RFLP markers. **Genome**, 40:370-378, 1997.
- 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.
- OYAMA, K. Isolation, characterization and cross amplification of polymorphic microsatellite loci in the threatened endemic *Mammillaria crucigera* (Cactaceae). **Molecular Ecology Resources**, 9:156–158, 2009.

- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, 6:288-295, 2006
- PÉPIN, L.; AMIGUES, Y.; LÉPINGLE, A.; BERTHIER, J.L.; BENSAID, A.; VAIMAN, D. Sequence conservation of microsatellites between *Bos Taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use parentage testing and phylogeny analysis. **Heredity**, 74:53-61, 1995.
- PEREZ, M.F.; TÉO, M.F.; ZAPPI, D.C.; TAYLOR, N.P.; MORAES, E, M. Isolation, characterization, and cross-species amplification of polymorphic microsatellite markers for *Pilosocereus machrisii* (Cactaceae). **American Journal of Botany**, 98:204–206, 2011.
- PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: Eduem, 2009. 351p.
- PINTO, R.M.; GOMES, D.C.; NORONHA, D. Evaluation of coinfection with pinworms (*Aspicularis tetraptera*, *Dentostomella translucida*, and *Syphacia obvelata*) in gerbils and mice. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, 42:46-48, 2003.
- POLLEGIONI, P.; WOESTE, K.; MAJOR, A.; MUGNOZZA, G.S.; MALVOLTI, M.E. Characterization of *Juglans nigra* (L.), *Juglans regia* (L.) and *Juglans x intermedia* (Carr.) by SSR markers: a case study in Italy. **Silvae Genetica**, 58:68-78, 2009.
- PRADO, J.J.A.; VALE, V.S.; OLIVEIRA, A.; GUSSON, A.E.; DIAS NETO, O.C.; LOPES, S.F.; SCHIAVINI, I. Estrutura da comunidade arbórea em um fragmento de floresta estacional semidecidual localizada na reserva legal da Fazenda Irara, Uberlândia, MG. **Bioscience Journal**, 4:638-647, 2010.
- PRIMMER, C.R.; MOLLER, A.P.; ELLEGREN, H. A wide ranging survey of cross-species amplification in birds. **Molecular Ecology**, 5:365-378, 1996.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Interference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945-959, 2000.
- RAJWANT, K.K.; MANOJ, K.R.; SANJAY, K.; ROHTAS, S.A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, 177:309–334, 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, 2007. 46p. Tese (Doutorado em Biologia Celular).

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

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

ROA, A.C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M.C.; MAYA, M.M.; BONIERBALE, M.W.; IGLESIAS, C.; THOME, J. Cross-species amplification PF cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites; allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, 87:1647-1655, 2000.

ROCHA, E.; AGRA, M. Flora do Pico do Jabre, Paraíba, Brasil: Cactaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, 16:1521, 2002.

ROSSETTO, M.; HARRIS, F.C.L.; MCLAUCCHALA, A.; HENRY, R.J.; BAVERSTOCK, P.R.; LEE, L.S. Interspecific amplification of tea tree (*Melaleuca alternifolia*-Myrtaceae) microsatellite loci-potential implications for conservation studies. **Australian Journal Botany**, 48:367-373, 2000.

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.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of a DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239:487-491, 1988.

SAJEVA, M.; MAUSETH, J. Leaf-like structure in the photosynthetic, succulent stems of cacti. **Annals of Botany**, 68:405-411, 1991.

SALA, J.; MANGOLIN, C.A.; FRANZONI, J.; MACHADO, M.F.P.S. Esterase Polymorphism and the Analysis of Genetic Diversity and Structure in Cactus Populations Descended from *Cereus peruvianus* Plants Regenerated In Vitro. **Biochemical Genetics**, 49:270-282, 2011.

- SANTOS, K.L.; WETER, L.J.; DANTAS, A.C.M.; GUERRA, M.P.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODAR, R.O. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology**, 30:73-79, 2007.
- SCANDALIOS, J.G. Genes, isozymes and evolution. In: MARKERT, C.L. (ed.) **Isozymes IV**. Genetics and evolution. New York: Academic, 1975. p. 1-7.
- SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, 109:365-371, 2000.
- SCHWABE, A.L.; HUBBARD, A.R.; NEALE, J.R.; MCGLAUGHLIN, E.M. Microsatellite loci development for rare Colorado *Sclerocactus* (Cactaceae). **Conservation Genet Resour**, 5:69–72, 2013.
- SILVA, D.; ALVES, J. Anatomia dos órgãos vegetativos de espécies de *Pilosocereus Byles & Rowley* (Cactaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, 18:53-60, 1999.
- SILVA, W.R.; SAZIMA, M. Hawkmoth pollination in *Cereus peruvianus*, a columnar cactus from southeastern Brazil. **Flora**, 190:339-343, 1995.
- SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, 61:620-641, 1955.
- SOFFIATTI, P.; ANGYALOSSY, V. Stem anatomy of *Cipocereus* (Cactaceae). **Bradleya**, 21:39-48, 2003.
- SOLÓRZANO, S.; CORTÉS-PALOMEC, A.C.; IBARRA, A.; DÁVILA, P.; SORIANI, H.H. **Uso de marcadores SSR no estudo de diversidade genética de matrizes de *Copaifera lagsdorffii* vc. Progênies conservadas no banco de germoplasma da floresta da USP/RP**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2005. 42p. Monografia (Especialização em Genética).
- SOLÓRZANO, S.; CORTÉS-PALOMEC, A.C.; IBARRA, A.; DÁVILA, P.; OYAMA, K. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in the threatened endemic *Mammillaria crucigera* (Cactaceae). **Molecular Ecology Resources**, 156–158, 2009.

- SOUZA, S.A.C.D. **Avaliação da variabilidade genética em Musa spp utilizando marcadores microssatélites**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2002. 86p. Tese (Doutorado em Agronomia).
- STRAND, M.; PROLLA, T.; LISKAY, M.R.; PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, 365:274-276, 1993.
- TANG, D.Q.; LU, J.J.; FANG, W.; ZHANG, S.; ZHOU, M.B. Development, characterization and utilization of genbank microsatellite markers in *Phyllostachys pubescens* and related species. **Molecular Breeding**, 25:299-311, 2010.
- TAYLOR, N.P. **Taxonomy and phytogeography of the Cactaceae of eastern Brazil**. England: The open university and Royal Botanic Gardens, Kew. 2000. 78p. PhD thesis.
- 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.
- THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequenced-tagged sites (STSs). **Theoretical Applied Genetics**, 86:985-990, 1993.
- TORQUATO, E.F.B.; PRIOLI, A.J.; MACHADO, M.F.P.S. Differential alcohol dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme expression in long-term callus tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 33:389-399, 1995.
- TOTH, Z.; SZUNYOGH, I.; MAJUMDAR, S.; MORSS, R.; ETHELTON, B.; BISHOP, C.; LORD, S. Targeted observations at NCEP: Toward an operational implementation. In: FOURTH SYMPOSIUM ON INTEGRATED OBSERVING SYSTEMS. **Proceedings...** California: Applied Molecular Service, 2000. p. 186–193.
- VARSHNEY, R.K.; GRANER, A; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, 23:48-55, 2005.
- VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.; LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991. 123p.

- VRIES, J.X.; MOYNA, P.; DIAZ, V. Alkaloides cactus Uruguay. **Revista Latinoamericana de Química**, 3:21-23, 1971.
- WALDSCHMIDT, A.M.; MARCO-JUNIOR, P.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. **Brazilian journal of Biology**, 62:923-928, 2002.
- WALLACE, R.S.; GIBSON, A.C. Evolution and systematics. In: PARK S. **Cacti: biology and uses**. California, EUA: Ed. University of California Press, 2002. 280p.
- WEBER, J.L.; MAY, P.E. An abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **The American Journal Human Genetics**, 44:388-396, 1989.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.G. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. **Molecular Ecology Notes**, 6:156-159, 2005.
- WEISS, J.; NERD, A.; MIZRAHI, Y. Development of *Cereus peruvianus* (apple cactus) as a new crop for the Negev desert of Israel. **New crops**, 471-486, 1993.
- WEISS, J.; NERD, A.; MIZRAHI, Y. flowering and pollination requirements in *Cereus peruvianus* cultivated in Israel. **Israel Journal of Plant Sciences**, 42:149-158, 1994.
- WHITE, G.; POWELL, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. **Molecular Ecology**, 6:1195-1197, 1997.
- WILLIAM, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18: 6531-6535, 1990.
- WRIGHT, S. Variability within and among populations. In: **Evolution and the genetics of population**. Chicago: University of Chicago Press, 79-103, 1978.
- WU, K.S.; TANSKLEY, D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular & General Genetics**, 241:225-235, 1993.
- YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SAWAMURA, Y.; KOTOBUKI, K.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:865-870, 2001.

- YANG, G.P.; MAROOF, M.A.S.; XU, C.G.; ZHANG, Q.F.; BIYASHEV, R.M. Comparative-analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. **Molecular & General Genetics**, 245:187-194, 1994.
- YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999. 29p.
- YILDIRIM, A.; KANDEMIR, N.; SONMEZOGLU, O.A.; GULEÇ, T.E. Transferability of microsatellite markers among cool season cereals. **Biotechnology & Biotechnology Equipment**, 23:1299-1302, 2009.
- YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, 11:413-418, 1996.
- ZAPPI, D. *Pilosocereus* (Cactaceae) - The genus in Brazil. **Royal Botanic Gardens, Kew**, 3:1-160, 1994.
- ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; SILVA, R. B.; MACHADO, M.; MORAES, E. M.; CALVENTE, A.; CRUZ, B.; CORREIA, D.; LAROCCA, J.; ASSIS, J. G.; AONA, L.; MENEZES, M. O. T.; MEIADO, M.; MARCHI, M. N.; SANTOS, M. R.; BELLINTANI, M.; COELHO, P.; NAHOUM, P.I.; RESENDE, S. **Plano de ação nacional para a conservação das cactáceas**. Brasília, DF: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011. 168p. (Série Espécies Ameaçadas nº 24).
- ZUCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2002. 130p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- ZUCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; BRONDANI, C.; VENCOSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, 3:512-513, 2002.

ANEXOS

Quadro 1 - Marcadores microssatélites desenvolvidos para diferentes espécies de cactáceas.

Locus	Sequência do Primer (5'-3')	Espécie	Autores
<i>Pchi5</i> AY147840	F: CAAGAAAAGGAAGCCCACA R: GGTGCCATATCCCCTGTGTA	<i>Polaskia chichipe</i>	Otero-Arnaiz et al., 2004
<i>Pchi9</i> AY147838	F: GTGGCCGAGAAAGAAGTTTG R: AAAGGCCCAAATCATAAGCA	<i>Polaskia chichipe</i>	Otero-Arnaiz et al., 2004
<i>Pchi21</i> AY147837	F: CGTTTAGCCCCTCTTTCTCC R: GTTCCCAACTGACCGACAAC	<i>Polaskia chichipe</i>	Otero-Arnaiz et al., 2004
<i>Pchi25</i> AY147836	F: GCCCTTCTAAGGCCATTCT R: ATTCCGTGTCAAGATTGTGC	<i>Polaskia chichipe</i>	Otero-Arnaiz et al., 2004
<i>Pchi44</i> AY147834	F: ATCAAACAGGCCACACAG R:GGGTGTTAGAAGGAATAATAGCTTG	<i>Polaskia chichipe</i>	Otero-Arnaiz et al., 2004
<i>Pchi47</i> AY147832	F: GTCCTTGTGGCTAGCCCTTT R: CCATTTCTCTCGCCATCTG	<i>Polaskia chichipe</i>	Otero-Arnaiz et al., 2004
<i>Pchi54</i> AY147831	F: CCTTGAGCTTTGACATTGAGA R: GGAAGGTTTTATTGGATGAG	<i>Polaskia chichipe</i>	Otero-Arnaiz et al., 2004
<i>Pchi20</i>	F:GTGGCCGAGAAAGAAGTTTG R:AAAGGCCCAAATCATAAGCA	<i>Polaskia chichipe</i>	Otero-Arnaiz et al., 2005
<i>Pchi50</i>	F: CCTGGGCAAACCTCTGTTTA R:GTTCCCAACTGACCGACAAC	<i>Polaskia chichipe</i>	Otero-Arnaiz et al., 2005
<i>AaB6</i>	F:ATGCGAACAGATTGAAAAGAGGG R: CTCAGGAAAGACTTACACCATGG	<i>Astrophytum asterias</i>	Terry et al., 2006
<i>AaH11</i>	F:GAAGAAACACTTCTGCAAGTAGATG R: GATTTCCATCACCATCTTGTGAGC	<i>Astrophytum asterias</i>	Terry et al., 2006
<i>AaA3</i>	F:GCAAGCAAGAGTATGGTGAATTGG R:AGTTATTTTACCGTAACACACATGG	<i>Astrophytum asterias</i>	Terry et al., 2006
<i>AaC3</i>	F: ACTAATATCATGCTGCGTCGTTAG R: ACGGTCCAGTCACATAACATTCC	<i>Astrophytum asterias</i>	Terry et al., 2006
<i>AaD9</i>	F: CTGTTTAGTTCTCTCGTCTTCACC R: CTCCGCTTTTACTGCTAGCACC	<i>Astrophytum asterias</i>	Terry et al., 2006
<i>AaG3</i>	F: TAACAGAGAATCCAAGGCTTTTCC R: AATCGCCAGCCGAGGGAGAC	<i>Astrophytum asterias</i>	Terry et al., 2006
<i>mAbR05</i>	F: AATAGGGACAGTGAGGGATT R: TCTTCTCATGAGCCTTGTCG	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes et al., 2008
<i>mAbR28</i>	F: CCATAAGCTGTGGTGGGTCT R: ATTTTAAAGCTCCCCCTCCA	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes et al., 2008
<i>mAbR40</i>	F: TTTAATGCGGAGGAAGTTGG R: GCTCAAAGTCTCTCCGTTAATGA	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes et al., 2008
<i>mAbR42</i>	F: GGGCAATTCATATGCACAA R: TTGTCCACCTTCCCTATTG	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes et al., 2008
<i>mAbR77</i>	F: CGGGGAAGGAATAATCCAAG R: ATGTGCCGTTTGAATCTTT	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes et al., 2008

Quadro 1 - Continuação

<i>mAbR82</i>	F: TTCCATCCTGGAGTTTAGGG R: GAAAACATTTCAAGTGCAACACA	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes et al., 2008
<i>mAbR86</i>	F: TTGCAACTTGGGCATCAGTA R: GGCAGCTCAACTCCAGAGAC	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes et al., 2008
<i>mAbR91</i>	F: CGACATCAAGTTGCACCATC R: TCAGGAGTTGCTTGATGGAA	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes et al., 2008
<i>mEgR39</i>	F: GAGCGCAGAATTGAGGTG R: GATGTGGCATTTCAGAC	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR02</i>	F: TGGGTTGGAGAAGTGGAAG R: CGGTGTGAGGCTTCATTTG	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR17</i>	F: ATCGTTGAAAGAGGCGAAA R: TCCCTCTTCTTCGTCAGAGC	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR63</i>	F: TTGAATTGGGTGCTTCACTG R: CCCTAATATGCTGCCGATG	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR76</i>	F: TCACAATTTGGAAGGAAGCA R: GTGAGCAAAGGGCTGATTC	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR73</i>	F: AAGGAAGAGGAGGAGGCAACC R: TTCTAATAAACACTTAAACCCTAACC	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR78</i>	F: AGCCCAAAGCCCAACTTATT R: TGCATGCAATCATAAGGTTTTTC	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR98</i>	F: ACCCTAGTGGGGTCGAGAAT R: GTCGCCCAGAACCCTAGTCT	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR99</i>	F: GCTACTCGTGGTTGTGGTGA R: CTGCCGTTCTCTCTGCTC	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR51</i>	F: TGGCATAGAGGTGGTGA CTG R: GCCAAATAAAATTTGAGCCATT	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR68</i>	F: GG TAGCCATTCGTCATCAGC R: GTCCCGTACTCGCTTCTCT	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>mEgR70</i>	F: ATGTTGCCAGAAACACTTCG R: GCAAATTAAGGGTCTCTTGG	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty et al., 2008
<i>Ht.la</i>	F: TTGAGGCCAATATGAGATTTGA R: TATGGCCCATTTGAAACCAT	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.lb</i>	F: CCAAGAAGCCATCTGAGGAG R: CACCCCTTCTCTCTCTCT	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.lc</i>	F: ATCCCAATTTCTTGCCTCCT R: GCTCACGAATGGTCAGAAGA	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.ld</i>	F: CCAAGATTGGTCGTCGACAT R: CTTGCCCCACCTTCTCTA	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.le</i>	F: TCACCTATTTGATCCCCTTCC R: CCTAAGTGCTTGAGCCAAAAA	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.lf</i>	F: TCCACATGCTACGACCACTT R: AGGCCTCATCCTACCAGAGTC	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010

Quadro 1 - Continuação

<i>Ht.IIa</i>	F: CATGAATTGAAAGCCACACG R: CCTTGCACTGCATAGTTGGA	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Hp.IVa</i>	F: CGACAAACCTTGTCCTCTTG R: AGGTCCGACTGGTCCTAACCC	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Hp.IVc</i>	F: AACCTTGCAATAAGCTCCA R: AATGGCAACGAAAGGAGAGA	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.Vb</i>	F: TCCAATGACATTTGCTATTCCA R: CCCCATCTTCCCTACAGTCA	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.ms4</i>	F: GCAAGAAAGGGAAGAGAAATC R: TCAATGTGCTTCCCTAAACATGAA	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.ms7</i>	F: TTCCCATGACTGCCCTTAG R: CTGTCCATTTAGCCCCAGAA	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.ms8</i>	F: ACCCTTGCTGTTTGTGTGG R: CCTCCTGCGAAGAAAGAGAA	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.ms9</i>	F: TACGGTTTTGGGTTTTGGAC R: ACTGGGATCTCCCAACTGC	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.ms11</i>	F: GCCATTACCCCAACGTA R: CTCACCTCCTTCATCTCTTCAA	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.ms12</i>	F: GGTTATGACCATGGAATGC R: ACTTGCAACCGTGTGTGTGT	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.ms13</i>	F: TCAAGACATGGCAGCTCAA R: GGCATGGTGCTGATTAGGAT	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Ht.ms16</i>	F: CTGGCCAAACCCTATCTACT R: GGGTACACCGATCAGATAAAGG	<i>Haageocereus tenuis</i>	Arakaki et al., 2010
<i>Opuntia1</i>	F: Cy5-CCATCTACTTCCCACTTTGC R: GTTTCTCCTGTGTTTCTCTGTGCTC	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia2</i>	F: Cy5- CACATACGCAAATACATGG R: GTTT-GCTTCATTTTCCAGGTTACT	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia3</i>	F: GTGAGTGCCCAGATGAAACT R: TCCTCAACTTTATTGTAGCAAGAG	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia4</i>	F: Cy5-GATGATTCCGCCATTACCC R: GTTT-CGTGCTGACTCACACC	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia5</i>	F: Cy5-TATGCACAAAGCACCATGC R: GTTTCAACCATAACCACTGTAAGTAC	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia6</i>	F: Cy5ATCTCATTGTATCATCTATTTCTG R: GTTTAGCACAAAGACACTTCATCG	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia8</i>	F: Cy5-ACCGCCATCACAGCTATC R: GTTTCTCACCCACAATTCCAAACC	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia9</i>	F: Cy5CTAGGCTTCATCCCACATTAGG R: GTTT-TCCAAATTCACCTCCTCTGC	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia10</i>	F: Cy5ACCAACATCAAACCTTCAATACC R: GTTTCATGCTTCATCTGTTTCATTGG	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007

Quadro 1 - Continuação

<i>Opuntia</i> 11	F: Cy5-CCTACACCTGCTGCCAATC R:GTTTCGAGACAAACATCAGAGGAG	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia</i> 12	F: Cy5TAATCTTATTCTCAGGTCAGTTAC R: GTTT-GGTATCTTGTTATTCGTTTCG	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia</i> 13	F: Cy5-CCAAATACCCAGCCCATAC R: GTTT-GAGAACCTAACTTCCGATG	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia</i> 14	F: Cy5-TCAGGATTCAAGAAGATTTGC R: GTTT-GATTCAATTGATGATGGGC	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia</i> 15	F: Cy5-GCGGTGGAAGCAGTTAGG R: GTTT-CAGTCGATCATACCCAAGG	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia</i> 16	F: Cy5-GTCAATCCCGAGCAATTTAGG R: GTTT-TCATTAGTGAGGCCCAACG	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
<i>Opuntia</i> 21	F: Cy5-AAAGGGAAGACCTTGCTCTC R: GTTT-CTATTCTCAGCCCTCCTCTC	<i>Opuntia echios</i>	Helsen et al., 2007
2G HQ285947	F: TCGCACAATCAGAAAGTCC R: TTGGTGAGACATTGAATTTAGCTC	<i>Coryphantha robustispina</i>	Butterworth et al., 2010
3B HQ285948	F: CTTGCCTTGAAGGTTGCCTA R: GAATTCAAGCTCCCATCGAA	<i>Coryphantha robustispina</i>	Butterworth et al., 2010
3C HQ285949	F: GAGCAACTGGTGGCTAGAGG R: CCTCCCTCTTTCCACTAAACC	<i>Coryphantha robustispina</i>	Butterworth et al., 2010
3F HQ285950	F: CGATTGGTTTTGCAAGGATT R: CGTCCCCTTGAGATGTTCA	<i>Coryphantha robustispina</i>	Butterworth et al., 2010
4C HQ285952	F: CTTTTACCCCTGGCTCTCTT R: TTTATTGCAGACTTGAATTTGTG	<i>Coryphantha robustispina</i>	Butterworth et al., 2010
5E HQ285953	F: GGCAATTCTCAACAACAATCG R: ATTCCCTTCTTGAGCCAAC	<i>Coryphantha robustispina</i>	Butterworth et al., 2010
7B HQ285954	F: AGCACAGACAGCACGCTCTA R: TCATTTGCCTGCACAAACAT	<i>Coryphantha robustispina</i>	Butterworth et al., 2010
7D HQ285955	F: TGGGCTCCTTTGCTGTTATT R: AATGTGCGGGCATGTAATTT	<i>Coryphantha robustispina</i>	Butterworth et al., 2010
7G HQ285951	F: CACCAGGGACCTACATGACC R: ATGCTCCAGTGTGCAGATCA	<i>Coryphantha robustispina</i>	Butterworth et al., 2010
10E HQ285956	F: GAGACTGGTGTGGGTGTCCT F: GAGACTGGTGTGGGTGTCCT	<i>Coryphantha robustispina</i>	Butterworth et al., 2010
<i>Pmac</i> 082 HQ667127	F: GTAAAAGAGGAGGATGGAGAGG R: CTTCTTCTTGCTAGGTTTCTCG	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011
<i>Pmac</i> 084 HQ667128	F: CATAAATTGCAGAAATGAGGAC R: AGGTAAACCGCTAACTCGATG	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011
<i>Pmac</i> 085 HQ667129	F: CCCCTCACTTCTCCAATCTC R: TCCCTCCTTCTTTGTGTTTC	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011
<i>Pmac</i> 101 HQ667130	F: TGATAGCTGCAACGATGTC R: CATTTGTTTTGTTGTTTGCTTCAC	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011

Quadro 1 - Continuação

<i>Pmac102</i> HQ667131	F: TCTATAAGTGCCGATGGATGC R: CACACCTCACTCCCAACCTC	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011
<i>Pmac108</i> HQ667132	F: TGAATGTCTGCCATTAGAAAGC R: TAATCGCCCCAAAGAAGAAC	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011
<i>Pmac128</i> HQ667133	F: GTGTTGATTGTA CTCTTCAG R: CTAACCTTTGTATACATGC	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011
<i>Pmac130</i> HQ667134	F: GAGGTGCCAATAAATCG R: TGTCACGCAATCTTGAACC	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011
<i>Pmac135</i> HQ667135	F: ACCAGAATGAGCTCAGCTGTAG R: CCTAGCTAGCAGAATCAGAGTGAAGAC	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011
<i>Pmac146</i> HQ667136	F: ACCCGACATCCCCTTGTAG R: TAGTCTGAAACGGAGCAAGG	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011
<i>Pmac149</i> HQ667137	F: TTCATCCTGCTTTTGAAGTTTG R: TGATGGATTAGGATTGACCTG	<i>Pilosocereus machrisii</i>	Perez et al., 2011
SCGL_71	F-TCATCTGGTCCAATCAGCAA R-TCAGCGAACAAGAATCATGC	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCGL_337	F-TGAACTTGCTTAGATTTCCCTTA R-CGCTAACCCAACACTTTGCT	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCGL_346	F-ACTGTGTGGTCGATGAGGAG R-AGAAGTGTGAAGGAGGCAAA	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCGL_401	F-CACAACCTTGCTTCTGTTTT R-CATTTGCATCATATCCACCTAATAAATAAG	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCGL_416	F-CGAACCATCCCCAAAAGTTA R-GACCCTCTCACCCACAAT	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCGL_446	F-ACTCAAGGTCCATCAAAACA R-ACTGCCCAATATCGTCTAAA	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCGL_448	F-GGGTTTCAAGTTCCCCCTTA R-AGTGCCAAGCGAGTTTCATT	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCGL_450	F-TTTTCATGCCCTATGACTATACAA R-GGTTCCACCACCAATTATCC	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCGL_461	F-GGCACTCTATCTCTCTCCCT R-AGGGTTTCATCCACACAAC	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCGL_704	F-GCAAACCATTCAAAGCAGTG R-CTTGCTGGCTGTTGAACTA	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCPA_125	F-GGTTTCAGCTTGAATAGGTTAATTC R-GGTTGAACTAGGGGTCAG	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
SCPA_268	F-GGAGTTCATCAGTAGCCTCT R-GGTTGAACTAGGGGTCAG	<i>Sclerocactus glaucus</i> e <i>S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013

Quadro 1 - Continuação

SCPA_623	F-CTGTAAGCAGCCGTCGTTG R-TCTCTCCCCACGCTCTCTTA	<i>Sclerocactus glaucus e S. parviflorus</i>	Schwabe et al., 2013
MamVTC1	F-NED CGATCATTAACCATTACCGTCA F-NED CGATCATTAACCATTACCGTCA	<i>Mammillaria crucigera</i>	Solórzano et al. 2009
MamVTC2	F-FAM TCTCACTGCCCGTTTTCTCT R: ACGGTGATGGTGGGTGTTAT	<i>Mammillaria crucigera</i>	Solórzano et al., 2009
MamVTC5	F-NED TACAGACGCCATAGGCAAAG R: GGTGGAGATGAGGGACTGAA	<i>Mammillaria crucigera</i>	Solórzano et al., 2009
MamVTC8	F-FAM TCGATTATCTGCTGCTTCCA R: CCGAGAAAGCCCTAAAACCT	<i>Mammillaria crucigera</i>	Solórzano et al., 2009
MamVTC9	F-FAM TGGATACGTGGCTCTTCGAT R: CCAAATGCCAATCCTCCTAA	<i>Mammillaria crucigera</i>	Solórzano et al., 2009
MamVTC10	F-NED CATTCTAGACATCATATCGCTCT R: TGAGACTCCACTCTATTTCTCT	<i>Mammillaria crucigera</i>	Solórzano et al., 2009
MamVTC11	F-NED CAGGGGTAAGGGAGACAACA R: CTTCAAGTCCCCCTTTGAAT	<i>Mammillaria crucigera</i>	Solórzano et al., 2009
MamVTC12	F-NED TGGGAATGGGCTATGATTA R: CGGCGTTTATTAGCCAATCT	<i>Mammillaria crucigera</i>	Solórzano et al., 2009