

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

ANDRÉA FLORINDO DAS NEVES

Caracterização genética de variedades morfológicas de *Cereus peruvianus* Mill.
utilizando marcadores microssatélites

Maringá
2013

ANDRÉA FLORINDO DAS NEVES

Caracterização genética de variedades morfológicas de *Cereus peruvianus* Mill.
utilizando marcadores microssatélites

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Profa. Dra. Claudete Aparecida Mangolin

Maringá
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

N518c Neves, Andréa Florindo das
Caracterização genética de variedades
morfológicas de *Cereus peruvianus* Mill utilizando
marcadores microssatélites / Andréa Florindo das
Neves. -- Maringá, 2013.
84 f. : il. color., figs., tabs.

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

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2013.

1. *Cereus peruvianus* Mill - Genética. 2.
Tortuosus. 3. *Monstruosus*. 4. Marcadores
microssatélites. I. Mangolin, Claudete Aparecida,
orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Comparada. III. Título.

CDD 21.ed. 583.56
ECSL-001561

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANDREA FLORINDO DAS NEVES

Caracterização genética de variedades morfológicas de *Cereus peruvianus* Mill.
utilizando marcadores microssatélites

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Claudete Aparecida Mangolin
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Patricia Sofiatti
Universidade Federal do Paraná

Aprovada em: 06 de Junho de 2013.

Local de defesa: Sala 205, Bloco G-80, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Adriano e Cinira.

AGRADECIMENTOS

Em especial, à Deus, Aquele que me guarda e me ilumina, me guia e me dá forças na busca dos meus objetivos.

À minha grande família, meus pais amados que são a alegria da minha vida e às minhas irmãs, minhas melhores amigas. Aos meus cunhados, os irmãos que eu ganhei de presente e meus sobrinhos adorados, porque são as pessoas mais especiais da minha vida. Agradeço ao apoio, tudo que fizeram por mim, sempre. Eu amo vocês.

À Prof. Dra. Claudete Mangolin, pelos ensinamentos e pela orientação na realização deste trabalho, e principalmente por ser essa pessoa tão querida, tão presente, amiga e compreensiva.

À Prof. Dra. Maria de Fátima e à Prof. Dra. Sandra Collet, por toda contribuição e participação, amizade e carinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada e seus coordenadores, aos professores por todo o ensinamento que proporcionaram, e à Marcinha e Estela, sempre muito eficientes e prestativas, assim como aos meus professores da graduação, que me incentivaram a continuar os estudos no Mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos para a realização deste trabalho.

À Benedita e Marlene, que me “adotaram” durante algum tempo para que eu pudesse estudar, tenho muita gratidão e um carinho muito especial por vocês.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais, colegas da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Pós-Graduação em Agronomia, e aos técnicos Leila, Sérgio, Enila e demais, porque todos sempre me ajudaram de alguma maneira, em algum momento, sempre presentes.

Aos amigos que tive o prazer de conquistar ao longo dessa caminhada, que além de me ajudarem na realização do trabalho, proporcionaram momentos felizes, de descontração e apoio, em especial à Vanessa, Danuza, Liriana, Eliane, Rafael e Maycon.

Aos amigos de Vera Cruz do Oeste, que moram no meu coração, e aos amigos “mandaguasuínos”, que me acolheram nessa vida nova.

Ao Erikson, pelo apoio, conselhos e motivação, por estar sempre ao meu lado, e acreditar em mim quando a insegurança batia ou a saudade da família começava a doer.

Enfim, de todo o meu coração, quero agradecer a todos que de alguma maneira estiveram presentes nessa etapa da minha vida, um abraço, uma palavra encorajadora, um sorriso, tem um poder inexplicável na vida da gente.

Caracterização genética de variedades morfológicas de *Cereus peruvianus* Mill. utilizando marcadores microsatélites

RESUMO

As cactáceas são plantas de grande importância ecológica e econômica, altamente adaptadas às regiões secas. As diferentes morfologias do caule, assim como flores e frutos, vêm sendo utilizadas para a classificação dos gêneros e espécies nessa família. A espécie *Cereus peruvianus*, popularmente conhecida como mandacaru, é bem difundida no território brasileiro, e muito utilizada com fins ornamentais e industriais, além de ser a principal espécie forrageira no ambiente seco do Nordeste brasileiro. Dentro desta espécie, ainda encontramos as supostas variedades “monstruosos”, cujo caule apresenta costelas formando sulcos irregulares e número variável de aréolas por costela, e a variedade “tortuosos”, com costelas em espiral. Para cactáceas não é adequado que a classificação seja realizada baseada somente em sua morfologia, pois existe uma grande plasticidade de características morfológicas. Neste sentido, a proposta da presente investigação foi utilizar marcadores microsatélites heterólogos para determinar a variabilidade e a relação genética entre as populações de plantas com os fenótipos “tortuosos” (morfotipo 2) e “monstruosos” (morfotipo 3) em relação às populações de plantas de *C. peruvianus* (morfotipo 1). Para a seleção dos marcadores microsatélites, foram avaliados 33 pares de *primers* desenvolvidos para diferentes espécies de cactáceas. A partir desta avaliação, foram selecionados doze pares de *primers* de microsatélites desenvolvidos para *Polaskia chichipe*, *Ariocarpus bravoanus*, *Astrophytum asterias* e *Echinocactus grusonii*, conferindo uma transferibilidade de 36,36% para *C. peruvianus*. Dos doze *primers*, sete foram polimórficos e utilizados na análise da diversidade genética. A análise dos sete *loci* microsatélites nas amostras dos três morfotipos de mandacaru resultou na amplificação de 17 alelos, com uma média de 2,43 alelos por *locus* polimórfico e um polimorfismo médio de 90,47%. As frequências variáveis dos alelos *A*, *B* ou *C* nos sete *loci* SSR conferiram uma heterozigotidade observada que variou de 0,00 a 0,7368 e a heterozigotidade esperada variou de 0,00 a 0,6771. O valor médio de F_{is} para os sete *loci* foi de 0,1821, mostrando que existe excesso de homozigotos, a análise da divergência genética entre os três grupos de amostras foi moderado ($F_{st}=0,0962$). A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior variância se encontra dentro das populações de cada morfotipo com valores de F_{ST} e R_{ST} igual a 87% e 85% respectivamente, e os valores de variabilidade entre as populações foram para o $F_{ST}=13\%$ e para o $R_{ST}=15\%$, valores altamente significativos ($p<0,0001$). A similaridade entre as amostras variou de 0,8456 a 0,9329, e para o dendrograma houve a formação de dois grupos, o primeiro foi formado com os morfotipos 1 e o 2, indicando que a maior similaridade é observada entre as plantas de *Cereus peruvianus* com morfologia normal e a var. *tortuosus*. O morfotipo 3 (var. *monstruosus*) ficou segregado dos demais indicando maior divergência. As relações genéticas entre os genótipos individuais também foram exploradas através de uma análise Bayesiana, o valor de ΔK , que deve ser levado em conta para definir o número de grupos, indicou a formação de 3 grupos, ou seja, manteve o número de agrupamentos formados usando o método de agrupamento UPGMA. Confirmando a não especificidade de alelos associados com a morfologia, o *bar plot* evidenciou que os três morfotipos compartilham alelos para os sete microsatélites estudados. A maior diferenciação genética em nível molecular (especiação) observada entre as plantas das variedades *C. peruvianus* var. *tortuosus* e *C. peruvianus* var. *monstruosus* devem estar sendo direcionadas por um rígido processo de seleção artificial, uma vez que estas duas variedades apresentam um acentuado caráter ornamental.

Palavras-chave: Cactaceae, *Cereus peruvianus*, *tortuosus*, *monstruosus*, transferibilidade.

Genetic characterization of morphological varieties of *Cereus peruvianus* Mill. using microsatellite markers

ABSTRACT

Cacti are plants with great adaptability in drought-stricken regions and with high ecological and economical relevance. The stems different morphologies, as well as flowers and fruits, are employed to classify the family's genera and species. The species *Cereus peruvianus*, popularly known as *mandacaru*, may be found throughout Brazil. It is used as an ornamental plant, for industrial purposes and is the main forage plant in the rainless region of the northeastern region of Brazil. Whereas 'monstrous' varieties of the species may be found with their stem forming ribs with irregular ridges and a variable number of areoles per rib, there is the 'crooked' variety with spiral-form ribs. It is not adequate to classify cacti merely by their morphology since there high plasticity rates are extant in their morphological characteristics. Current investigation employs heterologous microsatellite markers to determine the variability and genetic relationship among plant populations with 'crooked' (morphotype 2) and 'monstrous' (morphotype 3) phenotypes when compared to populations of *C. peruvianus* (morphotype 1). Thirty-three primer pairs were developed for different cactus species for the selection of microsatellite markers. Twelve pairs of microsatellites primers developed for *Polaskia chichipe*, *Ariocarpus bravoanus*, *Astrophytum asterias* and *Echinocactus grusonii* were then selected with 36.36% transferability for *C. peruvianus*. Seven out of the twelve primers were polymorphic and employed to analyze genetic diversity. The analysis of the seven microsatellite *loci* in the samples of the three mandacaru morphotypes provided the amplification of 17 alleles with mean 2.43 alleles per polymorphic *locus* and mean polymorphisms of 90.47%. Variable frequencies of alleles *A*, *B* or *C* in the seven SSR *loci* provided heterozygosity ranging between 0.00 and 0.7368 and an expected heterozygosity between 0.00 and 0.6771. F_{is} mean rate for the seven *loci* was 0.1821 and showed that there was an excess in homozygotes, whereas analysis of genetic divergence among the three sample groups was shown to be moderate ($F_{st}=0.0962$). The analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the highest variance was found within populations of each morphotype with F_{ST} and R_{ST} rates equal to 87% and 85% respectively. Variability rates among populations went to $F_{ST}=13\%$ and $R_{ST}=15\%$, highly significant rates ($p<0.0001$). Similarity among samples varied between 0.8456 and 0.9329. Dendrogram showed the formation of two groups. One was formed by morphotypes 1 and 2 and showed that the highest similarity occurred between *Cereus peruvianus* plants with normal morphology and the *tortuosus* variety. Morphotype 3 (var. *monstruosus*) remained segregated from the others and showed the greatest divergence. Genetic relationships among individual genotypes were also assessed by the Bayesian analysis; ΔK rate, which should be taken into consideration to define the number of groups, indicated the formation of three groups, or rather, the number of formed groupings was maintained by the UPGMA grouping method. While confirming the non-specification of alleles associated with morphology, the bar plot revealed that the three morphotypes shared alleles with the seven microsatellites under analysis. The largest genetic differentiation at the molecular level (speciation) found among the plants of the *C. peruvianus* var. *tortuosus* and *C. peruvianus* var. *monstruosus* varieties are being targeted by a rigid process of artificial selection, since these two varieties exhibit a marked ornamental character.

Keywords: Cactaceae, *Cereus peruvianus*, *C. tortuosus*, *C. monstruosus*, transferability.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	8
1. Introdução	9
2. Revisão Bibliográfica	11
2.1 Biologia do desenvolvimento das plantas	11
2.2 Características morfológicas da família Cactaceae	15
2.3 Aspectos taxonômicos de Cactaceae	19
2.4 Importância econômica da família Cactaceae	21
2.5 Gênero <i>Cereus</i>	22
2.6 Microsatélites e transferibilidade em Cactáceas	24
3. Referências	29
CAPÍTULO 2	41
Caracterização genética de variedades morfológicas de <i>Cereus peruvianus</i> Mill. utilizando marcadores microsatélites	42
Resumo	42
Introdução	43
Materiais e Métodos	45
Resultados	50
Discussão	59
Conclusões	66
Referências	67
APÊNDICE I	73
ANEXO I	77

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

Cactaceae compreende uma família de plantas essencialmente restritas ao Novo Mundo, desde o Chile e Argentina até o Canadá (WALLACE; GIBSON, 2002) e são extremamente adaptadas às regiões áridas e semi-áridas, onde também se encontra a maior riqueza de espécies (BOYLE; ANDERSON, 2002). Os órgãos das cactáceas sofreram algumas modificações necessárias para a sua manutenção neste ambiente seco. De maneira geral, os cactos possuem caule suculento, perene e fotossintetizante, com a presença de cutículas espessas auxiliando no armazenamento de água, possuem gemas axilares com espinhos produzidos a partir de folhas modificadas, denominados aréolas, mas sem folhas verdes; flores grandes e coloridas; e o fruto é uma baga, suculento e com muitas sementes (RIZZINI, 1987; ANDERSON, 2001).

A morfologia dos caules nas cactáceas pode ser considerada uma característica marcante, e tem sido usada, por mais de quatro décadas, para discriminar gêneros e espécies de cactos (BRITTON; ROSE, 1963; ALTESOR; EZCURRA, 2003). O gênero *Cereus*, por exemplo, é descrito como constituído por cactos 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; ROSE, 1963). A presença de aréolas é uma sinapomorfia da família (Cactaceae) (GIBSON; NOBEL, 1986; MAUSETH; ROSS, 1988).

O número de costelas, a disposição das aréolas, bem como o tamanho e a cor dos espinhos, são algumas das características usadas para identificar espécies do gênero *Cereus* (TAYLOR; ZAPPI, 2004). Nas populações naturais de *Cereus*, plantas com 7-8 costelas longitudinais regulares com aréolas com disposição linear são características da espécie *C. alocriportanus*; espinhos longos de cor preta ou castanha são descritos para a espécie *C. forbesii*, e em *C. validus* estão presentes espinhos curtos. 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 é descrito como características da variedade ou forma ‘monstrosus’. Esta última variedade também tem sido designada como espécie *C. monstrosus* ou *C. monstrosus*, e ainda como variedade *C. monstrosus minor* (BRITTON; ROSE, 1963).

Estas contradições quanto à classificação de determinadas plantas como variedades da espécie *C. peruvianus* ou como outra espécie do gênero *Cereus*, indicam uma limitação ou

ausência de parâmetros morfológicos que possam ser utilizados para discriminar variedades e espécies do gênero. Para cactáceas é inconveniente que a classificação seja realizada baseada em sua morfologia, pois existe uma grande plasticidade de características morfológicas (NOBEL, 1983; GIBSON; NOBEL, 1986; HICKS; MAUCHAMP, 1996; HICKS; MAUCHAMP, 2000; TAYLOR; ZAPPI, 2004). Mais recentemente, evidências filogenéticas moleculares têm sido incorporadas aos estudos sistemáticos deste grupo, e vêm proporcionando classificações mais abrangentes e uma melhor compreensão da evolução das cactáceas (CALVENTE, 2011). É necessária uma técnica que seja independente da estrutura, onde os casos de paralelismo e convergência podem ser claramente reconhecidos, de modo que cada espécie possa ser inserida e classificada de acordo com a sua posição filogenética adequada (WALLACE; GIBSON, 2002).

Portanto uma alternativa para contornar as limitações dos marcadores morfológicos é a utilização de marcadores moleculares para providenciar a caracterização genética das plantas que apresentam características morfológicas diferentes. Estes marcadores são ferramentas úteis para detecção da variação genética e se constituem em um meio eficiente para relacionar variações genótípicas e fenótípicas (VARSHNEY et al., 2005a). Os microssatélites representam uma importante classe de marcadores que surgiu após a implementação da PCR (MULLIS; FALOONA, 1987). Estes marcadores são altamente polimórficos e eficientes para a análise de genomas de plantas (PLIESKE; STRUSS, 2001; ZALAPA et al., 2012), sendo os mais utilizados em estudos de diversidade genética. Além disso, *primers* microssatélites desenvolvidos para uma espécie podem ser utilizados em espécies relacionadas, o que diminui consideravelmente os custos e o tempo de execução dos projetos.

Neste sentido, a proposta da presente investigação foi utilizar marcadores microssatélites heterólogos para determinar a variabilidade genética e a relação genética entre as populações de plantas com os fenótipos “monstruosos” e “tortuosos” com as populações de plantas de *C. peruvianus*. Desta forma, os microssatélites poderão revelar a presença de alelos restritos ou com frequências determinadas associados com morfologias específicas de caules “tortuosos” ou “monstruosos”; tais alelos ou a frequência destes poderá ser útil como ferramenta adicional em estudos de sistemática e taxonomia das cactáceas do gênero *Cereus*. Por outro lado, a relação de parentesco a ser estabelecida entre as plantas das populações morfologicamente divergentes pode apontar os variantes morfológicos como espécies do gênero *Cereus* ou como variedades da espécie *C. peruvianus*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Biologia do desenvolvimento das plantas

No final da década de 70 do século passado, a forma das plantas era descrita como sendo determinada pela organização de feixes vasculares. Gibson (1978) descreveu que na parte aérea da maioria das dicotiledôneas, os feixes vasculares que correm ao longo do caule teriam como função básica conectar as folhas com o resto da planta, e que deste modo, os feixes vasculares unem as folhas ao longo da parte aérea, e sua distribuição no interior do caule estaria fortemente relacionada com o arranjo externo das folhas, isto é, o padrão filotático (TOMLINSON; WHEAT, 1979).

De acordo com este modelo, com o crescimento secundário, uma camada cambial contínua seria desenvolvida, o feixe vascular iria desaparecer e as folhas se tornariam ligadas a um tecido lenhoso contínuo. Gibson e Nobel (1986) e Mauseth (1988), explicaram a morfologia dos cactos, por exemplo, como dependentes da organização dos feixes vasculares; os cactos retêm o arranjo de feixes de tecido vascular por toda a vida para garantir a morfologia suculenta de seus caules. Na maioria das espécies de cactos, as folhas e as gemas axilares são reduzidas e as aréolas são um aspecto distintivo. Basicamente, uma aréola é uma gema axilar transformada, situada sob um tubérculo com espinhos, e muitas vezes com pelos e tricomas. A morfologia vascular básica de cactos é similar àquelas das plântulas de dicotiledôneas não suculentas e os feixes vasculares correm ao longo do caule conectando aréolas vizinhas. Além disso, o arranjo filotático das aréolas no caule foi descrito como sendo fortemente ligado à distribuição interna dos feixes vasculares. Ainda com relação a morfologia dos cactos, Altesor et al. (1994) explicaram que a evolução do caule suculento apresenta a necessidade de suportar uma grande massa de parenquima não especializado, sustentado mecanicamente por uma limitada quantidade de feixes vasculares organizados em uma configuração biomecânica específica.

No início da década de 90 do século passado, os estudos de genética molecular de plantas mostraram que outras características morfológicas de folhas e flores eram geneticamente controlados (COEN; MEYEROWITZ, 1991; PYKE, 1994). Os estudos prévios da anatomia de brotos primários de plantas mostraram que enquanto a filotaxia era determinada por arranjos espaciais de primórdios em torno do meristema primário, a alongação do internó ocorria mais tarde, através da ação do meristema secundário (ESAU, 1977; MAUSETH, 1988). Deste modo, em nível meristemático, ambos fenômenos (filotaxia e

elongação dos internós) ocorreriam em fases sequencialmente distintas durante a diferenciação, e foi possível concluir que a compactação do caule e o ângulo de divergência filotático pareciam ser geneticamente e independentemente controlados pela planta (isto é, um pode variar substancialmente enquanto o outro permanece constante).

A relação entre a divisão celular e a forma de planta há muito tempo vem sendo alvo de debates entre os que concordam e discordam sobre o papel importante da divisão celular em processos morfogenéticos e de desenvolvimento. No início do século XXI as evidências de Meijer e Murray (2001) sugeriram que a divisão celular e morfogênese são intimamente interligadas, e que a arquitetura global é determinada por genes de padronização, onde a elaboração e execução de programas de desenvolvimento requerem um controle adequado do ciclo de divisão celular. O controle do ciclo celular foi considerado como essencial para estabelecer a formação de estruturas histológicas específicas, sendo que as taxas de divisões podem ser determinadas por uma resposta associada ao ambiente. Isto porque, apesar de a forma da planta ser pré determinada, flutuações ambientais podem mudar a taxa de divisão celular no meristema (FRANCIS, 1998). Para Meijer e Murray (2001) os genes de padronização deveriam definir a forma final desejada de uma planta e seus órgãos constituintes, mas a divisão celular devidamente controlada seria essencial para a execução do projeto. Deste modo o desenvolvimento total de um órgão e a forma não seria dependente nem na linhagem celular e nem de determinados padrões ou taxas de divisão celular, mas sim dependente do controle espacial e do desenvolvimento da divisão celular e sua integração com a diferenciação celular.

Meijer e Murray (2001) concluíram em seu trabalho que o ciclo celular está integrado em complexas vias de morfogênese e histogênese, onde o ciclo celular responde ativamente ao estímulo ambiental e adapta à taxa e orientação das divisões de acordo com estes estímulos. Alteração no padrão de divisão poderia afetar tanto o local como a morfogênese global, ou as taxas de divisão celular. O efeito fenotípico das mutações que interrompem a divisão celular parecia ser dependente da natureza da lesão. Oppenheimer (1998) já havia proposto anteriormente que a morfogênese é controlada em nível molecular, e que muitos genes associados a ela ainda seriam identificados.

O processo de expansão celular havia sido proposto por alguns autores (REINHARDT et al., 1998; BOWMAN; ESHED, 2000; PIEN et al., 2001), como sendo importante para a diferenciação do meristema apical dos brotos. E, de acordo com as propostas de Meyerowitz (1997) e Clark (2001), desde que células de diferentes camadas do meristema participam da formação de órgãos, era necessário que ocorresse uma rigorosa coordenação entre a divisão

celular, controle do plano de divisão, especificação do destino celular e expansão celular, onde todos estes eventos seriam importantes para regular o tamanho do ápice dos brotos. Para estes investigadores, a coordenação que integra o desenvolvimento do meristema poderia necessitar de sinais intercelulares de curto alcance entre as diferentes camadas, ou em zonas separadas do meristema, de forma que para compreender a biologia do desenvolvimento das plantas seria preciso entender os genes que controlam os aspectos característicos das células meristemáticas.

Estudos realizados por Bhalla e Singh (2006) mostraram que a formação inicial de órgãos após o período embrionário, e o desenvolvimento da planta dependem de uma coordenada formação e diferenciação das células pluripotentes do caule, localizadas nos meristemas apicais. Na proposta destes autores, a regulação transcricional e a sinalização intercelular parecem ter um papel chave na coordenação deste processo. Os autores destacam que a despeito da importância destes processos, muito pouco era conhecido sobre os fatores que são requeridos para manter estas células em estágio desdiferenciado, e uma vez que os genes reguladores destes processos fossem conhecidos seria possível entender o processo de diferenciação celular e de manutenção das células meristemáticas (BHALLA; SINGH, 2006).

De acordo com Raven et al. (2007) os planos nos quais as células dividem-se e a subsequente expansão das células eram considerados como os fatores primários que determinam a morfologia de uma planta ou de uma parte dela. Entretanto, um número cada vez maior de evidências indicava que o primeiro evento na morfogênese seria a expansão do tecido, o qual seria subdividido em unidades menores por divisões celulares: esta diferenciação tissular e celular teria como consequência a morfogênese.

As análises citológicas de Walker et al. (2007) mostraram que em células pré-mitóticas de plantas, o futuro plano de divisão é predito por um anel cortical de microtubulos e actina-F chamado banda préprofase (PPB). A PPB persiste através da profase, mas é desorganizada quando o envoltório nuclear é degradado quando o fuso mitótico é formado. Portanto, a conclusão foi de que em plantas a seleção do plano de divisão celular é selecionado antes da entrada na mitose; neste período, no sitio cortical, são recrutadas moléculas de referência que são mantidas durante toda a mitose (MÜLLER, 2012). No decorrer da divisão nuclear, se forma um fragmoplasto citocinético entre os dois núcleos filhos que se expande lateralmente ligando a nova parede ao sitio de PPB e AtTAN (*Arabidopsis* TANGLED) está envolvido como orientação cortical que permanece quando PPB é desassociado e dirige a formação do fragmoplasto para formar o sitio PPB durante a citocinese.

De acordo com Abrash e Bergmann (2009), um organismo multicelular deve ser capaz de gerar diversos tipos de células e estas devem ser adequadamente modeladas, onde uma divisão assimétrica seria o mecanismo responsável por isso. Neste modelo, uma célula mãe origina células filhas com distintas identidades, e este seria o mecanismo fundamental para a geração da diversidade celular; a célula mãe produz células filhas diferentes na morfologia, identidade ou função. Este processo foi estudado mais extensivamente em embriões, no meristema radicular e estômatos. Foi descrito que a embriogênese em *Arabidopsis* começa com uma divisão assimétrica que gera células filhas com destinos e programas de desenvolvimento distintos. Esta divisão inicial produz uma pequena célula apical, que dará origem ao embrião, e uma grande célula basal, que se desenvolve principalmente como uma estrutura de suporte chamada suspensor. Os estímulos externos e/ou determinantes intrínsecos que especificam essa divisão assimétrica ainda não estavam totalmente determinados, mas algumas enzimas e fatores de transcrição pareciam estar envolvidos e vários genes que regulam as divisões assimétricas em plantas foram descritos em Abrash e Bergmann (2009).

Os investigadores Katsir et al. (2011) resgataram a proposta de que no desenvolvimento das plantas, os peptídeos sinais transmitem informações para coordenar a proliferação e a diferenciação celular, e salientaram que esses peptídeos sinais são geralmente codificados por uma família de genes que se ligam à famílias de receptores correspondentes. Os referidos investigadores discutiram que durante o desenvolvimento ocorre uma precisa expressão espaço temporal de sinais e seus receptores, ocorrendo mudanças bioquímicas na expressão ao longo da evolução, contribuindo para o refinamento e manutenção da complexidade dos programas de desenvolvimento (KATSIR et al., 2011). Katsir et al. (2011) propuseram a existência de duas principais famílias de peptídeos com papéis centrais no desenvolvimento da planta: a família de peptídeo *CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE)* e *EPIDERMAL PATTERNING FACTOR (EPF)*; estes investigadores postularam que os peptídeos CLE modulam a diferenciação das células do caule em diferentes tipos de tecidos, e que a atividade de EPF regula o programa de desenvolvimento dos estômatos. O controle destas atividades incluem muitos mecanismos inclusive modificações pós-traducionais que auxiliam na comunicação célula-a-célula.

Segundo Müller (2012) as divisões celulares coordenadas e a expansão celular são os principais processos de crescimento em todos os organismos. A orientação das divisões celulares e a direção da expansão celular são críticos para o desenvolvimento normal: divisões simétricas contribuem para a proliferação e crescimento, enquanto divisões assimétricas iniciam a formação de diferentes padrões e de diferenciação. Em plantas estes processos são

de particular importância, uma vez que suas células estão cercadas em paredes celulósicas que determinam a sua forma e mantêm a sua posição dentro de tecidos e órgãos. Uma série de mutantes de *Arabidopsis thaliana* e *Zea mays* forneceram evidências de que a posição do plano de divisão celular durante a divisão simétrica contribui significativamente para a forma da célula e para a morfologia da planta (MÜLLER, 2012). Müller (2012) registrou que as principais proteínas estruturais que facilitam a divisão celular e a expansão das células através da integração de sinais intrínsecos e externos são os microtúbulos e actina, onde forças mecânicas, proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs), proteínas motoras de microtúbulos e da região cortical das células, e alterações pós-traducionais de tubulinas, atuam como fatores determinantes do plano de divisão das células.

2.2 Características morfológicas da família Cactaceae

A família Cactaceae é uma das mais populares, suas plantas são facilmente reconhecidas e morfologicamente distintas (GIBSON; NOBEL, 1986). De acordo com Hunt et al. (2006) esta família engloba cerca de 127 gêneros e 1.438 espécies. A maioria delas é terrestre, havendo algumas espécies epífitas, e a maioria destas espécies apresenta uma grande variedade de formas e adaptações (RIZZINI, 1987).

As espécies ocorrem naturalmente no Novo Mundo, sendo encontrados do sudoeste do Canadá (SPEIRS, 1982) ao sul da Patagônia no Chile e Argentina (KIESLING, 1988). Os principais centros de endemismo da família são o México e o Sudoeste dos EUA, Cordilheira dos Andes e Leste do Brasil (HUNT et al., 2006; TAYLOR; ZAPPI, 2004). A única exceção para a sua distribuição é o cacto epifítico *Rhipsalis baccifera*, que também ocorre na África tropical, Madagascar, no Sri Lanka e no sul da Índia (ANDERSON, 2001). No Brasil, Cereeae é o grupo mais representativo, juntamente com Rhipsalideae, sendo o seu centro de diversidade a região Nordeste, considerado como o terceiro maior centro de diversidade para a família (TAYLOR, 1997).

Os cactos são organismos que apresentam espinhos e são amados por cultivadores de plantas, pois apresentam diferentes formas e belas flores. Segundo Nobel (1994, 1998), eles também apresentam importância econômica, uma vez que diversos produtos comerciais são produzidos a partir deles. Os cactos também têm sido usados como ferramentas para ajudar no entendimento do metabolismo ácido das crassuláceas (*CAM - Crassulacean acid metabolism*) e suculentas (GIBSON; NOBEL, 1986; NOBEL, 1988, 1991).

A família Cactaceae é representada por indivíduos arborescentes, arbustivos ou rastejantes, e podem possuir caules lenhosos ou suculentos. O caule pode ser articulado,

plano, cilíndrico ou em forma globosa, com espinhos distribuídos uniformemente em torno do caule ou formando costelas longitudinais. A hipótese de Gibson e Nobel (1986) é de que os antepassados desta família eram plantas mesófilas que habitavam regiões subtropicais. As espécies da subfamília Pereskioideae mostram muitas características morfológicas e anatômicas ancestrais (MAUSETH; LANDRUM, 1997), tais como um caule lenhoso, folhas desenvolvidas e um metabolismo fotossintético C3. O desenvolvimento de suculência do caule, a redução ou a perda de folhas, e o desenvolvimento da via fotossintética CAM, foram as adaptações evolutivas que capacitaram os cactos para colonizar novas regiões (NOBEL, 2002; ALTESOR; EZCURRA; 2003). Desde então, a família também evoluiu para uma diversidade de formas que podem ser observadas no presente, desde árvores lenhosas até espécies suculentas e sem folhas (ALTESOR; EZCURRA; 2003).

Os aspectos anatômicos básicos de cactáceas têm sido estudados desde o século 16 (METCALFE; CHALK, 1950; CONDE, 1975). Segundo a descrição de Wallace e Gibson (2002), normalmente, um cacto possui caule suculento, perene e fotossintetizante, gemas axilares com espinhos produzidos a partir de folhas modificadas, denominadas aréolas, mas sem folhas verdes. Apresentam flores grandes e coloridas, e o fruto é uma baga, suculento e com muitas sementes. Todavia, existem espécies cujas características são bem variáveis. Aproximadamente 10% das espécies da família são epífitas de regiões úmidas (CALVENTE et al., 2008). De acordo com Anderson (2001), muitas vezes os cactos podem ser confundidos com outras suculentas por apresentarem típica morfologia de plantas adaptadas a ambientes áridos e à necessidade de armazenamento de água: grande porte, caules suculentos de diferentes formas e ausência de folhas. A eficiência de uso de água é elevada (5-10 vezes maior do que a maior parte das culturas convencionais), resultando em baixa exigência hídrica (MIZRAHI; NERD, 1999), e esta eficiência é devida ao seu tipo de metabolismo CAM (GIBSON; NOBEL, 1986; MIZRAHI et al., 1997). Típico de plantas suculentas, adaptadas a ambientes áridos, as plantas com metabolismo CAM abrem seus estômatos à noite, diminuindo a transpiração e consequente perda de água.

A epiderme é a camada de células mais externa, através dela todas as trocas com o ambiente são realizadas. Além desta importante função, a epiderme também consiste em uma importante característica taxonômica podendo ajudar na distinção e classificação das espécies (TERRAZAS; LOZA-CORNEJO, 2002). Uma adaptação importante para conservação da água é a presença de uma espessa cutícula hidrofóbica. A variação na espessura cuticular pode estar relacionada com a habilidade da espécie no processo de conservação da água. Nobel

(1999) descreve também que a espessura da cutícula pode aumentar a reflexão da radiação, e isto resulta na redução da temperatura do caule.

Segundo Nobel (2002) a única abertura física responsável pela troca de gases com o ar do ambiente são os estômatos, e em cactáceas estes estão organizados na epiderme dos caules, o desenvolvimento destes é regulado pelos mesmos genes que controlam o desenvolvimento dos estômatos na epiderme das folhas (MAUSETH, 1995). A frequência estomatal em cactáceas é extremamente variável, e a abertura do poro estomatal parece ser maior quando comparada com a abertura do estômato de outras dicotiledôneas, mas em alguns casos, a área de abertura dos poros estomatais para cactáceas tende a ser menor do que o encontrado em folhas de espécies C3 e C4, refletindo a conservação do uso de água em cactáceas CAM (NOBEL, 1994; 1999).

A hipoderme geralmente está organizada sob a epiderme e em caules suculentos de Cactoideae e Opuntioideae usualmente consiste de mais do que uma camada de célula, mas está ausente em Pereskioideae (MAUSETH, 1999b). O tecido fundamental, córtex e medula, possui duas funções importantes relacionadas com adaptações xéricas – fotossíntese e armazenamento de água. Para quase todas as cactáceas, o córtex é a região mais proeminente do tecido fundamental e é uma estrutura de longa duração, uma camada fina de células do parênquima; mesmo quando a epiderme é substituída pela periderme, o cortex é retido. Tanto em Opuntioideae e Cactoideae a medula tende a manter o seu tamanho com a idade do caule e mantém-se viva, isto difere de outras espécies de dicotiledôneas. O tecido fundamental também inclui células envolvidas com a secreção de mucilagem e laticíferos. As células deste tecido também produzem alcalóides, hormônios, e outros compostos químicos associados com o metabolismo (NOBEL, 1988; 1994). O córtex paliçádico em Cactaceae é verde e fotossintético e na maioria das espécies está no caule, e segundo Mauseth (1995) a sua formação é similar àquela do parênquima paliçádico nas folhas de eudicotiledôneas. Na maioria das cactáceas o tecido fotossintético está no caule. O interior do córtex armazena água que pode ser utilizada em secas prolongadas.

Uma outra diferença de muitas cactáceas em relação a outras eudicotiledôneas é a presença de uma espessa medula organizada radialmente no centro do caule (MAUSETH, 1989). Geralmente esta ocupa uma pequena fração do caule (MAUSETH, 1993) e as suas células apresentam uma fina parede, são isodiamétricas e vivas, agem como reservatório de água e muitas vezes, contém grãos de amidos, podendo também armazenar uma variedade de aleloquímicos.

Os tecidos do caule de cactáceas muitas vezes contém grandes quantidades de mucilagem, que é hidrofóbica e afeta a relação de água (GOLDSTEIN; NOBEL, 1991; NOBEL et al., 1992). O conteúdo e composição da mucilagem é variável com relação ao período do ano e com a espécie. Em caules mais velhos ou durante períodos de seca extensiva as células de mucilagem (idioblastos) podem conter cristais. Células de mucilagem são bastante abundantes em Cactoideae e Opuntioideae, geralmente ocorrendo no córtex interno e medula. A produção de latex também é um evento comum para algumas cactáceas, e a composição varia entre as espécies, em *Mammillaria* os laticíferos são abundantes e diferem daqueles encontrados em outras famílias de plantas, sendo únicos entre as cactáceas (MAUSETH, 1978).

Cactaceae pode acumular em seus caules enormes quantidades de oxalato de cálcio, que podem apresentar formatos prismáticos, drusas e raramente aciculares (SALGADO; MAUSETH, 2002). Os cristais são formados no vácuolo central através de um processo de precipitação, podendo ser um produto final do metabolismo e/ou pode servir como meio de remoção de Ca das células (FRANCESCHI; HORNER, 1980). Diferentes formas de oxalato de cálcio e outros compostos químicos estão envolvidos na formação de cristais; algumas espécies contém somente um tipo de cristais e outras podem conter dois ou mais tipos (GIBSON, 1973). Os cristais presentes nas células da epiderme muitas vezes apresentam valor taxonômico (ZAPPI, 1994).

O tecido vascular em Cactaceae é altamente especializado e o principal e grande feixe vascular está entre o córtex interno e a medula (NOBEL, 2002). Segundo Arnold e Mauseth (1999) cactáceas apresentam vários tipos de madeira e elas podem ser classificadas de acordo com o tipo de matriz que elas têm (fibrosa, parenquimática ou bandas largas de traqueídeos) ou de acordo com a uniformidade do desenvolvimento da madeira (monomórfica ou polimórfica). As fibras compreendem quase a metade do volume da madeira dando ao caule força, flexibilidade e resistência à quebra, caules com madeira fibrosa são encontrados em todos os cactos que são demasiadamente grandes para se manterem em função da pressão de turgor como é o caso de *Pereskia*, Opuntioideae e outros cactos de grande porte (TERRAZAS, 2000). Caules com madeira parenquimática são constituídos por uma matriz de células de parenquima não lignificadas com uma fina parede celular primária. Caule com madeira parenquimática é muito macio para fornecer um apoio significativo para a parte aérea, sendo encontrado em cactos cujos caules são globosos ou imersos no solo (MAUSETH, 1993). A madeira com traqueídeos de bandas largas aparece em plantas que ocupam habitats extremamente xéricos sendo altamente adaptada (NOBEL, 2002).

A morfologia das cactáceas é extremamente variada desde a morfologia de árvores comuns (*Pereskia*) às grandes Opuntioideae arborescentes, cactos colunares, suculentos emanharados, colunar-curto e arbustos pouco ramificados, formas globosas não ramificadas até geófitas. A redução do número de ramificações em função do aumento de suculência pode estar relacionada com o aumento de peso, pois os ramos se tornam grossos devido ao acúmulo de água. Uma correlação com esta mudança é a redução do número de meristema apical, cactos não ramificados apresentam somente um meristema apical com o qual constroem o seu corpo inteiro. O número de ramificações em um taxon pode muitas vezes ser afetado por fatores ambientais, por exemplo, maior precipitação anual, esta condição ambiental pode estar associada com raras ramificações na tribo Pachycereae (CORNEJO; SIMPSON, 1997).

2.3 Aspectos taxonômicos de Cactaceae

Gibson et al. (1986) destacaram que os cactos são famosos por suas belas flores e formas vegetativas “bizarras”, mas por outro lado complicados no que tange aos problemas sistemáticos de nomenclatura. De acordo com Bárcenas et al. (2011), no mesmo ano, o Grupo de Trabalho em Cactaceae da Organização Internacional de Estudos de Plantas Suculentas (IOS) publicou o seu primeiro relatório (HUNT, 1986) e começou a abordar este notável problema. O Grupo de Trabalho, que mais tarde se tornou o Grupo Internacional de Sistemática de Cactaceae, considerou a coexistência de várias taxonomias conflitantes na classificação da família.

A classificação da família foi desenvolvida pelo Grupo Internacional de Sistemática de Cactaceae e reconhece quatro subfamílias: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae, e Cactoideae (HUNT et al., 2006). Cactoideae é a maior subfamília, com sete tribos (HUNT et al., 2006). A maioria dos cactos encontra-se nesta subfamília e apresenta as seguintes características: plantas variando de arbustivas a arbóreas, trepadeiras ou epífitas. As raízes são fibrosas ou tuberosas e os caules geralmente não segmentados, globosos ou colunares. As folhas são vestigiais ou ausentes, com gloquídeos também ausentes. As flores são sésseis, diurnas ou noturnas. Distribuem-se em quase todo o Hemisfério Ocidental, com uma espécie epifítica, *Rhipsalis baccifera*, encontrada também na África, Madagascar, em ilhas do Oceano Índico, e no Sri Lanka (ANDERSON, 2001). Na subfamília Cactoideae ainda encontramos o gênero *Cereus*, que engloba algumas das espécies mais conhecidas no Brasil.

As flores, frutos e a morfologia dos caules são freqüentemente utilizados para discriminar gêneros e espécies dentro da família Cactaceae (TAYLOR; ZAPPI, 2004). Contudo, existe uma grande plasticidade de características morfológicas, tornando

inconveniente uma classificação baseada exclusivamente na morfologia. Além disso, um significativo heteromorfismo pode ser observado entre cactos adultos e jovens, este evento é observado em *Discocactus* ou *Melocactus*, onde plantas jovens e reprodutivamente maduras não se assemelham (NIKLAS; MAUSETH, 1981). A história de 250 anos da taxonomia e sistemática de cactos, como em todas as famílias de plantas, foi dominada pela utilização de caracteres estruturais para atribuir espécies aos devidos gêneros. Infelizmente, exemplos de convergência evolutiva e paralelismo em cactos são comumente observados (WALLACE; GIBSON, 2002).

Caruso et al. (2010) fazem referência ao gênero *Opuntia*, que inclui várias espécies originadas na América do Norte e América do Sul, onde podem ser encontrados vários exemplos de inconsistência taxonômica, resultado de uma classificação baseada unicamente em características morfológicas. Existe uma contínua variação morfológica dentro do gênero, e a falta de descritores claros para cada espécie combinada com a relativa facilidade de hibridação cruzada (com a presença de indivíduos com características intermediárias) levaram a uma designação errônea. A espécie mais difundida e economicamente importante desse gênero é *Opuntia ficus indica*, cujo conceito taxonômico é um pouco incerto. É uma espécie cultivada, e os caracteres morfológicos podem variar drasticamente em diferentes regiões de cultivo (REBMAN; PINKAVA, 2001). As mesmas variedades são muitas vezes classificadas como pertencentes a diferentes espécies e, em outros casos, elas são consideradas híbridos entre parentais desconhecidos (CARUSO et al., 2010).

Recentemente, outras ambiguidades na classificação taxonômica de *Opuntia* surgiram em um estudo que utilizou marcadores moleculares para discriminar duas variedades morfológicamente distintas nativas de Galápagos. Os autores destacaram que a diferenciação taxonômica atual não é suportada por dados moleculares (HELSEN et al., 2009).

Outro grande desafio para os estudiosos é a hibridação entre cactos na natureza. Para alguns cactos, os cruzamentos podem ocorrer entre espécies, inclusive de diferentes gêneros. As variações incomuns resultantes de um cruzamento entre indivíduos muito diferentes de uma única espécie ou entre indivíduos de espécies diferentes podem ser perpetuadas por reprodução assexuada, isto é, de forma vegetativa, contudo os híbridos são incapazes de floração e frutificação (ANDERSON, 2001).

Mais recentemente, evidências filogenéticas moleculares têm sido incorporadas aos estudos sistemáticos deste grupo, e vêm proporcionando classificações mais abrangentes e uma melhor compreensão da evolução das cactáceas (CALVENTE et al., 2011). Ainda assim, unidades taxonômicas e limites entre as espécies são difíceis de definir, e estudos moleculares

até o momento renderam grande parte da árvore filogenética, de modo que as relações dentro de Cactaceae permanecem insuficientemente compreendidas (KOROTKOVA, 2011).

2.4 Importância econômica da família Cactaceae

Muito antes dos europeus chegarem ao Novo Mundo, nativos americanos sabiam sobre os cactos e usavam-os para uma variedade de propósitos (ANDERSON, 2001). Hoje, além da grande utilização como plantas ornamentais, também despertam interesse econômico, por produzirem uma grande diversidade de compostos biológicos e de aplicação industrial, como saponinas, alcalóides, esteróides, triterpenos, glicosídeos, gorduras, óleos e ceras (WHISTTER, 1963; MARK, 1979; MARTINDALE, 1979; TURBAK, 1979; SCHEINVAR, 1985; DEMBITSKI; REZANKA, 1996; OKAZAKI et al., 2011).

Na subfamília Cactoideae tribo Cereeae, encontra-se o gênero *Cereus*, cujas espécies estão presentes desde as Índias até a América do Sul. Este gênero é bastante expressivo na constituição da flora de vários estados brasileiros e tem grande importância econômica, principalmente na região nordeste do país (DAVET, 2005). Os caules das plantas de *C. peruvianus* são utilizados como fonte de produtos do metabolismo primário e também de metabólitos secundários para a indústria farmacêutica, de alimentos, e química. As plantas desta espécie produzem alcalóides aminas (VRIES, 1971; OLIVEIRA; MACHADO, 2003), ésteres de cera com potencial de aplicação como barreira impermeável (DEMBITSKY; REZANKA, 1996; REZANKA; DEMBITSKY, 1998), e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais (ALVAREZ et al., 1992; 1995; NOZAKI et al., 1993; BARROS; NOZAKI, 2002). Os estudos de Nozaki et al. (1993) e Barros e Nozaki (2002) mostraram que os heteropolissacarídeos complexos constituintes dos caules de *C. peruvianus* podem substituir a aplicação de polieletrólitos sintéticos usados em processos de tratamento de águas residuais de indústrias. Da goma produzida foi isolado arabinogalactana que inibiu a formação de lesões gástricas em camundongos tratados com etanol, sugerindo o seu uso potencial em processos fitoterápicos (TANAKA et al., 2010).

Além desse interesse econômico, industrial e fitoterápico pela espécie em evidência, *C. peruvianus* vem sendo domesticada também a partir da década de 1987, na região de Israel (NERD et al., 1993; WEISS et al., 1993; MIZRAHI; NERD, 1999), onde é caracterizado como um *fruit crop*, e plantado comercialmente ainda em pequena escala. Devido ao valor comercial de seus frutos, foi implementado em Israel um programa de melhoramento genético visando obter frutos maiores, mais saborosos, e que permaneçam intactos (sem rachaduras precoces) até o seu completo amadurecimento. Este programa de melhoramento genético para

a obtenção de frutos comercializáveis de *C. peruvianus* foi apontado como sendo limitado pela baixa variabilidade genética encontrada nos clones que vem sendo cultivados com tal finalidade (GUTMAN et al., 2001). Mesmo com esta dificuldade *C. peruvianus* vem sendo cultivado em Israel desde 1987 e os seus frutos exportados com sucesso para toda a Europa (MIZRAHI; NERD, 1999). Quase todos os frutos carnosos de cactos são comestíveis, um fruto bastante apreciado é o figo-da-Índia (*Opuntia ficus indica*), sendo que alguns frutos que já foram analisados revelaram propriedades nutracêuticas e antioxidantes (ZAMPINI et al., 2011). Os frutos de cactáceas são muito consumidos por pessoas que vivem nas regiões secas do continente americano (ANDERSON, 2001).

De acordo com as considerações de Bem Salem e Nefzaqui (2002), o destaque do mandacaru *C. jamaçaru* na região nordeste semiárida, consiste na sua eficiência no uso da água, por permanecerem suculentas durante a seca, e produzirem continuamente forragem, além de prevenirem a degradação em ecossistemas frágeis. Segundo Cavalcanti (2007), as plantas de mandacaru têm apresentado um bom desenvolvimento em áreas de solos degradados, podendo repovoar áreas onde não é mais possível o cultivo de lavouras tradicionais, sendo importantes na sustentabilidade e conservação da biodiversidade do bioma caatinga. Devido ao potencial de adaptabilidade de mandacaru no nordeste, estas plantas têm sido extensivamente usadas como forrageiras, servindo de alimento para ruminantes (bovinos, ovinos, caprinos) em períodos de seca (SILVA et al., 2010; 2011).

2.5 Gênero *Cereus*

O gênero *Cereus* é um dos menos compreendido da tribo Cereeae, ou mesmo de toda a família Cactaceae, apesar de ter sido descrito primeiramente em 1698, por Hermann, e depois em 1754 por Philip Miller e ser um dos nomes mais antigos entre os cactos. O nome do gênero vem do latim *cereus*, cera, ou cone de cera, ou ainda vela, referindo-se à forma deste cacto (ANDERSON, 2001). O gênero é constituído de indivíduos que possuem caules do tipo colunar, com variações no número e disposição dos sulcos que formam costelas longitudinais, onde estão inseridos os meristemas axilares contendo espinhos (folhas modificadas); os meristemas axilares são também conhecidos como aréolas (MAUSETH, 2006).

Pertencente ao gênero *Cereus*, a espécie *Cereus peruvianus* Mill. é popularmente conhecida no Brasil como mandacaru. Alguns autores acreditam que a origem desta espécie seja o Brasil, mas isso ainda não está claramente estabelecido (MIZRAHI; NERD, 1999). Por toda a extensão do Brasil as plantas de mandacaru do gênero *Cereus* apresentam morfologia semelhante, mas são denominadas como espécies diferentes. Nas regiões norte e nordeste a

espécie é denominada de *Cereus jamacaru* De Candolle, na região sul de *C. repandus* Miller e também *C. peruvianus*, e na região sudeste do Brasil as plantas de mandacaru são classificadas como *C. hildmannianus* K. Schumann.

Taylor e Zappi (2004) classificaram o mandacaru (*Cereus jamacaru* DC) como uma espécie predominantemente da caatinga, mas que ocorre em outros tipos de ambientes; são espécies que habitam em condições edafoclimáticas caracterizadas por temperaturas elevadas, precipitações pluviométricas irregulares, e baixa fertilidade de solo. É um cacto colunar, muito utilizado como espécie ornamental devido a sua forma e suas flores que são grandes, noturnas, perfumadas e auto-incompatíveis, a polinização é realizada pela abelha *Apis mellifera*, que é ativa durante o dia, nas horas iniciais e finais da abertura da flor (MIZRAHI; NERD, 1999). O mandacaru é também uma das plantas mais conhecidas e cultivadas do gênero *Cereus*.

Principalmente em jardins e floriculturas, podem ser encontradas duas supostas variedades de *C. peruvianus*, com morfologias de caule totalmente distintas. A forma “*monstruosa*” apresenta caule com costelas formando sulcos irregulares e número variável de aréolas, enquanto caules com costela em espiral caracterizaram a variedade “*tortuosa*”. Essa última variedade é caracterizada pela espiral, que os cactos recebem nomes comerciais como “cacto parafuso” ou “rosca”.

Na literatura, encontramos referências a essas duas variedades de *Cereus peruvianus* (WATSON, 2004; BRITTON; ROSE, 1919; KARIMI et al., 2012). De acordo com Britton e Rose (1919), *Cereus peruvianus monstrosus* é uma forma comum de jardim descrita pela primeira vez como uma variedade por De Candolle. Eles descrevem como sendo semelhante à forma típica, exceto que as costelas são frequentemente divididas em tubérculos irregulares ou são irregularmente sulcadas, e explica que já foi chamada de *Cereus monstrosus*, *Cereus monstrosus minor* e *C. monstrosus* Schumann. Sobre a forma “tortuosos”, Britton e Rose (1919, p. 12) afirmam que “*Cereus peruvianus tortuosus* e *Cereus peruvianus tortus* são apenas nomes”.

Portanto, existem contradições quanto à classificação das plantas de *Cereus peruvianus*, assim como a determinação das variedades existentes para a espécie, indicando uma limitação ou ausência de parâmetros morfológicos que possam ser utilizados para discriminar variedades e espécies do gênero.

Outra observação dessa variação foi observada no trabalho de Mangolin et al. (1997), onde indivíduos de *C. peruvianus* regenerados a partir de tecidos de calos apresentaram diferentes tipos morfológicos de caules. Enquanto os indivíduos de *C. peruvianus*, obtidos a

partir de sementes germinadas, têm o caule formado por 4-5 costelas longitudinais e aréolas dispostas de forma linear, os somaclones regenerados *in vitro* apresentaram o número de costelas e a disposição de aréolas característicos de subespécies ou outras espécies do gênero (MANGOLIN et al., 1997; MACHADO et al., 2000). O número de costelas nos somaclones variou de 4 a 9, com aréolas apresentando disposição linear. Indivíduos apresentando costelas quebradas, formando sulcos regulares e irregulares com número variável de aréolas, também foram freqüentes dentre os somaclones de *C. peruvianus*.

Resende et al. (2006) relatam que na cultura de calos de *C. peruvianus* podem ter ocorrido alterações no controle da expansão e no plano de divisão das células, eventos estes que, de acordo com Bolwell (1993), são os responsáveis pela forma e direcionamento das células vegetais, e conseqüentemente, pela forma definitiva das plantas.

2.6 Microssatélites e transferibilidade em Cactáceas

Os marcadores moleculares denominados de SSR (*Simple Sequence Repeat*), também conhecidos como microssatélites, é uma classe de marcadores moleculares baseada em PCR. Este marcador foi desenvolvido por Litt e Luty (1989) e simultaneamente por Weber e May (1989). A abundância e o polimorfismo de microssatélites foram primeiramente demonstrados no genoma humano e de outros eucariontes por Hamada et al. (1982) e Weissenbach et al. (1992). Em plantas, os microssatélites estão amplamente distribuídos nos cromossomos, com freqüência média de um a cada cinquenta mil pares de base (LITT; LUTY, 1989).

Os microssatélites são repetições de poucos pares de bases de DNA (2 – 6 pb) em seqüências, onde as repetições mais abundantes são os dinucleotídeos (repetições de 2 pares de bases). Estas seqüências repetidas são distribuídas aleatoriamente através do genoma (JACOB et al., 1991; AGARWAL et al., 2008). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites ou *loci* SSRs são conservadas, e são utilizadas para construir as seqüências de *primers*, para serem usados na amplificação dos *loci* SSRs usando o método de reação de amplificação em cadeia, mediado por polimerases (PCR). Quando um par de *primers* construído para as regiões flanqueadoras é utilizado para amplificar o *locus* SSR em vários genótipos, este poderá revelar polimorfismo no referido *locus*. Este polimorfismo é observado na forma de diferença no comprimento do segmento de DNA produzido pela reação de amplificação, ou produto amplificado (WEBER; MAY, 1989; LITT; LUTY, 1989).

A capacidade de marcadores moleculares para detectar mudanças sutis na estrutura do genoma torna o seu uso altamente vantajoso em relação aos marcadores tradicionais e morfológicos (CHAPMAN et al., 2002).

A maioria das pesquisas em genética molecular têm se concentrado em culturas de maior importância econômica, como milho ou arroz, ou em espécies modelos, como *Arabidopsis*. Segundo Chapman et al. (2002), os trabalhos realizados em outras espécies podem servir como um trampolim para acelerar o desenvolvimento de ferramentas moleculares para estudo dos cactos.

De acordo com Figueredo et al. (2010), a diversidade genética foi examinada em poucas espécies de cactáceas, porém esses estudos mostram alta variabilidade genética, mesmo quando esta espécie têm uma distribuição restrita. A maioria dos resultados foram obtidos utilizando marcadores isoenzimáticos, e grande parte dos trabalhos foram realizados para espécies de cactos colunares polinizados por morcegos (NASSAR et al., 2001; HAMRICK, 2001; NASON et al., 2002; NASSAR et al., 2002; 2003) esfingídeos (CLARK-TAPIA; MOLINA-FREANER, 2003; CLARK-TAPIA et al., 2005; MOLINA-FREANER; CLARK-TAPIA, 2005) e beija-flor, no caso de espécies com flores diurnas (LAMBERT et al., 2006a; 2006b). Quase nada se sabe sobre a diversidade genética de cactos com outros mecanismos de dispersão de genes e sistemas de desenvolvimento e reprodutivo (NASSAR et al., 2002). Segundo Hamrick et al. (2001), a estrutura genética de populações em cactos colunares está associada com a potencialidade dos vetores de dispersão dos genes.

Os estudos com marcadores SSR em cactáceas são mais restritos, e se concentram em alguns gêneros, principalmente de espécies endêmicas e ameaçadas de extinção. Otero-Arnaiz et al. (2004; 2005) desenvolveram o primeiro conjunto de marcadores microssatélites para o estudo populacional nesta família, específicos para *Polaskia chichipe*, um cacto colunar do México central. Terry et al. (2006) mapearam seis *loci SSR* polimórficos na espécie *Astrophytum asterias*, uma espécie norte-americana ameaçada de extinção. Os seis *primers* se mostraram eficazes e altamente informativos para a geração de dados preliminares da genética de população dessa espécie.

Helsen et al. (2007) desenvolveram 16 marcadores microssatélites para espécies de *Opuntia*, endêmicas do arquipélago de Galápagos. Os marcadores apresentaram um elevado grau de polimorfismo, com números de alelos por *locus* variando de seis a 53, e evidenciam uma possível poliploidia nestes cactos.

Para a cactácea *Echinocactus grusonii*, Hardesty et al. (2008) descreveram doze *loci SSR*, e para *Ariocarpus bravoanus*, Hughes et al. (2008) desenvolveram mais oito *primers* para microssatélites, estes marcadores tem sido utilizados na tentativa de ajudar em programas de conservação dessas espécies, que são facilmente encontradas nos jardins e em regiões de

domesticação, mas no seu habitat natural estão criticamente ameaçadas em uma pequena região no México.

Solórzano et al. (2009) desenvolveram oito marcadores microssatélites para o cacto *Mammillaria crucigera*, uma espécie endêmica da região central do México e também ameaçada. Arakaki et al. (2010) isolaram 19 *primers* para microssatélites a partir de duas espécies do gênero *Haageocereus* (*H. tenuis* e *H. pseudomelanosteles*).

Mais recentemente, Butterworth (2011) realizou uma análise em *Coryphanta robustipina* spp. *robustipina*, uma cactácea cuja relação taxonômica não é bem esclarecida, e isso resultou em mais dez *primers* para microssatélites. Para a espécie *Pilosocereus machrisii*, nativa do leste tropical da América do Sul, Perez et al. (2011) desenvolveram onze *primers* microssatélites. Até o momento, o último conjunto de *primers* para cactáceas foi desenvolvido por Schwabe et al. (2013), que identificaram treze *loci* microssatélites nas espécies *Sclerocactus glaucus* e *S. parviflorus*, ambas listadas como ameaçadas e de taxonomia confusa, devido as semelhanças morfológicas com espécies estreitamente relacionadas.

Possivelmente, o número restrito de análises genéticas em cactáceas com marcadores microssatélites, e o pequeno número destes marcadores desenvolvidos deve-se a dificuldade na obtenção de SSRs específicos; para as diferentes espécies de cactáceas temos até o momento 111 microssatélites desenvolvidos. As dificuldades para o desenvolvimento de microssatélites envolvem algumas etapas como a construção de bibliotecas genômicas e seqüenciamento do DNA, sendo que estas etapas são muito laboriosas e demoradas, portanto o uso de marcadores heterólogos pode facilitar e agilizar os estudos em Cactaceae.

Também conhecida como amplificação heteróloga ou transposição de marcadores (NASSI et al., 2005), a transferibilidade é uma característica desejada, que consiste na utilização de *primers* microssatélites para amplificação de *loci* SSRs em uma espécie diferente da qual ele foi mapeado. Para ser transferível, o *primer* tem de ser capaz de amplificar um único *locus* (ou poucos *loci*) e para ser informativo tem que ser polimórfico na espécie em questão (MNEJJA et al., 2010).

Os microssatélites apresentam um alto nível de transferibilidade entre espécies relacionadas, e muitas vezes podem ser utilizados como marcadores de âncora para o mapeamento comparativo e estudos evolutivos (VARSHNEY et al., 2005a). Estas características fornecem a base para a sua aplicação com sucesso numa vasta variedade de campos fundamentais e aplicáveis (CHISTIAKOV et al., 2006).

Microssatélites são transferíveis porque suas regiões flanqueadoras são altamente conservadas entre táxons, permitindo a amplificação de espécies cruzadas, isto é, iniciadores

desenvolvidos em uma espécie podem ser usados para estudar outras espécies do mesmo gênero ou família, especialmente para os vertebrados, como peixes, répteis e mamíferos (PEAKALL et al, 1998; RICO et al., 1996). Em geral, SSRs são mais transferíveis entre espécies do mesmo gênero, ou entre gêneros estreitamente relacionados, que entre gêneros distantes da mesma família (PEAKALL et al., 1998; ZHANG et al., 2005), embora podemos observar exemplos de espécies congêneres com um baixo nível de transferibilidade (PALOP et al., 2000; GARCIA-MAS et al., 2004).

Muitos pesquisadores têm estudado a possibilidade de transferência de SSRs e isso já foi demonstrado com sucesso em muitas espécies (ELLIS; BURKE, 2007; VARSHNEY et al., 2007). De acordo com Roa et al. (2000) a transferência de marcadores SSRs entre gêneros é geralmente baixa. No entanto, Varshney et al. (2005b) encontraram elevada similaridade de sequências entre os membros da família Poaceae. Zhao et al. (2011) mostraram uma taxa de transferibilidade elevada (86%) de marcadores SSR originados em *Brachypodium* para *Miscanthus sinensis*, sendo que 31% dos marcadores transferíveis produziram bandas polimórficas perfeitas e de fácil interpretação.

Zucchi et al. (2002) testaram 346 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para *Eucalyptus spp.*, e apenas dez foram considerados transferíveis para *Eugenia dysenterica*, uma espécie pertencente a outro gênero da família Myrtaceae. Parida et al. (2009) testaram o potencial de transferibilidade de *primers* desenvolvidos para cana-de-açúcar em outras espécies do gênero *Saccharum* e para cinco espécies de cereais, encontrando uma transferibilidade de 93,2% dentro do gênero *Saccharum* e de 25% para os cereais. Assim, fica evidente o potencial para a transferência de marcadores microssatélites dentro do mesmo gênero e entre gêneros diferentes. Este é um resultado importante, devido ao custo relativamente elevado e da maior quantidade de tempo necessária para o desenvolvimento de *primers* específicos para cada espécie, principalmente as nativas.

A possibilidade de transferência de SSRs derivados de bases de dados EST (EST-SSR) é maior do que a dos SSRs derivados de bibliotecas enriquecidas de DNA genômico (HOSHINO et al., 2012). EST-SSRs originam-se de regiões expressas, e, portanto, elas são ainda mais conservadas entre espécies relacionadas do que as regiões não codificantes (VARSHNEY et al., 2005a).

A chance de uma amplificação heteróloga bem sucedida de qualquer sequência de DNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) está inversamente relacionada com a distância evolutiva entre as duas espécies (ZUCCHI et al., 2002), e mostra-se como

alternativa para solucionar a carência de *primers* microssatélites disponíveis para estudos de diversidade genética em muitas espécies.

Em cactáceas a transferibilidade tem sido observada entre várias espécies. 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% para vinte e sete espécies distintas de cactos. No trabalho realizado por Otero-Arnaiz et al. (2004), a transferibilidade obtida por estes autores foi entre 28,5% a 71,4%, esta transferibilidade foi observada para seis gêneros distintos de cactos, utilizando *primers* microssatélites desenvolvidos e caracterizados em *Polaskia chichipe*. Ao analisar a diversidade entre diferentes espécies de *Opuntia*, Caruso et al. (2010) também observaram um alto grau de transferibilidade entre diferentes genótipos, tornando evidente a importância dos SSRs em estudos filogenéticos de cactáceas.

Faria-Tavares (2011) e Fernandes (2013) testaram 33 pares de *primers* heterólogos em plantas de mandacaru e obtiveram uma taxa de transferibilidade de 15,15% e 30,30%, respectivamente. Monteiro (2013) testou a transferibilidade desses mesmos *primers* para *Pilosocereus gounellei*, uma cactácea nativa do nordeste brasileiro, e a transferibilidade foi de 24,24%, enquanto Martin (2011) encontrou uma transferibilidade de 27,27% desses *primers* para somaclones de *Cereus peruvianus*.

3. Referências

- ABRASH, E. B.; BERGMANN, D. C. Asymmetric Cell Divisions: A View from Plant Development. **Developmental Cell**, v. 16, p. 783-796, 2009.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 617–631, 2008.
- ALTESOR, A.; EZCURRA, E. Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti. **Journal of Arid Environments**, v. 53, p. 557-567, 2003.
- ALTESOR, A.; SILVA, C.; EZCURRA, E. Allometric neoteny and the evolution of succulence in cacti. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 114, p. 283–292, 1994.
- 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**, v. 51/52, p. 367-377, 1995.
- ALVAREZ, M.; COSTA, S.C.; UTUMI, H.; HUBER, A.; BECK, R.; FONTANA, J.D. The anionic glycan from the cactus *Cereus peruvianus*-structural features and potential uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34/35, p. 283-295, 1992.
- ANDERSON, E. F. **The Cactus Family**. Oregon: Timber Press, 2001.
- ARAKAKI, M.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; SPERANZA, P.R. Characterization of polymorphic microsatellite *loci* In *Haageocereus* (Trichocereae, Cactaceae). **American Journal of Botany**, e17-e19, 2010.
- ARNOLD, D. H.; MAUSETH, J. D. Effects of environmental factors on development of wood. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 367-371, 1999.
- BÁRCENAS, R. T.; YESSON, C.; HAWKINS, J. A. Molecular systematics of the Cactaceae. **Cladistics**, v. 27, p. 470–489, 2011.
- BARROS, M.J.; NOZAKI, J. Pollutants abatement from effluents of paper and pulp industries by flocculation/coagulation and photochemical degradation. **Quimica Nova**, v. 25, p. 736-740, 2002.
- BEM SALEM, H.; NEFZAQUI, A. *Opuntia* ssp. – a strategic fodder and efficient tool to combat desertification in the Wana region. In: MONDRAGON-JACOBO, C.; PÉREZ-GONZALÉZ, S. E. (Ed.) **Cactus (*Opuntia* Spp.) as forage**. Roma: FAO, n. 169, 2002. p. 73-90.
- BHALLA, P. L.; SINGH, M. B. Molecular control of stem cell maintenance in shoot apical meristem. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 249-256, 2006.
- BOLWELL, G.P. Dynamic aspects of the extracellular matrix. **International Review of Cytology**, v. 146, p. 261-324, 1993.

- BOWMAN, J. L.; Y. ESHED. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. **Trends in Plant Science**, v.5, p. 110–115, 2000.
- BOYLE, T.H.; ANDERSON, E. Biodiversity and Conservation. In: NOBEL, P.S. **Cacti Biology and Uses**. Los Angeles: University of California Press, 2002. p. 125–141.
- BRITTON, N.L.; ROSE, J. N. **The Cactaceae**. Carnegie Institute, Washington, 1919.
- BRITTON, N.L.; ROSE, J.N. **The Cactaceae: description and illustrations of plants of the cactus family**, volumes 1e 2. Dover, New York, 1963.
- BUTTERWORTH, C. A. Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellite *loci* in *Coryphanta robustipina* ssp. *robustipina*. **Conservation Genetics Resources**, v. 3, p. 247-249, 2011.
- CALVENTE, A.; ANDREATA, R. H. P.; VIEIRA, R. C. Stem anatomy of *Rhipsalis* (Cactaceae) and its relevance for taxonomy. **Plant Systematics and Evolution**, v. 276, p. 271-277, 2008.
- CALVENTE, A.; ZAPPI, D.C.; FOREST, F. E LOHMANN, L.G. Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (Cactaceae) and taxonomic implications for *Schlumbergera* and *Hatiora*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 58, p. 456–468, 2011.
- 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**, v. 290, p. 85-97, 2010.
- CAVALCANTI, N.B.; RESENDE, G. M. Efeito de diferentes substratos no desenvolvimento de mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.), facheiro (*Pilosocereus pachycladus* RITTER), xiquexique [*Pilosocereus gounellei* (A. WEBER EX K. SCHUM.) BYL. EX ROWL.], e coroa-de-frade (*Melocactus bahiensis* Britton e Rose). **Revista Caatinga**, v. 20, n. 1, p. 28-35, 2007.
- CHAPMAN, B.; JACOBO, C. M.; BUNCH, R. A.; PATERSON, A. H. Breeding and Biotechnology. In: NOBEL, P. S. **Cacti: Biology and Uses**. Califórnia, EUA: Ed. University of California Press, 2002. p. 255-271.
- CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, p.1-29, 2006.
- CLARK, S.E. Cell signalling at the shoot meristem. **Nature Reviews**, v. 2, p. 276-284, 2001.
- CLARK-TAPIA, R.; ALFONSO-CORRADO, C.; EGUIARTE, L.E.; MOLINA-FREANER F. Clonal diversity and distribution in *Stenocereus euruca* (Cactácea), a narrow endemic cactus of sonoran Desert. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 2, p. 272-278, 2005.
- CLARK-TAPIA, R.; MOLINA-FREANER, F. The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. **Heredity**, v. 90, p. 443-450, 2003.

- COEN, E.S.; MEYEROWITZ, E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**, v. 353, p. 31–37, 1991.
- CONDE, L. F. Anatomical comparisons of five species of *Opuntia* (Cactaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 62, p. 425-473, 1975.
- CORNEJO, D. O.; SIMPSON, B. B. Analysis of form and function in North American columnar cacti (tribe Pachycereeae). **American Journal of Botany**, v. 84, p. 1482–1501, 1997.
- DAVET, A. **Estudo Fitoquímico e biológico do cacto – *Cereus jamacaru de Candolle, Cactaceae***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em: <http://www.farmaceuticas.ufpr.br/pdf/teses_resumos/Aline_Davet_dis.pdf>. Acesso em: 09 mai. 2013.
- DEMBITSKY, M. V.; REZANKA, T. Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1075-1080, 1996.
- ELLIS, J. R.; BURKE, J. M. EST–SSRs as a resource for population genetic analyses. **Heredity**, v. 99, p. 125–132, 2007.
- ESAU, K. **Anatomy of Seed Plants**. John Wiley & Sons, New York, 1977.
- FARIA-TAVARES, J. S. **Marcadores moleculares para a caracterização genética de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)**. Maringá: UEM, 2011. 129 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.
- FERNANDES, V. N. A. **Transferibilidade de microssatélites para o estudo de genética de populações de mandacaru**. Maringá: UEM, 2013. 87p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Maringá, 2013.
- FIGUEREDO, C. J.; NASSAR, J. M.; GARCÍA-RIVAS, A. E.; GONZÁLEZ-CARCACÍA, J. A. Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. **Journal of Arid Environments**, v. 74, p. 1392-1398, 2010.
- FRANCESCHI, V. R.; HORNER JR, H. T. Calcium oxalate crystals in plants. **Botanical Review**, v. 46, p. 361-427, 1980.
- FRANCIS, D. Cell size and organ development in higher plants. In: FRANCIS D.; DUDITS, D.; INZE, D. (Ed.). **Plant Cell Cycle**. London: Portland Press, 1998. p. 187-206.
- GARCIA-MAS, J.; MONFORTE, A. J.; ARÚS, P. Phylogenetic relationships among *Cucumis* species based on the ribosomal internal transcribed spacer sequence and microsatellite markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 248, p. 191–203, 2004.
- GIBSON, A. C. Comparative anatomy of secondary xylem in Cactoideae (Cactaceae). **Biotropica**, v. 5, p. 29–65, 1973.
- GIBSON, A. C. Wood anatomy of Platyopuntias. **Aliso**, v. 9, p. 279–307, 1978.

- GIBSON, A.C. Architectural designs of wood skeletons in Cacti. **The Cactus and Succulent Journal of Great Britain**, v. 40, p. 73–80, 1978.
- GIBSON, A.C., SPENCER, K.C., BAJAJ, R., MCLAUGHLIN, J.L. The ever-changing landscape of cactus systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 73, p. 532–555, 1986.
- GIBSON, C.A.; NOBEL, P.S. **The Cactus Primer**. Harvard University Press, Cambridge, M.A, 1986.
- GOLDSTEIN, G.; NOBEL, P. S. Changes in osmotic pressure and mucilage during low-temperature acclimation of *Opuntia ficus-indica*. **Plant Physiology**, v. 97, p. 954-961, 1991.
- 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**, v.76, n. 6, p. 709-713, 2001.
- HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **PNAS**, v. 79, n. 21, p. 6465-6469, 1982.
- HAMRICK, J.L.; NASON, J. D.; FLEMING, T.H.; NASSAR, J.M. Genetic diversity in columnar cacti. In FLEMING, T.H.; VALIENTE-BANUET, A. (eds.). **Columnar cacti and their mutualists: Evolution, ecology and conservation** Arizona: University of Arizona Press, 2001. p. 122-133.
- HARDESTY, B. D.; HUGHES, S. L.; RODRIGUEZ, V. M.; HAWKINS, J. A. Characterization of microsatellite *loci* for the critically endangered cactus *Echinocactus grusonii*, and their cross-species utilization. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 164-167, 2008.
- HELSEN, P.; VERDYCK, A.; 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**, v. 7, p. 454-456, 2007.
- HELSEN, P.; VERDYCK, P.; TYE, A.; VAN DONGEN, S. Low levels of genetic differentiation between *Opuntia echios* varieties on Santa Cruz (Galápagos). **Plant Systematic and Evolution**, v. 279, p. 1–10, 2009.
- HICKS, D. J.; MAUCHAMP, A. Evolution and conservation biology of the Galápagos opuntias (Cactaceae). **Haseltonia**, v. 4, p. 89-102, 1996.
- HICKS, D. J.; MAUCHAMP, A. Population structure and growth patterns of *Opuntia echios* var. *gigantean* along an Elevational Gradient in the Galapagos Islands. **Biotropica**, v. 32, n. 2, p. 235-243, 2000.
- HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; NOBILE, P. M.; MORELLI, K. A. Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis. In: CALISKAN, M. (ed). **Genetic Diversity in Microorganisms**, InTech: 2012. p. 149-170.

- 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**, v. 8, p. 1068-1070, 2008.
- HUNT, D. The genera of the Cactaceae: towards a new consensus. **Bradleya**, v. 4, p. 65–78, 1986.
- HUNT, D.; TAYLOR, N. P. E CHARLES, G. **The New Cactus Lexicon**. UK: DH books, 2006.
- JACOB, H. J.; LINDPAINNESR, K.; KUSUMIR, E.L.; BUNKERY, K.; MAO, I. P.; GANTENV, D.; DZAU, J.; LANDER, E. S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v. 67, p. 213–224, 1991.
- KARIMI, N.; KIANAMIRI, S.; MOUSAVI, E.; BARKHORDAR, M. Study of genotype effect, different media and time of explanting on callus induction in *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Trakia Journal of Sciences**, v. 10, n. 3, p. 19-22, 2012.
- KATSIR, L.; DAVIES, K. A.; BERGMANN, D. C.; LAUX, T. Peptide signaling in plant development. **Current Biology**, v. 21, p. 356-364, 2011.
- KIESLING, R. Cactaceae. In: **Flora Patagónica 5, Dicotiledoneas dialipétalas (Oxalidaceae a Cornaceae)** (M. N. Correa, ed.). Colección Científica del INTA 8, Buenos Aires, Argentina, 1988. p. 218-243.
- KOROTKOVA, N.; BORSCH, T.; QUANDT, D.; TAYLOR, N.P.; MÜLLER, K.F. E BARTHLOTT, W. What does it take to resolve relationships and to identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipsalideae (cactaceae). **American Journal of Botany**. v. 98, n. 9, p. 1549–1572, 2011.
- 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**, v. 97, p. 389–403, 2006a.
- LAMBERT, S. M.; BORBA, E. L.; MACHADO, M. C. Allozyme diversity and morphometrics of the Endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus albicephalus* (*Melocactus ernestii* x *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, v. 21, p. 93–108, 2006b.
- LITT, M.; LUTTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401, 1989.
- 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**, v. 7, p. 77-80, 2000.
- MANGOLIN C.A., PRIOLI A.J., MACHADO M.F.P.S. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, v. 35, p. 189-204, 1997.

MARK, H.F. Biopolymers. In: MARK, H.F. **Encyclopedia of Chemical Technology**. 3^a ed. New York: Kirk-Othmer, 1979. p. 23-35.

MARTIN, P. G. **Transferibilidade de microssatélites de cactáceas para a análise de regenerantes clonais (R0) de *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae)**. Maringá: UEM, 2011. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

MARTINDALE, M. **The extra pharmacopeia pharmaceutical**. 27^a ed. London: Press. London, 1979.

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

MAUSETH, J. D. Collapsible water-storage cells in cacti. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 122, p. 145–151, 1995.

MAUSETH, J. D. Comparative anatomy of *Espostoa*, *Pseudoespostoa*, *Thrixanthocereus*, and *Vatricania* (Cactaceae). **Bradleya**, v. 17, p. 33–43, 1999b.

MAUSETH, J. D. Comparative structure-function studies within a strongly dimorphic plant, *Melocactus intortus* (Cactaceae). **Bradleya**, v. 7, p. 1-11, 1989.

MAUSETH, J. D. Medullary bundles and the evolution of cacti. **American Journal of Botany**, v. 80, p. 928–932, 1993b.

MAUSETH, J. D. The structure and development of an unusual type of articulated laticifer in *Mammillaria* (Cactaceae). **American Journal of Botany**, v. 65, n. 4, p. 415-420, 1978.

MAUSETH, J. D. Water-storing and cavitation-preventing adaptations in wood of cacti. **Annals of Botany**, v. 72, p. 81–89, 1993a.

MAUSETH, J. D.; LANDRUM, J. V. Relictual vegetative anatomical characters in Cactaceae: the genus *Pereskia*. **Journal of Plant Research**, v. 110, n. 1, p. 55-64, 1997.

MAUSETH, J. D. **Plant Anatomy**. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings Publishing Co., 1988.

MAUSETH, J. D. Structure–Function Relationships in Highly Modified Shoots of Cactaceae. **Annals of Botany**, v. 98, p. 901–926, 2006.

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

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Vol. II. Clarendon Press, Oxford, 1950.

MEYEROWITZ, E.M. Genetic control of cell division patterns in developing plants. **Cell**, v.88, p. 299–308, 1997.

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

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

MNEJJA, M.; GARCIA-MAS, J.; AUDERGON, J.M.; ARÚS, P. *Prunus* microsatellite marker transferability across rosaceous crops. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, p. 689-700, 2010.

MOLINA-FREANER, F.; CLARK-TAPIA, R. Clonal diversity and allelic relationships between two closely related species of columnar cacti from the Sonoran Desert: *Stenocereus eruca* and *Stenocereus gummosus*. **International Journal of Plant Sciences**, v. 166, n. 2, p. 257-264, 2005.

MONTEIRO, E. R. **Diversidade genética de xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl.) usando marcadores SSR e AFLP**. UEM: Maringá. 118 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

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

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via an polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NASON, J.D.; HAMRICK, J.L.; FLEMING, T.H. Historical vicariance and post-glacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran desert cactus. **Evolution**, v. 56, n. 11, p. 2214-2226, 2002.

NASSAR, J.M; HAMRICK J.L.; FLEMING, T.H. Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactacea). **Heredity**, v. 87, p. 69-79, 2001.

NASSAR, J.M; HAMRICK, J.L; FLEMING, T.H. Population genetic structure of Venezuelan chiropterophilous *Colummar cacti* (Cactacea). **American Journal of Botany**, v. 90, n. 11, p. 1628-1637, 2003.

NASSAR, J.M; HAMRICK; J.L; FLEMING, T.H. Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae]). **The Journal of Heredity**, v. 93, n. 3, p. 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: **Anais do XIV CIC-Congresso de Iniciação Científica. Pelotas, 2005**. CD-ROM. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005.

NERD, A.; RAVEH, E.; MIZRAHI, Y. Adaptation of five columnar cactus species to various conditions in the Negev desert of Israel. **Economic Botany**, v. 43, n. 3, p. 31-41, 1993.

NIKLAS, K. J.; MAUSETH, J. D. Relationships among shoot apical meristem ontogenic features in *Trichocereus pachanoi* and *Melocactus matanzanus* (Cactaceae). **American Journal of Botany**, v. 68, p. 100-105, 1981.

NOBEL, P. S. **Environmental Biology of Agaves and Cacti**. Cambridge University Press, New York, 1988.

NOBEL, P. S. **Los Incomparables Agaves y Cactus**. Editorial Trillas, Mexico City, 1998.

NOBEL, P. S. Nutrient levels in cacti – relation to nocturnal acid accumulation and growth. **American Journal of Botany**, v. 70, p. 1244-1253, 1983.

NOBEL, P. S. **Physicochemical and Environmental Plant Physiology**, 2nd ed. Academic Press, San Diego, California, 1999.

NOBEL, P. S. **Remarkable Agaves and Cacti**. Oxford University Press, New York, 1994.

NOBEL, P. S. Tansley Review 32. Achievable productivities of CAM plants: basis for high values compared with C3 and C4 plants. **The New Phytologist**, v. 119, p. 183–205, 1991.

NOBEL, P. S.; CAVELIER, J.; ANDRADE, J. L. Mucilage in cacti: Its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 641-648, 1992.

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

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.

OKAZAKI, S.; KINOSHITA, K.; ITO, S.; KOYAMA, K.; YUASA, H.; TAKAHASHI, K. Triterpenoid saponins from *Echinopsis macrogona* (Cactaceae). **Phytochemistry**, v. 72, p. 136–146, 2011.

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

OPPENHEIMER, D. G. Genetics of plant cell shape. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 520-524, 1998.

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**, v. 14, p. 1603-1611, 2005.

OTERO-ARNAIZ, A.; CRUSE-SANDERS, J.; CASAS, A.; HAMRICK, J. L. Isolation and characterization of microsatellites in the columnar cactus: *Polaskia chichipe* and cross-species amplification within the Tribe Pachycereeae (Cactaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 265-267, 2004.

PALOP, M.; PALACIOS, C.; GONZÁLES-CANDELAS, F. Development and across-species transferability microsatellite markers in the genus *Limonium* (Plumbaginaceae). **Conservation Genetics**, v. 1, p. 177-179, 2000.

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**, v. 118, p. 327-338, 2009.

PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, n.10, p. 1275–1287, 1998.

PEREZ, M. F.; TÉO, M. F.; ZAPPI, D. C.; TAYLOR, N. P.; MORAES, E. M. Isolation, characterization, and cross-species amplification of polymorphic microsatellite markers for *Pilosocereus machrisii* (Cactaceae). **American Journal of Botany**, e204-e206, 2011.

PIEN, S.; WYRZYKOWSKA, J.; MCQUEEN-MASON, S.; SMART, C.; FLEMING, A. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 11812–11817, 2001.

PLIESKE, J.; STRUSS, D. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica* L. development in *Brassica napus* and abundance in Brassicaceae species. **Theoretical Applied Genetics**, v. 102, n. 5, p. 689-694, 2001.

PYKE, K. *Arabidopsis* F its use in the genetic and molecular analysis of plant morphogenesis. **New Phytologist**, v. 128, p. 19–37, 1994.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Células e Tecidos do Corpo da Planta. In: RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Sétima Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

REBMAN, J. P.; PINKAVA, D. J. *Opuntia* cacti of North America - An overview. **The Florida Entomologist**, v. 84, n. 4, p. 474-483, 2001.

REINHARDT, D.; WITWER, F.; MANDEL, T.; KUHLEMEIER, C. Localized up regulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. **Plant Cell**, v. 10, p. 1427-1437, 1998.

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

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

RICO, C.; RICO, I.; HEWITT, G. 470 million years of conservation of microsatellite *loci* among fish species. **Proceedings Biological Sciences**, v. 263, n.1370, p. 549–557, 1996.

RIZZINI, C.T. Cactáceas: Os segredos da Sobrevivência. **Ciência Hoje**, p. 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**, v. 87, p. 1647-1655, 2000.
- SALGADO, T. T; MAUSETH, J. D. Shoot anatomy and morphology. In: NOBEL, P.S. **Cacti Biology and Uses**. Los Angeles: University of California Press, 2002. p. 125-141.
- SCHEINVAR, L. **Cactaceae**. México: Universidade Nacional Autonoma do México, 1985.
- SCHWABE, A. L.; HUBBARD, A. R.; NEALE, J. R.; McGLAUGHLIN, M. E. Microsatellite *loci* development for rare Colorado *Sclerocactus* (Cactaceae). **Conservation Genetics Resources**, v. 5, p. 69–72, 2013.
- SILVA, J. G. M.; LIMA, G. F. C.; PAZ, L. G.; MATOS, M. M. S.; BARRETO, M. F. P. Utilização de cactáceas nativas associadas à silagem de sorgo na alimentação de bovinos no semiárido norte-rio-grandense. **Revista Eletrônica Científica Centauro**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2010.
- SILVA, J. G. M.; MELO, A. A. S.; RÊGO, M. M. T.; LIMA, G. F. C.; AGUIAR, E. M. Cactáceas nativas associadas a fenos de flor de seda e sabiá na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 2, p. 158-164, 2011.
- SOLÓRZANO, S.; CORTÉS-PALOMEC, A. C.; IBARRA, A.; DÁVILA, P.; OYAMA, K. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite *loci* in the threatened endemic *Mammillaria crucigera* (Cactaceae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, 156–158, 2009.
- SPEIRS, D.C. The cacti of western Canada (part 3). **National Cactus and Succulent Journal**, v. 37, p. 53–54, 1982.
- TANAKA, L. Y. A.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, J. E.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; MARQUES, M. C. A.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 714–721, 2010.
- TAYLOR, N. P. Cactaceae. In: **Cactus and Succulent Plants. Status Survey and Conservation Action Plan**. Compiled by Sara Oldfield. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 1997.
- TAYLOR, N.; ZAPPI, D. **Cacti of Eastern Brazil**. The Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AB, UK, 2004.
- TERRAZAS, T. Occurrence of perforated ray cells in genera of Pachycereeae (Cactaceae). **IAWA Journal**, v. 21, n. 4, p. 457– 462, 2000.
- TERRAZAS, T.; LOZA-CORNEJO, S. Phylogenetic relationships of Pachycereeae: a cladistic analysis based on anatomical-morphological data. In: FLEMING, T.H.; VALIENTE-BANUET, A. (eds) **Evolution, ecology, conservation of the columnar cacti, their mutualists**. Arizona University Press, Arizona, 2002. p. 66-86.

- TERRY, M.; PEPPER, A.E.; MANHART, J.R. Development and characterization of microsatellite *loci* in endangered *Astrophytum asterias* (Cactaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 865-866, 2006.
- TOMLINSON, P. B.; WHEAT, D. W. Bijugate phyllotaxis in Rhizophoreae (Rhizophoraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 78, n. 4, p. 317-321, 1979.
- TURBAK, A.F. Cellulose. In: TURBAK, A.F. **Cellulose. Encyclopedia of Chemical Technology**. 3^a ed. New York: Kirk- Othmer., 1979. p. 60-72.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n.1, p.48-55, 2005a.
- VARSHNEY, R. K.; THUDI, M.; AGGARWAL, R.; BORNER, A. Genic molecular markers in plants: development and applications. In: VARSHNEY, R.K.; TUBEROSA, R. (Eds). **Genomics assisted crop improvement: genomics approaches and platforms**, v. 1. Springer, Dordrecht, 2007. p. 13-29.
- VARSHNEY, R.; SIGMUND, R.; BÖRNER, A.; KORZUN, V.; STEIN, N.; SORRELLS, M. E.; LANGRIDGE, P.; GRANER, A. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. **Plant Science**. v. 168, n. 1, p. 195–202, 2005b.
- VRIES, J.X.; MOYNA, P.; DIAZ, V. Alkaloides cactus Uruguay. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 3, p. 21-23, 1971.
- WALKER, K. L.; MÜLLER, S.; MOSS, D.; EHRHARDT, D. W.; SMITH, L. G. *Arabidopsis* TANGLED Identifies the Division Plane throughout Mitosis and Cytokinesis. **Current Biology**, v. 17, p. 1827–1836, 2007.
- WALLACE, R. S.; GIBSON, A. C. Evolution and Systematics. In: NOBEL, P. S. **Cacti Biology and Uses**. Califórnia, EUA: Ed. University of California Press, 2002. p. 1-21.
- WATSON, W. Cactus culture for amateurs: being descriptions of the various cactuses grown in this country, with full and practical instructions for their successful cultivation. eBook: Projeto Gutenberg. Disponível em: <http://archive.org/stream/cactusculturefor13357gut/13357.txt>. Acesso em: 16 fev. 2013.
- 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**, v. 44, p. 388-396, 1989.
- 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.). **In new crops**. New York: Wiley, 1993. p. 471-486.
- WEISSENBACH, J.; GYAPAY, G.; DIB, C.; VIGNAL, A.; MORISSETTE, J.; MILLASSEAU, P.; VAYSSEIX, G.; LATHROP, M. A second-generation linkage map of the human genome. **Nature**, v. 359, p. 794–801, 1992.
- WHISTTER, R.L. **Methods of Carbohydrate Chemistry**. Ed. Academic press. London, 1963.

ZALAPA, J. E.; CUEVAS, H.; ZHU, H.; STEFFAN, S.; SENALIK, D.; ZELDIN, E.; McCOWN, B.; HARBUT, R.; SIMON, P. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) *loci* in the plant sciences. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 2, p. 193–208, 2012.

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

ZAPPI, D. C. *Pilosocereus* (Cactaceae). The genus in Brazil. **Succulent Plant Research 3**. David Hunt, Dorset, United Kingdom, 1994.

ZHANG, L. Y.; BERNARD, M.; LEROY, P.; FEUILLET, C.; SOURDILLE, P. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. **Theoretical Applied Genetics**, v. 111, p. 677–687, 2005.

ZHAO, H.; YU, J.; YOU, F.M.; LUO, M.; PENG, J. Transferability of microsatellite markers from *Brachypodium distachyon* to *Miscanthus sinensis*, a potential biomass crop. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n.3, p. 232–245, 2011.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENCOSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 512-513, 2002.

CAPÍTULO 2

Caracterização genética de variedades morfológicas de *Cereus peruvianus* Mill. utilizando marcadores microssatélites

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Conservation Genetics*.

Caracterização genética de variedades morfológicas de *Cereus peruvianus* Mill. utilizando marcadores microssatélites

Andréa Florindo das Neves¹, Vanessa Neves de Azevedo Fernandes², Eliane Rodrigues Monteiro², Claudete Aparecida Mangolin³, Maria de Fátima Pires da Silva Machado³

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Brasil. E-mail: deiafn_16@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

³Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

Resumo: *Cereus peruvianus* é uma espécie bem difundida no território brasileiro, inclui as supostas variedades “*monstruosos*” e “*tortuosos*”. Ela é muito utilizada com fins ornamentais, industriais, sendo a principal forrageira em ambientes secos. A proposta deste trabalho foi utilizar sete *loci* SSR heterólogos para análise da diversidade genética dos morfotipos, resultando na amplificação de 17 alelos, com média de 2,43 alelos por *locus* polimórfico e um polimorfismo médio de 90,47%. As frequências variáveis dos alelos *A*, *B* ou *C* nos sete *loci* SSR conferiram uma heterozigosidade observada que variou de 0,00 a 0,7368 e a heterozigosidade esperada variou de 0,00 a 0,6771. O valor médio de F_{IS} para os sete *loci* foi de 0,1821, mostrando excesso de homozigotos, e a análise da divergência genética entre os três grupos de amostras foi moderado ($F_{ST}=0,0962$). A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior variância se encontra dentro das populações de cada morfotipo com valores de F_{ST} e R_{ST} iguais a 87% e 85%, respectivamente. A similaridade entre as amostras variou de 0,8456 a 0,9329, e o dendrograma indicou a maior similaridade entre *C. peruvianus* com morfologia normal e a variedade *tortuosus*. Confirmando a não especificidade de alelos associados à morfologia, o *bar plot* evidenciou que os três morfotipos compartilham alelos nos sete *loci* estudados. A maior diferenciação genética em nível molecular (especiação) observada entre as variedades *tortuosus* e *monstruosus* deve estar sendo direcionada por um rígido processo de seleção artificial, uma vez que estas duas variedades apresentam um acentuado caráter ornamental.

Palavras-chave: Cactaceae, *Cereus peruvianus*, *tortuosus*, *monstruosus*, transferibilidade.

Introdução

A família das cactáceas engloba cerca de 127 gêneros e 1.438 espécies (Hunt et al. 2006), nativas do Novo Mundo (Wallace e Gibson 2002); é endêmica das Américas e no Brasil ocorrem em praticamente todos os biomas, sendo estes de regiões áridas e semiáridas. Adaptações anatômicas, fisiológicas e morfológicas, como caule suculento com cutícula espessa, metabolismo CAM e uso eficiente da água, com baixo requerimento hídrico, foi o que tornou possível o seu desenvolvimento em ambientes áridos ou desérticos (Mizrahi e Nerd 1999). A classificação da família foi desenvolvida pelo Grupo Internacional de Sistemática de Cactaceae e reconhece quatro subfamílias: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae, e Cactoideae (Hunt et al. 2006). Cactoideae é a maior subfamília, com sete tribos (Hunt et al. 2006). A maioria das espécies encontra-se nesta subfamília e as plantas podem ser arbustivas, arbóreas, trepadeiras ou epífitas. No Brasil, Cereeae é o grupo mais representativo, juntamente com Rhipsalideae, sendo o seu centro de diversidade a região Nordeste, considerado como o terceiro maior centro de diversidade para a família (Taylor 1997). Na tribo Cereeae encontramos o gênero *Cereus*, que engloba algumas das espécies mais conhecidas no Brasil.

Cereus peruvianus Mill. é um cacto ornamental muito conhecido no Brasil como mandacaru. As plantas desta espécie possuem caules do tipo colunar, com variações no número e disposição dos sulcos que formam costelas longitudinais, onde estão inseridos os meristemas axilares contendo espinhos (folhas modificadas); os meristemas axilares são também conhecidos como aréolas (Britton e Rose 1963). A flor é noturna e auto-incompatível (Mizrahi e Nerd 1999). Além da importância ornamental, devido à beleza e perfume de suas flores, apresenta também interesse econômico e industrial devido a vários compostos biológicos sintetizados e extraídos como, triterpenos, esteróides, glicosídeos, alcalóides, ceras, óleos e gorduras, sendo utilizados em produtos medicinais, gomas com diversas aplicações, tintas e vernizes (Whistter 1963; Mark 1979; Martindale 1979; Turbak 1979; Scheinvar 1985; Dembitsky e Rezanka 1996). Tem importância na alimentação, pois seus frutos são consumidos *in natura* e utilizados para a fabricação de geléias, iogurtes e medicamentos, e ainda importância ecológica já que armazenam grandes quantidades de água em regiões xerófitas (Vries et al. 1971; Alvarez et al. 1992; Oliveira e Machado 2003; Silva et al. 2005; Tanaka et al. 2010).

As características morfológicas como o tamanho e a cor dos espinhos, flores, frutos, número de costelas e a disposição das aréolas são usadas para identificar espécies do gênero *Cereus* (Britton e Rose 1963). No ambiente natural as populações de *Cereus* apresentam

diferentes morfologias, como a espécie *Cereus peruvianus* que possui o caule formado por 4-5 costelas longitudinais e aréolas dispostas de forma linear, já a variedade ‘tortuosus’ apresentam caules com costelas em espiral e a variedade ‘monstruosus’ possui como característica caules com costelas formando sulcos irregulares e número variável de aréolas por costela; esta última variedade também tem sido designada como espécie *C. monstruosus* e ainda como variedade *C. monstruosus minor* (Britton e Rose 1963).

Uma característica da família Cactaceae é a grande plasticidade de características morfológicas, portanto, alguns autores destacam a importância de aliar dados moleculares aos já tradicionais marcadores morfológicos utilizados na classificação, buscando estabelecer e esclarecer a taxonomia de forma segura (Anderson 2001; Wallace e Gibson 2002; Taylor e Zappi 2004; Calvente et al. 2011). Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares microssatélites pode ser muito útil. Até o momento não temos *primers* para microssatélites desenvolvidos para o genoma de *Cereus peruvianus*, e esta espécie tem sido estudada com outros marcadores bioquímicos e moleculares (Sala et al. 2011; Faria-Tavares et al. 2013). Para cactáceas os estudos com marcadores SSR são restritos, se concentrando em alguns gêneros (Otero-Arnaiz et al. 2004, 2005; Terry et al. 2006; Helsen et al. 2007; Hardesty et al. 2008; Hughes et al. 2008; Solórzano et al. 2009; Arakaki et al. 2010; Butterworth 2011; Perez et al. 2011; Schwabe et al. 2013). O primeiro conjunto de marcadores microssatélites criado para o estudo populacional nesta família, foi desenvolvido por Otero-Arnaiz et al. (2004) para *Polaskia chichipe* (Terry et al. 2006). Apesar do pequeno número de SSRs desenvolvidos para cactáceas, eles são essenciais para um estudo detalhado de aspectos evolutivos (Hamrick et al. 2001). Por isso a tentativa de utilizar seqüências de *primers* identificadas em uma espécie, para outra espécie intimamente relacionada (*primers* heterólogos), é um processo vantajoso (White e Powell 1997). O empenho em empregar microssatélites no estudo de diversidade de *C. peruvianus* deve-se ao fato de que este marcador, devido à suas características de co-dominância, multialelismo e alto polimorfismo, constitui-se em 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). Desta forma, outra característica altamente desejável do microssatélite é a sua transferibilidade, que permite a utilização de *primers* desenvolvidos para espécies relacionadas, diminuindo custos e tempo de execução dos projetos.

Assim, o objetivo neste estudo foi caracterizar molecularmente as variedades morfológicas de mandacaru (*Cereus peruvianus* var. *tortuosus* e *C. peruvianus* var.

monstruosos) usando amplificação heteróloga de microssatélites, a fim de estabelecer uma relação de similaridade ou divergência genética em nível de DNA. As informações obtidas a partir destas análises serão utilizadas para caracterizar geneticamente as variedades de *C. peruvianus*. Esta avaliação fornecerá informações sobre a estruturação genética dos três morfotipos.

Materiais e Métodos

Material Biológico

Neste estudo foram avaliadas 92 amostras, destas, 19 são *Cereus peruvianus* com morfologia convencional que foram denominados de morfotipo 1; 26 amostras avaliadas foram do morfotipo 2 que são *Cereus peruvianus* var. *tortuosos*, e 47 amostras avaliadas foram do morfotipo 3 que é *Cereus peruvianus* var. *monstruosos*. Na Fig. 1A observamos *Cereus peruvianus* ao lado do morfotipo 3 (*Cereus peruvianus* var. *monstruosos*) e na Fig 1B observamos plantas do morfotipo 2 (*Cereus peruvianus* var. *tortuosos*). As sementes das amostras de *Cereus peruvianus* e de suas supostas variedades foram coletadas em jardins de residências nas cidades de Maringá e São Pedro de Itaipu, Paraná, Brasil, e estavam armazenadas e identificadas no Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese Vegetal, da Universidade Estadual de Maringá. Também foram utilizadas secções de caules de cinco plantas adultas da variedade “*tortuosos*” e de cinco da variedade “*monstruosos*”, estes caules adultos foram provenientes de floriculturas e jardins das cidades de Maringá, Marialva e Goioerê (no Estado do Paraná) e Iepê (no Estado de São Paulo) (Tabela 1).

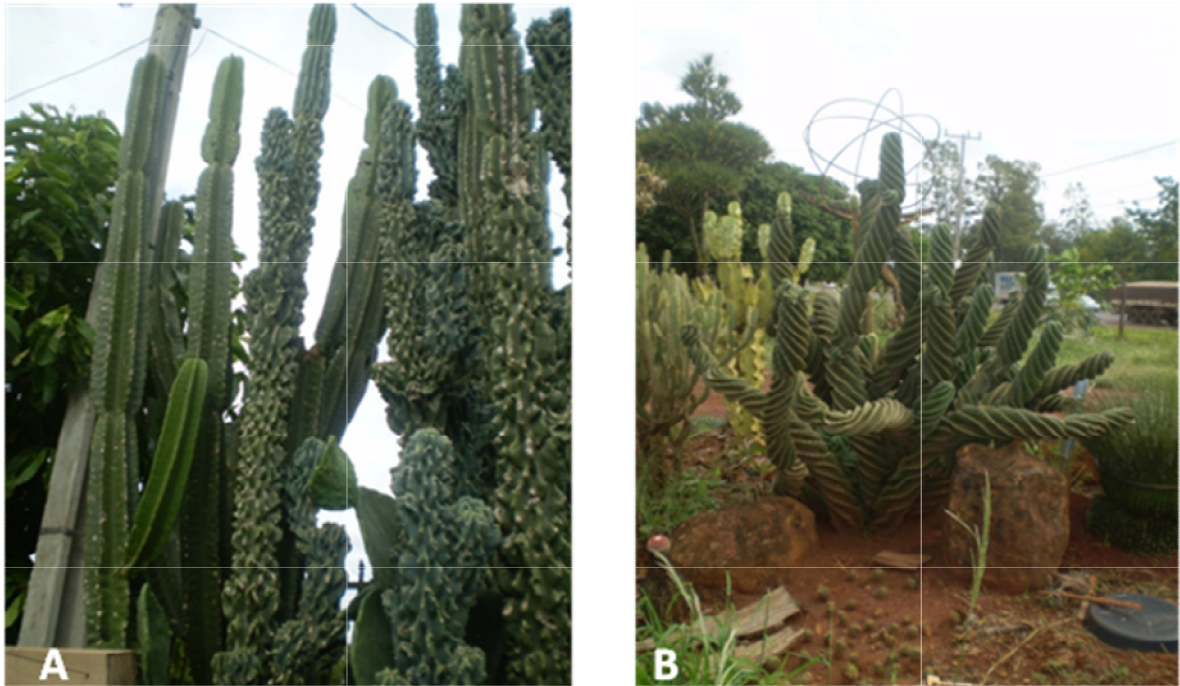


Figura 1. Em **A** são observadas plantas de mandacaru com morfologia normal ao lado de uma planta com morfologia “*monstruosus*”, estas estão mantidas em um jardim residencial da cidade de Vera Cruz do Oeste/Pr. Em **B** observamos planta da suposta variedade “*tortuosos*”, mantida em viveiro na cidade de Marialva/Pr (Fotos Andréa Florindo das Neves).

Germinação das sementes

As sementes foram embebidas na água, onde permaneceram por 24 horas, este procedimento foi utilizado para quebrar a dormência, como descrito por Carvalho et al. (2008). Após esse período, foram adicionadas gotas de detergente, a fim de quebrar a tensão superficial da água e promover maior hidratação das sementes. Após 15 minutos, foram enxaguadas com água destilada e autoclavada. Para desinfecção das sementes, foi utilizada uma solução de hipoclorito de sódio comercial e água destilada, na proporção 1:1, por uma hora, e posteriormente foram realizados mais dois enxágües com água destilada e autoclavada. Finalmente, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro estéril contendo o meio de cultura descrito por Knudson (1946), vedados e mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 30°C. Após cerca de seis meses, as plântulas crescidas a partir da germinação das sementes de *C. peruvianus*, coletadas nas diferentes localidades e de diferentes morfologias, foram usadas para a extração do DNA.

Tabela 1 – Localização das coletas e os números de plântulas e de plantas analisadas para cada morfologia de *Cereus peruvianus*.

	Local e Nº de Plantas	Nº de amostras
<i>Cereus peruvianus</i>	Maringá Planta 1	05 (PL)
	Maringá Planta 2	05 (PL)
	Maringá Planta 3	05 (PL)
	Maringá Planta 4	04 (PL)
<i>Cereus peruvianus</i> var. <i>tortuosos</i>	Maringá Planta 1	15 (PL)
	Maringá Planta 6	03 (PL)
	Maringá Planta 7	03 (PL)
	Maringá Planta 9	01 (PA)
	Marialva Planta 1	01 (PA)
	Marialva Planta 2	01 (PA)
	Marialva Planta 3	01 (PA)
	Goioerê Planta 1	01 (PA)
<i>Cereus peruvianus</i> var. <i>monstruosos</i>	São Pedro do Itaipu-PR Planta 1	04 (PL)
	Maringá Planta 1	04 (PL)
	Maringá Planta 2	04 (PL)
	Maringá Planta 3	04 (PL)
	Maringá Planta 4	05 (PL)
	Maringá Planta 5	05 (PL)
	Maringá Planta 6	04 (PL)
	Maringá Planta 7	04 (PL)
	Maringá Planta 8	04 (PL)
	Maringá Planta 9	04 (PL)
	Maringá Planta 10	01 (PA)
	Maringá Planta 11	01 (PA)
	Maringá Planta 12	01 (PA)
	Maringá Planta 13	01 (PA)
Iepê-SP Planta 1	01 (PA)	
	TOTAL	92

PL – plântula; PA – planta adulta

Extração do DNA

O DNA foi extraído de 80 mg de caules frescos das plântulas; para a extração de DNA de caules de plantas adultas, as secções dos caules tiveram suas cutículas e aréolas retiradas. As 92 amostras foram preparadas individualmente de acordo com o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999), mas com maior concentração de NaCl. Os caules de plântulas e plantas foram pulverizados com nitrogênio líquido para obter um pó fino, este foi transferido para um microtubo de 2mL e homogeneizado em 300 µL de tampão de extração e 100 µL de cada um dos reagentes de solubilização de membranas e antioxidantes. Os microtubos foram incubados em banho-maria durante uma hora em 65°C, realizando-se suaves agitações a cada 15 minutos. Após o período de incubação, os microtubos

permaneceram por cinco minutos na temperatura ambiente para esfriar. Em seguida, foram adicionados 600 μL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e os tubos foram agitados suavemente por cinco minutos. As amostras foram centrifugadas por dez minutos, a 10.000 r.p.m. em temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi recuperado e transferido para microtubos de 1,5 mL, foi adicionado RNase (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e os microtubos permaneceram a temperatura ambiente por duas horas para digestão do RNA. Após essa etapa, foram adicionados 600 μL de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e repetido o mesmo processo de centrifugação descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram novamente coletados e transferidos para outros microtubos de 1,5mL. Para a precipitação do DNA foram adicionados o isopropanol (0,6 do volume recuperado) e o cloreto de sódio (0,06 do volume recuperado de NaCl 5 mol/L). Em seguida, os tubos foram mantidos *overnight* em -20 °C. Após este período, foi realizada uma centrifugação por 20 minutos, com 10.000 r.p.m. em 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com etanol absoluto gelado por duas vezes, com a realização do mesmo processo de centrifugação entre as lavagens. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco e ressuspenso em 40 μL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA), os tubos foram vedados com Parafilm® e armazenados em geladeira em 4 °C. Na extração do DNA das plantas de cactos adultos, que possuem maior concentração de polissacarídeos no caule, foram feitas alterações na concentração do cloreto de sódio, que faz parte da composição do tampão de extração. Também foi adicionado um volume maior (900 μL) das duas soluções de purificação (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e clorofórmio:álcool isoamílico) e as lavagens do DNA precipitado foram realizadas com etanol 70%.

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 0,04M e EDTA 0,001M) com 80 Volts por aproximadamente 1 hora (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 ng e 100 ng. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e a imagem foi capturada em sistema de foto documentação L-PIX HE, Locus biotecnologia. Foi realizada uma certificação da quantificação, na qual os DNAs das amostras previamente quantificadas foram diluídos para uma concentração de 10 ng/ μL , desta diluição foi aplicado um volume de 10 μL de cada DNA em gel de agarose 0,8%, conforme procedimento já descrito, para a avaliação foram acrescentadas no gel amostras de DNA de

Fago λ nas concentrações de 50, 100 e 150 100 ng. Todas as amostras quantificadas corretamente ficaram com uma concentração final de 100 ng no gel de certificação.

Amplificação do DNA

Para a escolha dos marcadores moleculares polimórficos que foram utilizados no estudo, foram testados 33 pares de *primers* heterólogos mapeados para diferentes espécies de cactáceas. Os pares de *primers* testados para amplificar o DNA das diferentes amostras de *Cereus peruvianus* e suas variedades foram isolados de quatro espécies de cactos; deste total, sete foram isolados da espécie *Polaskia chichipe*, seis de *Astrophytum asterias*, oito de *Ariocarpus bravoanus* e doze de *Echinocactus grusonii*, totalizando assim 33 pares de *primers* (Tabela 2). Estes *primers* foram utilizados porque já estavam disponíveis no Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese Vegetal da Universidade Estadual de Maringá. Inicialmente todos os pares de *primers* foram amplificados de acordo com o programa de ciclos descrito por Albert e Schmitz (2002), mas as temperaturas de anelamento utilizadas para cada *primer* foram aquelas descritas e utilizadas nos artigos que descrevem o isolamento destes. Os *primers* que não amplificaram produtos nítidos foram novamente amplificados com o mesmo programa, alterando a temperatura de anelamento, visando desta forma, obter maior aproveitamento e nitidez nos produtos da amplificação. Após os testes de amplificação, os doze *primers* que apresentaram melhores resultados foram selecionados para a análise das 92 amostras de *Cereus*.

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*; reação em cadeia da polimerase) foi conduzida em termociclador Veriti (Applied Biosystems). As reações de amplificação, em volume final de 20 μ l, foram preparadas com 10ng de DNA genômico, tampão de reação 1X (10mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50mM de KCl), 2,5mM de MgCl₂, 0,1mM de cada dNTP, 1U de *Taq-DNA Polimerase* (Invitrogen) e 0,5 μ M de cada um dos *primers Forward* e *Reverse* específicos. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose Metaphor (4%) usando tampão TBE 0,5X (44,5mM Tris, 44,5mM ácido bórico e 1mM EDTA). Este gel foi preparado com 50% de agarose Metaphor e 50% de agarose comum. A eletroforese foi realizada com 60 Volts por aproximadamente 3 horas e 30 minutos. Após a eletroforese os géis foram corados por 30 minutos em solução com brometo de etídio contendo 0,5 μ g·mL⁻¹ e a imagem foi capturada em transluminador L-PIX HE, Locus biotecnologia. *DNA Ladder* (Invitrogen) de 100pb foi utilizado como padrão para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados.

Análise dos dados

A análise dos *loci* SSR foi feita estimando-se o número médio de alelos por *locus*, a heterozigosidade média observada (H_o) e a heterozigosidade média esperada (H_e), o número de alelos por *locus* (N_a), o número efetivo de alelos por *locus* polimórfico (N_e), a proporção de *loci* polimórficos (%P). O afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi examinado para cada *locus* e para cada amostra de *Cereus*. 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 foram obtidos usando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) sendo utilizado o complemento aritmético da distância genética de Nei (Nei 1978). Os valores para a identidade genética e distâncias entre *Cereus peruvianus* com morfologia convencional, e os morfotipos *Cereus peruvianus* var. *tortuosos* e *Cereus peruvianus* var. *monstruosos* foram calculadas usando o agrupamento UPGMA (Yeh et al. 1999).

A estruturação genética das populações foi verificada utilizando-se os índices F_{ST} de Weir e Cockerham (1984) que assume o modelo de mutação de alelos infinitos (IAM) e R_{ST} de Slatkin (1995) que assume o modelo de mutação *stepwise* (SMM) para todos os *loci* entre as três amostras utilizando-se o programa GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse 2006; Peakall e Smouse 2012). O agrupamento (*Bar Plot*) utilizando estatística Bayesiana foi implementado pelo programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000), o número de grupos foi determinado pelo método de Evanno et al. (2005) e os resultados do STRUCTURE foram apresentados pelo software DISTRUCT (Rosenberg 2004).

Resultados

A quantificação do DNA genômico extraído das plantas adultas e plântulas de *Cereus peruvianus* e seus morfotipos (*Cereus peruvianus* var. *tortuosos* e *Cereus peruvianus* var. *monstruosos*) foi realizada pela comparação visual da intensidade das bandas com o DNA fago λ em gel de agarose. A metodologia utilizada para a extração do DNA foi eficiente, sendo possível realizar uma extração livre de polissacarídeos e com qualidade para a amplificação, as concentrações dos DNAs extraídos variou de 10 a 80 ng/ μL^{-1} .

Foram testados os 33 pares de *primers* heterólogos desenvolvidos para quatro espécies de cactáceas. Deste total, sete foram isolados da espécie *Polaskia chichipe*, seis de *Astrophytum asterias*, oito de *Ariocarpus bravoanus* e doze de *Echinocactus grusonii*. Inicialmente, todos foram amplificados utilizando os programas descritos pelos autores para a

devida espécie, e para os que não amplificaram produtos nítidos foram feitos novos testes alterando a temperatura de anelamento. Dos 33 pares de *primers* microssatélites, doze foram selecionados para amplificação das amostras de *C. peruvianus* e seus morfotipos (*C. peruvianus* var. *tortuosus* e *C. peruvianus* var. *monstruosos*). Assim, a transferibilidade de *primers* microssatélites desenvolvidos em outras cactáceas para *C. peruvianus* foi de 36,36%. Após amplificação de todas as amostras, cinco pares de *primers* não apresentaram polimorfismo para as 92 amostras avaliadas, e portanto, não foram analisados. Os outros sete *primers* foram selecionados porque amplificaram regiões específicas, com produtos nítidos e evidenciaram diferentes alelos caracterizando-se polimórficos para as 92 amostras.

O melhor índice de transferibilidade foi encontrado nos *primers* desenvolvidos para *Polaskia chichipe* (Otero-Arnaiz et al. 2004) (Tabela 2). Até o momento, existem nove *primers* microssatélites para esta espécie, e neste trabalho sete deles foram testados em *C. peruvianus*. Os *primers* *Pchi21*, *Pchi25*, *Pchi44* e *Pchi47* foram utilizados para amplificar o genoma das 92 amostras, já os demais *primers* desenvolvidos para esta espécie não apresentaram padrões nítidos de amplificação (*Pchi5*, *Pchi9* e *Pchi54*). Para os *primers* desenvolvidos para *P. chichipe*, a transferibilidade foi de 57,14%. Dos seis *primers* mapeados para *Astrophytum asterias* por Terry et al. (2006) e testados em *C. peruvianus*, três foram transferíveis. Os *primers* *AaB6*, *AaD9* e *AaH11* proporcionaram uma transferibilidade de 50%.

Da espécie *Ariocarpus bravoanus*, foram transferíveis 50% dos *primers* microssatélites e apenas 8,33% dos *primers* desenvolvidos para *Echinocactus grusonii* amplificaram e revelaram polimorfismos no DNA de mandacaru (Tabela 2).

Tabela 2 *Primers* microssatélites de diferentes espécies da família Cactaceae que foram transferíveis para as amostras de mandacaru e respectivas porcentagens de transferibilidade.

Espécie	<i>Primers</i>	Transferibilidade
<i>Astrophytum asterias</i>	<i>AaB6</i> , <i>AaD9</i> e <i>AaH11</i>	50%
<i>Polaskia chichipe</i>	<i>Pchi21</i> , <i>Pchi25</i> , <i>Pchi44</i> e <i>Pchi47</i>	57,14%
<i>Ariocarpus bravoanus</i>	<i>mAbR05</i> , <i>mAbR28</i> , <i>mAbR42</i> e <i>mAbR86</i>	50%
<i>Echinocactus grusonii</i>	<i>mEgR78</i>	8,33%

O *primer* *mEgR78* foi o único dos 12 *primers* isolados na espécie *Echinocactus grusonii* transferível para as amostras de mandacaru, e também o único que superou o número de alelos amplificados na espécie original. Ele produziu dois alelos para a espécie

Echinocactus grusonii (Hardesty et al. 2008) e três alelos para as amostras de mandacaru. O primer *Pchi47*, desenvolvido para *Polaskia chichipe* (Otero-Arnaiz et al. 2004), também foi o único polimórfico para mandacaru entre os demais já estudados para esta cactácea, e produziu dois alelos em ambas as espécies (Tabela 3). Todos os outros primers evidenciaram menor número de alelos em mandacaru do que para as espécies onde foram descritos. Dos primers provenientes da espécie *Astrophytum asterias*, a maior diferença entre o número de alelos foi encontrada no primer *AaH11*, que produziu em *A. asterias* 13 alelos (Terry et al. 2006), e apenas dois nas amostras de mandacaru. Os primers *AaB6* e *AaD9* produziram, respectivamente, três e dois alelos, quatro a menos do que na espécie para o qual foram desenvolvidos. E, dentre os primers oriundos de *Ariocarpus bravoanus*, *mAbR28* produziu três alelos em mandacaru dos seis amplificados em *A. bravoanus*, e *mAbR86* produziu dois alelos, seis a menos do que na espécie onde foi isolado (Tabela 3) (Hughes et al. 2008).

A análise dos sete loci microssatélites nas amostras dos três grupos de mandacaru resultou na amplificação de 17 alelos, com uma média de 2,43 alelos por locus polimórfico. Para os loci *AaB6*, *mAbR28* e *mEgR78* foram amplificados três alelos, e dois alelos foram amplificados para cada um dos demais loci (*AaD9*, *AaH11*, *mAbR86* e *Pchi47*) (Tabela 3).

O locus *AaB6* amplificou sete alelos quando analisado na espécie para qual foi desenvolvido, enquanto *AaD9* e *AaH11* amplificaram seis e treze alelos, respectivamente (Terry et al. 2006). Nas amostras de mandacaru, o número de alelos evidenciados para o locus *mEgR78* foi maior do que o encontrado na espécie onde foi descrito (Hardesty et al. 2008), e o número de alelos foi o mesmo para o locus *Pchi47*, tanto em *P. chichipe* como em *C. peruvianus* (Otero-Arnaiz et al. 2004). Em *A. bravoanus*, *mAbR28* produziu seis alelos, enquanto *mAbR86* produziu oito alelos (Hughes et al. 2008). Em variedades de *Opuntia*, o número de alelos por locus variou de 6 a 44 dentro das diferentes populações (Helsen et al. 2009). Portanto, o número de 17 alelos produzidos por meio da análise nas amostras de mandacaru é considerado pequeno quando comparados às espécies de onde foram isolados, que totalizaram 44 alelos (Tabela 3). Em *Polaskia chichipe*, a média de alelos por locus foi de 5,28 (Otero-Arnaiz et al. 2004) e 8,4 (Otero-Arnaiz et al. 2005). Considerando os três grupos de amostras de mandacaru, o único que apresentou efetivamente o número de 17 alelos foi o morfotipo 3, composto por 47 indivíduos de *C. peruvianus* var. *monstruosus*. Para as amostras dos morfotipos 1 e 2 (*C. peruvianus* e *C. peruvianus* var. *tortuosus*) foram observados 16 e 15 alelos, respectivamente.

Tabela 3 Número (N_A) e tamanho dos alelos (pb) descritos na espécie original e número de alelos encontrados nas amostras de mandacaru.

<i>Primer</i>	N_A	pb	Alelos em <i>C. peruvianus</i>
<i>AaB6</i>	7	83-99	3
<i>AaD9</i>	6	135-143	2
<i>AaH11</i>	13	83-109	2
<i>Pchi47</i>	2	120	2
<i>mAbR28</i>	6	207-222	3
<i>mAbR86</i>	8	432-452	2
<i>mEgR78</i>	2	148-242	3
TOTAL	44		17

A frequência dos alelos para os diferentes *loci* foi bem variada nos morfotipos analisados (Tabela 4). Entre todos os *loci* estudados, *AaB6*, *mAbR28* e *mEgR78* foram os que apresentaram o maior número de alelos, três, sendo que o alelo *C* do *locus* *AaB6* não foi encontrado no morfotipo 2, composto por plantas da variedade “tortuosus”. O alelo *A* do *locus* *Pchi47* está fixado em todas as amostras de plantas do morfotipo 1 e do morfotipo 2. Todos os *loci* foram polimórficos em todos os morfotipos, com exceção do *locus* *Pchi47*, que foi monomórfico para os morfotipos 1 e 2 e o alelo *B* é exclusivo para a variedade “monstruosus”. A fig. 2 mostra o polimorfismo das amostras de *C. peruvianus* var. *monstruosus* evidenciado pelo *primer* *Pchi47*.

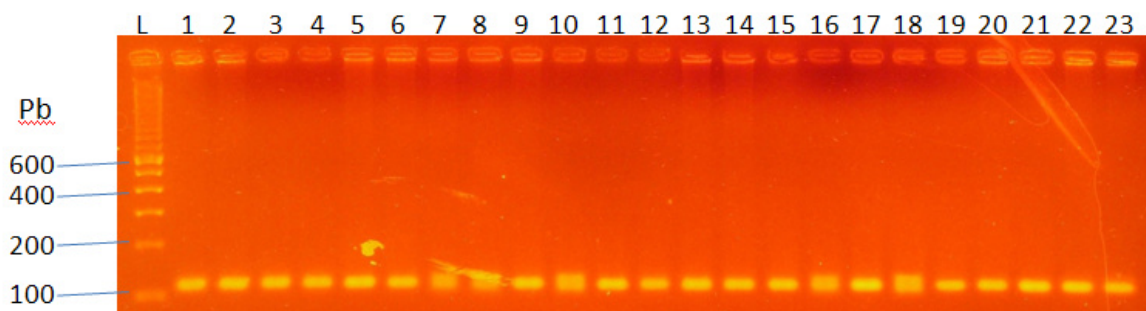


Fig 2. Gel de agarose concentrado 4% (50% agarose comum e 50% agarose MS-8) para separar o produto de amplificação dos DNAs das amostras do morfotipo 3 (variedade “monstruosus”), com o *primer* *Pchi47*. A primeira amostra (L) do gel indica o ladder 100 pb (Invitrogen).

Os sete pares de *primers* microsatélites desenvolvidos para as quatro espécies de cactáceas, que foram transferidos para *Cereus peruvianus*, foram utilizados para a análise da diversidade genética das amostras de *C. peruvianus*, *C. peruvianus* var. *tortuosus* e *C.*

peruvianus var. *monstruosos*. Eles foram selecionados porque amplificaram produtos nítidos e polimórficos, e, portanto, podem auxiliar a esclarecer ou sugerir uma relação entre as diferenças na morfologia entre as amostras das supostas variedades.

O polimorfismo entre as amostras dos três morfotipos analisados variou de 85,71% a 100% para os diferentes *loci* microssatélites, e o grupo mais polimórfico foi o que compõe a variedade “monstruosus”, com 100% dos *loci* polimórficos. Os morfotipos 1 (*C. peruvianus*) e 2 (*C. peruvianus* e *C. peruvianus* var. *tortuosus*) apresentaram o mesmo polimorfismo, que foi de 85,71%. O polimorfismo médio para os três grupos foi de 90,47%. As frequências variáveis dos alelos *A*, *B* ou *C* nos sete *loci* SSR conferiram uma heterozigosidade observada que variou de 0,00 a 0,7368 e a heterozigosidade esperada variou de 0,00 a 0,6771 (Tabela 5).

Tabela 4 Frequência dos alelos para os diferentes *loci* de microssatélites analisados para as amostras de *Cereus peruvianus* com diferentes morfologias.

<i>Loci</i>	Morfotipo 1	Morfotipo 2	Morfotipo 3
<i>AaB6</i>			
<i>Alelo A</i>	0,1842	0,6154	0,1064
<i>Alelo B</i>	0,5526	0,3846	0,7021
<i>Alelo C</i>	0,2632	0,1915
<i>AaD9</i>			
<i>Alelo A</i>	0,6316	0,8077	0,5106
<i>Alelo B</i>	0,3684	0,1923	0,4894
<i>AaH11</i>			
<i>Alelo A</i>	0,9474	0,8269	0,5638
<i>Alelo B</i>	0,0526	0,1731	0,4362
<i>mAbR28</i>			
<i>Alelo A</i>	0,2632	0,2308	0,1489
<i>Alelo B</i>	0,3684	0,7115	0,2660
<i>Alelo C</i>	0,3684	0,0577	0,5851
<i>mAbR86</i>			
<i>Alelo A</i>	0,5526	0,3846	0,4255
<i>Alelo B</i>	0,4474	0,6154	0,5745
<i>mEgR78</i>			
<i>Alelo A</i>	0,1316	0,0577	0,0213
<i>Alelo B</i>	0,1842	0,1538	0,3617
<i>Alelo C</i>	0,6842	0,7885	0,6170
<i>Pchi47</i>			
<i>Alelo A</i>	1,0000	1,0000	0,7766
<i>Alelo B</i>	0,2234

Tabela 5 Parâmetros de diversidade genética avaliados para os três morfotipos de mandacaru obtidos com a análise dos sete *loci* SSR.

<i>Loci</i>	Morfotipo 1				Morfotipo 2				Morfotipo 3			
	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
<i>AaB6</i>	3,0000	2,4475	0,3684	0,6074	2,0000	1,8989	0,1538	0,4827	3,0000	1,8485	0,1702	0,4640
<i>AaD9</i>	2,0000	1,8705	0,7368	0,4780	2,0000	1,4506	0,3846	0,3167	2,0000	1,9991	0,5957	0,5051
<i>AaH11</i>	2,0000	1,1108	0,0000	0,1024	2,0000	1,4010	0,0385	0,2919	2,0000	1,9679	0,2766	0,4971
<i>mAbR28</i>	3,0000	2,9350	0,5263	0,6771	3,0000	1,7766	0,4615	0,4457	3,0000	2,2975	0,3617	0,5708
<i>mAbR86</i>	2,0000	1,9781	0,2632	0,5078	2,0000	1,8989	0,6154	0,4827	2,0000	1,9566	0,6809	0,4942
<i>mEgR78</i>	3,0000	1,9253	0,6316	0,4936	3,0000	1,5416	0,2692	0,3582	3,0000	1,9531	0,0851	0,4933
<i>Pchi47</i>	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	2,0000	1,5314	0,3191	0,3507
Média	2,2857	1,8953	0,3609	0,4095	2,1429	1,5668	0,2747	0,3397	2,4286	1,9363	0,3556	0,4822

Na=número de alelos observados; Ne=número efetivo de alelos; Ho=heterozigossidade observada; He=heterozigossidade esperada.

O valor médio de Ho para as amostras de diferentes morfologias de mandacaru foi de 0,3304, para o morfotipo 1 Ho foi de 0,3609, para o morfotipo 2 foi de 0,2747 e para o morfotipo 3 foi de 0,3556 (Tabela 5).

Na análise global dos três grupos, os *loci AaD9* e *mAbR86* apresentaram valores negativos para o coeficiente de endogamia (F_{IS}), indicando um excesso de heterozigotos para os referido *loci* (Tabela 6). O valor da média de F_{IS} para os sete *loci* foi de 0,1821, que se aproxima dos valores já descritos para outros cactos auto-incompatíveis analisados com isoenzimas.

A análise da divergência genética entre os três grupos de amostras (F_{ST}) foi de 0,0962 (Tabela 6), este valor mostra que a divergência genética entre os grupos foi moderada. Na Tabela 9 também esta evidente um valor alto para o fluxo gênico ($Nm = 2,3499$) entre as plantas dos três morfotipos da espécie *C. peruvianus*.

A diferenciação genética entre *Cereus peruvianus* (morfotipo 1) e suas duas variedades (morfotipos 2 e 3) foi estimada através do índice F_{ST} para detecção de variação dentro e entre as populações, considerando cada um dos morfotipos como uma população. A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que a maior variância se encontra dentro das populações $F_{ST} = 87\%$ (Tabela 7) e $R_{ST}=85\%$ (Tabela 8), e os valores de variabilidade entre as populações foram para o $F_{ST} = 13\%$ e para o $R_{ST} = 15\%$, valores altamente significativos ($p < 0,0001$).

Tabela 6 Tamanho da amostra (N), coeficiente de endogamia (F_{IS}), déficit de heterozigotos (F_{IT}), proporção de diversidade gênica entre as populações (F_{ST}) e fluxo gênico (N_m) entre os três grupos de *Cereus peruvianus*.

<i>Locus</i>	N	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	N_m
<i>AaB6</i>	184	0,5456	0,6069	0,1350	1,6018
<i>AaD9</i>	184	-0,3460	-0,2580	0,0654	3,5734
<i>AaH11</i>	184	0,6411	0,6946	0,1492	1,4261
<i>mAbR28</i>	184	0,1876	0,2962	0,1337	1,6196
<i>mAbR86</i>	184	-0,0705	-0,0484	0,0206	11,8607
<i>mEgR78</i>	184	0,2531	0,2785	0,0340	7,1038
<i>Pchi47</i>	184	0,0802	0,2282	0,1609	1,3036
Média	184	0,1821	0,2607	0,0962	2,3499

Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA), aplicando o índice F_{ST} para os três morfotipos analisados.

Tipo de variação	GL	S Q	Variância	%
Entre populações	2	27,662	0,217	13
Dentro das populações	181	270,746	1,496	87
Total	183	298,408	1,713	100

Índice de Fixação $F_{ST}=0,127$

Tabela 8. Análise de variância molecular (AMOVA), aplicando o índice R_{ST} para os três morfotipos analisados.

Tipo de variação	GL	S Q	Variância	%
Entre populações	2	42,636	0,343	15
Dentro das populações	181	340,782	1,883	85
Total	183	383,418	2,225	100

Índice de Fixação $R_{ST}=0,154$

A análise das frequências genotípicas também indica distorção na segregação para vários *loci*, onde a maioria das frequências dos alelos não apresenta uma distribuição de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Apenas as frequências genotípicas nos *loci* *AaD9* (morfotipos 2 e 3), *mAbR86* (morfotipo 2), *mEgR78* (morfotipo 1) e *Pchi47* (morfotipo 3) ainda atendem a expectativa de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 9).

As relações de similaridade e dissimilaridade entre as amostras de mandacaru com morfologias distintas apresentaram valores de identidade variando de 0,8456 (entre os morfotipos 2 e 3) à 0,9329 (entre os morfotipos 1 e 2), a identidade entre o morfotipo 1 e 3 foi de 0,9314 (Tabela 10). No dendrograma (Fig 3) observamos a formação de dois grupos, no primeiro observamos os morfotipos 1 e o 2 indicando que a maior similaridade é observada

entre as plantas de *Cereus peruvianus* com morfologia normal e a var. *tortuosus*. O morfotipo 3 var. *monstruosus* ficou segregado dos demais indicando que este morfotipo é o mais divergente.

Tabela 9 Teste do χ^2 -quadrado para verificar o Equilíbrio de Hardy–Weinberg para os sete *loci* de microssatélites analisados nas amostras dos três morfotipos de *Cereus peruvianus*.

<i>Loci</i>	Morfotipo 1	Morfotipo 2	Morfotipo 3
<i>AaB6</i>	22,5222	12,6071	41,3543
<i>AaD9</i>	5,9347	1,3066*	1,5446*
<i>AaH11</i>	37,0285	21,7054	9,4577
<i>mAbR28</i>	28,9780	11,0630	37,3995
<i>mAbR86</i>	4,6613	2,0543*	6,8603
<i>mEgR78</i>	3,6553*	16,8080	39,8485
<i>Pchi47</i>	0,3968*

**Loci* em Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 10. Coeficiente de similaridade e distância genética de Nei entre as amostras de mandacaru: *C. peruvianus* (morfotipo 1), *C. peruvianus* var. *tortuosus* (morfotipo 2) e *C. peruvianus* var. *monstruosus* (morfotipo 3).

	Morfotipo 1	Morfotipo 2	Morfotipo 3
Morfotipo 1	****	0,9329	0,9314
Morfotipo 2	0,0695	****	0,8456
Morfotipo 3	0,0711	0,1678	****

Identidade genética de Nei (I) (acima da diagonal) e distância genética (D) abaixo da diagonal.

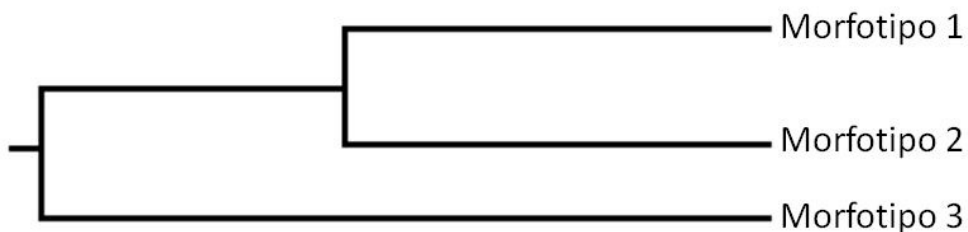


Fig 3. Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978) para os 3 morfotipos de *Cereus peruvianus* (1) *C. peruvianus* var. *tortuosus* (2) e *C. peruvianus* var. *monstruosus* (3). A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA empregando o programa POPGENE 1.32.

As relações genéticas entre os genótipos individuais também foram exploradas através de uma análise Bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Esta análise apresenta vantagens com relação aos métodos baseados na distância genética, principalmente porque a inferência dos parâmetros correspondentes a cada grupo é feita com base na inferência do grau de pertinência de cada indivíduo aos grupos (Pritchard et al. 2000). Os alelos cujas frequências apresentaram diferenças significativas entre dois grupos heteróticos divergentes são melhores candidatos para envolvimento na resposta heterótica. Esta análise tem como base o modelo de separação de grupos (*clusters*), que atribui indivíduos a um número K de populações, com base na estimativa Bayesiana em conformidade aos equilíbrios esperados de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os *loci* analisados, dentro de cada população. Esta análise foi realizada com valor de *length burning* de 5.000, com valor de MCMC de 50.000 e valor de corte de 10%, foram testados de K= 2 a K= 5. O número de grupos mais apropriado foi selecionado através do método proposto por Evanno et al. (2005), o valor de ΔK , que deve ser levado em conta para definir o número de grupos, foi maior ($\Delta K = 2,58$) para a formação de 3 grupos, ou seja, mantém o número de agrupamentos da análise obtida com base na distancia genética de Nei (1978).

A análise do *bar plot* (Figura 4) indica a divisão das amostras nos três grupos (Grupo 1: vermelho; Grupo 2: verde; Grupo 3: azul) de acordo com suas relações genéticas.

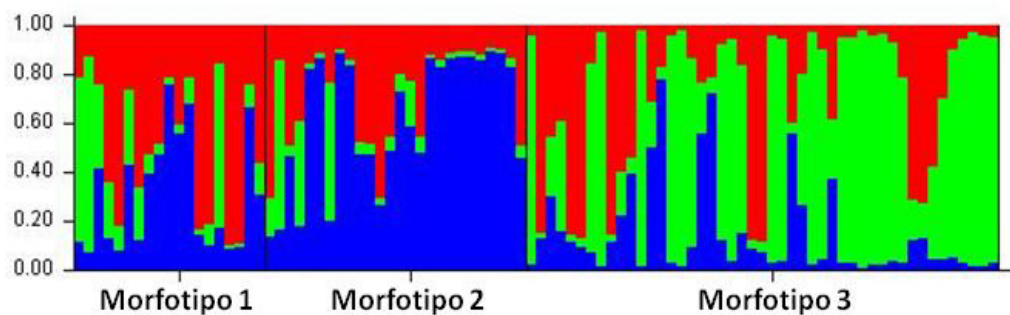


Fig 4. *Bar plot* das 92 amostras de plantas mandacaru (Morfotipo 1: *C. peruvianus*; Morfotipo 2: *C. peruvianus* var. *tortuosus*; Morfotipo 3: *C. peruvianus* var. *tortuosus*) divididas em três grupos inferidas com base no valor de ΔK . Cada planta está representada pela linha vertical dividida em K segmentos ($K = 3$), com comprimento proporcional de cada grupo inferido, Cada cor (vermelho, azul, e verde) representa a proporção de genótipos de cada grupo.

Como pode ser observado na figura 4, os três morfotipos compartilham alelos, mas nos morfotipos 2 há uma maior proporção de alelos do grupo 3 (azul), e nos morfotipos 3, o predomínio é de alelos do grupo 2 (verde).

Tabela 11 Proporção da participação de cada grupo pré-definido em cada um dos três agrupamentos de morfotipos e número de plantas em cada amostra.

Amostras	Grupos			Número de plantas
	1	2	3	
Morfotipo 1	0,482	0,211	0,307	19
Morfotipo 2	0,267	0,104	0,629	26
Morfotipo 3	0,277	0,575	0,148	47

Discussão

O sucesso na transferibilidade de *primers* para microssatélites entre diferentes gêneros de uma mesma família também foi evidenciado por Fehlberg et al. (2008), que testaram nove *primers* desenvolvidos para *Phlox pilosa* em sete gêneros de Polemoniaceae, e dois *loci* foram amplificados com sucesso tanto nos gêneros mais intimamente relacionados quanto nos mais distantemente relacionados nesta família. A transferência de *primers* para outras espécies depende da conservação de seqüências dentro das regiões flanqueadoras, de sua origem e dispersão dentro do genoma e também da manutenção de arranjos por tempo suficiente para promover polimorfismos (Ekué et al. 2009; Pollegioni et al. 2009). Os nossos resultados (36,36%) podem indicar que dentro da família Cactaceae existe uma baixa conservação de seqüências com uma alta diversidade dentro da família. Anderson (2001) descreve que as cactáceas apresentam alta variação até no nível individual.

Para os estudos de transferibilidade observamos que esta taxa é variável dependendo da família estudada. As freqüências de amplificação heteróloga dentro da família Cactaceae, são bem maiores do que as freqüências de transferibilidade de *loci* SSRs dentro da família Myrtaceae, que foi de apenas 2,9% de *Eucalyptus* spp. Para *Eugenia dysenterica* (Zucchi et al. 2002). Mas a transferibilidade observada no presente trabalho (36,36%) 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% (Zucchi et al. 2002). Segundo Barbará et al. (2007), em geral a transferibilidade difere muito entre as espécies, especialmente para as Angiospermas; com um forte indicativo de que a transferibilidade é mais elevada em espécies perenes e com sistemas de fecundação cruzada. Mesmo com diferentes taxas de transferibilidade, evidências do sucesso de amplificação entre espécies podem ser observadas tanto em plantas como em animais. Wu e Tanksley (1993) encontraram conservação de seqüências das regiões flanqueadoras entre subespécies de arroz

cultivadas e espécies selvagens relacionadas. Thomas e Scoot (1993) também descreveram a conservação de seqüências de regiões flanqueadoras em espécies de uva; a conservação de seqüências de regiões flanqueadoras 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). Varshney et al. (2005) tem postulado que uma melhor estratégia de transferibilidade é desenvolver microssatélites de regiões transcritas (EST-SSRs), pois estes marcadores são mais robustos, apresentam resolução alélica superior e maior transferibilidade interespecífica e intergenérica. De acordo com estes investigadores (Varshney et al. 2005), os EST-SSRs apresentam níveis mais altos de transferibilidade com espécies relacionadas, uma vez que são derivados a partir de regiões codificantes e mais conservadas do genoma aumentando assim a eficiência deste marcador. Entretanto, outros estudos têm salientado que as seqüências EST-SSRs apresentam menor polimorfismo (Cordeiro et al. 2001; Gutierrez et al. 2005); porém, a análise é limitada a algumas espécies ou parentes próximos para os quais haja um número suficientemente grande de ESTs disponíveis. Até o momento, não foram encontrados na literatura dados sobre SSRs gênicos em cactáceas. Ainda segundo Peakall et al. (1998) e Rossetto (2001), a eficiência da amplificação cruzada com marcadores moleculares também aumenta a medida que a distância filogenética entre as espécies diminui.

No presente estudo com os morfotipos de *C. peruvianus*, o melhor índice de transferibilidade foi encontrado para os *primers* desenvolvidos para *Polaskia chichipe* com 57,14% de transferibilidade (Tabela 2). Fernandes (2013) também encontrou o mesmo valor de transferibilidade para amostras de mandacaru de diferentes regiões do Brasil, e Martin (2011) obteve maior taxa de transferibilidade (42,86%) dos *primers* desenhados para *P. chichipe* para somaclones de *C. peruvianus*. Esta é uma observação interessante, pois a cactácea *P. chichipe* pertence à Tribo Pachycereeae, enquanto que plantas de *Cereus* pertencem à Tribo Cereeae (Anderson, 2001), indicando que as regiões flanqueadoras para estes microssatélites são conservadas nestas diferentes Tribos. 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* (Anderson 2001). 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*.

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*. De acordo com Hardesty et al. (2008) doze *primers* microssatélites descritos originalmente para *Echinocactus grusonii* apresentaram potencial para estudos com outras espécies de cactáceas. Os doze *primers* foram testados em 27 espécies, de 22 diferentes gêneros da família Cactaceae, e todos produziram pelo menos um alelo em cada uma.

De acordo com Solórzano et al. (2009), 62,5% dos *primers* para microssatélites desenvolvidos para *Mammillaria crucigera* foram transferíveis para outras quatro espécies do mesmo gênero. Perez et al. (2011) testaram a transferibilidade de onze *primers* microssatélites isolados de *Pilosocereus machrisii* para outras quatro espécies do gênero: *P. jauruensis*, *P. aurisetus*, *P. vilaboensis* e *P. aureispinus*, e nove deles foram transferíveis com sucesso (81,81%). Esses dados mostram que quanto maior a proximidade entre as espécies, maior a taxa de transferibilidade. As regiões flanqueadoras destes microssatélites são conservadas o suficiente para permitir a amplificação, concordando com trabalhos anteriores que mostraram que as regiões flanqueadoras dos microssatélites são conservadas, podendo ainda ser utilizadas para inferências filogenéticas de várias espécies (Matsuoka et al. 2002; Rosseto et al. 2002).

Quando avaliamos a composição alélica entre os três morfotipos, verificamos que a maior diversidade está contida na variedade “monstruosus”, o alelo *C* do *locus AaB6* está ausente na variedade “tortuosus” e o alelo *B* do *locus Pchi47* é exclusivo da variedade “monstruosus”. O número efetivo de alelos ($N_e = 1,9363$) e a diversidade genética inferida a partir da heterozigosidade esperada também foram maiores na amostra da variedade “monstruosus” ($H_e = 0,4822$). Desta forma, maior diversidade em nível molecular foi encontrada nas plantas com maior diversidade na morfologia de seus caules. O alelo *Pchi47^B* não pode ser relacionado com a morfologia atípica dos caules da variedade “monstruosus” no presente estudo, uma vez que a relação do *locus Pchi47* com regiões codificadoras do genoma é desconhecida. Em princípio, a morfologia de caules deve estar relacionada com a dinâmica e complexidade polipeptídica ou protéica das células das plantas, que determinam o plano de divisão destas. Meijer e Murray (2001) sugeriram que a divisão celular e morfogênese são intimamente interligadas, e que a arquitetura global de um órgão (caule, por exemplo) é determinada por genes de padronização, onde a elaboração e execução de programas de

desenvolvimento requerem um controle adequado do ciclo de divisão celular envolvendo um intrincado mecanismo proteico. As análises citológicas de Walker et al. (2007) mostraram que em células pré-mitóticas de plantas, o futuro plano de divisão já é predito por um anel cortical de microtubulos e actina-F chamado banda préprofase (PPB); esta estrutura é desorganizada após a degradação do envoltório nuclear, mas neste período, no sitio cortical, são recrutadas moléculas de referência que são mantidas durante toda a mitose (Müller 2012). Os investigadores Katsir et al. (2011) resgataram a proposta de que no desenvolvimento das plantas, os peptídeos sinais transmitem informações para coordenar a proliferação e a diferenciação celular, e salientaram que esses peptídeos sinais são geralmente codificados por uma família de genes que se ligam à famílias de receptores correspondentes. Os referidos investigadores discutiram que durante o desenvolvimento ocorre uma precisa expressão espaço temporal de sinais e seus receptores, ocorrendo mudanças bioquímicas na expressão ao longo da evolução, contribuindo para o refinamento e manutenção da complexidade dos programas de desenvolvimento (Katsir et al. 2011). No desenvolvimento do tipo de caule “monstruosos”, o tipo mais diversificado das plantas de *C. peruvianus*, é possível que a presença de peptídios sinais específicos adicionais estejam relacionados com a morfologia mais diversificada. Mas, por outro lado, a ausência de determinados peptídeos que determinam um padrão uniforme, e bem determinado, para os caules das plantas também pode ser uma hipótese, que merece investigações futuras.

A heterozigiosidade média esperada para os três grupos foi de 0,4105, um valor discretamente menor do que o já estimado para outras populações de *Cereus*, utilizando isoenzimas, 0,4977 (Sala et al. 2011). A maior heterozigiosidade observada foi para o grupo que apresenta o morfotipo 1 (0,3609), seguido pelo morfotipo 3 (0,3356) e a menor heterozigiosidade foi observada para o morfotipo 2 (0,2747). O intervalo dos valores de heterozigiosidade esperada entre os grupos para os sete *loci* variou de 0,00 a 0,6771, e também se aproximou do que já foi obtido para outras cactáceas. Otero-Arnaiz et al. (2005) ao analisarem sete *loci* polimórficos em *Polaskia chichipe*, obtiveram uma heterozigiosidade entre 0,188 e 0,797. Arakaki et al. (2010) ao analisar cinco *loci* polimórficos em *Haageocereus*, obtiveram uma heterozigiosidade observada variando de 0,478 a 0,871. Na análise de 12 *loci* de microssatélites polimórficos em 30 indivíduos de *Echinocactus grusonii*, observou uma heterozigiosidade entre 0,235 e 0,785 (Hardesty et al. 2008). Hughes et al. (2008) ao estudarem 8 *loci* polimórficos em populações de *Ariocarpus bravoanus*, obtiveram uma heterozigiosidade esperada entre 0,201 e 0,688. A menor proporção de indivíduos heterozigotos encontrados em relação à literatura pode ser justificada pelo uso convencional

de multiplicação vegetativa, principalmente porque as plantas são de zonas urbanas estruturadas pelo homem. O excesso de homozigotos também pode ser explicado pela ocorrência de alelos nulos, uma vez que a probabilidade desse evento ocorrer é maior quando se utiliza *primers* heterólogos (Pépin et al. 1995). Otero-Arnaiz et al. (2005) analisaram três populações de *Polaskia chichipe*, selvagens, manejadas e cultivadas e observaram que a heterozigosidade foi de 0,631, 0,505 e 0,560, respectivamente, mostrando também uma diminuição da heterozigosidade quando as populações são cultivadas.

Na análise global dos três grupos, mesmo que tenhamos observado baixos valores de heterozigosidade, os *loci AaD9* e *mAbR86* apresentaram valores negativos para o coeficiente de endogamia (F_{is}), indicando um excesso de heterozigotos para os referidos *loci* (Tabela 6). Martin (2011) encontrou quatro *loci* SSR em somaclones de *C. peruvianus* com valores negativos de F_{is} . O valor da média de F_{is} para os sete *loci* foi de 0,1821, que se aproxima dos valores já descritos para outros cactos auto-incompatíveis analisados com isoenzimas. Para *Pereskia guamacho*, polinizada por insetos, o valor de F_{is} foi 0,116 (Nassar et al. 2002); em espécies polinizadas por morcegos tais como *Stenocereus griseus* ($F_{is}= 0,145$), *Cereus repandus* ($F_{is}= 0,182$), e *Pilosocereus laguginosus* ($F_{is}= 0,176$) (Nassar et al. 2003). Outros trabalhos com microssatélites em *Cereus peruvianus* também indicaram déficit de heterozigotos, com um valor médio de F_{is} entre 0,0407 (Fernandes 2013) e 0,4466 (Faria-Tavares 2011).

A análise da divergência genética (F_{ST}) entre as amostras dos três morfotipos de mandacaru foi igual a 0,0962 (Tabela 6); este valor mostra que a divergência genética entre os grupos foi moderada. Informar que a diferenciação genética entre as populações é moderada leva em consideração a faixa de valores para diferenciação genética entre as populações que é proposta por Wright (1978). Segundo Wright (1978) valores de F_{ST} entre 0 e 0,05 indicam baixo nível de diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação genética moderada, e valores entre 0,15 e 0,25 indicam diferenciação genética alta. A diferenciação genética entre as três variedades morfológicas de *C. peruvianus* é menor do que a diferenciação genética descrita para plantas do morfotipo 1 ($F_{ST}=0,2645$) cultivadas em municípios diferentes do Estado do Paraná (Sala et al. 2011). Fernandes (2013) também avaliou a diversidade de plantas de mandacaru de diferentes regiões do Brasil, utilizando microssatélites heterólogos, e encontrou um valor muito alto, segundo Wright (1978), para divergência genética ($F_{ST}= 0,4914$) entre as plantas das diferentes localidades. Na análise dos três morfotipos, apenas quatro plantas de *C. peruvianus* var. *tortuosus* e duas plantas de *C. peruvianus* var. *monstruosus* são provenientes de regiões diferentes das demais amostras de

plantas (93%) que são mantidas cultivadas na cidade de Maringá. A moderada divergência genética entre as três variedades de *C. peruvianus* e o valor alto de fluxo gênico estimado ($N_m = 2,34$), indica a ocorrência de troca de alelos nos *loci* SSR entre as três variedades de *C. peruvianus*. Essa afirmação considera os limites propostos por Govindaraju (1989), onde valores de $N_m = 0,25$ indicam fluxo gênico baixo, valores entre 0,25 e 0,99 indicam fluxo gênico intermediário, e valores de $N_m = 1,0$ indicam um fluxo gênico muito alto entre as populações. De acordo com Loveless e Hamrick (1984), o fluxo gênico pode ser atribuído pelo fluxo de pólen e pela dispersão das sementes. Os cactos colunares são polinizados por vetores que apresentam grande potencial para dispersão de pólen (morcegos e pássaros), e assim exibem baixa diferenciação entre as populações (Hamrick et al. 2001). Nas amostras das três variedades de *C. peruvianus* o valor alto para o fluxo gênico pode ser em razão do fato destas serem plantas ornamentais, principalmente de zonas urbanas usadas em jardins, e a sua dispersão ser normalmente influenciada pelo homem. Além disso, o consumo e dispersão dos frutos realizados por pássaros e morcegos, que podem percorrer grandes distâncias, também pode contribuir para a indicação de um fluxo gênico alto.

A análise das frequências genotípicas revelou que a maioria das frequências dos alelos não apresenta uma distribuição de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 9). O desvio das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, pode se dever a vários fatores evolutivos, como deriva genética, seleção, cruzamentos entre parentes, efeito de Wahlund (redução da heterozigosidade devido à população estar estruturada em sub-populações), e a presença de alelos nulos (Hamrick 1982). Nas amostras analisadas, este já era um resultado esperado por não se tratarem de populações naturais. A maioria das plantas foi coletada de jardins em áreas urbanas. Contudo, as frequências genotípicas nos *loci* *AaD9* (morfotipos 2 e 3), *mAbR86* (morfotipo 2), *mEgR78* (morfotipo 1) e *Pchi47* (morfotipo 3), ainda atendem a expectativa de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 9).

A estruturação genética das populações também foi avaliada utilizando - se os índices F_{ST} de Weir e Cockerham (1984) que assume o modelo de mutação de alelos infinitos (IAM) e R_{ST} de Slatkin (1995) que assume o modelo de mutação *stepwise* (SMM) utilizando-se o programa GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse 2006; 2012). O valor do índice de fixação F_{ST} para todos os *loci* SSR das amostras das variedades de *C. peruvianus* foi igual a 0,127. Considerando a faixa de valores para diferenciação genética entre as populações, proposta por Wrigth (1978), os valores encontrados assumindo os modelos IAM e SMM também indicaram uma divergência genética moderada entre as amostras de plantas de *C. peruvianus*, *C. peruvianus* var. *tortuosus*, e *C. peruvianus* var. *monstruosus*. O índice R_{ST} para todos os

loci SSR foi de 0,154. Devido aos modelos de mutação em que se baseiam, normalmente há diferenças entre os resultados dos índices F_{ST} e R_{ST} , sendo o primeiro baseado no Modelo de Alelos Infinitos (IAM) e o segundo no *Stepwise Mutation Model* (SMM) ou “modelo passo a passo”. O modelo SMM tem sido o mais indicado para comparações utilizando dados de microssatélites (Benites 2008). Segundo Slatkin (1995) é esperado que os valores de R_{ST} que seguem estritamente o modelo *stepwise* como padrão, sejam mais altos que os valores de F_{ST} . A maior variância se encontra dentro das populações $F_{ST} = 87\%$ (Tabela 3) e $R_{ST} = 85\%$ (Tabela 4), e os valores de variabilidade entre as populações foram para o $F_{ST} = 13\%$ e para o $R_{ST} = 15\%$. Estes valores mostram que não existe uma muito clara estruturação genética das populações.

As relações de similaridade e dissimilaridade entre as amostras das três variedades de mandacaru com morfologias distintas indicaram similaridade genética mais alta entre as variedades *C. peruvianus* e *C. peruvianus* var. *tortuosus* (0,9329) e entre *C. peruvianus* e *C. peruvianus* var. *monstruosus* (0,9314), e menor similaridade genética entre as amostras de *C. peruvianus* var. *tortuosus* e *C. peruvianus* var. *monstruosus* (0,8456). Valores de identidade genética, menores que 0,85 foram descritos por Thorpe e Solé-Cava (1994) como sendo encontrados para populações que estão geograficamente distantes, em processo de especiação, ou para espécies diferentes do mesmo gênero. Desta forma, a análise dos *loci* *Pchi47*, *AaB6*, *AaD9*, *AaH11*, *mAbR28*, *mAbR86e* e *mEgR78*, aponta *C. peruvianus* var. *tortuosus* e *C. peruvianus* var. *monstruosus* como variedades da espécie *C. peruvianus*, enquanto as plantas com o fenótipo “*tortuosus*” e “*monstruosus*” poderiam ser consideradas em nível molecular, como espécies diferentes do gênero *Cereus*, ou como variedades em processo de especiação. É possível que, o caráter ornamental mais acentuado para os fenótipos “*tortuosus*” e “*monstruosus*” possa determinar um processo de seleção artificial mais rígido, que pode conduzir a um processo de especiação, a despeito do fluxo gênico que parece ocorrer entre os três morfotipos.

O agrupamento Bayesiano mostrou o predomínio de alelos de grupos diferentes nos morfotipo 2 (*C. peruvianus* var. *tortuosus*) e morfotipo 3 (*C. peruvianus* var. *monstruosus*). Nas plantas de *C. peruvianus* var. *tortuosus* há o predomínio de alelos do grupo 3 (azul), enquanto nas plantas de *C. peruvianus* var. *monstruosus* há o predomínio de alelos do grupo 2 (verde), apontando também para um processo de diferenciação maior entre as plantas destas duas variedades, e indicando que o fluxo de alelos parece ser mais restrito entre elas. No morfotipo que representa a espécie (*C. peruvianus*: morfotipo 1) a distribuição dos três grupos de alelos foi equivalente.

A análise do polimorfismo nos *loci* *Pchi47*, *AaB6*, *AaD9*, *AaH11*, *mAbR28*, *mAbR86*, e *mEgR78*, mostrou a fixação apenas do alelo *Pchi47^A* nas plantas com morfologia de caules mais uniformes (ereto: *C. peruvianus* e “tortuosus”: *C. peruvianus* var. *tortuosus*), mas foi muito importante para indicar que processos de seleção artificial pode estar conduzindo para uma maior diferenciação genética em nível molecular (especiação) entre as plantas das variedades *C. peruvianus* var. *tortuosus* e *C. peruvianus* var. *monstruosus*.

Conclusões

A transferibilidade de *primers* heterólogos para *C. peruvianus* e seus morfotipos foi de 36,36%, sendo que a maior transferência foi para os *primers* desenvolvidos para *Polaskia chichipe* (57,14%). Estes resultados são importantes, e mostram que é possível realizar estudos de diversidade genética apesar da carência de *primers* para cactáceas.

A maior diversidade para a composição alélica foi verificada para o morfotipo 3 que é a variedade “monstruosus”, que também apresenta a maior diversidade na morfologia de seus caules. Este resultado é importante, pois em princípio, a morfologia de caules deve estar relacionada com a dinâmica e complexidade polipeptídica ou protéica das células das plantas. Esta maior diversidade segregou o morfotipo 3 dos morfotipos 1 e 2, *C. peruvianus* e *C. peruvianus* var. *tortuosus* respectivamente.

A análise dos *loci* *Pchi47*, *AaB6*, *AaD9*, *AaH11*, *mAbR28*, *mAbR86* e *mEgR78*, aponta que as plantas com o fenótipo “tortuosus” e “monstruosus” poderiam ser consideradas em nível molecular, como espécies diferentes do gênero *Cereus*, ou como variedades em processo de especiação.

A maior diferenciação genética em nível molecular (especiação) observada entre as plantas das variedades *C. peruvianus* var. *tortuosus* e *C. peruvianus* var. *monstruosus* devem estar sendo direcionadas por um rígido processo de seleção artificial, uma vez que estas duas variedades apresentam um acentuado caráter ornamental.

Referências

- Albert S, Schmitz J (2002) Characterization of major royal jelly protein-like DNA sequences in *Apis dorsata*. *J Api Res* 41:75-85
- Aljanabi SM, Forget L, Dookun A (1999) An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Mol Biol Rep* 17:1-8
- Alvarez M, Costa SC, Utumi H, Huber A, Beck R, Fontana JD (1992) The anionic glycan from the cactus *Cereus peruvianus* - Structural features and potential uses. *Appl Biochem Biotechnol* 34/35: 283-295
- Anderson EF (2001) *The Cactus Family*. Timber Press, Oregon
- Arakaki M, Soltis DE, Soltis PS, Speranza PR (2010) Characterization of polymorphic microsatellite *loci* In *Haageocereus* (Trichocereae, Cactaceae). *Amer J Bot* 97(3):e17-e19
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MFC, Lexer C (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol Ecol* 16:3759-3767
- Barreneche T, Casasoli M, Russel K, Akkak A, Meddour H, Plomion C, Villani F, Kremer A (2004) Comparative mapping between *Quercus* and *Castanea* using simple-sequence repeats (SSRs). *Theor Appl Genet* 108:558-566
- Benites C (2008) Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma corruscans*, (Spix & Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares do tipo microsatélite. Tese, Universidade Estadual de São Paulo
- Britton NL, Rose JN (1963) *The Cactaceae: description and illustrations of plants of the cactus family, volumes 1 and 2*. Dover, New York
- Butterworth CA (2011) Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellite *loci* in *Coryphanta robustipina* ssp. *robustipina*. *Conservation Genetics Resour* 3:247-249
- Calvente A, Zappi DC, Forest FE, Lohmann LG (2011) Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (Cactaceae) and taxonomic implications for *Schlumbergera* and *Hatiora*. *Mol Phyl Evol* 58:456-468
- Carvalho VM, Mangolin CA, Machado MFPS (2008) Seed germination of the *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) somaclones follows a relatively simple protocol. *Seed Sci Technol* 36:595-560
- Cordeiro GM, Casu R, McIntyre CL, Manners JM, Henry R J (2001) Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum spp.*) ESTs cross transferable to *Erianthus* and *Sorghum*. *Plant Sci* 160:1115-1123
- Dembitsky MV, Rezanka T (1996) Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. *Phytochemistry* 42:1075-1080

- Ekue MRM, Gailing O, Finkeldey R (2009) Transferability of Simple Sequence Repeat (SSR) markers developed in *Litchi chinensis* to *Blighia sapida* (Sapindaceae). *Plant Mol Biol Rep* 27:570-574
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14(8):2611-2620
- Faria DA, Mamani EMC, Pappas MR, Pappas Jr JG, Grattapaglia D (2010) A selected set of EST-derived microsatellites, polymorphic and transferable across 6 species of *Eucalyptus*. *J Hered* 4:523-520
- Faria-Tavares JS (2011) Marcadores moleculares para a caracterização genética de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). Tese, Universidade Estadual de Maringá
- Faria-Tavares JS, Martin PG, Mangolin CA, Oliveira-Collet SA, Machado MFPS (2013) Genetic relationships among accessions of mandacaru (*Cereus* spp.: Cactaceae) using amplified fragment length polymorphisms (AFLP). *Biochem Syst Ecol* 48:12-19
- Fehlberg SD, Ford KA, Ungerer MC, Ferguson CJ (2008) Development, characterization and transferability of microsatellite markers for the plant genus *Phlox* (Polemoniaceae). *Mol Ecol Resour* 8:116–118
- Fernandes VNA (2013) Transferibilidade de microssatélites para o estudo de genética de populações de mandacaru. Dissertação, Universidade Estadual de Maringá
- Govindaraju RD (1989) Variation in gene flow levels among predominantly self pollinated plants. *J Evol Biol* 2:173-181
- Gutierrez MV, Vaz Patto MC, Huguet T, Cubero JL, Moreno MT, Torres AM (2005) Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theor Appl Genet* 110:1210-1217
- Hamrick JL (1982) Plant population genetic and evolution. *Am J Bot* 69:1685-1693
- Hamrick JL, Nason JD, Fleming TH, Nassar JM (2001) Genetic diversity in columnar cacti. In: Fleming TH, Valiente-Banuet A (eds) *Columnar cacti and their mutualists: Evolution, ecology and conservation*. University of Arizona Press, Arizona, pp 122-133
- Hardesty BD, Hughes SL, Rodriguez VM, Hawkins JA (2008) Characterization of microsatellite *loci* for the critically endangered cactus *Echinocactus grusonii*, and their cross-species utilization. *Mol Ecol Resour* 8:164-167
- Helsen P, Verdyck P, Tye A, Van Dongen S. (2009) Low levels of genetic differentiation between *Opuntia echios* varieties on Santa Cruz (Galápagos). *Plant Syst Evol* 279:1–10
- Hoisington D, Khairallah M, González-Léon D (1994) *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Second Edition, D.F.: CIMMYT, Mexico
- Hughes SL, Rodriguez VM, Hardesty BD, Luna RTB, Hernández HM, Robson RM, Hawkins JA (2008) Characterization of microsatellite *loci* for the critically endangered cactus *Ariocarpus bravoanus*. *Mol Ecol Resour* 8:1068-1070

- Hunt D, Taylor NP, Charles G (2006) *The New Cactus Lexicon*. UK: DH books.
- Katsir L, Davies KA, Bergmann DC, Laux T (2011) Peptide signaling in plant development. *Curr Biol* 21:356-364
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *Amer Orchid Soc Bull* 15:214-217
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann Rev Ecol Syst* 15:65–95
- Mark HF (1979) Biopolymers. In: Mark HF *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3^a ed. Kirk-Othmer, New York, pp 23-35
- Marquez-Lema A, Velasco L, Perez-Vich B (2010) Transferability, amplification quality, and genome specificity of microsatellites in *Brassica carinata* and related species. *J Appl Genet* 51:123-31
- Martin PG (2011) Transferibilidade de microssatélites de cactáceas para a análise de regenerantes clonais (R0) de *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). Dissertação, Universidade Estadual de Maringá
- Martindale M (1979) *The extra pharmacopeia pharmaceutical*. 27^a ed. London-Press, London
- Matsuoka Y, Mitchell SE, Kresovich S, Goodman M, Doebley J (2002) Microsatellites in *Zea* – variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor Appl Genet* 104:436–450
- Meijer M, Murray AHJ (2001) Cell cycle controls and the development of plant form. *Curr Opin Plant Biol* 4:44-49
- Mizrahi Y, Nerd A (1999) Climbing and columnar cacti: new arid land fruit crops. In: Janick J (ed.). *Perspectives on New Crops and New Uses*. J. Amer Soc Hort Sci, Alexandria, Virginia, pp 358-366
- Müller S (2012) Universal rules for division plane selection in plants. *Protoplasma* 249:239-253
- Nassar JM, Hamrick JL, Fleming TH (2002) Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae]). *J Hered* 93(3):193-200
- Nassar JM, Hamrick JL, Fleming TH (2003) Population genetic structure of Venezuelan chiropterophilous *Columnar cacti* (Cactacea). *Am J Bot* 90(11):1628-1637
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590
- Oliveira AJB, Machado MFPS (2003) Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Appl Biochem Biotechnol* 104:149-155

- Otero-Arnaiz A, Casas A, Hamrick JL, Cruse-Sanders J (2005) Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central Mexico. *Mol Ecol* 14:1603-1611
- Otero-Arnaiz A, Cruse-Sanders J, Casas A, Hamrick JL (2004) Isolation and characterization of microsatellites in the columnar cactus: *Polaskia chichipe* and cross-species amplification within the Tribe Pachycereeae (Cactaceae). *Mol Ecol Notes* 4:265-267
- Parida SK, Kalia SK, Kaul S, Dalal V, Hemaprabha G, Selvi A, Pandit A, Singh A, Gaikwad K, Sharma T, Srivastava PS, Singh NK, Mohapatra T (2009) Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theor Appl Genet* 118:327-338
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A (1998) Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol Biol Evol* 15:1275–1287
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288-295
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28 (19): 2537-2539
- Pépin L, Amigues Y, Lépingle A, Berthier JL, Bensaid A, Vaiman D (1995) 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
- Perez MF, Téó MF, Zappi DC, Taylor NP, Moraes EM (2011) Isolation, characterization, and cross-species amplification of polymorphic microsatellite markers for *Pilosocereus machrisii* (Cactaceae). *Am J Bot* 98(8):e204-e206
- Pollegioni P, Woeste K, Mugnozza GS, Malvolti ME (2009) Retrospective identification of hybridogenic walnut plants by SSR fingerprinting and parentage analysis. *Mol Breed* 24(4):321-335
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4: 137–138.
- Rossetto M (2001) Sourcing of SSR markers from related plant species. In: Henry RJ (ed) *Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants*. CABI, Wallingford, pp 211–224
- Rossetto M, McNally J, Henry RJ (2002) Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining taxonomic relationships in the Vitaceae. *Theor Appl Genet* 104:61–66
- Sala J, Mangolin CA, Franzoni J, Machado MFPS (2011) Esterase polymorphism and the analysis of genetic diversity and structure in cactus populations descended from *Cereus peruvianus* plants regenerated *in vitro*. *Biochem Genet* 49:1320-1325
- Scheinvar L (1985) Cactaceae. Monografia, Universidade Nacional Autônoma do México

- Schwabe AL, Hubbard AR, Neale JR, McGlaughlin ME (2013) Microsatellite *loci* development for rare Colorado *Sclerocactus* (Cactaceae). *Conservation Genet Resour*, 5:69–72
- Silva JGM, Silva DS, Ferreira MA, Lima GFC, Melo AAS, Diniz MCNM (2005) Xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. ExRowl.) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) na alimentação de vacas leiteiras. *R Bras Zootec* 34:1408-1417
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457–462
- Solórzano S, Cortés-Palomec AC, Ibarra A, Dávila P, Oyama K (2009) Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite *loci* in the threatened endemic *Mammillaria crucigera* (Cactaceae). *Mol Ecol Resour* 9:156–158
- Tanaka LYA, Oliveira AJB, Gonçalves JE, Cipriani TR, Souza LM, Marques MCA, Werner MFP, Baggio CH, Gorin PAJ, Sasaki GL, Iacomini M (2010) An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. *Carbohydr Polymers* 82:714–721
- Tang DQ, Lu JJ, Fang W, Zhang S, Zhou MB (2010) Development, characterization and utilization of genbank microsatellite markers in *Phyllostachys pubescens* and related species. *Mol Breed* 25:299-311
- Taylor N, Zappi D (2004) *Cacti of Eastern Brazil*. The Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AB, UK
- Taylor NP (1997) Cactaceae. In: Oldfield S (ed) *Cactus and Succulent Plants. Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK
- Terry M, Pepper AE, Manhart JR (2006) Development and characterization of microsatellite *loci* in endangered *Astrophytum asterias* (Cactaceae). *Mol Ecol Notes* 6:865-866
- Thomas MR, Scott NS (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequenced-tagged sites (STSs). *Theor Appl Genet* 86:985-990
- Thorpe JP, Solé-Cava AM (1994) The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zool Scripta* 23: 3–18
- Turbak AF (1979) Cellulose. In: Turbak AF Cellulose. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3^a ed. Kirk- Othmer, New York, pp 60-72
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23(1):48-55
- Vries JX, Moyna P, Diaz V (1971) Alkaloides cactus Uruguay. *Rev Latinoam Química* 3:21-23
- Walker KL, Müller S, Moss D, Ehrhardt DW, Smith LG (2007) *Arabidopsis* TANGLED Identifies the Division Plane throughout Mitosis and Cytokinesis. *Curr Biol* 17:1827–1836

Wallace RS, Gibson AC (2002) Evolution and Systematics. In: Nobel PS Cacti Biology and Uses. Ed. University of California Press, California, EUA, pp 1-21

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370

Whistler RL (1963) Methods of Carbohydrate Chemistry. Ed. Academic Press, London

White G, Powell W (1997) Cross-species amplification of SSR *loci* in the Meliaceae family. *Mol Ecol* 6:1195-1197

Wright S (1978) Variability within and among populations. University of Chicago Press, Chicago

Wu KS, Tanksley D (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* 241:225-235

Yeh FC, Boyle TYZ, Xiyun JM (1999) POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta

Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB, Brondani C, Vencovsky R (2002) Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Mol Ecol Notes* 2(4):512-513

APÊNDICE I

Tabela 1. Composição do meio Knudson (1946) utilizado para inoculação das sementes de mandacaru

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

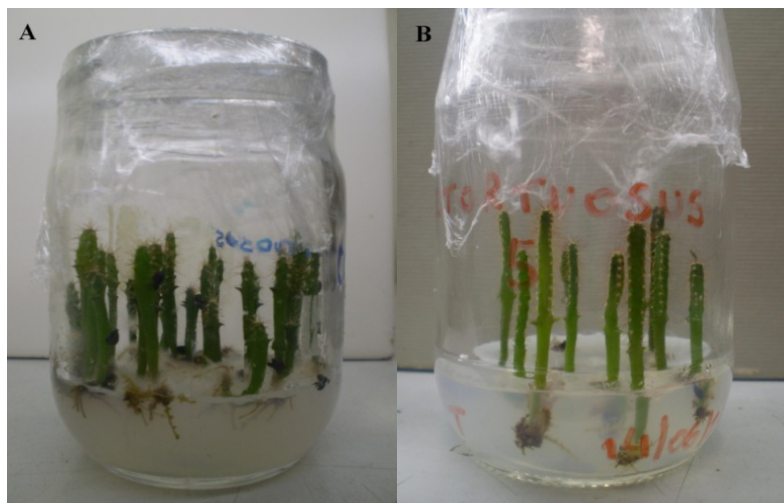


Fig 1. Em A, plântulas de *Cereus peruvianus* var. *tortuosus* com dois meses. Em B, algumas das plantas do primeiro frasco, com onze meses.

Tabela 2. Protocolo utilizado para a extração de DNA de caules de plântulas e de planta de mandacaru, segundo Aljanabi et al. (1999)

Tampão de extração	Concentração/Quantidade
Tris-HCL	200 mmol/L pH 8,0
EDTA	50 mmol/L pH 8,0
NaCl	2,2 mol/L para plântulas e 5,0 mol/L para plantas adultas
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)	600 µL
RNase (10mg/mL)	0,1 ng/ µL
Clorofórmio: Álcool isoamílico (24:1)	600 µL
Reagentes de Precipitação	
Isopropanol gelado	1 volume
NaCl (5 mol/L)	1/6 volume
Lavagem do precipitado	
Álcool absoluto (repetir 2x)	500 µL

Tabela 3. Condições de amplificação testadas para os 33 pares de *primers* de cactáceas, nas amostras de *Cereus* utilizando diferentes temperaturas de anelamento.

Primer	Autores	Testes com diferentes temperaturas de anelamento	Programas e temperaturas de anelamento utilizados os diferentes primers
<i>Pchi5</i> <i>AY147840</i>	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C, 58°C, 57°C.	
<i>Pchi9</i> <i>AY147838</i>	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C, 58°C, 57°C.	
<i>Pchi21</i> <i>AY147837</i>	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C.	Albert e Schimitz (2002): 60°C
<i>Pchi25</i> <i>AY147836</i>	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C, 58°C, 57°C.	Albert e Schimitz (2002): 57°C
<i>Pchi44</i> <i>AY147834</i>	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 59°C.	Albert e Schimitz (2002): 59°C
<i>Pchi47</i> <i>AY147832</i>	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C.	Albert e Schimitz (2002): 60°C
<i>Pchi54</i> <i>AY147831</i>	Otero-Arnaiz et. al., 2004	Albert e Schimitz (2002): 60°C.	
<i>AaB6</i>	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 64°C.	Albert e Schimitz (2002): 64°C
<i>AaH11</i>	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 63°C.	Albert e Schimitz (2002): 63°C.
<i>AaA3</i>	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 64°C, 62°C, 60°C.	
<i>AaC3</i>	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 63°C, 61°C, 58,5°C.	

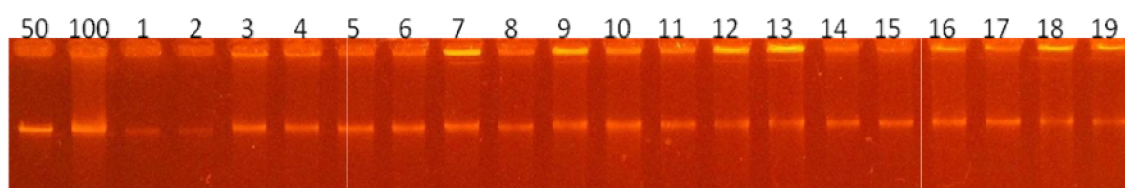
<i>AaD9</i>	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 64°C, 62°C, 60°C, 59°C.	Albert e Schimitz (2002): 59°C
<i>AaG3</i>	Terry et al., 2006	Albert e Schimitz (2002): 64°C, 62°C, 60°C.	
<i>mAbR05</i>	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C
<i>mAbR28</i>	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002):53,8°C	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C
<i>mAbR40</i>	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C, 50°C	
<i>mAbR42</i>	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C.	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C
<i>mAbR77</i>	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C, 52°C	
<i>mAbR82</i>	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C, 50°C	
<i>mAbR86</i>	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C
<i>mAbR91</i>	Hughes et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 53,8°C	
<i>mEgR02</i>	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C.	
<i>mEgR17</i>	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°.	
<i>mEgR39</i>	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C.	
<i>mEgR63</i>	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C, 58,5°C.	
<i>mEgR76</i>	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C.	
<i>mEgR73</i>	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C.	
<i>mEgR78</i>	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58° C.	Albert e Schimitz (2002): 58° C
<i>mEgR98</i>	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59°C, 58,5°C.	
<i>mEgR99</i>	Hardesty et al.,2008	Albert e Schimitz (2002): 58°C, 59,5°C.	
<i>mEgR51</i>	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C, 50°C.	
<i>mEgR68</i>	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C.	
<i>mEgR70</i>	Hardesty et al., 2008	Albert e Schimitz (2002): 51,4°C, 52°C.	

Tabela 4. 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			12,0
Tampão	10 X	1 X	2,0
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,0
dNTPs	2,5m M/cada	0,1 mM/cada	0,8
Primer (F)	10 μM	0,5 μM	1,0
Primer (R)	10 μM	0,5 μM	1,0
Taq-DNA Polimerase	5 U/ μL	1 U	0.2
DNA	10 ng/ μL	10ng	1,0
Total			20 μL

Tabela 5. Seqüência do programa segundo Albert e Schmitz (2002) com modificações nas temperaturas de anelamento de cada *primer*, utilizado para amplificação do DNA de mandacaru com todos os *primers*

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

Fig 2. Gel de Agarose 0,8% utilizado para quantificação das amostras de DNA de *Cereus peruvianus*. As amostras 50 e 100 são DNAs de fago λ utilizadas como padrão de concentração com 50 e 100ng, respectivamente. As demais amostras são de DNAs de diferentes plântulas de *Cereus peruvianus* var. *monstrosus*.

ANEXO I

Conservation Genetics: Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly

– at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Genus and species names should be in italics.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended. If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation(Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系 Springer 推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。
理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。
エダンズグループジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께
회사를 소개드립니다. 서
비스 내용, 가격 및
신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.