

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

PAULA GARCIA MARTIN

Transferibilidade de microssatélites de cactáceas para a análise de regenerantes clonais (R_0) de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)

MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
FEVEREIRO – 2011

PAULA GARCIA MARTIN

Transferibilidade de microssatélites de cactáceas para a análise de regenerantes clonais (R_0) de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)

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. Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
DEZEMBRO – 2011

Aos meus pais, Federico Augustin Garcia Martin e Maria Tantulli Garcia Martin,
por nunca terem desistido de mim.

Ao meu namorado, Renato, companheiro de todas as horas...
A todos os meus amigos e professores, por tanto terem me ensinado.

Dedico.

AGRADECIMENTO

A Deus, por ter estado comigo em todos os momentos da minha vida, encorajando-me em busca da conclusão desta importante etapa de minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade.

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

À minha Orientadora, professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, por oferecer essa valiosa oportunidade, pela ajuda, confiança e preocupação com que sempre me atendeu, do início ao término deste trabalho.

Às minhas Coorientadoras, professora doutora Claudete Aparecida Mangolin e professora doutora Maria Cláudia Colla RuvoloTakasusuki, pelo apoio, paciência, transmissão de conhecimento e pela atenção dedicada na análise detalhada deste trabalho.

Às professoras doutoras Maria Cláudia Colla RuvoloTakasusuki, Sandra A. de Oliveira Collet e ao professor doutor Erasmo Renesto, pelo apoio e amizade.

Aos companheiros do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Eletroforese e Genética de Animais, pela ajuda em momentos de estudo e pela alegria proporcionada nos momentos de descontração.

À amiga Juliana Sala de Faria, pelas contribuições indispensáveis durante esta pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética, pela ajuda e trabalho indispensáveis.

Aos Funcionários do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz e Maria Valquíria Magro, pela amizade e ajuda.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela companhia nas disciplinas cursadas e a todas as pessoas que passaram pela minha vida. Cada um contribuiu um pouco para esta conquista.

BIOGRAFIA

Paula Garcia Martin, filha de Federico Augustin Garcia Martin e Maria Tantulli Garcia Martin, nasceu em São Paulo, estado de São Paulo, no dia 10 de novembro de 1983.

Cursou o Ensino Fundamental e Médio no Colégio Marista, na cidade de Maringá, Paraná, concluindo o ciclo em 2002.

Em 2007, graduou-se em Ciências Biológicas – Licenciatura, pelo Centro Universitário de Maringá.

Em agosto de 2009, concluiu o Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Biotecnologia Aplicada à Agroindústria pela Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2009, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento (PGM), na Universidade Estadual de Maringá (UEM), realizando estudos na área de Análise Genética Vegetal.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. Família Cactaceae | 4 |
| 2.2. Marcadores moleculares | 7 |
| 2.3. Microssatélites ou marcadores SSR | 10 |
| 2.4. Marcadores microssatélites em Cactaceae..... | 13 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 3.1. Material vegetal..... | 21 |
| 3.2. Extração do DNA | 22 |
| 3.3. Quantificação do DNA..... | 23 |
| 3.4. Testes de transferibilidade | 23 |
| 3.5. Análise dos dados..... | 27 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 4.1. Transferibilidade de primers..... | 29 |
| 4.2. Diversidade genética..... | 33 |
| 5. CONCLUSÕES | 44 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |

RESUMO

MARTIN, Paula Garcia. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2011. **Transferibilidade de microssatélites de cactáceas para a análise de regenerantes clonais (R₀) de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae).** Orientadora: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Coorientadoras: Claudete Aparecida Mangolin e Maria Cláudia Colla RuvoloTakasusuki.

Frente à crescente importância econômica e industrial da espécie de cactos *Cereus peruvianus*, a proposta deste trabalho foi examinar a transferibilidade de marcadores de SSR desenvolvidos a partir do genoma de diferentes espécies de cactáceas para as plantas de *C. peruvianus*, no sentido de determinar a diversidade genética e analisar a estrutura das populações de somaclones geradas *in vitro*, que apresentam variação somaclonal. Foram avaliados 33 pares de primers de microssatélites desenvolvidos para diferentes espécies de cactáceas. Desta avaliação, foram selecionados 9 primers, conferindo uma transferibilidade de 27,27% destes primers para *C. peruvianus*. Os *loci* avaliados apresentaram 23 alelos, com uma média de 2,56 alelos por *locus* polimórfico. Os variantes somaclonais morfológicos (caules atípicos) de *C. peruvianus* apresentam menor diversidade de alelos e de genótipos heterozigotos. Os *loci* *mEgR76*, *mAbR28*, *Pchi47*, *mEgR78*, *mEgR02*, *Pchi54*, e *mAbR42* foram considerados como efetivos para analisar diversidade genética e a estrutura de populações de *C. peruvianus* e os *loci* *mEgR76* e *mAbR77*, *mEgR02* e *mAbR28* foram indicados para investigar diferenças morfológicas em caules de mandacaru do gênero *Cereus*, ou em variedades com morfologias de caules alteradas de *C. peruvianus* encontradas na natureza. O nível de identidade genética observado (0,8836 – 0,9609) entre os somaclones com caules típicos, atípicos e mistos indicou que as plantas com caules atípicos podem ser consideradas como sendo da mesma espécie dos somaclones com caules típicos.

Palavras-chave: *Cereus peruvianus*, microssatélites, transferibilidade.

ABSTRACT

MARTIN, Paula Garcia. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, February, 2011. **Transferability of cactus microsatellites for analyzing the genetic structure of clonal regenerants of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae).** Adviser Professor: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Committee Members: Claudete Aparecida Mangolin and Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

Due to the growing economical and industrial importance of the cactus species *Cereus peruvianus*, the purpose of the present work was to exam the transferability of SSR markers developed from genomes of different species of cactus to the *C. peruvianus* plants, as a way to determine the genetic diversity and analyze the structure of somaclones populations generated *in vitro* that show somaclonal variation. 33 pairs of microsatellites primers developed for different species of cactus were evaluated. From this evaluation, 9 primers were selected, giving a transferability of 27, 27% from these primers to *C.peruvianus*. The evaluated loci showed 23 alleles, with a medium of 2,56 alleles pre polymorphic locus. The morphological somaclonal variants (atypical stems) of *C.peruvianus* show less diversity of alleles and heterozygous genotypes. The *mEgR76*, *mAbR28*, *Pchi47*, *mEgR78*, *mEgR02*, *Pchi54*, e *mAbR42* loci were considered effective to analyse the genetic diversity and the population structure of *C. peruvianus*; and the *mEgR76* e *mAbR77*, *mEgR02*, e *mAbR28* loci were indicated to investigate morphological differences in the stems of Mandacaru plants of the *Cereus* genus or in *C. peruvianus* varieties with altered morphology of stems found in the wild. The genetic identity level observed (0,8836 – 0,9609) among the somaclones with typical, atypical and mixed stems indicated that the plants with atypical stems can be considered as being from the same species of the somaclones with typical stems.

Key words: *Cereus peruvianus*, microsatellites, transferability.

1. INTRODUÇÃO

As cactáceas sempre foram associadas a plantas ornamentais (Figueira et al., 1994). Atualmente, diversos trabalhos têm sido publicados destacando a importância de diversas espécies de cactos para outras finalidades, tais como: alternativa e complemento para a alimentação animal, utilização na medicina alternativa (popular), propriedades fitoterápicas e crescente importância econômica e industrial (Lima, 1996; Lima e Gama, 2001; Silva et al., 2005; Andrade et al., 2006; Francisco et al., 2008).

Um exemplo são as plantas de *C. peruvianus*, que produzem alcalóides aminas (Viés et al. 1971; Oliveira e Machado, 2003), ésteres de cera com a característica de impermeabilidade à água e de potencial aplicação como barreira impermeável (Dembitsky e Rezanka 1996; Rezanka e Dembitsky, 1998), e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais (Alvarez et al., 1992, 1995; Nozaki et al., 1993; Barros e Nozaki, 2002). Esta espécie é cultivada comercialmente em pequena escala em Israel, onde é considerada uma frutífera (Mizrahi e Nerd, 1999; Nerd et al. 1993; Weiss et al., 1993, 1994). Por isso, investimentos têm sido feitos em programas de melhoramento para seleção de frutos de *C. peruvianus* (Mizrahi et al. 1997; Mizrahi e Nerd, 1999).

No México, encontram-se diversas espécies de cactáceas de importância no comércio interno, sendo algumas vistas, também, no mercado internacional (Hughes et al., 2008). Porém, muitas dessas espécies estão correndo o risco de extinção, o que vêm aumentando o interesse de pesquisadores em obter um maior conhecimento do genoma destas espécies, o que auxiliarão em programas de conservação (Otero-Arnaiz et al., 2004, 2005; Terry et al., 2006; Hughes et al., 2008; Hardesty et al., 2008).

Segundo Ben Salem e Nefzaoui (2002), a grande importância das cactáceas em regiões áridas consiste no seu potencial para serem mais eficientes do que as gramíneas e leguminosas em converter água em matéria seca baseado em seu mecanismo fotossintético especializado CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*), por permanecerem suculentas durante a seca, produzir continuamente forragem e prevenir degradação em ecossistemas frágeis. O xiquexique (*Pilosocereus gounellei*), por exemplo, é utilizado na alimentação animal em quase todas as áreas

de ocorrência natural, sem informações técnicas sobre parâmetros importantes relacionados ao seu manejo conservacionista, na mesorregião Central Potiguar, que apresenta manejo alimentar deficitário dos rebanhos.

A perspectiva e o interesse de cultivar e conservar as espécies de cactos ornamentais em risco de extinção, espécies ecológica e economicamente importantes, tem direcionado várias pesquisas para investigar, em nível molecular, a diversidade genética de cactáceas. As isozimas têm sido adotadas como os marcadores moleculares mais usuais para analisar o polimorfismo de proteínas e enzimas, para estimar a diversidade genética e para decifrar a estrutura genética de populações das espécies alvo. Várias investigações focalizaram a análise de isozimas na espécie *C. peruvianus* desde o início da década de 1990 (Machado et al., 1993; 2000; Mangolin et al., 1994a, b; 1997, 1999; Torquato et al., 1995; Jorge et al., 1997; Mangolin e Machado, 1999). A partir do ano 2000, a análise de isozimas também foi aplicada para estimar a diversidade genética e verificar a organização das populações de cinco espécies do gênero *Melocactus*: *M. curvispinus* (Nassar et al., 2001), *M. paucispinus*, *M. concinnus*, *M. glaucescens* e *M. albicephalus* (Lambert et al., 2006a, b), de *Pereskia guamacho* (Nassar et al., 2002), *Lophocereus schottii* (Nason et al., 2002), três espécies de *Stenocereus*: *S. gummosus* (Clark-Tapia e Molina-Freaner, 2003), *S. stellatus* (Casas et al., 2006), *S. pruinosus* (Parra et al., 2008), de *Praecereus euchlorus*, *Facheira squamosa*, e três espécies de *Pilosocereus*: *P. marchisii*, *P. vilaboensis*, *P. aureispinus* (Moraes et al., 2005), de *Mammillaria gracilis* (Balén et al., 2003) e de *Escontria chiotilla* (Tinoco et al., 2005).

Nos últimos anos, tem aumentado significativamente o investimento na aplicação de marcadores moleculares baseados na análise do DNA para a detecção da variabilidade genética em cactáceas. A análise de polimorfismos de seqüências aleatórias de DNA amplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*; reação em cadeia para amplificação de DNA usando a enzima *Taq*-polimerase), conhecida como técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphism of DNA*; William et al., 1990; Welsh e McClelland, 1990) foi aplicada para estimar a diversidade genética nas espécies *Cereus peruvianus* (Mangolin et al., 1999), *Mammillaria haworth* (Mattagajasingh et al., 2006), *Stenocereus eruca* (Clark-Tapia et al., 2006) e *Opuntia ficus-indica* (Zoghلامي et al., 2007). A análise de polimorfismos de seqüências específicas de DNA delimitadas por cortes com enzimas de restrição e amplificadas por PCR, conhecida como técnica de AFLP (*Amplified Fragments Leght*

Polymorphism; Voz et al., 1995) foi verificada somente em quatro espécies de *Opuntia*: *O. ficus-indica* e *O. megacantha* (Labra et al., 2003), e *O. pilífera* e *O. velutina* (Nilsen et al., 2005).

Embora os marcadores baseados na análise do DNA, RAPD e AFLP tenham sido considerados pelos investigadores como eficientes para avaliar a diversidade em espécies de cactáceas (Mangolin et al., 1999; Resende et al., 2007; Mattagajasingh et al., 2006; Clark-Tapia et al., 2006; Zoghiami et al., 2007), estes são marcadores de herança dominante, onde as amostras podem ser comparadas somente pela presença ou ausência de determinada sequência de DNA. A análise de RAPD e AFLP não permite avaliar o número e a frequência de alelos em cada *locus* nas populações e nem a proporção de indivíduos heterozigotos para as características analisadas e, portanto, não é o mais recomendado para analisar a estrutura genética das populações.

Para analisar a estrutura genética das populações de cactáceas, é recomendado utilizar marcadores moleculares com tipo de herança codominantes, tais como as isozimas, ou baseado em DNA, os *loci* de seqüências simples repetidas (SSR; *Simple Sequence Repeated*), também denominados de microsatélites (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989).

Os marcadores moleculares baseados em microsatélites têm sido desenvolvidos em várias espécies de plantas cultivadas. Os *loci* SSR têm sido de grande utilidade no estudo das interações entre espécies botânicas intimamente relacionadas (La Rota et al., 2005; Varshney et al., 2005). A aplicação de marcadores SSR desenvolvidos em uma espécie e aplicados em outra é denominada de “transferibilidade” e demonstrado sucesso em inúmeras espécies.

Assim, o objetivo do presente estudo foi examinar a transferibilidade de marcadores SSR, desenvolvidos a partir do genoma de diferentes espécies de cactáceas para *C. peruvianus*, no sentido de determinar a diversidade genética e a estrutura de populações geradas *in vitro*. Os resultados poderão contribuir para entender os eventos relacionados com a formação de grupos morfologicamente distintos e gerados pela cultura de tecidos *in vitro*, assim também como de grupos morfologicamente distintos do gênero *Cereus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Cactaceae

As cactáceas são dicotiledôneas suculentas de diversos hábitos, podendo ser árvores, arbustos, trepadeiras, epífitas ou geófitas; as hastes (talos) podem ser colunares, roliços, globulares, tuberculados, em forma de costeletas, asas ou achatados, geralmente segmentados sem folhas e com espinhos (Barthlott e Hunt, 1993). A família apresenta aproximadamente 125 gêneros e 1.900 espécies (Areces, 2004), ocorrendo nas regiões tropicais e temperadas do continente americano, distribuída em uma ampla variedade de habitats, desde regiões áridas até florestas úmidas (Hunt e Taylor, 1990). No Brasil, estão registradas 160 espécies pertencentes a 32 gêneros (Barroso et al., 1978), dentre as quais, 80, pertencentes a 18 desses gêneros, ocorrem na região Nordeste (Barbosa et al., 1996).

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

A família Cactaceae encontra-se subdividida em três subfamílias: 1) Pereskioideae - que apresentam hastes não suculentas, folhas grandes, aréolas axilares com espinhos; representada pelos gêneros *Pereskia* e *Maihuenia*; 2) Opuntioideae - possuem hastes e folhas suculentas e aréolas axilares com espinhos, divididas em cinco gêneros; e 3) Cactoideae - a mais numerosa com 91 gêneros, geralmente são árvores sem folhas ou com vestígios de folhas, possuem hastes suculentas com aréolas bem desenvolvidas (Barthlott e Hunt, 1993), sendo recentemente proposta uma nova subfamília, Mahiuenioideae, à qual foi subordinado o gênero *Maihuenia* (Weber) *Schumann*, antes pertencente à subfamília Pereskioideae (Anderson, 2001).

A família Cactaceae é predominantemente neotropical e é encontrada principalmente em ambientes áridos e semi-áridos, porém cerca de 220 espécies

estão adaptadas à vida epifítica em florestas tropicais e subtropicais úmidas. As cactáceas epifíticas pertencem principalmente à subfamília Cactoideae, e às tribos Hylocereeae e Rhipsalideae (Barthlott, 1983). A tribo Hylocereeae, contém os principais gêneros *Epiphyllum*, *Hylocereus* e *Selenicereus*; e a tribo Rhipsalideae, os gêneros *Hatiora*, *Lepismium*, *Rhipsalis* e *Schlumbergera* (Barthlott e Hunt, 1993; Nyffeler, 2002).

Uma vez que as espécies desta família podem sobreviver em diversos ambientes, inclusive adversos, algumas adaptações metabólicas e estruturais são necessárias, como os sistemas radiculares superficiais e extensos, alta relação volume/superfície e células parenquimáticas especializadas em armazenar água (Costa, 1997), sendo alguns caracteres interpretados como adaptativos (Gibson, 1973; Mauseth e Ross, 1988; Sajeve e Mauseth, 1991; Mauseth e Sajeve, 1992; Mauseth, 1993a, b; Mauseth e Plesmons-Rodriquez, 1998; Soffiatti e Angyalossy, 2003).

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). O gênero *Cereus*, por exemplo, é descrito como constituído por caule do tipo colunar com um número e disposição de costelas longitudinais variáveis, onde estão inseridos os botões axilares contendo espinhos (folhas modificadas) conhecidos como aréolas (Britton e Rose, 1963). A presença de aréolas é uma característica da família Cactaceae e a organização destas estruturas nos caules parece estar fortemente ligada à distribuição dos feixes vasculares (Gibson e Nobel, 1986; Mauseth, 1988). Algumas das características usadas para identificar espécies do gênero *Cereus* são: número de costelas e a disposição das aréolas, assim como o tamanho e a cor dos espinhos (Britton e Rose, 1963). Em populações naturais de *Cereus*, indivíduos com 7-8 costelas longitudinais regulares, cujas aréolas mostram disposição linear, são características da espécie *C. alocriportanus*; espinhos longos de cor preta ou castanha são descritos para *C. forbesii*, e espinhos curtos estão presentes em *C. validus*. Caules com costelas em espiral são características da variedade 'tortuosus' de *C. peruvianus*; caules com costelas quebradas formando sulcos regulares, contendo uma aréola por costela, são características descritas para a variedade 'knobby'; e caules com costelas formando sulcos irregulares e número variável de aréolas por costela são descritos como características da

variedade ou forma 'monstrosus'. Esta última variedade também tem sido designada como *C. monstrosus* ou *C. monstrosus* e ainda como a variedade *C. monstrosus minor* (Britton e Rose, 1963).

Vários estudos foram realizados utilizando a morfologia como ferramenta na taxonomia da família, entre eles estão os trabalhos de Britton e Rose (1937), Zappi (1994), Taylor (2000) e Rocha e Agra (2002). Alguns aspectos anatômicos também têm se revelado úteis em termos diagnósticos, como padrão de espessamento das paredes celulares da hipoderme, tipo de espinhos ocorrente nas aréolas, ocorrência de feixes vasculares corticais e medulares, tipo e localização de estruturas secretoras (Conde, 1975; Mauseth, 1989, 1999; Silva e Alves, 1999; Soffiatti e Angyalossy, 2003).

As cactáceas são freqüentemente usadas como plantas ornamentais e forrageiras, mas estão cada vez mais ganhando espaço na agricultura. Há uma crescente utilização de caules de *C. peruvianus* como fonte de produtos de interesse industrial e econômico (Whistter, 1963; Mark, 1979; Martindale, 1979; Turbak, 1979; Rodrigues, 1984; Scheinvar, 1985; Alvarez et al., 1992, 1995; Nozaki et al., 1993).

No que se refere à agropecuária regional, algumas espécies de cactáceas servem para alimentação de bovinos, caprinos e ovinos, principalmente na época de estiagem. Andrade-Lima (1966) destacou *Cereus jamacaru* DC. entre as espécies nativas utilizadas para esse fim. Adominação ou subdominação de espécies de Cactaceae na caatinga nordestina, principalmente dos gêneros *Cereus*, *Opuntia* e *Pilosocereus*, tem sido de grande importância na alimentação da fauna local.

As cactáceas também são vegetais amplamente utilizados na medicina tradicional por curandeiros e tribos indígenas no México para diversas finalidades (Hollis e Sheinvar, 1995). Alguns autores descrevem os principais usos tradicionais, atuais e potenciais de *Opuntia* no México (Barbera et al., 1999; Lewis, 1977). No Brasil, diversos autores citam o conhecimento e a utilização de cactáceas com propriedades terapêuticas (Campos, 1967; Silva, 1986; Souto Maior, 1986; Bandeira, 1993; Agra, 1996; Mota, 1997; Costa-Neto e Moraes, 2000; Guerreiro et al., 2000; Tourinho, 2000 e Andrade et al., 2001).

No Nordeste brasileiro, a coroa-de-frade e o facheiro vêm sendo utilizados na fabricação de doces, bolos, biscoitos, cocadas, podendo ser uma nova fonte de renda para comunidades carentes e um atrativo para a gastronomia exótica (Silva et al., 2005b). A farinha de facheiro (*Cereus squamosus*) pode ser incorporada a

produtos de panificação, como bolos, pães e biscoitos, em substituição parcial a farinha de trigo (Lima, 2006).

Junto à crescente utilização das cactáceas na indústria e comércio, vêm aumentando cada vez mais os investimentos e, conseqüentemente, o número em pesquisas com plantas dessa família visando a um melhor conhecimento do genoma das mesmas (Machado et al., 1993; 2000; Mangolin et al., 1994a, b; 1997, 1999; Gutman et al., 2001; Otero-Arnaiz et al., 2004, 2005; Terry et al., 2006; Resende et al., 2008; Hughes et al., 2008; Hardesty et al., 2008).

2.2. Marcadores moleculares

De acordo com os registros de Guimarães e Moreira (1999), até o início da década de 1960, os estudos de genética e melhoramento utilizavam marcadores controlados por genes associados a caracteres morfológicos, onde os fenótipos de fácil identificação visual muito contribuíram para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para as primeiras versões de mapas genéticos. 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.

A partir da década de 60, o desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular tornou possível a manipulação do DNA, culminando com o surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares. Um marcador molecular foi definido como todo e qualquer fenótipo decorrente da expressão de um gene, como no caso de proteínas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma), cuja seqüência e função podem ou não ser conhecidas (Ferreira e Grattapaglia, 1996). 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 estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precisa e precoce dos genótipos de interesse (Guimarães e Moreira, 1999). As técnicas bioquímicas e moleculares, baseadas na

análise de polimorfismo de enzimas e de fragmentos de DNA, têm possibilitado a rápida detecção de marcadores moleculares no estudo de aspectos básicos de genética vegetal, bem como em programas de melhoramento genético, quer para caracteres qualitativos, quer para caracteres quantitativos. Nos últimos anos tem aumentado a aplicação de marcadores moleculares, tanto em estudos genéticos como em programas de melhoramento genético em seleção assistida.

A escolha dos genitores e o planejamento dos cruzamentos, por exemplo, são etapas de fundamental importância para o sucesso de um programa de melhoramento genético (Borém, 1997). Estas etapas podem ser auxiliadas por meio dos marcadores moleculares, que fornecem aos melhoristas informações genéticas adicionais e mais detalhadas dos genótipos, aumentando a probabilidade de obtenção de cultivares superiores. Conforme a metodologia utilizada para identificá-los, os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os Minissatélites ou *loci* 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 Microsatélite (ou SSR - *Simple Sequence Repeats*).

A técnica de RFLP é elaborada; mais demorada que as outras técnicas para obtenção de resultados; de custo relativamente alto; tem revelado um grau de polimorfismo de intermediário a baixo, conforme a espécie. Mesmo assim, os RFLPs têm sido utilizados em um grande número de estudos de caracterização de cultivares (Gebhardt et al., 1989; O'Donoghue et al., 1994; Autrique et al., 1996). Isso tem sido devido principalmente a sua alta consistência e repetibilidade na obtenção dos resultados.

Os minissatélites (ou *locus* VTNR) são seqüências repetitivas de DNA, adjacentes e em número variável (Jeffreys et al., 1985). Essa técnica é similar a de RFLP, variando basicamente o tipo de sonda utilizado e apresentado as vantagens e desvantagens já apresentadas para a técnica anterior (RFLP). Uma vantagem adicional dos minissatélites é o alto grau de polimorfismo apresentado, decorrente da variação na distribuição dos sítios de restrição, das sondas utilizadas e do número e tipos das seqüências repetitivas.

A técnica de RAPD consiste na amplificação de DNA genômico em PCR, utilizando primers de sequência arbitrária com 10 nucleotídeos. Frequentemente, utiliza-se apenas um primer em cada reação, sendo este formado por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, com um conteúdo de G+C entre 50 e 70% (Fritsch e Rieseberg, 1996). A técnica de RAPD possui um custo inferior, menor número de etapas e tempo para obter os resultados; é fácil de implementar. Essa, contudo, tem a desvantagem de ser considerada como tendo repetibilidade baixa e de ser pouco consistente de um laboratório para o outro, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes laboratórios (Milach, 1998).

A técnica de AFLP apresenta vantagens comparativas, tais como detecção de maior número de seqüências (ou fragmentos) de DNA amplificadas, cobertura ampla do genoma e baixo custo relativo (Lopes et al., 2002); possui também grande capacidade para a detecção de variabilidade genética e uso em caracterização de cultivares. Entre as vantagens do uso de AFLP estão o alto grau de polimorfismo e maior número de marcadores (fragmentos de DNA amplificados) obtidos por gel analisado. O AFLP é a mais elaborada das técnicas de PCR (Milach, 1998).

Outra técnica muito utilizada é a análise de microssátelites, também conhecido como Seqüências Simples Repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*) ou repetições curtas em *tandem* (STR), sendo regiões repetitivas do DNA compostas de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em seqüências, que são difundidos em genomas eucarióticos e procarióticos (Field e Wills, 1998; Tóth et al., 2000). Essas regiões de seqüências simples repetidas são amplificadas individualmente por meio de PCR, utilizando um par de primers específico (de 20 a 30 bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Os marcadores SSR são altamente reproduzíveis e estáveis, além de codominantes e multialélicos fornecendo um elevado nível de informação genética por *locus* SSR.

O uso de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento. Eles podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subseqüentes, comprovando sua natureza genética (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Milach, 1998a). Federizzi (1998) enfatizou que a área de maior impacto dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal é no processo da

seleção assistida por marcadores moleculares para identificação de genótipos superiores em populações segregantes. Contudo, o autor destaca que alguns pré-requisitos devem ser levados em consideração, tais como: o marcador deve co-segregar ou estar associado ao gene de interesse; a técnica deve ser eficiente, de baixo custo para uso rotineiro, reproduzível e de fácil uso.

2.3. Microssatélites ou marcadores SSR

De acordo com os registros de alguns autores, a maior vantagem da análise dos microssatélites ou *loci* SSR é o elevado polimorfismo revelado por estes marcadores, o que torna esta técnica uma das melhores opções para o uso na caracterização de cultivares, especialmente em germoplasma aparentado e com baixa variabilidade para outras características (Faleiro et al., 2001b; Sereno et al., 2006; Lanaud et al., 1999).

Os microssatélites, também conhecidos por *locus* de seqüências 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 seqüências de DNA que flanqueiam a região repetida dos *loci* SSR são conservadas e são utilizadas para sintetizar primers (Schlötterer, 2000). Este par de primer é então utilizado para a amplificação dos *loci* SSR por PCR. O polimorfismo é detectado quando existe diferença no comprimento do segmento. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo *locus*. A identificação dos produtos da amplificação é separado por eletroforese em géis de agarose de alta resolução, ou em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata.

Em indivíduos diferentes, um mesmo fragmento observado em posições diferentes no gel representa um alelo diferente do mesmo *locus*. Esses *loci* constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponível atualmente (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os microssatélites são classificados em três famílias: de repetições puras, compostas, e interrompidas. Nas repetições puras, os *loci* de microssatélites são formados por um único motivo repetido, por exemplo, (TAT)_n; nas repetições compostas, mais de um motivo compõem o microssatélite (TAT)_n(AC)_n; e nas repetições interrompidas os motivos são intercalados por nucleotídeos que não

fazem parte da unidade de repetição $(CA)_nTT(CA)_n$ (Pinto et al., 2001). Usado amplamente como marcadores genéticos, os microssátelites possuem um atributo particular, pois sofrem elevadas taxas de mutação no genoma (Jarne e Lagoda, 1996). O marcador SSR é classificado de acordo com o tipo de sequência de repetição, como: perfeito, imperfeito, interrompido ou composto. Em um microssátelite perfeito, a sequência de repetição não é interrompida por nenhuma base que não pertence a esta repetição, se houver um par de bases diferente entre as repetições que não combine com a sequência da repetição, é um microssátelite imperfeito. No exemplo de um microssátelite interrompido, há uma sequência pequena dentro da sequência de repetição que não combina com a sequência original. Quando um microssátelite é composto, ele contém duas sequências repetidas distintas.

De acordo com os registros de Mاتيoli (1999), a ocorrência de seqüências de DNA repetitivo no genoma nuclear dos organismos eucariontes, contendo seqüências simples e complexas, foi evidenciada há três décadas. Em genomas eucariotos, as seqüências simples são mais freqüentes e melhor distribuídas ao acaso. Essas regiões são formadas por blocos de DNA compostos de seqüências de nucleotídeos idênticas ou similares, repetidas em *tandem* (em seqüência, ou uma seguida de outra). Esses blocos repetitivos podem variar de tamanho, de poucos a muitos pares de bases, assim como podem variar no comprimento da unidade de repetição. Os microssatélites são considerados como altamente susceptíveis a mutações e quase que invariavelmente apresentam um polimorfismo extensivo, resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetitivos. A variabilidade de tamanho observada nos *loci* de microssatélites normalmente se deve à adição ou deleção do número de cópias das unidades repetitivas. Essa alta taxa de mutação permite extensiva variação alélica e altos níveis de heteroziguidade (Carvalho e Pitcher, 1995).

Diversos mecanismos foram sugeridos para explicar a elevada taxa de mutação dos microssátelites, 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).

Os marcadores SSR, de acordo com Heywood e Iriundo (2003), fornecem uma informação relevante, identificando unidades de conservação e investigando os processos genéticos que ocorrem nas populações, tais como testes padrões do fluxo

de gene, de gerações geneticamente vizinhas e da incidência da tração genética. Atualmente, os marcadores microssátelite são empregados, geralmente, para a análise da estrutura genética de populações de planta da mesma espécie (Zucchi et al., 2002) e de espécies selvagens (Pinto et al., 2003a,b). Devido à sua natureza co-dominante e por ser multialélicos, fornecem um nível elevado de informação genética por *locus*.

Uma pesquisa mais recente baseada em seqüências expressas, freqüentemente registradas como ESTs, sugeriu que a freqüência dos microssátelites nas plantas é maior do que havia sido previsto por Morgante et al. (2002), tendo sido encontrado que o número de microssátelites é aproximadamente 1.844 no genoma de *Arabidopsis thaliana*, 2.757 no arroz, 2.000 na soja, 1.470 no milho e 1.796 no trigo.

Ramos et al. (2006) observaram que os marcadores microssatélites foram eficientes para determinar a pureza varietal de lotes de sementes de linhagens de milho com sensibilidade para detecção de concentrações de DNA iguais ou superiores a 0,01%, apresentando nitidez e repetibilidade, especialmente com a utilização de gel de poliacrilamida.

A grande variabilidade genética inter e intrapopulacional, gerada pelo grande número de *loci* de microssatélites, e a alta taxa de mutação pode, em alguns casos, evitar fixação de alelos dentro das populações. A presença dos mesmos alelos em diferentes grupos ou espécies pode diminuir a diferenciação interpopulacional ou interespecífica, quando comparado a outros tipos de marcadores (Fumagalli et al., 2002).

Muitos autores vêm descrevendo a utilização de marcadores SSR em diversas espécies de plantas. Bianchi et al. (2004) utilizaram marcadores SSR em plantas de pessegueiro e nectarineira e concluíram que estes marcadores produzem elevado polimorfismo entre cultivares de pessegueiro e podem ser utilizados na certificação da identidade genética das duas plantas cultivadas no Brasil.

Os microssatélites têm sido utilizados para estudos de diversidade e estrutura genética de populações e aplicados para auxílio da conservação genética em *Oryza rufipogon* Griff. (Gao et al., 2000a, 2002a, b; Gao, 2004), uma espécie de arroz selvagem de origem asiática e reconhecida como ancestral da espécie cultivada *O. sativa* L. (Khush, 1997). Este marcador vem sendo também desenvolvido para outras espécies de arroz selvagem, como *O. officinalis* Wall ex

Watt., *O. granulata* Nees et Arn. ex Watt., *O. latifolia* Desv., *O. minuta* J.S. Presl. ex C.B. Presl., *O. australiensis* Domin e *O. ridleyi* Hook. (Ishii e McCouch, 2000; Gao et al., 2000b, 2005; Gao, 2005; Zhou et al., 2003). Girotto (2008) utilizou microssatélites na seleção de genótipos de trigo tolerantes à seca.

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 (Hughes et al., 2008; Hardesty et al., 2008; Otero-Arnaiz et al., 2004, 2005).

2.4. Marcadores microssatélites em Cactaceae

Otero-Arnaiz et al. (2004) desenvolveram os primeiros primers para *loci* SSR em cactáceas. Dez marcadores microssatélites foram desenvolvidos para o cacto colunar *Polaskia chichipe*, de importância ecológica e econômica para o México Central. Sete destes dez *loci* apresentaram polimorfismo, com número de alelos variando de dois a oito. O potencial dos sete primers polimórficos também foi testado para amplificar *loci* SSR das espécies *Carnigea gigantea*, *Lophocereus schottii*, *Pachycereus pringeli*, *Pilocereus lanuginosus*, *Subpilocereus reandus*, *Stenocereus thurberii*, e *S. stellatus*. O primer para o *locus Pchi25* de *P. 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 *loci* em *Lophocereus schottii* (Otero-Arnaiz et al., 2004). Os investigadores registraram que estes *loci* poderão ser úteis em estudos evolutivos, tais como fluxo gênico, e em programas de melhoramento (Otero-Arnaiz et al., 2004). Estudo para investigar o efeito da seleção artificial para obtenção de frutos comestíveis de *P. chichipe*, por exemplo, foi realizado em populações simpátridas cultivadas, selvagens e manejadas silviculturalmente (Otero-Arnaiz et al., 2005).

Terry et al. (2006) relataram o desenvolvimento de marcadores microssatélites polimórficos para o cacto ameaçado de extinção Norte-americano *Astrophytum asterias*. Seis *loci* de microssatélites, com média de 8,5 alelos por *locus*, 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* e poderão permitir a geração de dados adequados para estimar os parâmetros genéticos da

população, estrutura da população e o grau de endogamia nas populações pequenas e fragmentadas de *A. asterias* que existem atualmente.

Primers para microssatélites de espécies do gênero *Opuntia* também foram desenvolvidos por Helsen et al. (2007). O gênero *Opuntia* (figo da Índia) contém mais de 200 espécies, sendo seis delas endêmicas do Arquipélago de Galápagos e possuem papel importante na região. Helsen et al. (2007) desenvolveram 16 marcadores microssatélites para estudar a estrutura genética populacional de algumas destas espécies (*O. echios*, *O. zacana*, *O. galapageia* var. *macrocarpa*, *O. saxicola* e *O. megasperma*). Estes marcadores exibiram um alto nível de polimorfismo, com os números de alelos por *locus*, variando de seis a 53, o que tornam estes marcadores adequados para investigar a estrutura genética de populações destas espécies e, possivelmente, de outras espécies do gênero. Uma possível poliploidia também foi detectada nos resultados, o que é considerado importante no papel evolutivo.

Com o objetivo principal de ajudar na conservação de *Ariocarpus bravoanus*, Hughes et al. (2008) isolaram primers de microssatélites desta espécie, em vista que esta espécie encontra-se ameaçada de extinção e possui grande importância comercial no México. Os referidos investigadores caracterizaram oito *loci* polimórficos de microssatélites para *A. bravoanus* nos 23 indivíduos analisados, sendo vinte de uma população da região central de San Luis Potosí (México) e três indivíduos adquiridos no comércio.

Hardesty et al. (2008) caracterizaram 12 *loci* 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 12 primers 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. histrix*, *F. wislizenii*, *Grusonia aggeria*, *Hylocereus trigonus*, *Isolatocereus dumontieri*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Nopalea karwinskiana*, *Pachycereus pectin-aboriginoum*, *Pelecyphora adelliformis*, *Peniocereus cuixmalensis*, *Sclerocactus uncinatus*, *Stenocactus coptonogonus*, *Stenocereus standleyi*, *Strombocactus disciformis*, e *Turbincarpus flaviflorum*. O

primer para o *locus mEgR98* de *E. grusonii*, por exemplo, amplificou o DNA de somente sete das espécies testadas, mas o primer para o *locus mEg39* amplificou o DNA de 22 das espécies analisadas no estudo de Hardesty et al. (2008). Estes marcadores foram considerados úteis para análise da estrutura genética das populações de *E. grusonii* e ajudar na conservação da espécie.

Com o objetivo de analisar o nível de diversidade genética intra-específica e elucidar possíveis ambigüidades na classificação de diferentes espécies, Caruso et al. (2010) utilizaram seis *loci* polimórficos de SSR para estudar variedades cultivadas e silvestres de *O. indica* e outras espécies relacionadas de diferentes locais do mundo. Os seis primers de SSR, obtidos a partir de *O. echios*, demonstraram altos níveis de polimorfismos, com um número médio de 16,9 alelos por *locus*, ressaltando o alto grau de transferibilidade entre as espécies analisadas. As análises com SSR demonstraram que, embora a maioria das espécies selvagens de *Opuntia* esteja em grupos separados, os genótipos classificados como *O. amyclaea*, *O. megacantha*, *O. fuscicaulis*, *O. streptacantha* e *O. albicarpa* estão estritamente relacionados com variedades cultivadas de *O. ficus indica*. Outro dado importante obtido para *Opuntia* é que grande parte dos genótipos sem espinhos e que apresentam frutos carnosos possuem uma base genética muito estreita com perfis de microssatélites bastante semelhantes, principalmente em termos de número de alelos observados.

Possivelmente, o número restrito de análises genéticas em cactáceas com marcadores microssatélites deve-se a dificuldade na obtenção de SSR específicos. Para as diferentes espécies de cactáceas temos até o momento 69 microssatélites desenvolvidos (Quadro 1).

Quadro 1 - Marcadores microssatélites desenvolvidos para espécies de cactáceas

| <i>Loci</i> | Seqüência 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: GCCCTTCTAAGGCCATTTCT R: ATTCCGTGTCAAGATTGTGC | <i>Polaskia chichipe</i> | Otero-Arnaiz et al., 2004 |

Quadro 01, Cont...

| | | | |
|----------------------------------|--|--|---------------------------|
| <i>Pchi47</i> <i>AY147832</i> | F: GTCCTTGTGGCTAGCCCTTT R: CCATTTCTCTCGCCATCTG | <i>Polaskia</i> <i>chichipe</i> | Otero-Arnaiz et al., 2004 |
| <i>Pchi54</i> <i>AY147831</i> | F: CCTTGAGCTTTGACATTGAGA R: GGAAGGTTTTTCATTGGATGAG | <i>Polaskia</i> <i>chichipe</i> | Otero-Arnaiz et al., 2004 |
| <i>Pchi20</i> | F:GTGGCCGAGAAAGAAGTTTG R:AAAGGCCCAAATCATAAGCA | <i>Polaskia</i> <i>chichipe</i> | Otero-Arnaiz et al., 2005 |
| <i>Pchi50</i> | F: CCTGGGCAAACCTCTGTTTA R:GTTCCCAACTGACCGACAAC | <i>Polaskia</i> <i>chichipe</i> | Otero-Arnaiz et al., 2005 |
| <i>AaB6</i> | F:ATGCGAACAGATTGAAAAGAGGG R: CTCAGGAAAGACTTACACCATGG | <i>Astrophytum</i> <i>asterias</i> | Terry et al., 2006 |
| <i>AaH11</i> | F:GAAGAAACACTTCTGCAAGTAGATG R: GATTTCCATCACCATCTTGTGAGC | <i>Astrophytum</i> <i>asterias</i> | Terry et al., 2006 |
| <i>AaA3</i> | F:GCAAGCAAGAGTATGGTGAATTGG R:AGTTATTTTCACGGTAACACACATGG | <i>Astrophytum</i> <i>asterias</i> | Terry et al., 2006 |
| <i>AaC3</i> | F: ACTAATATCATGCTGCGTCGTTAG R: ACGGTCCAGTCACATAACATTCC | <i>Astrophytum</i> <i>asterias</i> | Terry et al., 2006 |
| <i>AaD9</i> | F: CTGTTTAGTTCTCTCGTCTTCACC R: CTCCGCTTTTACTGCTAGCACC | <i>Astrophytum</i> <i>asterias</i> | Terry et al., 2006 |
| <i>AaG3</i> | F: TAACAGAGAATCCAAGGCTTTTCC R: AATCGCCAGCCGAGGGAGAC | <i>Astrophytum</i> <i>asterias</i> | Terry et al., 2006 |
| <i>mAbR05</i> | F: AATAGGGACAGTGAGGGATT R: TCTTCTCATGAGCCTTGTCG | <i>Ariocarpus</i> <i>bravoanus</i> | Hughes et al., 2008 |
| <i>mAbR28</i> | F: CCATAAGCTGTGGTGGGTCT R: ATTTTAAAGCTCCCCCTCCA | <i>Ariocarpus</i> <i>bravoanus</i> | Hughes et al., 2008 |
| <i>mAbR40</i> | F: TTTAATGCGGAGGAAGTTGG R: GCTCAAAGTCTCTCCGTTAATGA | <i>Ariocarpus</i> <i>bravoanus</i> | Hughes et al., 2008 |
| <i>mAbR42</i> | F: GGGCAATTCACATGACAAA R: TTGTCCACCTTCCCTATTG | <i>Ariocarpus</i> <i>bravoanus</i> | Hughes et al., 2008 |
| <i>mAbR77</i> | F: CGGGGAAGGAATAATCCAAG R: ATGTGCCGTTTGCAATCTTT | <i>Ariocarpus</i> <i>bravoanus</i> | Hughes et al., 2008 |
| <i>mAbR82</i> | F: TTCCATCCTGGAGTTTAGGG R: GAAAACATTTCAAGTGCAACACA | <i>Ariocarpus</i> <i>bravoanus</i> | Hughes et al., 2008 |
| <i>mAbR86</i> | F: TTGCAACTTGGGCATCAGTA R: GGCAGCTCAACTCCAGAGAC | <i>Ariocarpus</i> <i>bravoanus</i> | Hughes et al., 2008 |
| <i>mAbR91</i> | F: CGACATCAAGTTGCACCATC R: TCAGGAGTTGCTTGATGGAA | <i>Ariocarpus</i> <i>bravoanus</i> | Hughes et al., 2008 |
| <i>mEgR39</i> | F: GAGCGCAGAATTGAGGTG R: GATGTGGCATTTCAGAC | <i>Echinocactus</i> <i>grusonii</i> | Hardesty et al., 2008 |
| <i>mEgR02</i> | F: TGGGTTGGAGAAGTGGAAG R: CGGTGTGAGGCTTCATTTG | <i>Echinocactus</i> <i>grusonii</i> | Hardesty et al., 2008 |
| <i>mEgR17</i> | F: ATCGTTGAAAGAGGCGAAA R: TCCCTCTTCTTCGTGAGAGC | <i>Echinocactus</i> <i>grusonii</i> | Hardesty et al., 2008 |

Quadro 01, Cont...

| | | | |
|---------------|---|---------------------------------------|-----------------------|
| <i>mEgR63</i> | F: TTGAATTGGGTGCTTCACTG R: CCCTAAATATGCTGCCGATG | <i>Echinocactus grusonii</i> | Hardesty et al., 2008 |
| <i>mEgR76</i> | F: TCACAATTTGGAAGGAAGCA R: GTGAGCAAAGGGCTGATTTTC | <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: GTCGCCCCAGAACCCTAGTCT | <i>Echinocactus grusonii</i> | Hardesty et al., 2008 |
| <i>mEgR99</i> | F: GCTACTCGTGGTTGTGGTGA R: CTGCCGTTCTCTCTCTGCTC | <i>Echinocactus grusonii</i> | Hardesty et al., 2008 |
| <i>mEgR51</i> | F: TGGCATAGAGGTGGTGACTG R: GCCAAATAAAATTTGAGCCATT | <i>Echinocactus grusonii</i> | Hardesty et al., 2008 |
| <i>mEgR68</i> | F: GGTAGCCATTCGTCATCAGC R: GTCCCGGTACTCGTTCTCTCT | <i>Echinocactus grusonii</i> | Hardesty et al., 2008 |
| <i>mEgR70</i> | F: ATGTTGCCAGAAACACTTCG R: GCAAATTAAGGGTTCTCTTGG | <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: CACCCCTTCTCTCTCTCTCT | <i>Haageocereus tenuis</i> | Arakaki et al., 2010 |
| <i>Ht.lc</i> | F: ATCCCAATTTCTTGCCCTCCT 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 |
| <i>Ht.IIa</i> | F: CATGAATTGAAAGCCACACG R: CTTGCACTGCATAGTTGGA | <i>Haageocereus tenuis</i> | Arakaki et al., 2010 |
| <i>Hp.IVa</i> | F: CGACAAACCTTGTCTCTTG R: AGGTCCGACTGGTCCTAACC | <i>Haageocereus pseudomelanostele</i> | Arakaki et al., 2010 |
| <i>Hp.IVc</i> | F: AACCCCTTGCAATAAGCTCCA R: AATGGCAACGAAAGGAGAGA | <i>Haageocereus pseudomelanostele</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: TCAATGTCGTTTCTAAACATGAA | <i>Haageocereus tenuis</i> | Arakaki et al., 2010 |
| <i>Ht.ms7</i> | F: TTCCCATGACTGCCCTTAG R: CTGTCCATTTAGCCCCAGAA | <i>Haageocereus tenuis</i> | Arakaki et al., 2010 |

Quadro 01, Cont...

| | | | |
|------------------|--|----------------------------|----------------------|
| <i>Ht.ms8</i> | F: ACCCTTGCTGTTTGTGTGG R: CCTCCTGCGAAGAAAGAGAA | <i>Haageocereus tenuis</i> | Arakaki et al., 2010 |
| <i>Ht.ms9</i> | F: TACGGTTTGGGTTTTGGAC 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> | Arak et al., 2010 |
| <i>Opuntia1</i> | F: Cy5-CCATCTACTTCCCACCTTTGC 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-CGTGATCTGACTCACACC | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |
| <i>Opuntia5</i> | F: Cy5-TATGCACAAAGCACCATGC R: GTTTCAACCATAACCAACTGACTGAC | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |
| <i>Opuntia6</i> | F: Cy5ATCTCATTGTATCATCTATTTCTCTG R: GTTTAGCACAAAGACACTTCATCG | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |
| <i>Opuntia8</i> | F: Cy5-ACCGCCATCACCAGCTATC 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:GTTTCATGCTTCATCTTGTTCATTGG | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |
| <i>Opuntia11</i> | F: Cy5-CCTACACCTGCTGCCAATC R:GTTTCGAGACAAACATCAGAGGAG | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |
| <i>Opuntia12</i> | F: Cy5TAATCTTATTCTCAGGTCAGTTAC R: GTTT-GGTATCTTGTTATTTCGTTCCG | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |
| <i>Opuntia13</i> | F: Cy5-CCAAATACCCAGCCCATAC R: GTTT-GAGAACCTAACTTCCGATG | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |
| <i>Opuntia14</i> | F: Cy5-TCAGGATTCAAGAAGATTGTC R: GTTT-GATTCAATTGATGATGGGC | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |
| <i>Opuntia15</i> | F: Cy5-GCGGTGGAAGCAGTTAGG R: GTTT-CAGTCGATCATACCCAAGG | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |
| <i>Opuntia16</i> | F: Cy5-GTCAATCCCAGCAATTTAGG R: GTTT-TCATTAGTGAGGCCCAACG | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |
| <i>Opuntia21</i> | F: Cy5-AAAGGGAAGACCTTGCTCTC R: GTTT-CTATTCTCAGCCCTCCTCTC | <i>Opuntia echios</i> | Helsen et al., 2007 |

2.3. Transferibilidade de loci microssatélites

A transferibilidade de primers microssatélites é uma alternativa para quando não se possui primers específicos para a espécie de interesse, uma vez que esta técnica 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 da utilização 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 *locus* ou poucos *loci* e ser polimórfico em outras espécies (Mnejja et al., 2010).

A principal desvantagem de marcadores SSR é o seu desenvolvimento, que consome muito tempo, além de ser um trabalho moroso e de custos elevados. No entanto, uma vez desenvolvidos, estes podem ser utilizados para uma variedade de fins e, com frequência, em diferentes espécies. Além disso, recentemente foram criadas técnicas para facilitar o desenvolvimento desses marcadores e reduzir seus custos. Eles podem ser obtidos tanto de bibliotecas genômicas como a partir de ESTs (Bouck; Vision, 2007).

A transferibilidade de *loci* heterólogos pode ser extremamente alta quando realizada em espécies ou gêneros taxonomicamente relacionados. Dependendo de sua localização (se o *locus* está ou não presente em uma região codante do genoma) esta taxa pode ser ainda maior (Oliveira et al., 2006). Quando as espécies envolvidas na transferibilidade são proximamente relacionadas, têm-se maior chance de partilhar sítio de ligação de primers microssatélites do que em espécies menos próximas, mas é possível transferir primers funcionais mesmo entre espécies mais distantes (Lorieux et al., 2000).

Resultados satisfatórios com a utilização de primers heterólogos foram observados em diversos trabalhos, entre espécies do mesmo gênero (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). Em termos gerais, o grau de transferibilidade está relacionado com o grau de divergência evolutiva entre diferentes seções e subgêneros, ou seja, geralmente a amplificação heteróloga exibe mais êxito quando é realizada dentro do mesmo gênero ou em gêneros filogeneticamente mais próximos.

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) obteve sucesso na transferência de primers SSR de *Tabebuia aurea* para *T. ochracea*, *T. serratifolia*, *T. impetiginos* e *T. roceo-alba*. Ciampi et al. (2008) desenvolveu microssatélites para *Hymenaea courbaril* e utilizou com sucesso em *Hymenaea stigonocarpa*.

Martins (2005) obteve sucesso no uso de primers heterólogos desenvolvidos para *Capsicum* e utilizados para amplificar o DNA de *Solanum lycocarpum*. Em cereais, a transferibilidade observada entre diferentes gêneros como, *Triticum* spp., *Hordeum vulgare*, *Sacale cereale*, *Oryza stiva* e *Zea mays*, variou de 43,5% a 74% (Yildirim et al., 2009). Foram testados 18 primers microssatélites desenvolvidos para *Euterpe edulis* na espécie *Euterpe oleracea*. Desses, sete apresentaram produtos de amplificação polimórficos e claramente interpretáveis (Gaiotto, 2001).

Vários autores utilizaram primers heterólogos em espécies de cactáceas. Hardesty et al. (2008), ao caracterizarem *loci* polimórficos de SSR a partir de *Echinocactus grusonii*, obteve uma taxa de transferibilidade variando de 7,4% a 81% em vinte e sete espécies distintas de cactos. No trabalho realizado por Otero-Arnaiz et al. (2004), estes autores descrevem que 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 SSR em estudos filogenéticos de cactáceas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Os somaclones foram regenerados a partir de calos formados por apenas seis explantes (Oliviera et al., 1995). As plantas regeneradas *in vitro*, os somaclones (R_0) de *Cereus peruvianus*, estão plantadas no Jardim Experimental Didático da Universidade Estadual de Maringá, desde 1997.

O DNA genômico foi extraído de fragmentos de caule dos somaclones R_0 (também denominados S), que apresentam morfologias atípicas (costelas formando sulcos irregulares), morfologia mista (costelas lineares e formando sulcos irregulares) e morfologia típica (costelas formando sulcos regulares e disposição linear das aréolas).



Figura 1 - Somaclones de *Cereus peruvianus*, que estão plantadas no Jardim Experimental Didático da Universidade Estadual de Maringá, desde 1997. I representa um caule de morfologia típica; II de morfologia atípica; III caule de morfologia mista.

3.2. Extração do DNA

Para extração do DNA foi utilizado o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999), com modificações referentes à concentração de NaCl, incubação com RNase e etapa adicional de purificação com clorofórmio:isoamílico (24:1) implementadas por Resende (2006) (Quadro 2).

Em um microtubo (2 mL), foram adicionados 200mg de tecido do caule, previamente macerados com nitrogênio líquido, 500 μL de tampão de extração e 100 μL de cada um dos reagentes de solubilização de membranas e antioxidantes (Quadro 2). Os microtubos foram agitados para homogeneização e incubados em banho-maria durante uma hora a 55 °C, realizando-se agitações suaves a cada 15 minutos. Após esta etapa, os microtubos foram deixados por cinco minutos em temperatura ambiente para esfriar. Em seguida, foram adicionados 900 μL da solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 e os microtubos foram agitados suavemente durante cinco minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 12.000 r.p.m. em temperatura ambiente. O sobrenadante foi recuperado e transferido para outro microtubo (1,5 mL) e adicionado 2 μL RNase (10 mgmL^{-1}). Estes foram mantidos em temperatura ambiente por duas horas para a digestão do RNA. Após o período de incubação com RNase, foram adicionados 900 μL de uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e os microtubos foram agitados durante cinco minutos, repetindo-se o mesmo processo de centrifugação descrito anteriormente. O sobrenadante foi novamente coletado e transferido para outro microtubo (1,5 mL) onde foram adicionados um volume de isopropanol e 0,16 volumes de cloreto de sódio (5M), a fim de precipitar o DNA. Em seguida, os tubos foram mantidos *overnight* a -20 °C. Após este período, foi efetuada uma centrifugação por 20 minutos, 12.000 r.p.m a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70% gelado por duas vezes, com a realização de centrifugações por 20 minutos, a 12.000 r.p.m e a 4°C entre as lavagens. Após a segunda lavagem com etanol 70%, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi seco e ressuspendido em 50 μL de TE (0,0004 M Tris/HCl e 0,0002M EDTA pH 8,0) por 2 horas em temperatura ambiente. Os tubos foram vedados com filme plástico e armazenados em geladeira a 4 °C.

Quadro 2 - Protocolo utilizado para a extração de DNA de tecidos de caules de *Cereus peruvianus*, segundo Aljanabi et al. (1999)

| | |
|---|--------------------------------|
| Tampão de extração | |
| Tris-HCL | 200 mmolL ⁻¹ pH 8,0 |
| EDTA | 100 mmolL ⁻¹ pH 8,0 |
| NaCl | 2,2 molL ⁻¹ |
| 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 (25:24:1) | 900 µL |
| RNAse (10mg/mL) | 20ng/ µL |
| Clorofórmio: Álcool isoamílico (24:1) | 900 µL |
| Reagentes de Precipitação | |
| Isopropanol gelado | 1 volume |
| NaCl (5 mol/L) | 0, 16 volume |
| Lavagem do precipitado | |
| Álcool (70%) (2x) | 500 µL |

3.3. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris-Acetato 0,04 M e EDTA 0,001M) submetido a 80 Volts por aproximadamente 1h (Hoisington et al., 1994). O DNA extraído de cada amostra foi comparado com soluções de DNA padrão (Fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas de 50, 100 e 150 ng. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio contendo 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a imagem foi capturada por um sistema de fotodocumentação L-PIX HE, Loccus biotecnologia.

3.4. Testes de transferibilidade

Foram selecionados e testados 33 pares de primers heterólogos dos 69 descritos na literatura para cactáceas (Quadro 3), para a escolha dos marcadores polimórficos entre as populações de *C. peruvianus* a serem avaliadas. Os 33 pares

de primers testados foram isolados de quatro espécies de cactos: 7 foram isolados da espécie *Polaskia chichipe*, 6 de *Astrophytum asterias*, 8 de *Ariocarpus bravoanus* e doze de *Echinocactus grusonii* (Quadro 1). Inicialmente, todos os primers foram amplificados utilizando um programa *Touchdown* (Don et al., 1991) (Quadro 4). Os primers que não amplificaram produtos nítidos foram novamente amplificados com o programa descrito por Albert e Schmitz (2002) (Quadro 5), alterando a temperatura de anelamento entre 50 - 59°C, visando obter maior aproveitamento e nitidez nos produtos da amplificação.

Após os testes, nove pares de primers amplificaram regiões específicas mais nítidas e polimórficas. Os primers que após estes testes não amplificaram fragmentos específicos foram descartados das análises (Quadro 3).

Quadro 3 - Condições de amplificação testadas para os 33 pares de primers de cactáceas, nas três populações de *Cereus peruvianus* utilizando diferentes números de ciclos e temperaturas de anelamento

| Primer | Autores | Testes com diferentes programas e temperaturas de anelamento | Programas e temperaturas de anelamento utilizados nos primers |
|---------------------------|---------------------------|--|---|
| <i>Pchi5</i> AY147840 | Otero-Arnaiz et al., 2004 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schmitz (2002): 50°C. | |
| <i>Pchi9</i> AY147838 | Otero-Arnaiz et al., 2004 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schmitz (2002): 52°C. | |
| <i>Pchi21</i> AY147837 | Otero-Arnaiz et al., 2004 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991) | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991). |
| <i>Pchi25</i> AY147836 | Otero-Arnaiz et al., 2004 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schmitz (2002): 50°C, 52°C. | |
| <i>Pchi44</i> AY147834 | Otero-Arnaiz et al., 2004 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schmitz (2002): 52°C, 53°C. | |
| <i>Pchi47</i> AY147832 | Otero-Arnaiz et al., 2004 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schmitz (2002): 50°C, 53°C. | Albert e Schmitz (2002): 53°C. |
| <i>Pchi54</i> AY147831 | Otero-Arnaiz et al., 2004 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schmitz (2002): 50°C, 52°C. | Albert e Schmitz (2002): 52°C. |
| <i>AaB6</i> | Terry et al., 2006 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schmitz (2002): 52°C. | |
| <i>AaH11</i> | Terry et al., 2006 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schmitz (2002): 50°C, 52°C. | |
| <i>AaA3</i> | Terry et al., 2006 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schmitz (2002): 57°C, 53°C. | |
| <i>AaC3</i> | Terry et al., 2006 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schmitz (2002): 50°C. | |

Quadro 3, Cont...

| | | | |
|---------------|-----------------------|--|---|
| <i>AaD9</i> | Terry et al, 2006 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C, 53°C. | |
| <i>AaG3</i> | Terry et al, 2006 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 52°C. | |
| <i>mAbR05</i> | Hughes et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C. | |
| <i>mAbR28</i> | Hughes et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 52°C, 53°C. | Albert e Schimitz (2002): 52°C. |
| <i>mAbR40</i> | Hughes et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 52°C. | |
| <i>mAbR42</i> | Hughes et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C, 52°C. | Albert e Schimitz (2002): 52°C. |
| <i>mAbR77</i> | Hughes et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 52°C. | Albert e Schimitz (2002): 52°C. |
| <i>mAbR82</i> | Hughes et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002) :50°C, 52°C, 53°C. | |
| <i>mAbR86</i> | Hughes et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C, 52°C. | |
| <i>mAbR91</i> | Hughes et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 52°C, 53°C. | |
| <i>mEgR02</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 52°C, 53°C. | Albert e Schimitz (2002): 52°C. |
| <i>mEgR17</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C. | |
| <i>mEgR39</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C, 52°C, 53°C. | |
| <i>mEgR63</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C, 52°C. | |
| <i>mEgR76</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991). | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991) |
| <i>mEgR73</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C, 52°C, 53°C. | |
| <i>mEgR78</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C, 52°C, 53°C. | Albert e Schimitz (2002): 52°C. |
| <i>mEgR98</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 52°C. | |
| <i>mEgR99</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C, 52°C, 53°C, 55°C, 59°C. | |
| <i>mEgR51</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 52°C, 53°C. | |
| <i>mEgR68</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 52°C. | |
| <i>mEgR70</i> | Hardesty et al., 2008 | <i>Touchdown PCR</i> (Don et al., 1991); Albert e Schimitz (2002): 50°C, 52°C. | |

Quadro 4 - Sequência do programa *Touchdown* utilizado para amplificação do DNA de *Cereus peruvianus* com os 33 primers microssatélites

| Passo | Etapa | Temp. | Tempo |
|-------|------------------------------|-------------------|--------|
| 1 | Desnaturação inicial | 94°C | 1 min. |
| 2 | Desnaturação | 94°C | 1 min. |
| 3 | Anelamento | 65°C (-1°C/Ciclo) | 1 min. |
| 4 | Extensão | 72°C | 2 min. |
| 5 | Voltar ao passo 2 – 9 vezes | ----- | ----- |
| 6 | Desnaturação | 94°C | 1 min. |
| 7 | Anelamento | 55°C | 1 min. |
| 8 | Extensão | 72°C | 2 min. |
| 9 | Voltar ao passo 6 – 19 vezes | ----- | ----- |
| 10 | Extensão Final | 72°C | 2 min. |
| 12 | Imersão | 10°C | ∞ |

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foi realizada em termociclador Techne TC-512. As reações de amplificação foram preparadas com 20 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 Foward e Reverse, em volume final de 20 μl (Quadro 6).

Quadro 5 - Sequência do programa segundo Albert e Schmitz (2002), utilizado para amplificação do DNA de *Cereus peruvianus* com os primers microssatélites que não apresentaram amplificação com o programa do Quadro 4

| Passo | Etapa | Temp. | Tempo |
|-------|---|-------|-------|
| 1 | Desnaturação inicial | 94°C | 120 s |
| 2 | Desnaturação | 94°C | 30 s |
| 3 | Anelamento | 54°C | 30 s |
| 4 | Extensão | 72°C | 60 s |
| 5 | Voltar aos passos 2, 3 e 4 por 29 vezes | | |
| 6 | Extensão final | 72°C | 600 s |
| 7 | Imersão | 10°C | ∞ |

Quadro 6 - Concentrações dos reagentes estoques e utilizados nas reações de amplificação

| Reagentes | Concentração estoque dos reagentes | Concentração final dos reagentes/reação | $\mu\text{L}/20 \mu\text{L}$ de reação |
|-------------------|------------------------------------|---|--|
| H ₂ O | | | 11,0 |
| Tampão | 10 X | 1 X | 2,0 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 2,5 mM | 2,0 |
| dNTPs | 2,5 mM/cada | 0,1 mM/cada | 0,8 |
| Primer (F) | 10 μM | 0,5 μM | 1,0 |
| Primer (R) | 10 μM | 0,5 μM | 1,0 |
| Taq-DNA | 5 U/ μL | 1 U | 0.2 |
| Polimerase | | | |
| DNA | 10 ng/ μL | 20 ng | 2,0 |
| Total | | | 20 μL |

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose Metaphor (4%), usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Este gel foi preparado com 50% de agarose Metaphor e 50% de agarose comum. A eletroforese foi realizada com 60 Volts por 3 horas. Em seguida, os géis foram corados em solução com brometo de etídio contendo 0,5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e a imagem foi capturada em sistema de fotodocumentação L-PIX HE, Loccus biotecnologia. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular *DNA Ladder* de 100 pb (Invitrogen).

3.5. Análise dos dados

Os loci SSR foram analisados estimando-se o número médio de alelos por *locus*, a heterozigosidade média observada (H_o) e a esperada (H_e). O afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi examinado para cada *locus* e para cada população de *Cereus peruvianus*. O coeficiente de endogamia (F_{is}), déficit de heterozigotos (F_{IT}) e a diversidade genética entre as populações (F_{ST}) foram estimados empregando-se o 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).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Transferibilidade de primers

Entre os 33 primers microssatélites avaliados, dez não amplificaram em nenhuma das condições testadas, 14 geraram fragmentos inespecíficos e nove pares de primers amplificaram regiões específicas e foram polimórficos (Quadro 7). A transferibilidade de microssatélites desenvolvidos para diferentes gêneros de cactáceas para *C. peruvianus* foi de 27,27%.

Três dos 7 primers microssatélites testados de *Polaskia chichipe* amplificaram o DNA de *C. peruvianus*, obtendo uma transferibilidade de 42,86%; dos microssatélites desenvolvidos para *Ariocarpus bravoanus* 3 dos 8, ou seja 37,5% amplificaram o DNA de *C. peruvianus*; 3 dos 6 primers de *Echinocactus grusonii* foram transferidos para *C. peruvianus* (25%) e nenhum dos 6 primer microssatélite isolado para *Astrophytum asterias* amplificou o DNA de *C. peruvianus* (Quadro 7).

O empenho em empregar microssatélites para o estudo de diversidade de *C. peruvianus* deve-se ao fato de que este marcador, devido às suas características de co-dominância, multialelismo e alto polimorfismo pode ser considerado como uma ferramenta ideal para auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação sustentável, onde é vital o conhecimento da variação genética e do grau de diferenciação dentro e entre populações naturais (White e Powell, 1997). Entretanto o isolamento de microssatélites é um processo demorado e caro e ainda em plantas a frequência de SSR é relativamente baixa (Powell et al., 1996). Por isso, a tentativa de utilizar seqüências de primers identificadas em uma espécie, para outra espécie intimamente relacionada, é um processo vantajoso (White e Powell, 1997).

A amplificação de primers SSR entre espécies depende da conservação das seqüências flanqueadoras às regiões repetitivas e que são utilizadas como primers. 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 apresentam um tempo de divergência entre 15-25 milhões de anos, comparada a apenas 6,2% em 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. Isto confirma que a eficiência da utilização de primers heterólogos está mais relacionada à taxa de evolução molecular do que ao tempo de divergência entre as espécies (Moore et al., 1991; Primmer et al., 1996).

Quadro 7 - Conjunto de todos os primers microsatélites transferíveis a partir de quatro espécies de cactáceas, repetições de nucleotídeos, variação no tamanho do alelo (pb), número de alelos detectados por cada primer usado na estimativa da diversidade genética e porcentagem de transferibilidade para *Cereus peruvianus*

| Espécie | Primer | Repetição | Variação no tamanho do alelo (pb) | | Número de alelos obtidos para a espécie original | Número de alelos obtidos para <i>C. peruvianus</i> | transferibilidade (%) |
|------------------------------|---------------|--|-----------------------------------|--------------------------|--|--|-----------------------|
| | | | Espécie de origem | <i>Cereus peruvianus</i> | | | |
| <i>Polaskia chichipe</i> | <i>Pchi21</i> | (AG) ₁₀ (AAG) ₂ C(CA) ₂ | 120–134 | Menor que 100 | 6 | 2 | |
| | <i>Pchi47</i> | (TC) ₁₀ | 120 | 136-172 | 2 | 3 | 42,86% |
| | <i>Pchi54</i> | (AG) ₄ CG(AG) ₁₁ | 158–182 | 446-464 | 8 | 2 | |
| <i>Ariocarpus bravoanus</i> | <i>mAbR28</i> | (CT) ₅ (AT) ₃ (GT) ₈ GA(GT) ₅ | 207–222 | 103-176 | 6 | 4 | |
| | <i>mAbR42</i> | (TG) ₁₅ | 196-217 | 469-484 | 6 | 2 | 37,5% |
| | <i>mAbR77</i> | (CA) ₅ CG(CA) ₅ TG(CA) ₂₂ (TA) ₃ | 346–374 | 355-371 | 4 | 2 | |
| <i>Echinocactus grusonii</i> | <i>mEgR02</i> | (AG) ₇ | 260–280 | Menor que 100 | 2 | 3 | |
| | <i>mEgR76</i> | (AG) ₁₀ AC(AG) ₂ AC(AG) ₇ | 376–396 | 368-395 | 7 | 2 | 25% |
| | <i>mEgR78</i> | (AG) ₁₃ GAG(CA) ₃ | 148–242 | 250-288 | 2 | 3 | |
| <i>Astrophytum asterias</i> | - | - | - | - | 0 | 0 | 0% |
| TOTAL | | | | | | 43 | |

Das quatro espécies de cactáceas das quais foram obtidos os nove pares de primers heterólogos para *C. peruvianus*, os pertencentes à *Polaskia chichipe* foram os que exibiram maior transferibilidade, 42,86%. O primer *Pchi21* também foi transferível para outras cinco espécies de cactáceas: *Carnegiea gigantea*, *Lophocereus schottii*, *Subpilocereus repandus*, *Stenocereus thurberri* e *S. stellatus* (Otero-Arnaiz et al., 2004). O primer *Pchi47*, foi transferível apenas para *C. gigantea* e *L. schottii* e o primer *Pchi54* foi transferível para três outras espécies de cactáceas, *Carnegiea gigantea*, *Lophocereus schottii* e *Stenocereus thurberri* (Otero-Arnaiz et al., 2004).

Os primers *mAbR28*, *mAbR42* e *mAbR77*, desenvolvidos a partir de *Ariocarpus bravoanus* e que tiveram uma transferibilidade para *C. peruvianus* de 37,5%, produziram um total de oito alelos.

Dos 12 primers isolados para espécie *Echinocactus grusonii*, três, *mEgR02*, *mEgR76* e *mEgR78* amplificaram no genoma de *C. peruvianus*. Essa transferibilidade (25%) foi superior 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). Esses valores baixos de amplificação heteróloga, entre gêneros, sugerem que as regiões flangeadoras de repetições não são altamente conservadas entre estes grupos taxonômicos. O primer *mEgR76* também foi transferível para outras 14 espécies de cactáceas sendo, entre todos os primers descrito por Hardesty et al. (2008) para *E. grusonii*, o segundo primer mais transferível em vinte e sete espécies de cactos (Hardesty et al., 2008). Esse primer produziu apenas dois alelos em regenerantes clonais de *C. peruvianus* e três em plântulas da mesma espécie. Estes números de alelos são bem menores do que o número produzido na espécie de onde ele foi isolado, onde foram amplificados sete alelos (Hardesty et al., 2008). O número reduzido de alelos em *C. peruvianus*, produzidos pelos primers transferidos a partir de *A. bravoanus* e de *E. grusonii*, é muito comum na transferência de primers microsatélites entre gêneros distintos (Santos et al., 2007).

É interessante destacar que a maior porcentagem de transferibilidade para *C. peruvianus* (42,86%) foi observada usando os primers de *P. chichipe*, endêmico do México Central, e que assim como *C. peruvianus*, trata-se de um cacto colunar, com alta importância econômica devido aos seus frutos que são comestíveis e com interesse para a indústria de alimentos (Carmona e Casas, 2005). As espécies *A.*

bravoanus e *E. grusonii*, onde foram observadas as menores taxas de transferibilidades (37,5 e 25%, respectivamente), também são nativas do México Central, mas apresentam uma morfologia bem diferenciada de *C. peruvianus*. O cacto *A. bravoanus* possui o caule em forma de roseta e as plantas de *E. grusonii* possuem o caule em forma de barril ou globular (popularmente conhecido como cacto barril dourado ou bola de ouro). Embora não seja possível estabelecer alguma relação entre morfologia de plantas e uma maior, ou menor, taxa de transferibilidade de primers para loci SSR em cactos, a espécie *P. chichipe* apresenta várias sinonímias e dentre elas *Cereus chichipe* e *Cereus mixtecensis*. Isso é um indicativo de que *P. chichipe* foi classificada por alguns autores como do gênero *Cereus* e, portanto, da maior proximidade entre as espécies *P. chichipe* e *C. peruvianus*. Esta maior proximidade de *C. peruvianus* com *P. chichipe* poderia justificar a maior transferibilidade dos primers SSR de *P. chichipe*, quando comparada com a menor transferibilidade dos primers SSR de *A. bravoanus* e *E. grusonii*, para *C. peruvianus*.

As freqüências de amplificação heterólogas dentro da família Cactaceae, são bem maiores do que as freqüências de transferibilidade de locus SSR dentro da família Myrtaceae, que foi de apenas 2,9% de *Eucalyptus* spp. para *Eugenia dysenterica* (Zuchi et al., 2002b). Mas a transferibilidade observada no presente trabalho com *C. peruvianus* foi menor do que a obtida para a família Sapindaceae que foi de 58,3% (Ekué et al., 2009), para a família Fagaceae foi de 47% (Barreneche et al., 2004) e para Meliaceae foi de 68,2% (Zuchi et al., 2002). Segundo Barbará et al. (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, o sucesso de amplificação entre espécies podem ser observadas tanto em plantas como em animais. Wu e Tanksley (1993) encontraram conservação de seqüências entre subespécies de arroz cultivadas e espécies selvagens relacionadas. Thomas e Scoot (1993) acharam similar conservação de seqüências em espécies de uva; a conservação de seqüências também foi observada em *Brassica carinata* e espécies relacionadas (Márquez-Lema et al., 2010); em *Phyllostachys pubescens* e seis espécies relacionadas (Tang et al., 2010); dentro do complexo *Saccharum* (Parida et al., 2009); e para o gênero *Eucalyptus* (Faria et al., 2010). 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 (Varshney et al., 2005).

Segundo Weising et al. (2005), a porcentagem de transferibilidade de primers entre gêneros diferentes é baixa, cerca de 35,2%. Nossos resultados neste trabalho indicam uma transferência de primers entre gêneros distintos pertencentes à família Cactaceae de 27,27%. Este é um resultado satisfatório e importante, uma vez que há grandes dificuldades para o desenvolvimento de microssatélites para esta família, pois este processo requer algumas etapas como a construção de bibliotecas genômicas e sequenciamento do DNA, sendo que estas etapas são muito laboriosas e demoradas.

4.2. Diversidade genética

A pequena quantidade de indivíduos heterozigotos encontrados nas populações de *C. peruvianus* analisadas com os nove *loci* para microssatélites, em relação aos valores estimados para as outras espécies de cactos colunares, pode ser justificada por se tratarem de regenerantes clonais. Os somaclones foram regenerados a partir de calos formados por apenas seis explantes (Oliviera et al., 1995); o número reduzido de genótipos fundadores de uma população pode determinar um número reduzido de alelos e/ou de heterozigotos nas populações formadas. É possível que as estimativas de indivíduos heterozigotos sejam maiores em populações casualmente estabelecidas na natureza a partir de sementes dispersas por pássaros, 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).

Nove pares de primers foram utilizados para a avaliação da diversidade genética de plantas de *C. peruvianus* regeneradas *in vitro* (Figura 1). Estas plantas apresentam diferentes morfologia de caules típica (originalmente observada em plantas na natureza), morfologia atípica, diferente da morfologia observada em plantas na natureza e caules com morfologia mista (típica e atípica). Estes pares de primers, suas seqüências e o número de alelos produzidos para *C. peruvianus* estão

apresentados no Quadro 7, junto com o número de alelos para cada *locus* produzido originalmente para a espécie de onde foram isolados.

A análise dos nove *loci* microssatélites em *C. peruvianus* no presente estudo resultou na amplificação de 23 alelos, com uma média de 2,56 alelos por *locus* polimórfico. Para os *loci* *Pchi21*, *Pchi54*, *mAbR42*, *mAbR77* e *mEgR76* foram amplificados dois alelos, os *loci* *Pchi47*, *mEgR02* e *mEgR78*, três alelos. O *locus* *mAbR28* foi o único que amplificou quatro alelos (Quadro 7). Vinte e três alelos para os nove *loci* é um número relativamente alto, tratando-se de regenerantes clonais, isto é, todos os indivíduos da população analisada regeneraram a partir de calos de uma mesma planta. No gênero *Opuntia*, que foi analisada com 19 primers SSR, o número médio de alelos por *locus* foi de 16,9 (Caruso et al., 2010); em *Astrophytum asterias*, foi observada uma média de 8,5 alelos por *locus* (Terry et al., 2006); já em *Polaskia chichipe*, a média de alelos observados por *locus* analisado foi de 5,28 (Otero-Arnaiz, et al., 2004); em *Ariocarpus bravoanus*, a quantidade média de alelos por *locus* foi de 5,62 (Hughes et al., 2008) e em *Echinocactus grusonii*, foi observado uma média de apenas 3,33 alelos por *locus* (Hardesty et al., 2008).

A transferabilidade de primers é um fator que influencia o número de alelos para os microssatélites, as diferenças na taxa de polimorfismo e conseqüentemente, no conteúdo de informação genética. Além disto, também estão relacionadas com o conjunto de repetições de dinucleotídeos e trinucleotídeos dos microssatélites. É esperado que uma maior taxa de mutação ocorra para as seqüências com repetições menores (Chakraborty et al., 1997). Estes autores sugerem que repetições de dinucleotídeos para microssatélites são mais hipervariáveis do que as de trinucleotídeos. Para Vigouroux et al. (2002), este é um fenômeno muito comum para as espécies vegetais, pois as seqüências de dinucleotídeos apresentam quase o dobro de alelos para os *loci* entre as espécies.

No presente estudo, para o *locus* *mAbR28*, que é uma repetição (AG)⁷, foram amplificados quatro alelos. Entretanto, nos *loci* *mAbR42* [(TC)¹⁰] e *Pchi47* [(TG)¹⁵], também com repetições de dinucleotídios, o número de alelos observado foi de dois e três alelos, respectivamente, indicando que no genoma de *C. peruvianus* as repetições de dinucleotídeos para microssatélites não são mais hipervariáveis do que as de trinucleotídeos ou os demais tipos de repetições (Quadro 7). Faria et al. (2010) trabalhando com eucaliptos, comparando os microssatélites obtidos de EST e derivados de seqüências não gênicas, produzidos a partir de bibliotecas genômicas,

observaram que o número médio de alelos e as heterozigosidades observadas e esperadas são significativamente mais baixas para os dinucleotídeos e ainda mais baixas para os microssatélites com repetições de trinucleotídeos. Por exemplo, embora a média global do número de alelos para os 10 *loci* microssatélites com repetições de dinucleotídeos, para todas as seis espécies de eucaliptos tenha sido de 8,3, e de 5,5 para os trinucleotídeos, o número médio de alelos de microssatélites dinucleotídeos a partir de bibliotecas enriquecidas foi de 14,3 (Brondani et al., 2006).

A freqüência dos alelos para os diferentes *loci* foi variada nas três populações de *C. peruvianus* regeneradas *in vitro* (Quadro 8). Entre todos os *loci* estudados, o *locus mAbR28* foi o que apresentou o maior número de alelos, quatro, sendo que o alelo D não foi encontrado na população de plantas com caules atípicos. O alelo A do *locus mEgR76* tem uma freqüência alta (maior que 50%) nas plantas com caules típicos e este alelo não foi encontrado nas plantas com caules atípicos. O alelo A do *locus mAbR77* também não foi observado nas plantas com caules atípicos e o alelo A do *locus mEgR02* não foi encontrado nas populações de plantas com caules atípicos e com caules mistos. O primer *Pchi21* se mostrou polimórfico nas três populações. Na Figura 2, está demonstrada a amplificação do *locus mAbR28* nas três populações regeneradas *in vitro* de *C. peruvianus*.

Quadro 8 - Freqüência dos alelos para os diferentes *loci* de microssatélites analisados para as populações (I: caules com morfologia típica; II: caules com morfologia atípica; III: caules com morfologia mista) de *Cereus peruvianus*

| <i>Loci</i> | I | II | III |
|---------------|--------|--------|--------|
| <i>mEgR76</i> | | | |
| Alelo A | 0,6176 | | 0,3500 |
| Alelo B | 0,3824 | 1,0000 | 0,6500 |
| <i>mAbR42</i> | | | |
| Alelo A | 0,5882 | 0,5000 | 0,4000 |
| Alelo B | 0,4118 | 0,5000 | 0,6000 |
| <i>mAbR77</i> | | | |
| Alelo A | 0,3333 | | 0,2500 |
| Alelo B | 0,6667 | 1,0000 | 0,7500 |
| <i>Pchi21</i> | | | |
| Alelo A | 0,0882 | 0,1429 | 0,0500 |
| Alelo B | 0,9118 | 0,8571 | 0,9500 |
| <i>Pchi47</i> | | | |

Quadro 8, Cont...

| | | | |
|---------------|--------|--------|--------|
| Alelo A | 0,4412 | 0,1429 | 0,3000 |
| Alelo B | 0,2941 | 0,7143 | 0,4000 |
| Alelo C | 0,2647 | 0,1429 | 0,3000 |
| <i>Pchi54</i> | | | |
| Alelo A | 0,5588 | 0,5000 | 0,4500 |
| Alelo B | 0,4412 | 0,5000 | 0,5500 |
| <i>mAbR28</i> | | | |
| Alelo A | 0,1176 | 0,1429 | 0,1500 |
| Alelo B | 0,1765 | 0,1429 | 0,2500 |
| Alelo C | 0,4706 | 0,7143 | 0,4000 |
| Alelo D | 0,2353 | | 0,2000 |
| <i>mEgR02</i> | | | |
| Alelo A | 0,0294 | | |
| Alelo B | 0,4412 | 0,4286 | 0,4500 |
| Alelo C | 0,5294 | 0,5714 | 0,5500 |
| <i>mEgR78</i> | | | |
| Alelo A | 0,4375 | 0,3333 | 0,0500 |
| Alelo B | 0,4375 | 0,5000 | 0,7000 |
| Alelo C | 0,1250 | 0,1667 | 0,2500 |

Nos *loci* *mEgR76* e *mAbR77* foi observado a fixação do alelo B, de modo que polimorfismo inferido a partir da proporção de *loci* polimórficos é menor na população de plantas com caules atípicos (7/9 = 77,7%), do que nas populações de plantas com caules típicos e caules mistos. Os *loci* *mAbR28*, *mAbR77*, *mEgR02* e *mEgR76* contém alelos que parecem estar associados com a morfologia de caules de plantas de *C. peruvianus* e têm potencial para serem indicados para investigar diferenças morfológicas em caules de mandacaru do gênero *Cereus*, ou de variedades de *C. peruvianus* encontradas na natureza.

O polimorfismo entre as três populações analisadas variou de 77,78% a 100%, onde a população de caules de morfologia atípica foi a que apresentou menor polimorfismo, seguida pelas populações de caules de morfologia típica e mista, respectivamente, que apresentaram 100% de *loci* polimórficos (Quadro 9). O polimorfismo médio para as três populações foi de 92,59%. Este é um aspecto positivo para a espécie, pois os somaclones representam um material promissor para compor programas de melhoramento genético.

A base genética estimada no presente estudo, para as plantas de *C. peruvianus*, está próxima daquela registrada por Gutman et al. (2001), que

encontraram valores de 89 a 99% para a similaridade em clones desta espécie originários da Califórnia, usando o marcador molecular RAPD. Os referidos autores destacaram a base genética estreita da espécie, que tem limitado os programas de melhoramento genético no sentido de obter frutos com as características desejáveis pelos consumidores. O polimorfismo médio das três populações foi maior do que o polimorfismo estimado por Faria-Tavares (2006), que foi de 42,85% em populações de *Cereus peruvianus* na natureza, utilizando o sistema PAGE (*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*), para avaliar α - e β - esterases e também maior do que o valor estimado por Resende et al. (2007; 2010), utilizando o marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) em plântulas crescidas a partir de sementes de plantas localizadas na cidade de Maringá. Nestes trabalhos o polimorfismo foi de apenas 42,57%.

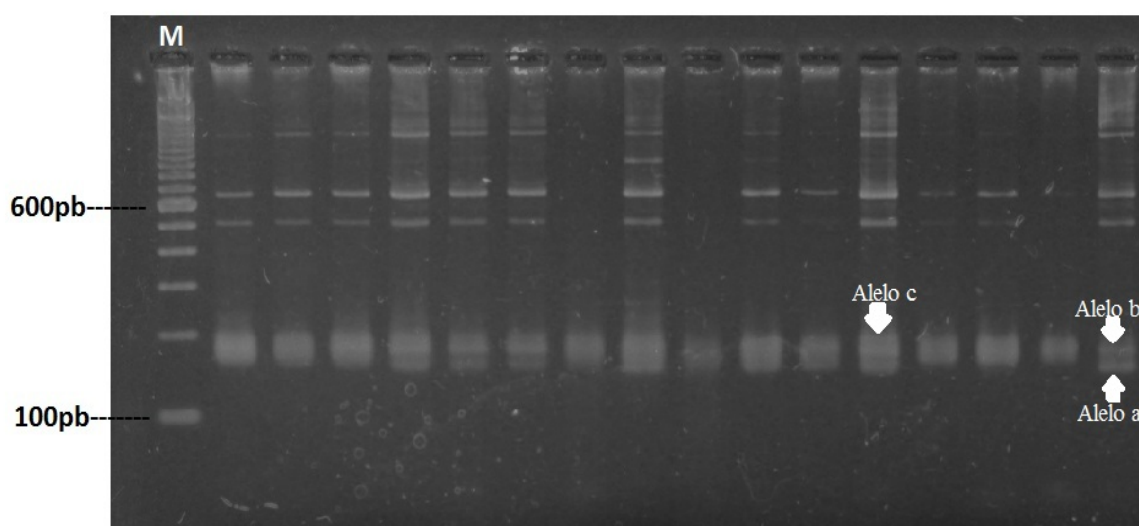


Figura 2 - Gel de agarose concentrado 4% (50% agarose comum e 50% agarose MS-8) para separar o produto da amplificação dos DNAs de diferentes plantas das três populações de *Cereus peruvianus* com os primer *mAbR28*. A primeira amostra (M) do gel indica o *ladder* 100 pb (Invitrogen).

Historicamente, desde a década de 1970, a cultura de tecidos vegetais tem sido considerada uma técnica promissora para multiplicar genótipos de interesse. Por outro lado, as análises de plantas multiplicadas *in vitro* têm revelado a existência de polimorfismos, caracterizados como variações somaclonais por Larkin e Scowcroft (1981), as quais podem comprometer a estabilidade genética dos clones ou somaclones produzidos no cultivo *in vitro*. Variações na morfologia de tecidos,

variações cromossômicas, bioquímicas e moleculares têm sido evidenciadas em várias espécies de plantas (Joyce et al., 2003). Nos somaclones de *C. peruvianus* foi evidente que as variações morfológicas que determinaram caules com morfologia atípica não são acompanhadas por maiores variações em nível de *locus* SSR. Nestes somaclones com caules atípicos, a variação em nível de loci SSR foi menor que a observada nos somaclones com morfologias típicas.

Evidências de não associação entre variações morfológicas e polimorfismo de fragmentos aleatórios de DNA amplificados têm sido registradas para somaclones de outras espécies de plantas (Goto et al., 1998; Chen et al., 1998). Morfologias alteradas em plantas cultivadas *in vitro* têm sido explicadas por eventos de metilação diferencial, como a metilação diferencial em decorrência da condição de estresse *in vitro* (Kaepler e Phillips, 1993). Eventos de hipometilação foram associados com diferentes fenótipos em regenerantes de *Solanum tuberosum* (Joyce e Cassels, 2002) e em regenerantes de *Elaeis guineensis* (Jaligot et al., 2002; Kubis et al., 2003). A reversão fenotípica, que determinou a característica de caules com morfologia mista em somaclones de *C. peruvianus*, foi verificada em somaclones de outras espécies e trata-se de um evento que tem sido considerado por Joyce et al. (2003) como indicativo da ocorrência de eventos de metilação. Além disso, a hipoacetilação de histonas, que reduz a expressão de alguns genes em *Arabidopsis*, também resultou em anomalias fenotípicas (Finnegan, 2001). De acordo com Tregear et al. (2002), indicações e evidências da expressão de genes de defesa, geralmente induzidos por estresse biótico e abiótico em células cultivada *in vitro* (Yu et al., 1999), também estão relacionadas a alterações de fenótipos de plantas.

Quadro 9 - Estimativas do número de *loci* polimórficos $N_{(lp)}$; número de *loci* monomórficos $N_{(lm)}$ e porcentagem de polimorfismo (%P) para as três populações (I: caules com morfologia típica; II: caules com morfologia atípica; III: caules com morfologia mista) de *Cereus peruvianus*

| População | $N_{(lp)}$ | $N_{(lm)}$ | %P |
|-----------|------------|------------|--------|
| I | 9 | 0 | 100% |
| II | 7 | 2 | 77,78% |
| III | 9 | 0 | 100% |

As frequências variáveis dos alelos nos *loci* SSR conferiram uma baixa proporção de plantas heterozigotas nas três populações. A heterozigosidade média

observada variou de 0,3122 (população de caules e morfologia atípica) a 0,40 (população de caules de morfologia mista). A heteroziguidade esperada variou de 0,3899 (população de caules e morfologia atípica) a 0,5164 (população de caules e morfologia típica população) onde foi a maior (Quadro 10).

O valor médio de H_o para as três populações de *C. peruvianus* foi de 0,3492 e os valores observados nas diferentes populações são menores do que os valores já descritos para *C. peruvianus* e para outras cactáceas. Faria-Tavares (2006), utilizando isoenzimas α - e β - esterases para a caracterização de populações de *C. peruvianus*, obtiveram uma heteroziguidade observada entre 0,2528 e 0,6175. Em populações selvagens, manejadas e cultivadas de *Polaskia chichipe*, a heteroziguidade observada foi de 0,631; 0,505 e 0,560, respectivamente (Otero-Arnaiz, 2005). Arakaky et al. (2010), ao analisar cinco *loci* polimórficos em *Haageocereus*, obtiveram uma heteroziguidade observada variando de 0,478 a 0,871.

A heteroziguidade média esperada de 0,4664 para as populações analisadas de *C. peruvianus* foi discretamente menor do que a já estimada para outras populações de *Cereus*, utilizando isoenzimas, 0,4977 (Faria-Tavares, 2006). O intervalo dos valores da heteroziguidade esperada nas três populações também foi menor do que o obtido para outras cactáceas. O *locus* *mAbR28* foi o que apresentou o maior valor para as estimativas de heteroziguidade observada ($H_o = 0,6924$) e heteroziguidade esperada ($H_e = 0,6450$). O mesmo *locus* apresentou o maior número médio de alelos observados ($N_a = 3,67$) e efetivos ($N_e = 2,81$), indicando que este *locus* é bom para analisar divergências populacionais na espécie *C. peruvianus*. Otero-Arnaiz et al. (2004), ao analisarem sete *loci* polimórficos em *Polaskia chichipe*, obtiveram uma heteroziguidade entre 0,188 e 0,797. Na análise de 12 *loci* SSR polimórficos, em 30 indivíduos de *Echinocactus grusonii*, a heteroziguidade esteve entre 0,235 e 0,785 (Hardesty et al., 2008). Hughes et al. (2008), ao estudarem oito *loci* polimórficos em populações de *Ariocarpus bravoanus*, obtiveram uma heteroziguidade esperada entre 0,201 e 0,688.

A porcentagem de alelos nulos nas três populações estudadas variou de 0,0 (caules de morfologia atípica) a 9,52 (caules de morfologia mista). Os *loci* *Pchi2*, *Pchi47*, *mAbR28*, *mAbR42*, *mEgR02* e *mEgR76* não apresentaram alelos nulos. O *locus* *Pchi54* apresentou uma porcentagem de 2,94 alelos nulos, em *mEgR78* foi de 5,88% e o que teve maior índice de alelos nulos foi o primer *mAbR77* (17,65%).

Quadro 10 - Parâmetros de diversidade genética avaliados para as três populações de *Cereus peruvianus* obtidos mediante análise dos nove *loci* SSR

| <i>Loci</i> | Caule típico | | | | Caule atípico | | | | Caule misto | | | |
|---------------|--------------|--------|--------|--------|---------------|--------|--------|--------|-------------|--------|--------|--------|
| | Na | Ne | Ho | He | Na | Ne | Ho | He | Na | Ne | Ho | He |
| <i>mEgR76</i> | 2,0000 | 1,8951 | 0,0588 | 0,4866 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 2,0000 | 1,8349 | 0,5000 | 0,4789 |
| <i>mAbR42</i> | 2,0000 | 1,9396 | 0,2353 | 0,4991 | 2,0000 | 2,0000 | 0,7143 | 0,5385 | 2,0000 | 1,9231 | 0,6000 | 0,5053 |
| <i>mAbR77</i> | 2,0000 | 1,8000 | 0,5333 | 0,4598 | 1,0000 | 1,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 2,0000 | 1,6000 | 0,3000 | 0,3947 |
| <i>Pchi21</i> | 2,0000 | 1,1918 | 0,1765 | 0,1658 | 2,0000 | 1,3243 | 0,2857 | 0,2637 | 2,0000 | 1,1050 | 0,1000 | 0,1000 |
| <i>Pchi47</i> | 3,0000 | 2,8473 | 0,5294 | 0,6684 | 3,0000 | 1,8148 | 0,2857 | 0,4835 | 3,0000 | 2,9412 | 0,6000 | 0,6947 |
| <i>Pchi54</i> | 2,0000 | 1,9727 | 0,0588 | 0,5080 | 2,0000 | 2,0000 | 0,3333 | 0,5455 | 2,0000 | 1,9802 | 0,1000 | 0,5211 |
| <i>mAbR28</i> | 4,0000 | 3,1075 | 0,7059 | 0,6988 | 3,0000 | 1,8148 | 0,5714 | 0,4835 | 4,0000 | 3,5088 | 0,8000 | 0,7526 |
| <i>mEgR02</i> | 3,0000 | 2,1018 | 0,4706 | 0,5401 | 2,0000 | 1,9600 | 0,2857 | 0,5275 | 2,0000 | 1,9802 | 0,5000 | 0,5211 |
| <i>mEgR78</i> | 3,0000 | 2,5098 | 0,2500 | 0,6210 | 3,0000 | 2,5714 | 0,3333 | 0,6667 | 3,0000 | 1,8018 | 0,1000 | 0,4684 |
| Média | 2,5556 | 2,1517 | 0,3354 | 0,5164 | 2,1111 | 1,7206 | 0,3122 | 0,3899 | 2,4444 | 2,0750 | 0,4000 | 0,4930 |

Na=número de alelos observados; Ne=número efetivos de alelos; Ho=heterozigidade observada; He=heterozigidade esperada.

A análise do polimorfismo nos loci SSR dos somaclones de *C. peruvianus* mostrou que os loci *mAbR28*, *mAbR42*, *mAbR77* e *Pchi 21* apresentaram valores negativos para o coeficiente de endogamia (Fis), indicando um excesso de heterozigotos nos referidos loci (Quadro 11). O valor da média de Fis para os nove loci foi 0,2093, maior que o valor já descrito, quando isoenzimas foram utilizadas como marcador, para outras populações de *C. peruvianus*, Fis=-0,0778 (Faria-Tavares, 2006) e também maior do que os valores de Fis já descritos para outros cactos auto-incompatíveis analisados com isoenzimas. Para *Pereskia gamacho*, polinizada por insetos o valor de Fis foi 0,116 (Nassar et al., 2002); em espécies polinizadas por morcegos tais como *Stenocereus griseus* Fis = 0,145, *Cereus repandus* Fis = 0,182, e *Pilosocereus laguginosus* Fis=0,176. Para *Stenocereus gummosus* polinizado por mariposa, o valor de Fis foi de 0,672 (Clark-Tapia e Molina-Freaner, 2003). Os valores altos de Fis em populações de cactos auto-incompatíveis são explicados pela ocorrência de eventos tais como endocruzamentos biparentais dentro de populações relativamente pequenas e parcialmente isoladas, ou pela vantagem adaptativa de homozigotos, ou pela estrutura clonal das populações (Moraes et al., 2005).

A análise da divergência genética entre as plantas das três populações regeneradas *in vitro*, de 0,0757 (Quadro 11) determinou uma baixa divergência

genética entre as plantas de morfologia típica, mista e atípica, de acordo com o índice estabelecido por Wright (1978). Este valor baixo se deve-se ao fato de serem regenerantes clonais, ou seja, os somaclones foram regenerados a partir de calos formados por apenas seis explantes (Oliviera et al., 1995). Este valor foi inferior ao encontrado por Faria-Tavares (2006), com isoenzimas ($F_{st} = 0,2645$) em outras populações de *C. peruvianus*.

Quadro 11 - Estimativa do número de alelos observados (Na) e efetivo (Ne), coeficiente de endogamia (Fis), déficit de heterozigotos (Fit), proporção de diversidade gênica entre as populações (Fst), Heterozigosidade Observada (Ho) e Esperada (He) nas três populações de *Cereus peruvianus*

| Locus | N | Na | Ne | Fis | Fit | Fst | Ho | He |
|---------------|----|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|
| <i>mEgR76</i> | 68 | 2,0000 | 1,9396 | 0,3974 | 0,5738 | 0,2927 | 0,1765 | 0,4917 |
| <i>mAbR42</i> | 68 | 2,0000 | 1,9983 | -0,0581 | -0,0331 | 0,0237 | 0,4412 | 0,5070 |
| <i>mAbR77</i> | 56 | 2,0000 | 1,6453 | -0,0169 | 0,1133 | 0,1281 | 0,3929 | 0,3994 |
| <i>Pchi21</i> | 68 | 2,0000 | 1,1918 | -0,1226 | -0,1034 | 0,0171 | 0,1765 | 0,1633 |
| <i>Pchi47</i> | 68 | 3,0000 | 2,8864 | 0,1949 | 0,2596 | 0,0804 | 0,5000 | 0,6633 |
| <i>Pchi54</i> | 66 | 2,0000 | 1,9982 | 0,6693 | 0,6719 | 0,0079 | 0,1212 | 0,5072 |
| <i>mAbR28</i> | 68 | 4,0000 | 2,9832 | -0,1276 | -0,0734 | 0,0481 | 0,7059 | 0,6747 |
| <i>mEgR02</i> | 68 | 3,0000 | 2,0370 | 0,1675 | 0,1684 | 0,0011 | 0,4412 | 0,5167 |
| <i>mEgR78</i> | 64 | 3,0000 | 2,5006 | 0,5878 | 0,6169 | 0,0707 | 0,2188 | 0,6096 |
| Média | 66 | 2,5556 | 2,1311 | 0,2093 | 0,2692 | 0,0757 | 0,3527 | 0,5037 |

A análise das frequências genotípicas também indica distorção na segregação para vários *loci*, onde metade das frequências dos alelos não apresenta uma distribuição de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Quadro 12). Ao comparar as heterozigosidades esperadas e observadas, fica claro que esses desvios foram causados pela alta taxa de homozigotos, apontado pelos altos índices de Fis e Fit. O desvio das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, pode ser devido à seleção pelo cultivo *in vitro*, efeito de Wahlund (redução da heterozigosidade devido à população estar estruturada em sub-populações) e a presença de alelos nulos (Hamrick, 1982). Nas populações analisadas, isso pode ser reflexo da forma de multiplicação clonal *in vitro* (seleção artificial) e efeito do genótipo fundador. Mas, a despeito deste distúrbio (seleção artificial), as frequências genotípicas nos *loci mEgR76* (população de caules e morfologia mista), *mAbR42* (populações de caules e morfologia atípica e mista), *mAbR77* (populações de caules

de morfologia típica e atípica), *Pchi21* e *mEgR02* (nas três populações), *Pchi54* (população e caules de morfologia atípica) e *mAbR28* (população de caules de morfologia atípica), ainda atendem a expectativa de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Quadro 12).

Quadro 12 - Teste do χ^2 -quadrado para verificar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os nove *loci* microssatélites analisados nas três populações de *Cereus peruvianus*

| População | Caules típicos | Caules atípicos | Caules mistos |
|---------------|----------------|-----------------|---------------|
| <i>loci</i> | | | |
| <i>mEgR76</i> | 14,065934 | - | 0,021978* |
| <i>mAbR42</i> | 5,067438 | 0,870748* | 0,394481* |
| <i>mAbR77</i> | 0,419181* | - | 0,694286* |
| <i>Pchi21</i> | 0,103226* | 0,090909* | 0,000000* |
| <i>Pchi47</i> | 23,961905 | 13,222222 | 19,857143 |
| <i>Pchi54</i> | 14,147368 | 1,088889* | 7,272727 |
| <i>mAbR28</i> | 10,148884 | 0,800000* | 4,097321 |
| <i>mEgR02</i> | 1,242951* | 1,728571* | 0,018182* |
| <i>mEgR78</i> | 18,065934 | 7,933333 | 11,630769 |

**Loci* em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As relações de similaridade e dissimilaridade entre as populações de *C. peruvianus* apresentam valores de identidade variando de 0,0399 (entre as populações de caule de morfologia típica e mista) a 0,9455 (entre as populações de caules de morfologia atípica e mista) (Quadro 13, Figura 3). No agrupamento apresentado no dendrograma da Figura 3, a população de caules de morfologia atípica está em grupo distinto, enquanto as populações de plantas de caules de morfologia típica e mista, respectivamente, estão no mesmo grupo (Figura 3).

Quadro 13 - Coeficiente de similaridade e distância genética de Nei entre as três populações (I: caules com morfologia típica; II: caules com morfologia atípica; III: caules com morfologia mista) de *Cereus peruvianus*

| População | I | II | III |
|-----------|--------|--------|--------|
| I | **** | 0,8836 | 0,9609 |
| II | 0,1237 | **** | 0,9455 |
| III | 0,0399 | 0,0561 | **** |

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

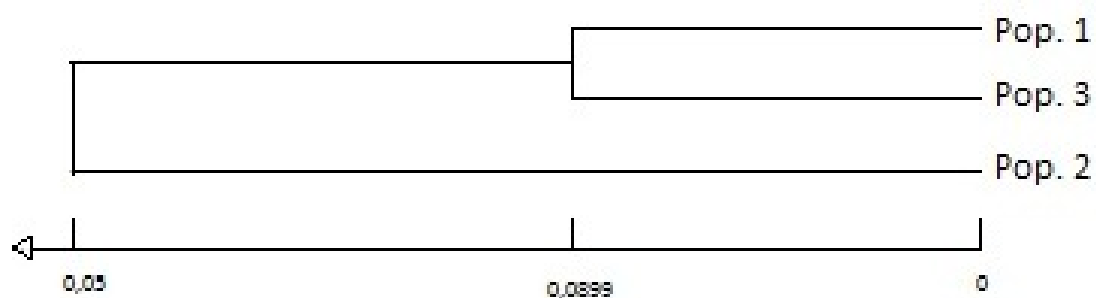


Figura 3 - Dendrograma da distância genética entre as treze populações de *Cereus peruvianus*. A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA empregando o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999).

MELHORAR OS N UMEROS DA FIGURA

A determinação das relações de similaridade e diversidade entre as populações 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 e principalmente, para ilustrar o intervalo de diversidade encontrado na espécie. Os somaclones de *C. peruvianus* com caules de morfologia atípica estão mais distantes dos somaclones com caules típicos e mistos, devido a fixação de alelos e maior proporção de homozigotos nas plantas com caules atípicos.

5. CONCLUSÕES

- a) A transferibilidade de primers de microssatélites desenvolvidos para diferentes gêneros de cactáceas é promissora para o estudo de diversidade e de estrutura genética de populações de *C. peruvianus*; a taxa de transferibilidade de primers desenvolvidos para espécies de cactos colunares foi mais eficiente para a análise das populações de *C. peruvianus*.
- b) Os variantes somaclonais morfológicos (caules atípicos) de *C. peruvianus* apresentam menor diversidade de alelos e de genótipos heterozigotos em *loci* SSR.
- c) O *locus* *mEgR76* que apresentou valor maior de F_{ST} (0,2927) pode ser considerado como o mais eficiente para diferenciar populações de *C. peruvianus*; os *loci* *mAbR28* ($He = 0,6747$), *Pchi47* ($He = 0,6633$), *mEgR78* ($He = 0,6096$), *mEgR02* ($He = 0,5167$), *Pchi54* ($He = 0,5072$), e *mAbR42* ($He = 0,5070$) também podem ser considerados como efetivos para analisar diversidade genética e analisar a estrutura de populações de *C. peruvianus*, porque apresentaram valores de heterozigosidade média esperada maiores que 0,50.
- d) Os *loci* *mEgR76* e *mAbR77*, onde foram observados a fixação de alelos, e os *loci* *mEgR02* e *mAbR28*, onde foi observado a ausência de alelos específicos nos somaclones com caules atípicos, podem ser indicados para investigar diferenças morfológicas em caules de mandacaru do gênero *Cereus*, ou em variedades com morfologias de caules alteradas de *C. peruvianus* encontradas na natureza.
- e) O nível de identidade genética na análise dos nove *loci* SSR observado (0,8836 – 0,9609) entre os somaclones de *C. peruvianus* com caules típicos, atípicos e mistos foi superior a 0,85 indicando que as plantas com caules atípicos podem ser consideradas como sendo da mesma espécie dos somaclones com caules típicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M.F. **Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: espécies mais comuns.** João Pessoa: União, 1996. 125p.
- 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.
- ALVAREZ, M.; COSTA, S.C.; HUBER, A.; BARON, M.; FONTANA, J.D. The cuticle of the cactus *Cereus peruvianus* as a source of a homo-D-galacturonan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 51/52:367-377, 1995.
- ALVAREZ, M.; COSTA, S.C.; UTUMI, H.; HUBER, A.; BECK, R.; FONTANA, J.D. The anionic glycan from the cactus *Cereus peruvianus* - estrutural features and potential uses. **Applied 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).
- ALTESOR, A.; EZCURRA, E. Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti. **Journal of Arid Environments**, 53:557-567, 2003.
- ANDERSON, E.F. **The cactus family.** Oxford: Timber Press, 2001. 266p.
- ANDRADE, C.T.S.; MARQUES, J.G.W.; ZAPPI, D.C. Utilização de Cactáceas por sertanejos baianos: Um exercício com a tipologia de Marques para definir categorias utilitárias. In: 53 REUNIÃO ANUAL DA SBPC. Salvador, 2001. **Resumos expandidos...** Salvador: SBPC, 2001, p.75.

ANDRADE, C.T.S.; MARQUES, J.G.W; ZAPPI, D.C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8:36-42, 2006.

ANDRADE-LIMA, D. Cactaceae de Pernambuco. In: XI CONGRESSO INTERNACIONAL DE PASTAGENS. São Paulo, 1966. **Resumos expandidos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1966, p.1453-1458.

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

ARECES, A. Cactaceae. In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, W.D.; HEALD, S.V. (eds.). **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.

BALEN, A.H.; LAVEN, J.S.E.; TAN, S.L.; DEWAILLY, D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. **Human Reproduction**, 9:505-514, 2003.

BANDEIRA, F.P. **Etnobiologia Pankararé**. Salvador: Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, 1993. 95p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas).

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.

BARBERA, G.; INGLESE, P.; BARRIOS, E. **Agroecología, cultivos y usos del nopal**. Estudio FAO producción y protección vegetal. Roma: FAO, 1999. 168p.

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. 255p.

BARTHLOTT, W. Biogeography and evolution in neo- and paleotropical Rhipsalinae (Cactaceae). **Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg**, 7:241-248, 1983.

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

BEN SALEM, H.; NEFZAOU, A. *Opuntia* ssp. – a Strategic Fodder and Efficient Tool to Combat Desertification in the Wana Region. In: MONDRAGON-JACOBO, C.; PÉREZ-GONZALÉZ, S.E. (eds.). **Cactus (*Opuntia* Spp.) as forage**. Roma: FAO, 2002. p. 73-90.

BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C.; SANSAVINI, S. Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp. rootstocks. **Scientia Agricola**, 61:303-306, 2004.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 574p.

BOUCK, A.; VISION, T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. **Molecular Ecology**, 16:907-924, 2007.

BOUSQUET, J.; SIMON, L.; LANONDE, M. DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Forest Research**, 20:254-257, 1990.

BRITTON, N.L.; ROSE, J.N. **The Cactaceae. Descriptions and illustrations of plants of the cactus family.** Washington: Carnegie Institute of Washington, 1937. 491p.

BRITTON, N.L.; ROSE, J.N. **The Cactaceae. Description and illustrations of plants of the cactus family.** New York: Dover, 1963. 236p.

BRONDANI, R.P.V.; WILLIAMS, E.R.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biology**, 6:20, 2006.

CAMPOS, E. **Medicina popular do Nordeste.** Rio de Janeiro: O Cruzeiro, 1967. 145p.

CARVALHO, G.R.; PITCHER, T.J. **Molecular genetics in fisheries.** London: Chapman & Hall, 1995. 141p.

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 Evolution**, 290:85-97, 2010.

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.

CHEN, W.H.; CHEN, T.M.; FU, Y.M.; HSIEH, R.M.; CHEN, W.S. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. **Plant Cell Reports**, 18:7-13, 1998.

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 gummosis* in the Sonoran desert. **Heredity**, 90:443-450, 2003.

CHAKRABORTY, R.; KIMMEL, M.; STIVERS, D.N.; DEKA, R.; DAVISON, L.J. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetra-Second, deviation from mutation-drift equilibrium is nucleotide microsatellite loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94:1041–1046, 1997.

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.

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 *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, 99 65-72, 1999.

COLLEVATTI, R.; 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.

CONDE, L. Anatomical comparisons of five species of *Opuntia* (Cactaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 62:425-473, 1975.

COSTA-NETO, E.; MORAES, V. The use of medicinal plants in the County of Tanquinho, State of Bahia, Northeastern, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2:1-8, 2000.

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.

DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, 19:4008, 1991.

D'OVIDIO, R.; TANZARELLA, O.A.; PONCEDDU, E. Rapid and efficient detection of genetic polymorphism in wheat through amplification by polymerase chain reaction. **Plant Molecular Biology**, 15:169-171, 1990.

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.

FALEIRO, A.S.G.; FALEIRO, F. G.; LOPES, U.V.; MELO, G.R.P.; YAMADA, M.M.; BAHIA, R.C.S.; CORRÊA, R.X. Diversidade genética de acessos de *Theobroma cacao* L. selecionados por produtores para resistência à vassoura-de-bruxa com base em marcadores microssatélites. In: XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. **Resumo expandido...** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2001b. p. 36-138.

FARIA, D.A.; MAMANI, E.M.C.; PAPPAS, M.R.; PAPPAS Jr., J.G.; GRATTAPAGLIA, D. A selected set of EST- derived microsatellites, polymorphic and transferable across 6 species of *Eucalyptus*. **Journal of Heredity**, 4:523-520, 2010.

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).

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILLACH, S.C.K. (ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 3-15.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, 1996. 220p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 187p.

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.

FIGUEIRA, J.E.C.; VASCONCELOS NETO, J.; GARCIA, M.A.; SOUZA, A.L.T. Saurocory in *Melocactus violaceus* (Cactaceae). **Biotropica**, 26:295-301, 1994.

FINNEGAN, E.J. Epialleles - a source of random variation in times of stress. **Current Opinion In Plant Biology**, 5:101-106, 2001.

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.

FRANCISCO, M.S.; SOUZA, J.M.B.; JUNIOR, F.C.M.; OLIVEIRA, M.C.; MOREIRA, R.T.; LIMA, E.E. Avaliação sensorial de biscoito a base de farinha de facheiro (*Cereus squamosus*). In: III JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA. **Resumos...** Bananeiras: UFPB, 2008. p. 126-127.

FRITSCH, P.; RIESEBERG, L.H. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: SMITH, T.B.; WAYNE, R.K. (eds.). **Molecular genetic approaches in conservation**. New York: Oxford University Press, 1996. p. 54-73.

FUMAGALLI, A.; TACCA, M.; UNGHVARY, F.; FARAGO, A. Shared path protection with differentiated reliability. **International Conference on Communications**, 4:2157-2161, 2002.

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.Z. Population structure and conservation genetics of wild rice *Oryza rufipogon* (Poaceae): a region-wide perspective from microsatellite variation. **Molecular Ecology**, 13:1009-1024, 2004.

GAO, L.Z. Microsatellite variation within and among populations of *Oryza officinalis* (Poaceae), an endangered wild rice from China. **Molecular Ecology**, 14:4287-4297, 2005.

GAO, L.Z.; GE, S.; HONG, D.Y. Allozyme variation and population genetic structure of common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. in China. **Theoretical and applied genetics**, 101:494-502, 2000a.

GAO, L.Z.; GE, S.; HONG, D.Y. Low levels of genetic diversity within population and high differentiation among populations of a wild rice, *Oryza granulata* Nees et. Arn. ex. Watt. from China. **International Journal of Plant Sciences**, 161:691-697, 2000b.

GAO, L.Z.; GE, S.; HONG, D.Y. Allozyme variation and conservation genetics of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Yunnan, China. **Euphytica**, 124:273-281, 2002.

GAO, L.Z.; SCHAAL, B.A.; ZHANG, C.H.; JIA, J.Z.; DONG, Y.S. Assessment of population genetic structure in common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. using microsatellite and allozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 106:173-180, 2002.

GAO, Z.S.; VAN DE WEG, W.E.; SCHAART, J.G. et al. Linkage map positions and allelic diversity of two Mal d 3 (non-specific lipid transfer protein) genes in the cultivated apple (*Malus domestica*). **Theoretical and Applied Genetics**, 110:479-491, 2005.

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 RFLPfingerprints. **Theoretical and Applied Genetics**, 78:16-22, 1989.

GIBSON, A.C. Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). **Biotropica**, 5:29-65, 1973.

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

GOTO, S.; THAKUR R.C.; ISHII K. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. **Plant Cell Reports**, 18:193-197, 1998.

GUERREIRO, W.; ANDRADE, C.T.; MARQUES, J.G. Um estudo de caso da conexão homem/vegetal (Cactaceae/*Bromeliaceae*), no semi-árido alagoano. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ETNOBIOLOGIA E ETNOECOLOGIA. Piracicaba, 2000. **Resumos expandidos...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Etnobiologia e Etnoecologia, 2000. p. 18-18.

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).

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

GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R.K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, 113:163-185, 2000.

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.

HAMANN, A.; ZINK, D.; NAGI, W. Microsatellite fingerprinting in the genus *Phaseolus*. **Genome**, 38:507-515, 1995.

HAMRICK, J.L. Plant population genetic and evolution. **American Journal of Botany**, 69:1685-1693, 1982.

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

HELSEN, P.; VERDYCK, P.; TYE, 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.

HEYWOOD, V.H.; IRIONDO, J.M. Plant conservation: old problems, new perspectives. **Biological Conservation**, 113:321–335, 2003.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. **Laboratory Protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**. México: CIMMYT, 1994. 50p.

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

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.; TAYLOR, N. The genera of Cactaceae - Progress Toward Consensus. **Bradleya**, 8:85-107, 1990.

ISHII, T.; MCCOUCH, S.R. Microsatellites and microsynteny in the chloroplast genomes of *Oryza* and eight other Gramineae species. **Theoretical and Applied Genetics**, 100:1257-1266, 2000.

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.

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

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to population and back. **Trends in Ecology and Evolution**, 11:424-429, 1996.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, 316:76-79, 1985.

JORGE, I.C.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Malate dehydrogenase isozymes in long-term callus tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) exposed to sugar and temperature stress. **Biochemical Genetics**, 35:155-164, 1997.

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

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

KAEPPLER, S.M.; PHILLIPS, R.L. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. **PNAS**, 90:8773-8776, 1993.

KARVONEN, P.; SALVOLAINEN, O. rDNA variation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). In: FIFTH WORKSHOP OF THE IUFRO WORKING PARTY MOLECULAR GENETICS AND CYTOGENETIC, 1992, Maubuisson. **Proceedings...** Maubuisson: Careans (CD Room).

KHUSH, G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, 35:25-34, 1997.

KLEIN-LANKHORST, R.M.; VERMUND, A.; WEIDE, R.; LIHARSKA, T.; ZABEL, P. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Theoretical and Applied Genetics**, 83:108-114, 1991.

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

LABRA, M.; GRASSI, F.; BARDINI, M.; IMAZIO, S.; GUIGGI, A.; CITTERIO, S.; BANFI, E.; SGORBATI, S. Genetic relationships in *Opuntia* Mill. Genun (Cactaceae) detected by molecular markers. **Plant Science**, 165:1129-1136, 2003.

LAMBERT, S.M.; BORBA, E.L.; MACHADO, M.C.; ANDRADE, S.C.S. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. **Annals of Botany**, 97:389-403, 2006.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; FALQUE, M.; BOUET, A.; LAGODA, P.J.L. Isolation and characterization of microsattelites in *Theobroma cacao* L. **Molecular Ecology**, 8:2141-2143, 1999.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, 60:197-214, 1981.

LA ROTA, M.; KANTETY, R.V.; YU, J-K; SORRELLS, M.E. Non random distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat, and barley. **BMC Genomics**, 6:23, 2005.

LEWIS, W. **Plants affecting man's health**. New York: Willey, 1977. 318p.

LIMA, E.E. **Produção e armazenamento da farinha**. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande, 2006. 83p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola).

LIMA, I.M.M.; GAMA, N.S. Registro de plantas hospedeiras (Cactaceae) e de nova forma de disseminação de *Diaspis echinocacti* (Bouché) (Hemiptera: Diaspididae), Cochonilha-da-palma-forrageira, nos estados de Pernambuco e Alagoas. **Neotropical Entomology**, 30:479-481, 2001.

LIMA, J.L.S. **Plantas forrageiras das caatingas – usos e potencialidades**. Petrolina: Embrapa-Cpatsa, PNE, Rbgkew, 1996. 37p.

LITT, M.; LUTTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human 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.

LOPES, M.S.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 5:56-60, 2002.

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. Isozymes patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 32:237-247, 1994.

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

MARK, H.F. Biopolymers. In: **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: Willey-Interscience, 1979. p. 227-239.

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**, 51:123-31, 2010.

MARTINDALE, M. **The extra pharmacopeia pharmaceutical**. London: London Press, 1979. 170p.

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.D. **Plant anatomy**. Menio Park, CA: Benjamin-Cummings Publishing Co., 1988. 560p.

MAUSETH, J.D. Comparative structure-function studies within a strongly dimorphic plant, *Melocactus inortus* (Cactaceae). **Bradleya**, 7:1-12, 1989.

MAUSETH, J.D. Water-storing and cavitation-preventing adaptations in wood of Cacti. **Annals of Botany**, 72:81-89, 1993a.

MAUSETH, J.D. Medulary bundles and the evolution of cacti. **American Journal of Botany**, 80:928-932, 1993b.

MAUSETH, J.D. Comparative anatomy of *Espostoa*, *Pseudoespostoa*, *Thrixanthocereus* and *Vatricania*. **Bradleya**, 17:27-37, 1999a.

MAUSETH, J.D. Comparative anatomy of *Espostoa*, *Pseudoespostoa*, *Thrixanthocereus* and *Vatricania*. **Bradleya**, 17:27-37, 1999b.

MAUSETH, J.D. PLEMONS-RODRIGUEZ, B. Evolution of extreme xeromorphic characters in woody a study of nine evolutionary lines in Cactaceae. **American Journal of Botany**, 85:209-218, 1998.

MAUSETH, J.D.; SAJEVA, M. Cortical bundles in the persistent, photosynthetic stems of cacti. **Annals of Botany**, 70:317-324, 1992.

MAUSETH, J.D.; ROSS, R. Systematic anatomy of the primitive *cereoid cactus* *Leptocereus quadricostatus*. **Bradleya**, 6:49-64, 1988.

MEDEIROS, A.C.B.; PEREIRA, R.W.; COLLEVATTI, R.G. Transferabilidade de primers microssatélites de *Tabebuia aurea* para outras espécies do gênero e desenvolvimento de sistema de genotipagem multiplex. . In: 52 CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. Foz do Iguaçu, 2006. **Resumos expandidos...** Foz do Iguaçu: SBG, 2006. (CD-Room).

MILLACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K Millach, 1998. 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. 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.

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.

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.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially present with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, 30:194-200, 2002.

MOTA, C.N. **Jurema's Children in the forest of spirits**: healing and ritual among two Brazilian indigenous groups. London: Intermediate Technology Publications, 1997. 133p.

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. 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. Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae]). **The American Genetic Association**, 93:193-200, 2002.

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.

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.

NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; CARVALHO, G.A.; OCHA, R.C.; PAULA Jr., T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. RAPD and SCAR markers linked to gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal Phytopathology**, 148:117-121, 2000.

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

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.

NYBOM, H. Applications of DNA fingerprinting in plant population studies. In: PENA, S.D.J.; CHAKRABORTY, R.; EPPLEN, J.T.; JEFFREYS, A.J. (eds.). **DNA Fingerprinting: State of the Science**. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1993. p. 293-309.

NYBOM, H.; SCHAAL, B.A. DNA 'fingerprints' reveal genotype distribution in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus*, Rosaceae). **American Journal of Botany**, 77:883-888, 1990.

NYFFELER, R. Phylogenetic relationship in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. **American Journal of Botany**, 89: 312-326, 2002.

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.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29:294-307, 2002.

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.; MRICK, 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.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:985-993, 1993.

PARIDA, S.K.; KALIA, S.K.; KAUL, S.; DALAL, V.; HEMAPRABHA, G.; SELVI, A.; PANDIT, A.; SINGH, A.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T.; SRIVASTAVA, P.S.; SINGH, N.K.; MOHAPATRA, T. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical Applied Genetics**, 118:327-338, 2009.

PARRA, F.; PÉREZ-NASSER, N.; LIRA, R.; PÉREZ-SCALICRUP, D.; CASAS, A. Population genetics and processo of domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, México. **Journal of Arid Environments**, 72:1997-2010, 2008.

PÉPIN, L.; AMIGUES, Y.; LÉPINGLE, A.; BERTHIER, J.L.; BENSALD, 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.

PINTO, R.M.; GOMES, D.C.; MENEZES, R.C.; MUNIZ-PEREIRA, L.C.; NORONHA, D. First natural helminth infection in the Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus* (Rodentia, Muridae), parasitized with *Dentostomella translucida* (Nematoda, Heteroxynematidae) in the Neotropical region. **Brazilian Journal of Biology**, 63:173-175, 2003a.

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, 2003b.

POWELL, W.; MACHRAY, G.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Science**, 1:215-222, 1996.

PRIMMER, C.R.; MOLLER, A.P.; ELLEGREN, H. A wide ranging survey of cross-species amplification in birds. **Molecular Ecology**, 5:365-378, 1996.

QUIROS, C.F.; HU, J.; THIS, P.; CHEVRE, A.M.; DELSENY, M. Development and chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in *Brassica*. **Theoretical Applied Genetics**, 82:627-632, 1991.

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

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

RIZZINI, C.T. Cactáceas: Os segredos da sobrevivência. **Revista Ciência Hoje**, 34:62-72, 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.

RODRIGUES, D.G. **Polieletrólitos naturais**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1984. 87p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária).

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.

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

SANTOS, K.L.; WETER, L.J.; DANTAS, A.C.M.; GUERRA, M.P.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, 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.

SCHEINVAR, L. **Cactaceas**. México: Universidade Nacional Autônoma do México, 1985. 60p. Monografia (Graduação em Agronomia).

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, 109:365-371, 2000.

SERENO, M.L.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; VENCOSKY, R.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, 7:13-24, 2006.

SILVA, A.; SANT'ANA; FIGUEIREDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M.; LIMA, E.E. **Avaliação da composição físico-química da coroa-de-frade**. **Revista Biologia e Ciências da terra**. Disponível em: <http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/pdf/coroadefrade.pdf>. Acesso em: 19, fevereiro, 2010.

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

SILVA, M. Ecologia das comunidades vegetais da caatinga – prioridades de pesquisa. In: SIMPÓSIO SOBRE CAATINGA E SUA EXPLORAÇÃO RACIONAL. Brasília, 1986. **Resumos Expandidos...** Embrapa-DDT. Brasília-DF, 1986, p.185-188.

SOFFIATTI, P.; ANGYALOSSY, V. Stem anatomy of *Cipocereus* (Cactaceae). **Bradleya**, 21:39-48, 2003.

SOUTO MAIOR, M. **Remédios populares do Nordeste**. Recife: Fundação Joaquim Nabuco, Massangana, 1986. 130p.

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.

TINOCO, A.; CASAS, A.; LUNAR, R.; OYAMA, K. Populations genetics of *Escontria chiottila* in wild and silvicultural managed populations in the Tehuacán Valley, Central Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 52:525-538, 2005.

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.; ETHERTON, B.; BISHOP, C.; LORD, S. Targeted observations at NCEP: Toward an operational implementation. In: FOURTH SYMPOSIUM ON INTEGRATED OBSERVING SYSTEMS, 2000, Long Beach. **Proceedings...** Long Beach: AMS, 2000. p. 186-193.

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

TREGEAR J. W.; MORCILLO F.; RICHARD F.; BERGER A.; SINGH R.; CHEAH S. C.; HARTMANN C.; RIVAL A.; DUVAL Y. Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. **Journal of Experimental Botany**, 53:1387-1396, 2002.

TURBAK, A.F. Cellulose. In: **Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology**. New York: Willey-Interscience, 1979. p. 60-72.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, 23:48-55, 2005.

VARSHNEY, R.K.; SHARMA, P.C.; GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; RAMESH, B.; ROY, J.K.; KUMAR, A.; SEN, A. Low level of polymorphism detected by SSR probes in bread wheat. **Plant Breeding**, 117:182-184, 1998.

VIGOUROUX, Y.; JAQUETH, J.S.; MATSUOKA, Y.; SMITH, O.S.; BEAVIS, W.D.; SMITH, S.C.; DOEBLEY, J. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. **Molecular Biology Evolution**, 19:1251-1260, 2002.

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

- VRIES, J.X.; MOYNA, P.; DIAZ, V. Alcaloides de cactus del Uruguay. **Revista Latinoamericana de Química**, 3:21-23, 1971.
- WEBER, J.L.; MAY, P.E. An abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of 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 Negev desert of Israel. In: JANICK, J.; SIMON, J.E. (eds.). **New Crop**. New York: Wiley, 1993. p. 471-486.
- WEISS, J.; NERD, A.; MIZRAHI, Y. flowering and pollination requirements in *Cereus peruvianus* cultivad in Israel. **Israel Journal of Plant Sciences**, 42:149-158, 1994.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18:7213-7218, 1990.
- WHISTTER, R.L. **Methods of carbohydrate chemistry**. London: Academic Press, 1963. 470p.
- WHITE, G.; POWELL, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. **Molecular Ecology**, 6:1195-1197, 1997.
- WILDE, J.; WAUGH, R.; POWELL, W. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. **Theoretical Applied Genetics**, 83:871-877, 1992.
- 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: WRIGHT. S. (ed.). **Evolution and the genetics of population**. Chicago: University of Chicago Press, 1978, p.79-103.

WU, K.S.; TANKSLEY, S.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.; MATSTUTA, N. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:865-870, 2001.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. **University of Alberta and Center for International Forestry Research**, 1999.

YILDIRIM, A.; KANDEMIR, N.; SONMEZOGLU, O.A.; GÜLEÇ, T.E. Transferability of microsatellite markers among cool season cereals. **Biotechnology & Biotechnology Equipment**, 23:1299-1302, 2009.

YU, H.J.; MOON, M.S.; LEE, H.S.; MUN, J.H.; KWON, Y.M.; KIM, S.G. Analysis of cDNA expressed during first cell division of petunia petal protoplast cultures using expressed sequence tags. **Molecules and Cell**, 9:258-264, 1999.

ZAPPI, D. *Pilosocereus* (Cactaceae) - The genus in Brazil. **Royal Botanic Gardens, Kew**, 1994. 160p.

ZHOU, H.F.; ZHONG, W.X.; GE, S. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China. **Theoretical and Applied Genetics**, 107:332-339, 2003.

ZOGLHAMI, N.; CHRITA, I.; BOUAMAMA, B.; GARGOURI, M.; ZEMNI, H.; GHORBEL, A.; MLIKI, A. Molecular based assessment of genetic diversity within Barbary fig (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill.) in Tunisia. **Scientia Horticulturae**, 113:134-141, 2007.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, 3:512-513, 2002.