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

ELIANE RODRIGUES MONTEIRO

Diversidade genética em xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl.) utilizando marcadores SSR e AFLP

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
MARÇO - 2013

ELIANE RODRIGUES MONTEIRO

Diversidade genética em xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl.) utilizando marcadores SSR e AFLP

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

Orientadora: Profª Drª Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
MARÇO – 2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

À minha mãe, Maria dos Remédios Rodrigues Monteiro, e ao meu pai, José de Ribamar Monteiro.

Ao meu noivo, Raimundo de Souza Júnior.

Aos meus irmãos, Gilvan Rodrigues Monteiro, José de Ribamar Monteiro Júnior e Nilvan Rodrigues Monteiro.

Com carinho, Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as vitórias alcançadas.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

À minha Orientadora, professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, e à minha Coorientadora, professora Doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela sabedoria, confiança, amizade, dedicação e ensinamentos adquiridos com a convivência e, principalmente, por serem grandes exemplos pessoais e profissionais.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), Francisco José da Cruz e Maria Valquiria Magro, pela atenção e profissionalismo com que sempre me atenderam.

Ao pesquisador José Geraldo Medeiros da Silva, à professora doutora Gleice Ribeiro Orasmo e ao professor doutor José Ribeiro Neto, pela coleta e envio de sementes de xiquexique.

À minha família, em especial, à minha querida mãe, por tanto amor a mim dedicado e por estar sempre presente em minha vida.

Ao meu noivo, Raimundo de Souza Júnior, pelo apoio, estímulo e carinho incondicional, durante o Curso de Doutorado, período em que por tantos momentos estive ausente.

Às amigas, Aline Bronzato, Ana Clara Meirelles, Iciene Clímaco, Marciana Silveira, Patrícia Cardoso e Socorro Sampaio, pela ajuda recebida e pelos momentos de alegria e descontração que passamos juntos.

Aos colegas de Laboratório: Andréa Neves, Ana Luiza Monezi, Bruna Rodrigues, Danuza Strioto, Ivone Eloi, Juliana Sala, Liriana Cantagalli, Maycon Bevilaqua, Simone Santos, Tânia Crivelari e Wanessa Neves, pela ajuda na realização do experimento, pelo companheirismo e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais e do Laboratório de Genética Animal, pelo agradável convívio.

Aos amigos, Davi Santos, Eva Costa, Cinthya Pacheco, Hugo Zeni Neto, Jardel Santos e Leonel Moiana, pelo apoio durante esta jornada.

Aos Técnicos de Laboratório, Leila Frota e Sérgio Calvi, e a os todos que colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Eliane Rodrigues Monteiro, filha de Maria dos Remédios Rodrigues Monteiro e de José de Ribamar Monteiro, nasceu em José de Freitas, Estado do Piauí, aos dezenove dias do mês de julho de 1977.

Concluiu o Ensino Fundamental, em 1991, no Centro de Educação Comunitária Eurípedes Aguiar, em Teresina, Piauí.

Em 1994, na cidade de Teresina, Piauí, concluiu o Ensino Médio, na Escola Técnica Federal do Piauí, atual IFPI.

Em 1997, iniciou o Curso de Ciências Biológicas, pela Universidade Federal do Piauí, concluindo o Curso de Licenciatura, em fevereiro de 2002, e a modalidade Bacharelado em março de 2005.

Em maio de 2008, concluiu o Curso de Mestrado em Agronomia, na Universidade Federal do Piauí, realizando estudos na área de Diversidade Genética Vegetal.

Em março de 2009, iniciou o Curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, Brasil.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS ..... **ix**
LISTA DE FIGURAS ..... **xiii**
RESUMO ..... **xv**
ABSTRACT ..... **xvi**
1. INTRODUÇÃO GERAL **1**
2. REVISÃO DE LITERATURA **3**
2.1. Cactáceas 3
2.2. Xiquexique 6
2.2.1. Xiquexique como valor forrageiro 9
2.2.2. Xiquexique como reserva ecológica 13
2.2.3. Xiquexique para outras finalidades 15
2.3. Marcadores moleculares em plantas 15
2.3.1. Microssatélites em plantas 17
2.3.1.1. Microssatélites em cactáceas 20
2.3.1.2. Transferibilidade de sequências de *primers* microssatélites 26
2.3.1.3. Transferibilidade de *primers* microssatélites em cactáceas 29
2.4. Marcador AFLP (Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados) 30
2.4.1. Uso do AFLP em cactáceas 34
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **36**
CAPÍTULO I - Transferibilidade de *loci* microssatélites para a caracterização genética de *Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl. **52**
RESUMO **52**
1. INTRODUÇÃO **54**
2. MATERIAL E MÉTODOS **56**
2.1. Material vegetal 56
2.2. Germinação das sementes 57
2.3. Isolamento do DNA 58
2.4. Quantificação do DNA 59
2.5. Amplificação e transferibilidade de marcadores microssatélites de cactáceas 62
2.6. Separação dos produtos das amplificações 64
2.7. Análise dos dados 65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO **66**

3.1.Transferibilidade de microssatélites....66
3.2. Caracterização genética....67
4. CONCLUSÕES....80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....81
CAPÍTULO II - Diversidade genética de *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae), utilizando AFLP....84
RESUMO....84
1. INTRODUÇÃO....86
2. MATERIAL E MÉTODOS....88
2.1. Material vegetal....88
2.2. Extração do DNA e quantificação do DNA....89
2.3. Ensaios de AFLP....91
2.3.1. Reação de digestão do DNA....91
2.3.2. Ligação de adaptadores....92
2.3.3. Pré-amplificação....92
2.3.4. Amplificação seletiva....93
2.4. Preparo dos géis e condições da eletroforese....94
2.5. Análise dos dados....96
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO....98
4. CONCLUSÕES....103
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....104
6. CONCLUSÕES GERAIS....107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Desempenho de bovinos, ovinos e caprinos arraçoados com diferentes associações de xiquexique e silagem de sorgo e fenos ... 12
Quadro 2 - Relação dos 111 *loci* microssatélites identicados em 11 espécies de cactáceas com as respectivas seqüências e autores 22
Quadro 3 - Locais de coleta dos frutos de xiquexique (*Pilosocereus gounellei*), com as respectivas coordenadas geográficas e quantidade de plântulas utilizadas para a avaliação da transferibilidade e diversidade genética com o marcador molecular microssatélite 56
Quadro 4 - Composição do meio Knudson utilizado para germinação de sementes e obtenção de plântulas de *Pilosocereus gounellei*..... 58
Quadro 5 - Protocolo utilizado para a extração de DNA de tecidos de caules de plântulas de *Pilosocereus gounellei,* segundo Aljanabi et al. (1999) 61
Quadro 6 - Condições de amplificação testadas para os 33 pares de *primers* microssatélites de cactáceas, nas populações de *Pilosocereus gounellei,* utilizando diferentes números de ciclos e temperaturas de anelamento para a amplificação do DNA das plântulas 62
Quadro 7 - Seqüência do programa *Touchdown* utilizado para amplificação do DNA de *Pilosocereus gounellei* com 16 *primers* microssatélites testados 63
Quadro 8 - Concentrações dos reagentes estoques e utilizados nas reações de amplificação 64
Quadro 9 - Seqüência do programa utilizado para amplificação do DNA de *Pilosocereus gounellei* com os *primers* microssatélites testados 64
Quadro 10 - Conjunto dos *primers* microssatélites obtidos a partir de três espécies de cactáceas e número de alelos amplificados em *Pilosocereus gounellei* e na espécie de origem 67
Quadro 11 - Seqüências de nucleotídeos dos *primers* microssatélites, sequência de repetição, número e variação no tamanho dos alelos em pares de base (pb) produzidos em *Pilosocereus gounellei* e na espécie de origem 68

Quadro 12 - Frequência dos alelos para os diferentes *loci* microssatélites analisados nas plântulas descendentes das 17 amostras de *Pilosocereus gounellei.* Amostras 1, 2 e 16 (Teresina); 3 (Picos); 9 e 14 (Campo Maior); 7, 11, 12, 13 (Bahia); 4, 5, 6, 8, 10, 15 e 17 (RN). Os pontos indicam a ausência do alelo 70

Quadro 13 - Estimativas do número de *loci* polimórficos N(lp), número de *loci* monomórficos N(lm) e porcentagem de polimorfismo (%P) para as plântulas descendentes das 17 amostras de *Pilosocereus gounellei* 71

Quadro 14 - Parâmetros de diversidade genética avaliados para as plântulas descendentes das 17 amostras de populações de *Pilosocereus gounellei* obtidos mediante análise de cinco *loci* microssatélites..... 72

Quadro 15 - Estimativa do número de alelos observados (Na) e número efetivo de alelos (Ne), coeficiente de endogamia (FIS), déficit de heterozigotos (FIT), proporção de diferenciação gênica (FST), fluxo gênico (Nm), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) para as plântulas descendentes das 17 amostras de *Pilosocereus gounellei* 75

Quadro 16 - Teste do χ^2-quadrado para verificar o Equilíbrio de Hardy–Weinberg para os cinco *loci* de microssatélites analisados nas plântulas descendentes das 17 amostras de *Pilosocereus gounellei* 76

Quadro 17 - Estimativa do número de alelos por *locus* (Na), número efetivo de alelos (Ne) e heterozigosidade média observada (Ho) e esperada (He) nas amostras de *Pilosocereus gounellei* dos três estados do Nordeste do Brasil: Piauí (PI), Bahia (BA) e Rio Grande do Norte (RN) 77

Quadro 18- Valores do número de alelos por locus (Na), número efetivo de alelos (Ne), coeficiente de endogamia (FIS), déficit de heterozigotos (FIT), e divergência genética (FST) nos *loci* microssatélites entre as amostras de *Pilosocereus gounellei* dos três Estados do Nordeste do Brasil: Piauí (PI), Bahia (BA), e Rio Grande do Norte (RN) 77

Quadro 19 - Análise da variância molecular (AMOVA) para 85 genótipos de *Pilosocereus gounellei* de 17 amostras baseada em seis *loci* polimórficos..... 79
Quadro 20 - Número de cada amostra de *Pilosocereus gounellei*, código da amostra, cidade e estado, de onde foram coletados os frutos para a avaliação da diversidade genética com a técnica AFLP..... 88
Quadro 21 - Protocolo utilizado para a extração de DNA de tecidos de caules de plântulas de *Pilosocereus gounellei,* segundo Aljanabi et al. (1999) 90
Quadro 22 - Sítios de restrição das endonucleases, seqüências dos adaptadores e dos *primers* pré-seletivos complementares aos adaptadores, utilizados para realização da técnica AFLP em plântulas de *Pilosocereus gounellei,* segundo Labra et al. (2003)..... 92
Quadro 23 - Sequência do programa utilizado para amplificação do DNA de *Pilosocereus gounellei* com os *primers* pré-seletivos 93
Quadro 24 - Sete combinações e sequências dos *primers* seletivos, utilizadas para as reações de amplificação seletiva dos DNAs das plântulas de *Pilosocereus gounellei*..... 93
Quadro 25 - Sequência do programa utilizado para amplificação seletiva dos DNAs de *Pilosocereus gounellei*..... 94
Quadro 26 - Volumes dos reagentes utilizados para o preparo da solução estoque dos géis de poliacrilamida segundo Creste et al. (2001)..... 95
Quadro 27 - Protocolo com modificações, utilizado para coloração do gel de poliacrilamida, segundo Beidler et al. (1982)..... 96
Quadro 28 - Número de *loci* amplificados, número de *loci* polimórficos (lp), número de *loci* monomórficos (lm) e porcentagem de polimorfismo para cada combinação de *primer* AFLP nas 21 amostras analisadas de *Pilosocereus gounellei*..... 98
Quadro 29 - Porcentagem de *loci* polimórficos (%P) para cada uma das três populações de *Pilosocereus gounellei* analisadas com a técnica AFLP, valores de diversidade genética de Nei (h) (Nei, 1973) e índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972)..... 100
Quadro 30 - Estimativas da diversidade genética na população total (H_T), diversidade genética dentro das subpopulações (H_S), coeficiente

de diferenciação gênica (G_{ST}) e estimativa de fluxo gênico de G_{ST} (Nm) para as 21 amostras de *Pilosocereus gounellei* analisadas 100
Quadro 31 - Identidade genética de Nei e distância genética de Nei entre as plântulas descendentes das 21 amostras de *Pilosocereus gounellei* analisadas com marcador AFLP..... 101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plantas de xiquexique (*P. gounellei*) em Teresina (PI) 7
Figura 2 – Plantas de xiquexique (*P. gounellei*) na localidade Queimada Nova (BA) 7
Figura 3 – Plantas de xiquexique (*P. gounellei*) no município de Cruzeta (RN) .. 8
Figura 4 - Flor de xiquexique (*P. gounellei*)..... 8
Figura 5 - Vista externa do Fruto de *P. gounellei* (xiquexique), imaturo (a); maduro (b), e aspecto interno (c), Barra = 10 mm..... 9
Figura 6 - Preparo do xiquexique para fornecimento aos animais (a), transporte do material colhido; (b) queima dos espinhos por intermédio do lança-chamas a gás butano (Silva et al., 2004) 10
Figura 7 - Esquema das etapas do método AFLP obtido de Arif et al. (2010) ... 33
Figura 8 - Mapa do Brasil com a localização dos cinco pontos de coleta dos frutos de *Pilosocereus gounellei*, frutos dos quais foram obtidas as sementes que deram origem às plântulas utilizadas no presente trabalho. Bahia: Queimada Nova; Piauí: Campo Maior, Picos e Teresina; Rio Grande do Norte: Cruzeta 57
Figura 9 - Plântulas de *Pilosocereus gounellei* crescendo em meio Knudson. Estas plântulas foram obtidas a partir da germinação de sementes coletadas dos frutos de diferentes plantas. (a) amostra TE(PI)02; (b) amostra CR(RN)04; (c) amostra PI(PI)03; (d) amostra QN(BA)07; (e) TE(PI)01; (f) CR(RN)05..... 60
Figura 10 - Gel de agarose 0,8% utilizado para quantificação do DNA extraído de plântulas de *Pilosocereus gounellei* (a) e certificação da quantificação (b) 61
Figura 11 - Gel de agarose concentrado 4% utilizado para separar o produto da amplificação do *locus* SSR AaB6 em diferentes plântulas descendentes das populações de *Pilosocereus gounellei*. A primeira amostra (M) do gel indica o *ladder* 100pb..... 69
Figura 12 - Dendrograma gerado pelo método de UPGMA para distâncias genéticas obtidas pelo método de Nei (1978) entre as plântulas

descendentes das 17 amostras de *Pilosocereus gounellei,* utilizando o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999) 78
Figura 13 - Locais de coleta de frutos de xiquexique 89
Figura 14 - Gel (8% de poliacrilamida e 7 M de ureia) utilizado para separar o produto da amplificação seletiva dos DNAs de 21 amostras de *Pilosocereus gounellei* com a combinação de *primers* AFLP EAGG-MCTG..... 99
Figura 15 - Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), obtido com os dados de marcadores AFLP entre as três populações de *Pilosocereus gounellei*. Programa Popgene 1.32 (Yeh et al., 1999) 101
Figura 16 - Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, mostrando o relacionamento entre as 21 amostras de *Pilosocereus gounellei* dos Estados do Piauí, Bahia e Rio Grande do Norte. Programas FreeTree e TreeView..... 102

RESUMO

MONTEIRO, Eliane Rodrigues, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2013. **Diversidade genética em xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl.) utilizando marcadores SSR e AFLP**. Orientador: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Conselheiros: Claudete Aparecida Mangolin e Erasmo Renesto.

A espécie *Pilosocereus gounellei* é comum no semiárido nordestino, região sob domínio geoecológico do bioma Caatinga, onde ela é popularmente conhecida como xiquexique. O objetivo do presente trabalho foi estimar a diversidade e similaridade genética em amostras de populações de *P. gounellei* dos estados do Piauí, Bahia e Rio Grande do Norte, usando as técnicas de marcadores moleculares SSR e AFLP. Para a seleção de marcadores microssatélites, foram avaliados 33 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para diferentes espécies de cactáceas. Desta avaliação, foram selecionados oito *loci* microssatélites desenvolvidos para *Astrophytum asterias*, *Polaskia chichipe* e *Echinocactus grusonii*, conferindo uma transferibilidade de 24,24% destes *primers* para *P. gounellei*. O polimorfismo médio para as 17 amostras de *P. gounellei* foi de 73,05%; os *loci* avaliados apresentaram 18 alelos, com uma média de 3,6 alelos por *locus*. As sete combinações de *primers* AFLP geraram 703 fragmentos, dos quais 700 (99,21%) foram polimórficos entre as 21 amostras analisadas. A porcentagem média de *loci* polimórficos entre as combinações utilizadas variou de 95,3%, para a combinação E-AAG/M-CTT, a 100% para as combinações E-ACC/M-CAT, E-ACC/M-CAA, EAGC/M-CAG, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTA e E-AGG/M-CTG. O maior número de *loci* informativos (126) foi detectado com a combinação E-AAC/M-CTA, enquanto a combinação E-AAG/M-CTT revelou o menor número de bandas informativas (48). O baixo valor do G_{ST} (0,1353) e o alto valor de fluxo gênico (3,1968) indicam que a diferenciação gênica dentro das populações dos três estados é maior do que entre as populações dos três Estados. No dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, as amostras foram distribuídas em dois grupos. O estudo demonstrou que as técnicas SSR e AFLP podem ser aplicadas para estimar a diversidade genética e verificar como as populações da referida espécie estão geneticamente estruturadas.

Palavras-chave: Cactaceae, polimorfismo, marcadores moleculares, transferibilidade.

ABSTRACT

MONTEIRO, Eliane Rodrigues, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, Marth, 2013. **Genetic diversity in samples of xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (Web) Byl. & Rowl.) using AFLP and SSR markers**. Adviser: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Commitee Members: Claudete Aparecida Mangolin, Erasmo Renesto.

Pilosocereus gounellei is common in Semiarid region, which is under the dominion geoecológico Caatinga biome, where it is popularly known as xiquexique. The objective of the present study was to evaluate the genetic diversity and similarity at the DNA level of *P. gounellei* among samples from the Piauí, Bahia e Rio Grande do Norte States. For the characterization of microsatellite markers were assessed 33 pairs of microsatellite *primers* developed for different species of cactaceae. Five pairs of microsatellite *primers* developed for *Astrophytum asterias*, *Polaskia chichipe* and *Echinocactus grusonii*, were selected resulting a 24.24% transferability of these primers for *P. gounellei*. The polymorphism to average of samples of *P. gounellei* was 73.05%, the evaluated *loci* showed 18 alleles, with an average of 3.6 alleles per *locus*. Seven *primer* pairs used amplified 703 AFLP markers, of which 700 (99.21%) were polymorphic. The percentage of polymorphic fragments ranged from 95.3% for the *primer* combination E-AAG/M-CTT to 100% for E-ACC/M-CAT, E-ACC/M-CAA, EAGC/M-CAG, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTA e E-AGG/M-CTG. The largest number of informative markers (126) was detected using the *primer* combination E-AAC/M-CTA, while the E-AAG/M-CTT combination revealed the lowest number of polymorphic fragments (48). Nei's gene diversity was 0.3064. The low value of GST (0.1353) and high amount of gene flow (3.1968) indicate that the genetic differentiation within populations of the three states is higher than among the populations of the three states. In the dendrogram based on the Jaccard similarity coefficient, the samples were divided into two groups. Our results demonstrated that AFLP markers were efficient to genetic characterization in the samples *P. gounellei*. SSR and AFLP techniques can be applied to estimate the genetic diversity and genetic structure this species.

Key words: Cactaceae, polymorphism, molecular markets, transferability, genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os cactos são considerados um dos grupos de planta ecologicamente dominantes em terras áridas e semiáridas no novo mundo (Figueredo et al., 2010). A distribuição dos cactos vai desde o Canadá ao extremo sul da América do Sul (Anderson, 2001), sendo o México o centro global de diversidade para a família Cactaceae (Prado et al., 2010). Os cactos podem ser encontrados em habitats que variam de exuberantes florestas tropicais a desertos extremamente secos. Essa ampla diversidade de habitats resultou em muitas formas e tamanhos dessas plantas, que se apresentam muito belos, ou no mínimo notáveis, aos olhos humanos. Embora alguns cactos de deserto pareçam estar mortos, suas flores são quase sempre muito bonitas (Anderson, 2001). As espécies adaptadas a condições de deserto tornam-se um recurso muito importante num ambiente quente, propenso à seca (Prado et al., 2010).

Na região semiárida do Nordeste brasileiro ocorrem diversas cactáceas de grande importância para a fauna e flora regional. Em determinadas localidades dessa região, as cactáceas nativas têm sido utilizadas, nos períodos de secas prolongadas, como um dos principais suportes forrageiros dos ruminantes (Silva et al., 2005). Entre elas, está o xiquexique [*Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl. (Byles; Rowley, 1957)]. Esta cactácea aparece desde o Maranhão até a Bahia, sendo encontrada em solos areno-pedregosos e afloramentos rochosos (Rocha e Agra, 2002). Sua distribuição ocorre principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia (Silva et al., 2005).

A utilização do xiquexique é dificultada pela grande quantidade de espinhos que ele possui, mas os agricultores recorrem ao mesmo para alimentar os animais quando não encontram o mandacaru (*Cereus jamacaru*), a macambira (*Bromelia lacimiosa*) e a coroa-de-frade (*Melocactus* sp.) (Cavalcanti e Resende, 2007). Para que o xiquexique seja oferecido aos animais, é necessário o corte da planta, a queima dos espinhos e a trituração do material forrageiro (Lima, 1998). Contudo, esta forma tradicional de eliminação dos espinhos, que é a utilização de fogueira na Caatinga, é desaconselhável. Por isso, nos últimos anos, os pecuaristas adotaram novos métodos de queima dos espinhos das cactáceas, entre eles, o lança-chamas a gás butano (Silva et al., 2010b).

Considerando esta realidade, fica evidente que a retirada dos espinhos seria o objetivo em um programa de melhoramento genético do xiquexique. No entanto, é preciso pensar primeiro na conservação da espécie e na consequência que a retirada dos espinhos poderia ter para a mesma. É preciso analisar se há diversidade genética, qual o nível dessa diversidade e desenvolver estratégias de conservação, para que, a partir disso, possa ser criado um programa de melhoramento genético para a espécie.

A esse respeito, verificou-se que a diversidade genética tem sido examinada em algumas espécies de Cactáceas, tais como: *Melocactus curvipinus* (Nassar et al., 2001), *Pereskia guamacho* (Nassar et al., 2002), *Polaskia chichipe* (Otero-Arnaiz et al., 2005), *Pilosocereus tillianus* (Figueredo et al., 2010), *Astrophytum asterias* (Terry et al., 2006) e *Cereus peruvianus* (Sala et al., 2011). Esses estudos mostram alta variabilidade genética, mesmo quando as espécies têm uma distribuição restrita (Figueredo et al., 2010).

Ferramentas moleculares, como os marcadores microssatélites, vêm sendo desenvolvidas em várias espécies de cactáceas e, para um número ainda restrito de espécies, tem-se utilizado a técnica AFLP. Os marcadores microssatélites são confiáveis, codominantes, multialélicos, altamente informativos e bem estabelecidos para a análise genética em vegetais (Parida et al., 2006). O AFLP é capaz de detectar um grande número de bandas polimórficas em uma única coluna, em vez de níveis elevados de polimorfismo em cada *locus*, como é o caso do método SSR (Garcia et al., 2004). No entanto, devido a sua natureza amplamente dominante, os marcadores AFLP não competem com marcadores microssatélites (Mueller e Wolfenbarger, 1999).

Embora o xiquexique seja uma planta adaptada às condições do semiárido nordestino e um recurso alimentar importante no período da seca, ainda não foram encontradas pesquisas que tratem da estimativa de parâmetros genéticos para essa espécie. Por esse motivo, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estimar a diversidade genética em plântulas de amostras de populações provenientes dos estados da Bahia, Piauí e Rio Grande do Norte, por meio da transferência de *primers* microssatélites desenvolvidos para cactáceas e do uso da técnica AFLP.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cactáceas

A família Cactaceae conta com 124 gêneros e aproximadamente 1.440 espécies (hunt et al., 2006). É originária do Continente Americano, sendo o México o país que apresenta maior riqueza destas plantas, com 913 táxons, dos quais 80% são endêmicos do País (Sierra, 2011). Uma exceção é o cacto epifítico *Rhipsalis baccifera,* o qual também ocorre na África tropical, Madagascar, em ilhas do Oceano Índico e no Sri Lanka, tendo quase certamente sido disperso do novo mundo para estas áreas por pássaros (Anderson, 2001). A maioria das espécies de cactos são diploides (*2n =2x=22*), mas podem ser encontradas espécies poliploides (2 *n* > 22), só que em menor proporção - menos de 20% (Anderson, 2001).

As cactáceas são algumas vezes confudidas com outras suculentas por apresentar caules largos, sem folhas, de longa vida, suculentos, de diferentes formas e tamanhos, sobre os quais são sustentados os espinhos. A família Cactaceae é também caracterizada por possuir grande número de alcaloides, conter pigmentos e mucilagem e ter capacidade de absorver muito rapidamente a água da chuva (Anderson, 2001). Todos os cactos têm uma única estrutura, como uma "almofada" em seus caules e ramos, chamada aréola. Cada aréola tem dois pontos de crescimento, ou brotos. O broto de baixo geralmente produz espinhos e o de cima produz novos ramos ou flores. Os cactos são perenes: requerem mais de uma estação para amadurecer e não morrem após o florescimento. De maneira geral, eles têm flores em formato de roda ou funil, com um número indefinido de sépalas e pétalas, e o ovário ou fruto é sempre formado abaixo da flor. O fruto é uma baga com as sementes dispersas no seu interior (Chidamian, 1984).

Os cactos se distinguem da maioria das plantas verdes por possuirem características que permitem o uso da água de maneira muito eficiente (eficiência 5 a 10 vezes maior que as plantas de cultivo convencional), apresenando, assim, baixo requerimento hídrico (Mizrahi e Nerd, 1999), o que torna possível o seu desenvolvimento em ambientes com carência de água. Esta capacidade se deve à forma especial de fotossíntese realizada por esta família, o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), com o qual se visa economizar água, uma vez que os estômatos abrem-se à noite e capturam o dióxido de carbono quando a transpiração

é baixa (Sierra, 2011; Nobel e Bobish, 2002). A transpiração reduzida é garantida por cutículas espessas, revestimento ceroso e células epidérmicas com paredes lignificadas(Rizzini,1987), que são estruturas especializadas e relacionadas com os mecanismos de adaptação (Whistter, 1963; Mark, 1979; Martindale, 1979; Turbak, 1979; Scheinvar, 1985). A cutícula hidrofóbica, que se forma sobre a parede externa de células epidérmicas (e frequentemente sobre a parede interna), contém cutina, uma mistura de ácidos graxos que se polimeriza ao contato com oxigênio. A cutícula é geralmente lisa, mas em, alguns cactos, apresenta-se áspera e grossa (Salgado e Mauseth, 2002).

Na região semiárida do Nordeste brasileiro ocorrem diversas cactáceas de grande importância para fauna e flora regional. Estas espécies de cactos têm uma distribuição relativamente homogêna (Moraes et al., 2005). Entre estas espécies, destacam-se o mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.), o facheiro (*Pilosocereus pachycladus* Ritter), o xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl.) e o coroa-de-frade (*Melocactus bahiensis* Britton & Rose) (Cavalcanti e Resende, 2007). Em termos de importância, o terceiro centro de diversidade da família Cactaceae situa-se nas regiões Nordeste e Sudeste (excluindo o sul do Rio de Janeiro e o estado de São Paulo), uma região ampla, mas separada das outras áreas de diversidade da família devido a extensas áreas ecologicamente inadequadas para o estabelecimento da maioria dos membros das cactáceas, primariamente distribuídas em zonas áridas (Taylor e Zappi, 2004)

Os cactos têm sido explorados desde os tempos pré-colombianos. Muitos cactos têm frutos que são consumidos crus, cozidos ou fermentados em bebidas alcoólicas. Os caules de alguns cactos são cozidos como verdura, usados como uma fonte de água de emergência, ou como alimento para animais domésticos em forma de forragem. Caules lenhosos e secos de alguns grandes cactos colunares são recolhidos para material de construção ou lenha. Algumas espécies produzem substâncias de interesse farmacêutico ou industrial, enquanto outras são utilizadas para induzir alucinações visuais com propósitos religiosos ou de recreação. Os cactos são valorizados por suas diversas formas e lindas flores e são cultivados em todo o mundo como plantas ornamentais (Boyle e Anderson, 2002).

Diversos em forma e tamanho, os cactos têm sido também de grande importância para humanos que vivem em regiões áridas ou semiáridas do Hemisfério Ocidental. Alguns cactos, como o cacto São Pedro, *Echinopsis pachanoi,*

e o peyote, *Lophophora williamsii,* têm sido venerados por nativos americanos há milhares de anos (Anderson, 2001). Já os cladódios jovens e tenros, de espécies como *Opuntia ficus-indica, O. robusta,* ou *Nopalea* spp., são consumidos principalmente pelos mexicanos. Outro importante uso de caules de *Opuntia* é a produção de ácido carmínico, um corante natural desenvolvido pelo povo indígena pré-colonial do México. Esse corante é produzido por um inseto conhecido como cochonilha, um parasita que infesta várias espécies de cactos pertencentes a dois gêneros proximamente relacionados, o *Opuntia* e o *Nopalea* (Sáenz-Hernández et al., 2002).

As cactáceas também se destacam por sua importância cultural. O xiquexique, o mandacaru e a palmatória (respectivamente *P. gounellei*, *C. jamacaru* e *Tacinga palmadora*), frequentemente, aparecem nos cartazes de restaurantes e bares do Nordeste do Brasil, onde representam parte do folclore e inclusive do nome de diversas vilas e cidades (Silva et al., 2011c).

Sob o aspecto da conservação, recentemente, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, com base na Portaria MMA/ICMBio nº 316/2009, coordenou, em parceria com várias instituições, uma estratégia para a conservação das cactáceas: o Plano de Ação Nacional para Conservação de Cactáceas (PAN) Cactáceas. O Plano abrange os biomas Cerrado, Pampa, Pantanal, Caatinga, Mata Atlântica e Amazônia em 15 estados: Espírito Santo, São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, parte de Minas Gerais, Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí, parte de Rondônia e Amazonas. Contempla 28 táxons relacionados na lista oficial da flora ameaçada de extinção e outras com dados insuficientes. (Silva et al., 2011c). Os autores constataram que a diversidade de cactos nos estados situados ao norte do rio São Francisco (PI, CE e RN) é pouco conhecida. Nesses estados, prospecções e coletas adicionais previstas pelo PAN Cactáceas são de grande importância para melhor entendimento da ocorrência e distribuição das cactáceas – especialmente no que diz respeito a táxons ameaçados ou com status de conservação incerto.

Na Embrapa Agroindústria Tropical estabeleceu-se a conservação *in vitro* das seguintes espécies nativas: *Cereus jamacaru*, *Pilosocereus gounellei*, *Pilosocereus pachycladus*, *Harrisia adscendens*, *Tacinga* sp., Brasili*opuntia brasiliensis*, *Melocactus zehntneri* e *Pilosocereus chrysostele*. A instituição mantém a

coleção de germoplasma de cactáceas e a estratégia de conservação *in vitro* é complementar à conservação *in vivo* (Silva et al., 2011c).

2.2. Xiquexique

A espécie *P. gounellei* é endêmica do Nordeste do Brasil, ocorrendo desde o Maranhão até a Bahia, com ampla distribuição na Caatinga, sendo encontrada em solos areno-pedregosos e afloramentos rochosos (Rocha e Agra, 2002). É resistente a altas temperaturas e à baixa precipitação pluviométrica. Sua distribuição ocorre principalmente nas áreas mais secas da região semiárida nordestina (Silva et al., 2004).

O xiquexique também recebe o nome de alastrado, em determinadas localidades do semiárido nordestino (Andrade-Lima,1989), e de sodoro na Mesorregião Central Potiguar do Rio Grande do Norte (Silva et al., 2011). Ele é um cacto colunar de porte baixo, que rebrota bem próximo à base, de 0,5 a 1,0 m do solo.

A espécie caracteriza-se como arbusto de 0,8 m a 1,5 m de altura (Rocha e Agra (2002), podendo chegar a 3,75 m (Cavalcanti e Resende, 2007). Os cladódios são multiarticulados em ramificações candelabriformes, decumbentes (Figuras 1, 2 e 3). Os artículos são cilíndricos, angulosos, de 50 a 70 cm de comprimento, e com 9 a 11 costelas. Possui aréolas armadas, distanciadas entre si de 1 a 1,5 cm. Os espinhos são rígidos, aciculares, cinzentos ou esverdeados, em número e tamanho diferentes: 12 -15 radiais, com 1 a 3 cm de comprimento; 1-5 centrais e comprimento variando de 3 a 6 cm. Suas flores são noturnas, com antese às cinco horas da tarde, sendo visitadas por mariposas de fevereiro a setembro. As flores têm de 6 a 8 cm de comprimento e são isoladas, sésseis, inseridas nas áreolas, protegidas por tricomas sedosos, cinéreos. O perianto é infundibuliforme, alvoesverdeado e tubo com 3 cm – 6 cm de comprimento. Os filetes são curtos, inseridos no perianto e as anteras subglobosas. O pericarpelo possui de 0,6 a 1 cm comprimento e apresenta-se no formato ovóide (Figura 4). Os frutos são uma baga de 3 a 6 cm x 4 a 6 cm, suculenta, subglobosa, deiscente lateralmente e possui epicarpo glabro, purpúreo. A polpa funicular é mucilaginosa, purpúrea, sendo produzida de março a outubro. As sementes (Figura 5) possuem cerca de 2 mm de comprimento e apresentam-se obovóides a cordiformes, expostas no fruto maduro (Rocha e Agra, 2002).

Figura 1 - Plantas de xiquexique (*Pilosocereus gounellei*) em Teresina (PI). Foto: Gleice Orasmo.

Figura 2 – Plantas de xiquexique (*Pilosocereus gounellei*) na localidade Queimada Nova (BA). Foto: José Ribeiro Neto.

Figura 3 – Plantas de xiquexique (*Pilosocereus gounellei*) no município de Cruzeta (RN). Foto: José Geraldo Medeiros da Silva (EMPARN).

Figura 4 - Flor de xiquexique (*Pilosocereus gounellei*). Fonte: http://www.flickr.com/photos/ ncmandre/5707292538/in/photostream/. Foto: Andre Cagol.

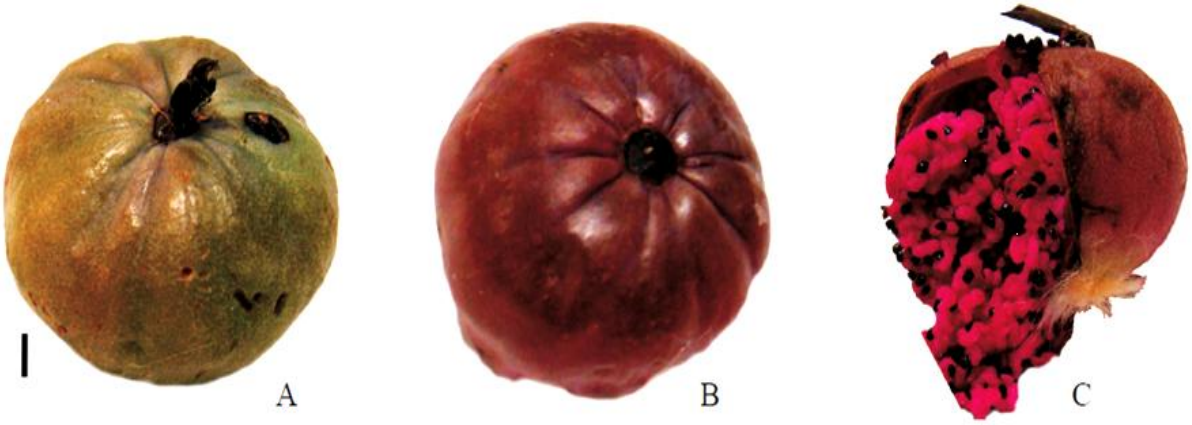


Figura 5 - Vista externa do fruto de *Pilosocereus gounellei* (xiquexique), imaturo (a); maduro (b), e aspecto interno (c), Barra = 10 mm. Fonte: Abud et al. (2012).

2.2.1. Xiquexique como valor forrageiro

Em épocas de seca, a falta de alimentos, associada à ausência de tradição na utilização de práticas de conservação de forragem, torna os produtores rurais extremamente dependentes do mercado de rações concentradas. Contudo, a utilização das cactáceas nativas, como o xiquexique e o mandacaru, associadas aos fenos de espécies forrageiras orindas da Caatinga como parte da dieta animal, pode representar opções de estratégias alimentares para reduzir os custos de produção em períodos de seca prolongadas. Portanto, pela importância que tais cactáceas possuem, é necessário que haja um manejo conservacionista e sustentável dessas espécies, bem como a implantação de áreas cultivadas (Silva et al., 2011a).

Em relação ao xiquexique, Silva et al.,(2004) afirmaram que a colheita das plantas é feita manualmente pela retirada das brotações laterais, utilizando-se o facão e gancho próprio, tendo-se o cuidado de preservar o caule principal. Posteriormente, o material colhido é transportado (Figura 6a) até o local de fornecimento aos animais, onde serão queimados os espinhos por intermédio do lança-chamas a gás butano (Figura 6b). Esse processo poderá ocorrer de forma inversa, ou seja, a queima dos espinhos após a colheita e depois o transporte. Transcorridas 12 horas da queima dos espinhos, tritura-se o material colhido em máquina forrageira e fornecem-se aos animais. Em função da suculência do material, é recomendável associá-lo a outros alimentos ricos em fibra e proteína, como silagem e concentrados (Silva et al., 2004).

Figura 6 - Preparo do xiquexique para fornecimento aos animais (a), transporte do material colhido; (b) queima dos espinhos por intermédio do lança-chamas a gás butano (Silva et al., 2004).

Outro modo de preparo do xiquexique foi mencionado no estudo realizado por Lucena et al.(2012), nas comunidades rurais de Besouro e Barroquinha, no município de Lagoa (Paraíba), no qual observou-se que a planta inteira é queimada e usada para alimentar animais, ou seu fruto é consumido em fresco pelos pássaros.

Sobre a utilização do xiquexique por vacas leiteiras, foi realizada uma pesquisa por Silva et al. (2005), na qual o desempenho de vacas da raça Pardo-suíça em lactação e a digestibilidade aparente de dietas contendo níveis de 0%; 12,5%; 25%; 37,5% e 50% de xiquexique (*Pilosocereus gounellei (*A. Weber ex K. Schum.) Bly. ex Rowl.), em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), foi avaliado utilizando-se cinco vacas com peso vivo (PV) médio de 520 kg e produção média diária de 15 kg de leite. Os valores de consumo de matéria seca (kg/vaca/dia), consumo de NDT (kg/dia), produção de leite (kg/dia) e teor de gordura do leite (%) encontram-se na Quadro 1. Não houve efeito da inclusão de xiquexique na dieta sobre a produção (média de 14,80 kg/dia), a composição química do leite e eficiência alimentar (kg de leite produzido/kg de MS consumida (Silva et al., 2005).

Em ovinos, Silva et al. (2010b) objetivaram avaliar os efeitos da utilização das cactáceas nativas mandacaru e xiquexique associadas aos fenos de sabiá (*Mimosa caesalpiniifolia* Benth.) e flor de seda (*Calotropis procera* (Ait.) R.Br.) sobre o consumo de nutrientes, ganho de peso e conversão alimentar de ovinos em confinamento. Vinte ovinos machos da raça Morada Nova, com média de peso inicial de 15,40 ± 2,66 kg, foram castrados e distribuídos em blocos casualizados, com

quatro tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos experimentais froam estabelecidos com base na matéria seca a 30% de cactácea + 30% de feno + 40% de concentrado, sendo: T1- xiquexique + feno de sabiá; T2- xiquexique + feno de flor de seda; T3- mandacaru + feno de sabiá e T4- mandacaru + feno de flor de seda. O concentrado a cada tratamento foi representado por 100% de vagens de algarobeira (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). O consumo de matéria seca e consumo de NDT não diferiram (P> 0,05) entre as dietas experimentais. Apesar do consumo de MS não ter diferido entre os tratamentos, a dieta com xiquexique e feno de sabiá promoveu menor consumo de água, pelo maior conteúdo de água contida no xiquexique, enquanto a dieta com mandacaru e feno de flor de seda promoveu maior consumo, devido ao menor conteúdo de água contida no mandacaru. O consumo de NDT não apresentou diferença (P>0,05) entre as dietas experimentais, refletindo o mesmo comportamento verificado para ingestão de MS. O ganho de peso dos animais em g/dia também não diferiu (P>0,05) e a conversão alimentar (CA) apresentou diferença (P<0,05) entre as dietas experimentais, sendo a CA mais eficiente para a dieta com xiquexique e feno de flor de seda, com 6,01 (Quadro 1).

Em cabras da raça Saanen, foi avaliada por Silva et al. (2011a) a utilização de mandacaru e xiquexique associados aos fenos de flor de seda e sabiá sobre o consumo de nutrientes, produção e características químicas do leite. Oito cabras primíparas, com média de peso inicial de 43,40 kg, foram distribuídas em dois quadrados latinos (4x4), cujos tratamentos experimentais corresponderam com base na matéria seca a 30% de cactácea + 30% de feno + 40% de concentrado, sendo: xiquexique + feno de flor de seda; xiquexique + feno de sabiá; mandacaru + feno de flor de seda e mandacaru + feno de sabiá. O concentrado foi constituído de 57,5% de algaroba, 37,5% de farelo de soja e 5% de mistura mineral. Houve diferença (P<0,05) em CMS e CNDT (Quadro 1). Ambos os consumos foram maiores nas dietas que tinham em suas associações o feno de sabiá. Não houve diferença na produção de leite e na composição química do leite (Quadro 1).

Foi avaliado o efeito da utilização do xiquexique sobre o ganho de peso de 12 caprinos, no período de agosto a novembro de 2005. Os animais consumiram uma média de 351,13 kg de fitomassa de xiquexique no período. O consumo diário de xiquexique foi de 6,63 kg/dia. Os animais do tratamento 1, que receberam suplementação de xiquexique diariamente após o período de pastoreio na Caatinga, apresentaram ganho de peso com média de 4,93 kg no período. Os animais do

tratamento 2, que receberam apenas oferta de xiquexique, tiveram perda de peso, em média, de -3,72 kg, confirmando que este suplemento não atende a todas as necessidades energéticas e protéicas dos animais. Os animais do tratamento 3, que não receberam nenhuma suplementação e permaneceram em pastoreio na Caatinga, apresentaram um porcentual maior de perda de peso em relação aos animais dos demais tratamentos, com uma média de -6,23% em relação ao peso vivo inicial (Cavalcanti e Resende, 2007).

Quadro 1 - Desempenho de bovinos, ovinos e caprinos arraçoados com diferentes associações de xiquexique e silagem de sorgo e fenos

	Nível de xiquexique (%)				
	Vacas leiteiras				
Item	0	12,5	25	37,5	50
Consumo de MS (kg/vaca/dia)	15,20	15,14	15,67	14,89	15,18
Consumo de NDT (kg/dia)	10,49	9,80	9,51	8,81	9,40
PL (kg/dia)	14,34	14,80	15,26	14,89	14,72
G%	3,59	3,63	3,09	3,13	3,18
Item	Ovinos				
	Feno de sabiá		Feno de flor de seda		
CMS (g/kg0.75)	66,44		63,42		
CNDT(g/kg0.75)	44,12		43,29		
GP (g/dia)	84,52		95,71		
CA (g MS/g GP)	7,25ab		6,01b		
Item	Cabras				
	Feno de sabiá		Feno de flor de seda		
CMS (g/kg0.75)	110,44a		69,75b		
CNDT(g/kg0.75)	70,05a		46,33b		
PL (g/dia)	1385,25		1268,92		
G%	2,93		2,78		

[a,b] Médias seguidas de letras distintas na linha diferem (P□0,05) entre si pelo teste Tukey. MS - matéria seca; NDT - nutrientes digestíveis totais; PL- produção de leite; G% - teor de gordura do leite; CMS - consumo de matéria seca em gramas por unidade de tamanho metabólico; CNDT - Consumo de nutrientes digestíveis totais em gramas por unidade de tamanho metabólico; GP - ganho de peso; CA -conversão alimentar.
Dados adaptados de Silva et al. (2005), Silva et al. (2010b) e Silva et al. (2011a)

Os experimentos relacionados à utilização do xiquexique na alimentação de novilhas foram desenvolvidos por Silva et al. (2004) e Silva et al. (2010a). Na EMPARN, no Seridó, foi avaliado o potencial forrageiro de misturas de cardeiro e xiquexique com silagem de sorgo forrageiro (50% / 50% e até 75% de participação dos cactos). Os melhores desempenhos (0,716 e 0,695 kg/ dia) foram observados para as misturas cardeiro/silagem, seguidas do xiquexique/silagem (0,514 e 0,505 kg/dia) e da silagem exclusiva (0,391 kg/dia). Todos os animais receberam uma

suplementação concentrada diária de 1,6 kg (Silva et al., 2004). A pesquisa conduzida na Estação Experimental de Cruzeta-RN, pertencente à EMPARN, teve como objetivo verificar os efeitos das cactáceas nativas mandacaru e xiquexique associadas à silagem de sorgo e 1,7 kg/dia de concentrado sobre o ganho de peso de novilhas das raças Pardo-suíça, Guzerá e Gir, com peso médio inicial de 222,00 ± 43,08 kg, sob confinamento, durante 83 dias. Os tratamentos foram testados em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com duas repetições e tiveram a seguinte composição: T1= silagem de sorgo (SS) (100%); T2= silagem de sorgo (50%) + xiquexique (XX) (50%); T3= silagem de sorgo (50%) + mandacaru (MA) (50%); T4= silagem de sorgo (25%) + xiquexique (75%) e T5= silagem de sorgo (25%) + mandacaru (75%). Foram observadas diferenças significativas ($P<0,05$) entre raças e tratamentos para alguns dos parâmetros estudados. O consumo médio da matéria seca (CMS) situou-se entre 4,21 e 5,54 kg/cab/dia para os tratamentos T1= (SS/100%) e T4= (SS/25% + XX/75%) respectivamente. O ganho de peso médio diário oscilou entre 283,0 g/cabeça para a raça Gir, no tratamento T1, e 813,5 g/cabeça para a raça Pardo-suíça, no tratamento T5= (SS/25% + MA/75%) (Silva et al., 2010b).

2.2.2. Xiquexique como reserva ecológica

O xiquexique desenvolve-se muito bem nas áreas mais secas da região semiárida; cresce em solos rasos, em cima de rochas e se multiplica regularmente, cobrindo extensas áreas (Gomes, 1977). Esta planta tem apresentado um bom desevolvimento em áreas de solos degradados e de irregularidades na distribuição das chuvas. Assim, pode-se considerar que o xiquexique, como outras cactáceas do semiárido é uma opção para o repovoamento de áreas onde não mais é possível o cultivo de lavouras tradicionais, como o milho, o feijão etc. (Cavalcante, 2007).

Resultados de pesquisas realizadas pela EMPARN no Campo Experimental e de Produção de Cruzeta/RN, com plantio do xiquexique por estaquia com idade de 6,5 anos, apresentaram, no espaçamento 1,5 x 1,0 m, uma produtividade média de 5.250 kg de forragem verde e 1.008 kg de matéria seca e, no espaçamento 1,0 x 1,0m, a produtividade foi de 5.900 kg de forragem verde e 1.120 kg de matéria seca por hectare (Silva et al., 2004). Outra pesquisa foi conduzida por Silva et al. (2011), na Estação Experimental de Cruzeta, teve como objetivo avaliar a produção de

matéria seca e características morfológicas do xiquexique em condições cultivadas com cinco densidades populacionais: 2.000, 4.000, 6.667, 8.333 e 10.000 plantas/ha. O plantio foi por estaquia no sentido vertical. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com cinco densidades populacionais e quatro repetições. O índice de sobrevivência (SOB) diminuiu linearmente (P<0,01) com as maiores densidades de plantas, atingindo 95,85% para a menor e 80,00% para a maior. O número de brotos basais e axilares aumentou linearmente (P<0,01) com as maiores densidades de plantas, variando de 1.416 para 8.083 brotos basais e 4.250 para 14.500 brotos axilares. O comprimento do caule principal (CCP) diminuiu linearmente (P<0,05), com as maiores densidades de plantas sendo de 51,20cm para 40,55cm (CCP). A produção de matéria seca (PMS) aumentou linearmente (P<0,01) nas maiores densidades populacionais, produzindo 424,48kg/MS/ha para a menor densidade e 1.120,57kg/MS/ha para a maior densidade, durante 6,5 anos. O aumento de plantas de xiquexique por unidade de área influenciou positivamente nas brotações e na produção de matéria seca por hectare, indicando a possibilidade do cultivo por estaquia como bancos de reservas ecológicas e forrageiras.

No que se refere à conservação da espécie *P. gounellei*, a categoria da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) na qual ela está inserida, de acordo com Hunt et al., (2006), é “fora de perigo” de extinção. No entanto, há uma preocupação em relação ao manejo sustentável dessa espécie, pois, segundo Lucena et al. (2012), para forrageio, a planta inteira é queimada e usada para alimentar animais no período de seca. Cavalcanti e Resende (2007) relataram que há uma grande dificuldade de utilização do xiquexique em função da presença de inúmeros espinhos. Nos últimos anos, os pecuaristas vêm adotando um novo sistema de queima dos espinhos das cactáceas nativas, o lança-chamas a gás butano (Silva et al., 2005). Diante de tal situação, fica claro que o grande desafio da pecuária no semiárido é utilizar os recursos da Caatinga preservando sua sustentabilidade (Andrade et al., 2010).

O cultivo de lavouras xerófilas, segundo Andrade et al. (2010), pode garantir um aumento da disponibilidade de forragem nas épocas secas do ano, principalmente na forma de forragem conservada como feno e silagem. Sobre o processo de fenação, ele tem permitido o melhor aproveitamento de espécies forrageiras com técnicas e manejos sustentáveis. Entre as espécies arbustivas da

Caatinga utilizadas para produção de feno, a flor de seda e o sabiá proporcionam fenos de bom valor nutritivo, além de serem espécies tolerantes à seca (Silva et al., 2010a).

2.2.3. Xiquexique para outras finalidades

As polpas de xiquexique têm natureza ligeiramente ácida e apresentam diferenças de composição consideráveis conforme sejam provenientes do talo central ou do cilindro vascular. As polpas provenientes do talo central são mais adequadas para a produção de farinhas e as polpas de origem vascular são mais apropriadas para a elaboração de produtos com alto teor de água (Almeida et al., 2007).

Diversos usos do xiquexique foram observados por Lucena et al. (2012) nas comunidades rurais de Besouro e Barroquinha, no município de Lagoa (Paraíba). A planta tem o miolo (medula) cozido ou o fruto consumido em fresco, na alimentação humana. Para uso medicinal, o miolo é colocado de molho na água para tratar enfermidades, como a gastrite. Na categoria tecnologia, o espinho é usado como agulha na confecção de renda de almofada. Outra utilidade dos frutos do xiquexique é o elevado consumo por animais silvestres, principalmente os pássaros (Cavalcante, 2007).

2.3. Marcadores moleculares em plantas

O conceito de marcadores genéticos não é novo. Gregor Mendel usou marcadores genéticos baseados em fenótipo em experimento no século XIX. Mais tarde, os marcadores genéticos baseados em fenótipo para *Drosophila* levaram ao estabelecimento da teoria de ligação gênica. Devido às limitações de fenótipo oriundas dos marcadores genéticos, foram desenvolvidos marcadores mais gerais e úteis, baseados diretamente no DNA, que se tornaram conhecidos como marcadores moleculares (Agarwal et al., 2008). Dessa forma, de acordo com Semagn et al. (2006), os marcadores genéticos ficam divididos em três classes amplas: marcadores morfológicos e agronômicos (baseados em características visualmente avaliáveis), marcadores bioquímicos (baseadas no produto do gene), e marcadores moleculares (dependentes de um ensaio de DNA).

Em relação aos marcadores moleculares, estes são definidos por Agarwal et al. (2008) como sendo segmentos particulares de DNA, representativos das diferenças de genoma. Os autores mencionaram que marcadores moleculares podem ou não se correlacionar com a expressão fenotípica da característica e oferecem numerosas vantagens sobre alternativas convencionais baseadas em fenótipo. Como eles são estáveis e detectáveis em todos os tecidos, independentemente de crescimento, diferenciação, desenvolvimento ou estado de defesa da célula, não são influenciados pelo ambiente, efeitos pleiotrópicos e epistáticos (Semagn et al., 2006).

A análise genética de populações de plantas e de animais para estudos taxonômicos, evolutivos e ecológicos é bastante beneficiada pelo desenvolvimento de várias técnicas de marcadores moleculares (Agarwal et al., 2008; Castillo et al., 2008). Algumas Técnicas, como *DNA barcoding*, RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), SSR (*simple sequence repeats*) e SNP (single nucleotide polymorphisms), têm sido usadas recentemente para estudo de diversidade em plantas. Cada técnica apresenta vantagens e limitações, difere em relação ao poder de resolução, aos tipos de dados que geram e aplicabilidade em níveis taxonômicos particulares (Arif et al., 2010). O desenvolvimento e uso de marcadores moleculares para a detecção e exploração de polimorfismo de DNA é um dos mais significantes desenvolvimentos no campo de genética molecular (Semagn et al., 2006).

Os marcadores RAPD, AFLP e ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) são fáceis de serem desenvolvidos em grandes quantidades, sem a difícil etapa de construir uma biblioteca genômica, e geralmente produzem polimorfismo para diferenciar indivíduos dentro de populações. Esses marcadores são dominantes, ou seja, não diferenciam heterozigotos em espécies diplóides. Como não há regra aparente, uma boa estratégia para decidir pela construção ou não de uma biblioteca de microssatélite pode, portanto, ser a avaliação do polimorfismo das espécies usando os marcadores anteriormente mencionados. Tais métodos não requerem o investimento que os microssatélites exigem para o desenvolvimento e podem servir como um teste preliminar para o nível de polimorfismo nas espécies-alvo (Dutech et al., 2007).

Diante da existência de várias técnicas moleculares e das diferenças em seus princípios e metodologias, é necessário ter cuidadosa consideração em

escolher um ou mais tipos de marcadores (Semagn et al., 2006). Um problema que geralmente surge é como escolher o marcador de DNA mais apropriado em meio à grande quantidade de tecnologias de diferentes marcadores. Em geral, a escolha de uma técnica de marcador molecular deve ser um compromisso entre confiança e facilidade de análise, poder estatístico e certeza de revelar polimorfismos (Agarwal et al., 2008). As propriedades desejáveis de marcadores moleculares são: alto polimorfismo, herança codominante, frequente ocorrência e uma distribuição uniforme por todo o genoma, comportamento seletivamente neutro, acesso fácil, ensaio rápido e fácil, baixo custo e alto rendimento, alta reprodutibilidade, e transferibilidade entre laboratórios, populações e/ou espécies (Semagn et al., 2006).

2.3.1. Microssatélites em plantas

Em 1989, Litt e Luty publicaram o artigo no qual os microssatélites foram apresentados como uma nova categoria de marcadores moleculares que se tornaria importante em muitas áreas de estudo. Sabendo que regiões com elementos repetidos maiores frequentemente mostravam extenso polimorfismo de comprimento, como os números variáveis de repetições em tandem (VNTR), bem como o fato de que repetições (TG)n estavam sendo frequentemente sequenciadas em humanos, esses pesquisadores presumiram que as repetições (TG)n ("microssatélites") poderiam também ser polimórficas. Tais polimorfismos, se existiam, provavelmente compreenderiam alelos que se diferenciariam em comprimento por somente alguns pares de base e, portanto, não seriam detectáveis pela técnica de Southern blotting convencional. Foi utilizada, então, a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar um microssatélite (TG)n no gene da actina cardíaca humana. Como resultado, foram detectados 12 fragmentos alélicos diferentes em 37 indivíduos não relacionados, sendo que 2 deles foram identificados como heterozigotos. Enquanto o referido artigo estava sendo revisado, os autores tomaram conhecimento de um relato preliminar, descrevendo estudos similares por Weber e May (1988), nos quais foram caracterizados 12 microssatélites (TGY)n e todos foram polimórficos.

Os microssatélites são arranjos em tandem de repetições curtas de DNA que variam de 1 pb a 6 pb de comprimento (Gong et al., 2008; Parida et al., 2006; Zhang et al., 2005). Os alelos diferem porque mostram números distintos de repetições em

tandem, gerando o chamado polimorfismo. Essas diferenças no número de repetições de DNA em um dado *locus* são oriundas de *crossing over* desigual durante a meiose ou de deslize da DNA polimerase (*strand - slippage*) durante a duplicação da molécula (Pinto el al., 2001). O polimorfismo pode ser facilmente detectado por PCR (Parida et al., 2006; Zhang et al., 2005). A PCR utiliza *primers* que hibridizam as regiões flanqueadoras conservadas (Gutierrez et al., 2005). Cada segmento ou seqüência de DNA, produto da amplificação, é separado por eletroforese em gel de poliacrilamida (Kun-Sheng e Tanksley, 1993), ou em gel de agarose ultra-pura (Becker e Heun, 1995), ou por seqüenciador automático, representando um alelo do *locus* (Gupta et al*.,* 2001). Há duas classes de marcadores SSR baseadas na origem: SSR genômicos, os quais são desenvolvidos de bibliotecas de DNA genômico enriquecidas; e sequências expressas marcadas (EST)-SSRs, as quais são derivadas de sequências EST originárias de regiões expressas do genoma (Zhang et al., 2005; Parida et al., 2006).

Os SSRs podem ser classificados em três categorias: puros, compostos e interrompidos. Os SSRs puros consistem de repetições initerruptas de uma sequencia única, por exemplo, (AT)*n*; SSRs compostos consistem de dois ou mais tipos de repetição, por exemplo, (GT)*n*(AT)*m*; e SSRs interrompidos contêm uma interrupção na repetição, por exemplo, (GT)*n*GG(GT)*m* (Peakall et al.*,*1998). Foi relatado que marcadores baseados em repetições imperfeitas foram menos conservados do que aqueles que possuem repetições perfeitas e, dessa forma, o acúmulo de interrupções e/ou grandes deleções, favorece a descaracterização de tais marcadores e, portanto, os SSRs compostos poderiam representar um último estágio na evolução dos microssatélites (Ekué et al., 2009). Existe uma boa relação linear entre o número de alelos detectado em um *locus* e o comprimento do microssatélite. Quanto maior o número de repetições em um microssatélite, maior é o número de alelos detectados (Gupta et al*.,* 2001). Sabe-se que, em um organismo diplóide mostrando segregação dissômica Mendeliana em um dado *locus*, uma ou duas bandas por indivíduo são esperadas. No entanto, alguns pares de *primers* microssatélite polimórficos formam complexos perfis multibandeados e não facilmente interpretáveis em termos de *loci* e alelos. Este problema parece ser mais acentuado em táxons com genomas que contêm grande quantidade de DNA repetitivo, tais como coníferas. É provável também ser o caso de poliplóides de origem recente (Squirrell et al., 2003).

Em relação à área de genética vegetal e melhoramento, os microssatélites têm ganhado considerável importância, devido à hipervariabilidade, ampla distribuição genômica, herança co-dominante, reprodutibilidade, natureza multialélica, e localização específica no cromossomo. Esses marcadores são passíveis de genotipagem com alto rendimento e são assim adequados para determinação de paternidade, construção de mapas genômicos de alta densidade, mapeamento de genes úteis, seleção assistida por marcador e para estabelecimento de relações genéticas e evolutivas (Parida et al., 2006; Parida et al., 2009; Singh et al., 2011).

Sob o aspecto evolutivo, os microssatélites são importantes, pois representam regiões instáveis do genoma, que estão sob alterações mutacionais a taxas muito maiores que as observadas nas sequências de cópia única (Pinto et al., 2001). As taxas de mutações em microssatélites variam de 10^{-6} a 10^{-2} por geração e, portanto, são significantemente maiores que as taxas de substituição de bases. Essa alta taxa de mutação é baseada em experimentos *in vitro*, pois ela difere muito em relação à taxa de mutação *in vivo*, uma vez que esta última é resultante da taxa de deslizamento primário (*slippage*) e da eficiência do sistema de reparo de danos (Schlötterer, 2000). Contudo, é 10.000 vezes mais provável um microssatélite ganhar ou perder uma repetição de uma geração para outra, que um gene, como o responsável pela anemia falciforme, por exemplo, sofrer uma mutação em única base, promovendo essa doença. Os microssatélites podem facilmente retornar aos seus comprimentos anteriores dentro de poucas gerações (Moxon e Wills, 1999).

Em se tratando da utilização de microssatélites em plantas, um estudo inicial foi realizado por Condit e Hubbell (1991), como parte da pesquisa sobre ecologia de plantas de florestas tropicais. Foram analisadas regiões com repetições de dinucleotídeos em vários gêneros de árvores tropicais, concluindo-se que essas repetições são abundantes em genomas de plantas e poderiam fornecer um grande número de marcadores polimórficos para estudos de genética de população de plantas. Posteriormente, houve um crescente uso dos marcadores microssatélites para a determinação da pureza genética em programas de melhoramento e de produção de sementes, visando a garantir a qualidade genética das sementes (Rabel et al., 2010). Para o gênero *Cucurbita,* foram desenvolvidos 500 marcadores microssatélites de bibliotecas genômicas enriquecidas de SSR (Gong et al., 2008). Em *Panax ginseng*, comumente conhecido como ginseng coreano, foram

desenvolvidos e caracterizados 35 marcadores microssatélites de BACs e sequências disponíveis (Van Dan et al., 2010). Devido ao fato de os marcadores microssatélites serem tão comumente usados por geneticistas humanos, as tecnologias para seu uso são facilmente disponíveis (Cregan et al., 1999). Segundo Salles et al. (2003), o Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, utilizando bibliotecas enriquecidas, tem desenvolvido marcadores SSR para as seguintes espécies: eucalipto (Brondani et al., 1998), pequi (Collevatti et al., 1999), pimenta e pimentão (Buso et al., 2000), feijão (Buso et al., 2006), copaíba (Ciampi et al., 2000), palmito (Gaiotto et al., 2001), mogno (Lemes et al., 2002), arroz (Brondani et al., 2001) e coco (Moretzsohn et al., 2001).

2.3.1.1. Microssatélites em cactáceas

Estudos com marcadores microssatélites em cactáceas são recentes e escassos, concentrando-se em alguns gêneros. Baseando-se em pesquisas sobre diversidade genética em menos de 15 táxons, os cactos podem ser descritos como tendo altos níveis de diversidade genética e relativamente baixa diferenciação da população. Essas conclusões, no entanto, são direcionadas para cactos colunares com sistemas de fecundação cruzada, predominantemente, e com dispersão de semente e polinização por morcegos e pássaros (Nassar et al., 2001).

Os primeiros marcadores microssatélites na família Cactaceae foram desenvolvidos por Otero-Arnaiz e colaboradores em 2004, para estudo da genética de população na tribo de cactos Pachycereeae. Esses marcadores foram desenvolvidos para o cacto colunar *Polaskia chichipe* do México central. Após um procedimento de enriquecimento e três etapas de *screening*, 87% das colônias continham microssatélites. Foram desenvolvidos pares de *primers* para 10 *loci*, testados e usados para estimar a variação em amostras de 18 a 45 indivíduos do Vale de Tehuacan, no México. O número de alelo por *locus* variaram de dois a oito. A variação nos valores de heterozigosidade esperada foi de 0,188 a 0,797. Esses *loci* são particularmente úteis para estudos evolutivos mais precisos, tais como fluxo gênico e sistemas de reprodução para esta espécie de cacto.

Outra espécie que teve os primeiros microssatélites registrados foi *Astrophytum asterias*, um cacto da América do Norte em risco de extinção, pertencente à tribo Cacteae. Seis *loci*, com uma média de 8,5 alelos por *locus*, foram

detectados para amplificar consistentemente DNA genômico em 94 indivíduos de quatro regiões geograficamente definidas no Sul do Texas. Esses marcadores permitiram a geração de dados apropriados para estimar os parâmetros de genética de população, estrutura de população e o grau de endogamia que atualmente existe nas populações pequenas e fragmentadas de *A. asterias* (Terry et al., 2006).

Os microssatélites para o gênero *Opuntia* foram publicados por Helsen et al. (2007). O gênero *Opuntia* contém cerca de 200 espécies, sendo que seis delas são endêmicas do arquipélago de Galápagos. Embora esses cactos sejam elementos essenciais do ecossistema semiárido de Galápagos, elas nunca foram estudadas detalhadamente. Por causa da atual condição de ameaças e sua importante função no ecossistema, foram desenvolvidos 16 marcadores microssatélites para estudar a estrutura genética de algumas dessas espécies. Os microssatélites exibiram um alto nível de polimorfismo, com o número de alelos por *locus* variando de seis a 53. Os resultados também revelaram possível poliploidia nesses cactos.

Prosseguindo com o isolamento de microssatélites em espécies em risco de extinção em seus hábitats, foram contempladas as espécies *Echinocactus grusonii* (Hardesty et al., 2008) e *Ariocarpus bravoanus* (Hughes et al., 2008). O objetivo principal foi desenvolver um programa de certificação para ajudar na conservação destas espécies. Em *E. grusonii*, cinquenta e cinco sequências continham um arranjo microssatélite, das quais 12 foram polimórficas entre 30 indivíduos de uma única população silvestre. Em *A. bravoanus*, cinquenta e quatro sequências continham um arranjo microssatélite e, destas, oito foram polimórficas entre 23 indivíduos, dos quais 20 eram provenientes de população naturais e três provenientes do comércio. Esses marcadores foram úteis para descrever a estrutura genética de populações de *E. grusonii* e *A. bravoanus*, como também para desenvolver um programa de certificação para ajudar na conservação de genótipos silvestres (Hardesty et al., 2008; Hughes et al., 2008).

Como meio de avaliar o *status* genético de populações da espécie *Mammillaria crucigera*, Solórzano et al. (2009) desenvolveram oito marcadores microssatélites. Estes *primers* foram testados em 40 indivíduos de duas populações silvestres. Os resultados mostraram que estes *primers* serão úteis para descrever a estrutura da população e ajudar na conservação das espécies. As siglas FAM e NED (Quadro 2) representam os Fluorocromos adicionados aos *primers*.

Quadro 2 - Relação dos 111 *loci* microssatélites identicados em 11 espécies de cactáceas com as respectivas seqüências e autores

Espécie	*Locus*	Seqüência do *primer* (5′−3′)	Autores
Polaskia chichipe	*Pchi5 AY147840*	F: CAAGAAAAAGGAAGCCCACA R: GGTGCCATATCCCCTGTGTA	Otero-Arnaiz et. al., 2004
Polaskia chichipe	*Pchi9 AY147838*	F: GTGGCCGAGAAAGAAGTTTG R: AAAGGCCCAAATCATAAGCA	Otero-Arnaiz et. al., 2004
Polaskia chichipe	*Pchi21 AY147837*	F: CGTTTAGCCCCTCTTTCTCC R: GTTCCCAACTGACCGACAAC	Otero-Arnaiz et. al., 2004
Polaskia chichipe	*Pchi25 AY147836*	F: GCCCTTCTAAGGCCATTTCT R: ATTCCGTGTCAAGATTGTGC	Otero-Arnaiz et. al., 2004
Polaskia chichipe	*Pchi44 AY147834*	F: ATTCAAACAGGCCCACACAG R:GGGTGTTAGAAGGAATAATAGCTTG	Otero-Arnaiz et. al., 2004
Polaskia chichipe	*Pchi47 AY147832*	F: GTCCTTGTGGCTAGCCCTTT R: CCATTTCTCTCGCCATCTG	Otero-Arnaiz et. al., 2004
Polaskia chichipe	*Pchi54 AY147831*	F: CCTTGAGCTTTGACATTGAGA R: GGAAGGTTTTCATTGGATGAG	Otero-Arnaiz et. al., 2004
Polaskia chichipe	*Pchi20*	F:GTGGCCGAGAAAGAAGTTTG R:AAAGGCCCAAATCATAAGCA	Otero-Arnaiz et al., 2005
Polaskia chichipe	*Pchi50*	F: CCTGGGCAAACCTCTGTTTA R:GTTCCCAACTGACCGACAAC	Otero-Arnaiz et al., 2005
Astrophytum asterias	*AaB6*	F:ATGCGAACAGATTGAAAAGAGGG R: CTCAGGAAAGACTTACACCATGG	Terry et al., 2006
Astrophytum asterias	*AaH11*	F:GAAGAAACACTTCTGCAAGTAGATG R: GATTTCCATCACCATCTTGTCAGC	Terry et al., 2006
Astrophytum asterias	*AaA3*	F:GCAAGCAAGAGTATGGTGAATTGG R:AGTTATTTTCACGGTAACACACATGG	Terry et al., 2006
Astrophytum asterias	*AaC3*	F: ACTAATATCATGCTGCGTCGTTAG R: ACGGTCCAGTCACATAACATTCC	Terry et al., 2006
Astrophytum asterias	*AaD9*	F: CTGTTTAGTTCTCTCGTCTTCACC R: CTCCGCTTTTACTGCTAGCACC	Terry et al., 2006
Astrophytum asterias	*AaG3*	F: TAACAGAGAATCCAAGGCTTTTCC R: AATCGCCAGCCGAGGGAGAC	Terry et al., 2006
Opuntia Echios	*Opuntia1*	F: Cy5-CCATCTACTTCCCACTTTGC R: GTTT-CTCCTGTGTTTCTCTGTGCTC	Helsen et al., 2007
Opuntia Echios	*Opuntia2*	F:Cy5-CACATACGCAAATACATGG R:GTTT-GCTTCATTTTCCAGGTTACT	Helsen et al.,2007
Opuntia echios	*Opuntia3*	F:Cy5-GTGAGTGCCCAGATGAAACT R:GTTT-TCCTCAACTTTATTGTAGCAAGAG	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia4*	F: Cy5-GATGATTCCGCCATTCACC R: GTTT-CGTCGATCTGACTCACACC	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia5*	F: Cy5-TATGCACAAAGCACCATGC R:GTTT-CAACCATACCAACTGTACTGAC	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia6*	F:Cy5-ATCTCATTGTATCATCTATTTCCTG R:GTTT-AGCACAAAGACACTTCATCG	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia8*	F: Cy5-ACCGCCATCACCAGCTATC R: GTTT-CTCACCCACAATTCCAAACC	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia9*	F:Cy5-CTAGGCTTCATCCCACATTAGG R: GTTT-TCCAAATTCACCTCCTCTGC	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia10*	F:Cy5-ACCAACATCAAACCTTCAATACC R:GTTT-CATGCTTCATCTTGTTCATTGG	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia11*	F: Cy5-CCTACACCTGCTGCCAATC R:GTTT-CGAGACAAACATCAGAGGAG	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia12*	F:Cy5-TAATCTTATTCTCAGGTCAGTTAC R: GTTT-GGTATCTTGTTATTCGTTCG	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia13*	F: Cy5-CCAAATACCCAGCCCATAC R: GTTT-GAGAACCTAACTTCCGATG	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia14*	F: Cy5-TCAGGATTCAAGAAGATTTGC R: GTTT-GATTCAATTGATGATGGGC	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia15*	F: Cy5-GCGGTGGAAGCAGTTAGG R: GTTT-CAGTCGATCATACCCAAGG	Helsen et al., 2007
Opuntia echios	*Opuntia16*	F: Cy5-GTCAATCCCGAGCAATTTAGG R: GTTT-TCATTAGTGAGGCCCAACG	Helsen et al., 2007

Quadro 2, cont.

Ariocarpus bravoanus	*mAbR05*	F: AATAGGGACAGTGAGGGATT R: TCTTCTCATGAGCCTTGTCG	Hughes et al., 2008
Ariocarpus bravoanus	*mAbR28*	F: CCATAAGCTGTGGTGGGTCT R: ATTTTAAAGCTCCCCCTCCA	Hughes et al., 2008
Ariocarpus bravoanus	*mAbR40*	F: TTTAATGCGGAGGAAGTTGG R: GCTCAAAGTCTCTCCGTTAATGA	Hughes et al., 2008
Ariocarpus bravoanus	*mAbR42*	F: GGGCAATTCACTATGCACAA R: TTGTCCCACCTTCCCTATTG	Hughes et al., 2008
Ariocarpus bravoanus	*mAbR77*	F: CGGGGAAGGAATAATCCAAG R: ATGTGCCGTTTGCAATCTTT	Hughes et al., 2008
Ariocarpus bravoanus	*mAbR82*	F: TTCCATCCTGGAGTTTAGGG R: GAAAACATTTCAAGTGCAACACA	Hughes et al., 2008
Ariocarpus bravoanus	*mAbR86*	F: TTGCAACTTGGGCATCAGTA R: GGCAGCTCAACTCCAGAGAC	Hughes et al., 2008
Ariocarpus bravoanus	*mAbR91*	F: CGACATCAAGTTGCACCATC R: TCAGGAGTTGCTTGATGGAA	Hughes et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR02*	F: TGGGTTGGAGAAGTGGAAG R: CGGTGTGAGGCTTCATTTG	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR17*	F: ATCGTTGAAAGAGGCGAAA R: TCCCTCTTCTTCGTCAGAGC	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR39*	F: GAGCGCAGAATTGAGGTG R: GATGTGGCATTTTCAGAC	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR51*	F: TGGCATAGAGGTGGTGACTG R: GCCAAATAAAATTTGAGCCATT	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR63*	F: TTGAATTGGGTGCTTCACTG R: CCCTAAATATGCTGCCGATG	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR68*	F: GGTAGCCATTCGTCATCAGC R: GTCCCGGTACTCGCTTCTCT	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR70*	F: ATGTTGCCAGAAACACTTCG R: GCAAATTAAAGGGTTCTCTTGG	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR73*	F: AAGGAAGAGGAGGAGGCAACC R:TTCTAATAAACACTTAAACCCTAACC	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR76*	F: TCACAATTTGGAAGGAAGCA R: GTGAGCAAAGGGCTGATTTC	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR78*	F: AGCCCAAAGCCCAACTTATT R: TGCATGCAATCATAAGGTTTTC	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR98*	F: ACCCTAGTGGGGTCGAGAAT R: GTCGCCCAGAACCCTAGTCT	Hardesty et al., 2008
Echinocactus grusonii	*mEgR99*	F: GCTACTCGTGGTTGTGGTGA R: CTGCCGTTCTCTCTCTGCTC	Hardesty et al., 2008
Mammillaria crucigera	MamVTC1	F-NED CGATCATTAACCATTACCGTCA R: CCGACTGCACAATTTTATGA	Solórzano et al., 2009
Mammillaria crucigera	MamVTC2	F-FAM TCTCACTGCCCGTTTTCTCT R: ACGGTGATGGTGGGTGTTAT	Solórzano et al., 2009
Mammillaria crucigera	MamVTC5	F-NED TACAGACGCCATAGGCAAAG R: GGTGGAGATGAGGGACTGAA	Solórzano et al., 2009
Mammillaria crucigera	MamVTC8	F-FAM TCGATTATCTGCTGCTTCCA R: CCGAGAAAGCCCTAAAACCT	Solórzano et al., 2009
Mammillaria crucigera	MamVTC9	F-FAM TGGATACGTGGCTCTTCGAT R: CCAAATGCCAATCCTCCTAA	Solórzano et al., 2009
Mammillaria crucigera	MamVTC10	F-NED CATTCTAGACATCATATCGCTCT R: TGAGACTCCACTCTATTTCCTCT	Solórzano et al., 2009
Mammillaria crucigera	MamVTC11	F-NED CAGGGGTAAGGGAGACAACA R: CTTCAGTGCCCCCTTTGAAT	Solórzano et al., 2009
Mammillaria crucigera	MamVTC12	F-NED TGGGGAATGGGCTATGATTA R: CGGCGTTTATTAGCCAATCT	Solórzano et al., 2009
Haageocereus tenuis	*Ht.Ia*	F: TTGAGGCCAATATGAGATTTGA R: TATGGCCCATTTGAAACCAT	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.Ib*	F: CCAAGAAGCCATCTGAGGAG R: CACCCCCTTCCTCTCTCTCT	Arakaki et al., 2010

Quadro 2, cont.

Haageocereus tenuis	*Ht.Ic*	F: ATCCCAATTTCTTGCCTCCT R: GCTCACGAATGGTCAGAAGA	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.Id*	F: CCAAGATTGGTCGTCGACAT R: CTTCGCCCCACCTTCTCTA	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.Ie*	F: TCACCTATTTGATCCCCTTCC R: CCTAAGTGCTTGAGCCAAAAA	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.If*	F: TCCACATGCTACGACCACTT R: AGGCCTCATCCTACCAGAGTC	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.IIa*	F: CATGAATTGAAAGCCACACG R: CCTTGCACTGCATAGTTGGA	Arakaki et al., 2010
Haageocereus pseudomelanostele	*Hp.IVa*	F: CGACAAACCTTGTCCTCTTG R: AGGTCCGACTGGTCCTAACC	Arakaki et al., 2010
Haageocereus pseudomelanostele	*Hp.IVc*	F: AACCCTTGCAATAAGCTCCA R: AATGGCAACGAAAGGAGAGA	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.Vb*	F: TCCAATGACATTTGCTATTCCA R: CCCCATCTTCCCTACAGTCA	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.ms4*	F: GCAAGAAAGGGAAGAGAAATC R: TCAATGTCGTTCCTAAACATGAA	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.ms7*	F: TTCCCATGACTGCCCTTAG R: CTGTCCATTTAGCCCCAGAA	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.ms8*	F: ACCCTTGCTGTTTGTGTGG R: CCTCCTGCGAAGAAAGAGAA	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.ms9*	F: TACGGTTTGGGTTTTGGAC R: ACTGGGATCTCCCAACTGC	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.ms11*	F: GCCATTACCCCAACGTA R: CTCACCTCCTTCATCTCTTCAA	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.ms12*	F: GGTTATGACCATGGAATGC R: ACTTGCAACCGTGTGTGTGT	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.ms13*	F: TCAAGACATGGCAGCTCAA R: GGCATGGTGCTGATTAGGAT	Arakaki et al., 2010
Haageocereus tenuis	*Ht.ms16*	F: CTGGCCAAACCCTATCTACT R: GGGTACACCGATCAGATAAAGG	Arakaki et al., 2010
Coryphantha robustispina	2G	F: TCGCACAAATCAGAAAGTCC3 R: TTGGTGAGACATTGAATTTAGCTC2	Butterworth, 2011
Coryphantha robustispina	3B	F: CTTGCCTTGAAGGTTGCCTA3 R: GAATTCAAGCTCCCATCGAA2	Butterworth, 2011
Coryphantha robustispina	3C	F: GAGCAACTGGTGGCTAGAGG2 R: CCTTCCCTCTTTCCACTAAACC3	Butterworth, 2011
Coryphantha robustispina	3F	F: CGATTGGTTTTGCAAGGATT3 R: CGTCCCACTTGAGATGTTCA2	Butterworth, 2011
Coryphantha robustispina	4C	F: CTTTTACCCCTGGCTCTCTT1 R: TTTATTGCAGACTTGAAATTTGTG3	Butterworth, 2011
Coryphantha robustispina	5E	F: GGCAATTCTCAACAACAATCG2 R: ATTCCCTTCCTTGAGCCAAC3	Butterworth, 2011
Coryphantha robustispina	7B	F: AGCACAGACAGCACGCTCTA3 R: TCATTTGCCTGCACAAACAT1	Butterworth, 2011
Coryphantha robustispina	7D	F: TGGGCTCCTTTGCTGTTATT3 R: AATGTGCGGGCATGTAATTT2	Butterworth, 2011
Coryphantha robustispina	7G	F: CACCAGGGACCTACATGACC3 R: ATGCTCCAGTGTGCAGATCA1	Butterworth, 2011
Coryphantha robustispina	10E	F: GAGACTGGTGTGGGTGTCCT2 R: CTTATGGCAATTCCCGTTGT3	Butterworth, 2011
Pilosocereus machrisii	*Pmac082*	F: GTAAAAGAGGAGGATGGAGAGG R: CTTCTTCTTGCTAGGTTTCTCG	Perez et al., 2011
Pilosocereus machrisii	*Pmac084*	F: CATAAATTGCAGAAATGAGGAC R: AGGTAAACCGCTAACTCGATG	Perez et al., 2011
Pilosocereus machrisii	*Pmac085*	F: CCCCTCACTTCTCCAATCTC R: TCCCTCCTTCTTTTGTGTTC	Perez et al., 2011
Pilosocereus machrisii	*Pmac101*	F: TGATAGCTGCAACGATGTC R: CATTTGTTTTGTTGTTTGCTTCAC	Perez et al., 2011
Pilosocereus machrisii	*Pmac102*	F: TCTATAAGTGCCGATGGATGC R: CACACCTCACTCCCAACCTC	Perez et al., 2011
Pilosocereus machrisii	*Pmac108*	F: TGAATGTCTGCCATTAGAAAGC R: TAATCGCCCCAAAGAAGAAC	Perez et al., 2011

Quadro 2, cont.

Pilosocereus machrisii	*Pmac128*	F: GTGTTGATTGTACTCTTCAG R: CTAACCCTTTGTATACATGC	Perez et al., 2011
Pilosocereus machrisii	*Pmac130*	F: GAGGTGCCAATAAATCG R: TGTCACGCAATCTTGAACC	Perez et al., 2011
Pilosocereus machrisii	*Pmac135*	F: ACCAGAATGAGCTCAGCTGTAG R:CCTAGCTAGCAGAATCAGAGTGAAGAC	Perez et al., 2011
Pilosocereus machrisii	*Pmac146*	F: ACCCGACATCCCACTTGTAG R: TAGTCTGAAACGGAGCAAGG	Perez et al., 2011
Pilosocereus machrisii	*Pmac149*	F: TTCATCCTGCTTTTGAAGTTTG R: TGATGGATTAGGATTGACCTG	Perez et al., 2011
Sclerocactus glaucus	SCGL_71	F-TCATCTGGTCCAATCAGCAA R-TCAGCGAACAAGAATCATGC	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus glaucus	SCGL_337	F-TGAACTTGCTTAGATTTCCCTTA R-CGCTAACCCAACACTTTGCT	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus glaucus	SCGL_346	F-ACTGTGTGGTCGATGAGGAG R-AGAAGTGTTGAAGGAGGCAAA	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus glaucus	SCGL_401	F-CACAACTTTGCTTCCTGGTTT R-CATTTGCATCATATCCACCTAATAAATAAG	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus glaucus	SCGL_416	F-CGAACCATCCCCAAAAGTTA R-GACCCTCTCACCCACAAT	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus glaucus	SCGL_446	F-ACTCAAGGTCCATCAAAACA R-ACTGCCCAATATCGTCTAAA	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus glaucus	SCGL_448	F-GGGTTTCAAGTTCCCCCTTA R-AGTGCCAAGCGAGTTTCATT	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus glaucus	SCGL_450	F-TTTTCATGCCCTATGACTATACAA R-GGTTCCACCACCAATTATCC	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus glaucus	SCGL_461	F-GGCACTCTATCTCTCTCCCT R-AGGGTTTCATCCACACAAC	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus glaucus	SCGL_704	F-GCAAACCATTCAAAGCAGTG R-CTTGCTGGCTGTTGAACTA	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus parviflorus	SCPA_125	F-GGTTCAGCTTGAATAGGTTAATTTC R-GGTTGAAACTAGGGGTCAG	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus parviflorus	SCPA_268	F-GGAGTTCATCAGTAGCCTCT R-GGTTGAAACTAGGGGTCAG	Schwabe et al., 2013
Sclerocactus parviflorus	SCPA_623	F-CTGTAAGCAGCCGTCGTTG R-TCTCTCCCCACGCTCTCTTA	Schwabe et al., 2013

Em relação ao gênero *Haageocereus*, foram isolados microssatélites de duas espécies (*H. tenuis* e *H. pseudomelanostele*) para serem aplicados em estudos de diversidade genética e estrutura genética de populações. Dos 19 *loci* microssatélites registrados, cinco foram caracterizados em quatro espécies de *Haageocereus* e aplicados para o estudo de diversidade genética e diferenciação de população. Esses marcadores estarão disponíveis para estudos de diversidade genética, diferenciação de população e para análise de parentesco em outras espécies de *Haageocereus* (e parentes próximos tais como *Espostoa*), fornecendo informação essencial para planos futuros de conservação (Arakaki et al., 2010).

No ano de 2011, foram publicados os microssatélites identificados para mais duas espécies de cactáceas: *Coryphantha robustispina* subsp. *robustispina* e *Pilosocereus machrisii* (Perez et al., 2011). Para o gênero *Coryphantha* são reconhecidas duas espécies, havendo controvérsias sobre o reconhecimento

taxonômico de três possíveis subespécies. Dessa forma, foram isolados e caracterizados 10 *loci* microssatélites polimórficos de *C. robustispina* subsp. *robustispina*, os quais podem ser valiosos no entendimento de restrições taxonômicas de membros da seção Robustispina (Butterworth, 2011). Para o cacto colunar *P. machrisii*, foram caracterizados 11 *loci* em 51 indivíduos de duas populações naturais, sendo que um deles, *Pmac82* (Quadro 1*),* foi monomórfico em ambas as populações analisadas. O número de alelos por *locus* polimórfico variou de dois a oito e o número total de alelos foi 57. Esses marcadores serão também usados para entender padrões de fluxo gênico e para fornecer informação sobre mudanças na distribuição histórica e sobre conectividade entre populações (Perez et al., 2011).

O registro mais recente de *primers* microssatélites desenvolvidos para cactáceas foi feito por Schwabe et al. (2013) para o gênero *Sclerocactus*. Este gênero consiste em 15 espécies, que possuem uma história taxonômica confusa devido a semelhanças morfológicas e sobreposição de distribuição. Treze *loci* microssatélites foram identificados, utilizando *S. glaucus* e *S. parviflorus* e foram testados nas espécies *S. wetlandicus, S. brevispinus* e *S. cloverii*.

2.3.1.2. Transferibilidade de sequências de *primers* microssatélites

Devido à sua natureza codominante e geralmente de *locus* único, os *loci* SSR podem ser identificados e seus alelos reconhecidos em diferentes genótipos da mesma espécie e frequentemente naqueles de outros parentes próximos. Isso significa que um conjunto específico de SSRs pode ser usado em diferentes genótipos, por meio da transferibilidade, tornando-o particularmente útil para análise de diversidade genética (Peakall et al*.,* 1998; Castillo et al., 2008; Datta et al., 2010).

A identificação e a aplicação de SSRs em plantas têm se restringido a poucas culturas agriculturalmente mais importantes. Muitos dos SSRs iniciais registrados para essas plantas foram obtidos da base de dados do GenBank, mas este método é somente útil quando os dados estão disponíveis para espécies de interesse (Peakall et al*.,* 1998). Considerando que a identificação de marcadores microssatélites é extremamente caro e consome tempo e trabalho porque requer prévio conhecimento da sequência para desenhar os *primers* específicos para o *locus* (Gutierrez et al., 2005; Yildirim et al., 2009), um uso mais amplo de SSRs em

plantas seria facilitatado se tais *loci* fossem transferíveis entre espécies (Gutierrez et al., 2005). Os marcadores SSR transferíveis são especialmente importantes quando há escassez de marcadores polimórficos em regiões específicas do genoma. Certamente, este método seria muito mais fácil e barato do que o desenvolvimento de novos *primers* SSR (Yildirim et al., 2009).

A transferibilidade de *primers,* de acordo com os registros encontrados na literatura, é também conhecida como amplificação heteróloga ou transposição de marcadores. A denominação “amplificação heteróloga” é mais frequente em pesquisas envolvendo espécies animais, tais como o rato e o camudongo (Lima-Rosa et al., 2000), a serpente (Hille et al., 2002), o macaco (Lau et al., 2004) e o peixe (Olivatti et al., 2011). Também foi utilizado esse termo no estudo realizado por Gutierrez et al. (2005) com a espécie vegetal *Medicago truncatula*. O termo “transposição de marcadores” foi encontrado no trabalho realizado por Mistura et al. (2006), avaliando em arroz, os microsatélites derivados de milho. Em sentido restrito, a transferibilidade significa que o SSR deve ser capaz de amplificar um único *locus* ou alguns *loci* em outra espécie e ser polimórfico naquela espécie. Portanto, sendo possível utilizar um SSR identificado para uma determinada espécie em outra espécie, a transferibilidade é então uma característica desejada (Peakall et al*.,* 1998).

A amplificação cruzada entre espécies e a utilidade de marcadores moleculares depende da conservação de sítios de iniciação dentro de sequências flanqueadoras e da manutenção de arranjos longos o suficiente para promover polimorfismo (Ekué et al., 2009). No entanto, Mnejja et al. (2010) salientaram que enquanto sequências de espécies modelo podem ser uma fonte de grande número de microssatélites em parentes menos estudados, uma desvantagem com o uso de SSRs de uma espécie para outra é que somente uma proporção dos SSRs será transferível. Outra limitação é a qualidade dos marcadores, uma vez que os SSRs obtidos em outra espécie podem ser menos variáveis e a presença de alelos nulos pode ser mais frequente que naqueles da mesma espécie. Além disso, García-Moreno et al. (2010) mencionaram que a diversidade alélica é mais pronunciada quando a transferência ocorre entre espécies filogeneticamente distantes.

O sucesso da transferência de marcadores microssatélites pode ser constatado em diversos trabalhos publicados nas duas últimas décadas e alguns destes serão relatados neste presente trabalho. Onze *loci* microssatélites foram

identificados por White e Powell (1997) na espécie *Swietenia humilis* Zucc. (Família Meliaceae), fonte de mogno de renome mundial. Sete desses *loci* produziram produtos de amplificação em pelo menos uma das onze espécies da família Meliaceae nas quais foram testados. A transferibilidade de 31 *loci* SSR de soja (*Glycine max*) para congêneres silvestres e outros gêneros de legumes foi investigada por Peakall et al. (1998). Até 65% dos pares de *primers* de soja amplificaram SSRs em *Glycine,* mas, frequentemente, os SSRs eram curtos e interrompidos, comparados com aqueles de soja. Entretanto, 85% dos *loci* foram polimórficos em *G. clandestina.* A amplificação cruzada de espécies fora do gênero foi muito menor (3%–13%), com polimorfismo restrito a um par de *primer* (AG81).

Cinquenta microssatélites foram testados por Shepherd et al. (2002) para amplificação de espécies cruzadas e polimorfismo de duas espécies de *Pinus* (*Pinus elliottii* var. elliottii e *P. caribaea* var. hondurensis). Vinte e nove (58%) dos marcadores amplificaram em ambas as espécies e, desse total, 23 marcadores foram polimórficos. Em Cagaita (*Eugenia dysenterica*) uma planta amplamente encontrada no Cerrado brasileiro, uma bateria de 346 pares de *primers* identificados para *Eucalyptus* spp. foi testada em cagaita. Somente 10 (2,81%) pares de *primers* foram transferíveis entre as duas espécies (Zucchi et al., 2002). Foi examinada a transferibilidade de marcadores SSR-EST de damasco e videira para outras espécies não relacionadas. No geral, os *primers* de uva amplificaram produtos na maioria dos acessos de *Vitaceae*, enquanto os *primers* de damasco amplificaram alelos polimórficos somente nas espécies de *Rosaceae* proximamente relacionadas (Decroocq et al., 2003).

Em *Hordeum chilense* foi testada a transferibilidade de 82 pares de *primer* de cevada (*Hordeum vulgare)*. Desses 82 EST-SSRs, 21 (26%) mostraram polimorfismo entre linhagens de *H. chilense*. Os marcadores polimórficos identificados foram usados para testar a transferibilidade e polimorfismo em outras espécies da família Poaceae com o objetivo de estabelecer as relações filogenéticas em *H. chilense* (Castillo et al., 2008). Outro estudo com cereais de estações frias foi conduzido por Yildirim et al. (2009) com o objetivo de examinar a transferibilidade de alguns marcadores SSR entre cerais de estação fria. A transferibilidade dos marcadores SSR de cevada para trigo foi de 69,6%, para aveia 43,5% e para o centeio de 52,2%. Dos 27 marcadores SSR de trigo, foram amplificados 20 (74%) em cevada, 74% em aveia e 19 (70,4%) em centeio.

Também foi estudada a transferibilidade de marcadores microssatélites para as espécies *Litchi chinensis* Sonn. e *Blighia sapida* K. Konig, Sapindaceae (Ekué et al., 2009), pimentas do gênero *Capsicum* (Ince et al., 2010), *Brassica carinata* A. Braun., *B. nigra* (L.) Koch e *B. napus* L. (Márquez-Lema et al., 2010), gênero *Prunus*, Família Rosaceae (Mnejja et al., 2010), *Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl. e *Pirus malus*, L. (He et al., 2011), *Jatropha curcas* L. e *Ricinus communis* L. (Yadav et al., 2011) e gênero *Ficus* (Heer et al., 2012).

2.3.1.3. Transferibilidade de *primers* microssatélites em cactáceas

Em cactáceas, a transferibilidade tem sido observada entre várias espécies. A partir de 10 *primers* microssatélites desenvolvidos e caracterizados em *Polaskia chichipe*, Otero-Arnaiz et al. (2004) testaram a amplificação de um produto homólogo em sete cactos colunares da tribo *Pachycereeae*, o DNA foi extraído de dois indivíduos por espécie e pelo menos dois pares de *primers* mostraram clara amplificação em seis das sete espécies testadas. Na espécie *Echinocactus grusonii*, foram caracterizados 12 *loci* de microssatélites polimórficos e estes foram utilizados em 27 outras espécies de cactos. Como resultado, todos os pares de *primers* aplificaram um ou mais produtos nas 27 espécies de cactos. O uso generalizado de espécies cruzáveis dentro da família Cactaceae indica que os microssatélites desenvolvidos para *E. grusonii* têm também potencial para estudos com outras espécies de cacto (Hardesty et al., 2008).

No estudo conduzido por Caruso et al. (2010) para espécies do gênero *Opuntia*, entre os 19 pares de *primer* SSR e EST-SSR testados em seis genótipos, 11 foram descartados porque não produziram produtos de amplificação na maioria dos genótipos analisados ou produziram perfis de picos difíceis de interpretar. Os outros oito *primers* (seis SSRs de *Opuntia echios* e dois EST-SSRs de *Opuntia streptacantha*) produziram perfis confiáveis e reprodutíveis, sendo então usados para o *fingerprint* de 62 genótipos de *Opuntia* previamente classificados como pertencentes a 16 supostas espécies, incluindo genótipos cultivados, híbridos artificiais e acessos silvestres. Dos oito pares de *primers* SSR, somente um, o OP3, falhou em amplificar um pequeno conjunto de sete genótipos. Os *primers* restantes amplificaram fragmentos em todos os genótipos com sucesso, revelando um alto grau de transferibilidade entre as espécies analisadas. Dessa forma, a análise de

oito *loci* SSR altamente polimórficos permitiu a investigação do nível de diversidade genética entre espécies de *Opuntia*, cultivares e acessos de diferentes regiões do mundo.

Dos 11 *loci* isolados por Perez et al. (2011) em *Pilosocereus machrisii*, nove foram amplificados com sucesso em outras quatro espécies de *Pilosocereus*, usando dois indivíduos de cada espécie. As espécies foram: *P*. *jauruensis* (Buining & Brederoo), *P. aurisetus* [(Werderm.) Byles & G. D. Rowley], *P*. *vilaboensis* (Diers & E. Esteves Pereira) e *P*. *aureispinus* [(Buining & Brederoo) F. Ritter]. Os *primers Pmac101* e *Pmac108*, não amplificaram em nenhuma das quatro espécies e *Pmac085* não amplificou em *P. aureispinus*.

Pesquisas envolvendo a transferibilidade de *primers* microssatélites de cactáceas para a espécie *Cereus peruvianus* foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese Vegetal da Universidade Estadual de Maringá. Foram testados por Tavares (2011) 33 *primers* microssatélites originados de quatro espécies de cactáceas e com eles foi caracterizada a diversidade genética de plântulas crescidas de sementes de 13 acessos de municípios dos estados do Paraná, São Paulo e Piauí. Desta avaliação, foram selecionados um total de cinco *loci* microssatélites (*mAbR42*, *mAbR77, mEgR76, Pchi21* e *Pchi47),* conferindo uma transferibilidade de 15,15% destes *primers* para *C. peruvianus.* Os 33 *primers* microssatélites foram também analisados por Martin (2011), que extraiu o DNA genômico de fragmentos de caule de somaclones R0 de *C. peruvianus*. Após os testes, nove pares de *primers* amplificaram regiões específicas mais nítidas e polimórficas. A transferibilidade de microssatélites desenvolvidos para diferentes gêneros de cactáceas para *C. peruvianus* foi de 27,27%.

2.4. Marcador AFLP (Polimorfismo do comprimento dos fragmentos amplificados)

Nas últimas décadas, sistemas de marcadores baseados em PCR foram desenvolvidos para análise de DNA, sendo o AFLP uma poderosa técnica entre eles. O marcador AFLP não necessita de clonagem e sequenciamento (Karimi et al.,2009) e fornece um grande número de fragmentos, os quais acentuam a capacidade de detectar polimorfismo (Garcia et al., 2004; Karimi et al., 2009), sendo sua principal vantagem quando comparado a outros marcadores (Arif et al, 2010). Essa técnica é adequada para novos táxons e para uso tanto em organismos

procarióticos como eucarióticos. Além disso, ela percorre todo o genoma, é relativamente econômica e gera muitos marcadores filogenéticos potenciais (Althoff et al., 2007).

Uma característica das marcas AFLP é sua dominância. Alelos de um mesmo *locus* são revelados pela presença ou ausência de uma banda, que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento de determinado tamanho no gel. Não sendo possível saber se o *locus* amplificado está em homozigose ou heterozigose, não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos, constituindo apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado são considerados homozigóticos para ausência da banda (Lopes et al., 2002).

O AFLP apresenta potencial para inúmeras aplicações, como: monitoramento de herança de caracteres em plantas e animais, diagnóstico de doenças geneticamente herdadas, análise de *pedigree*, identificação de clones e cultivares, mapeamentos de genes, incluindo QTLs (*quantitative trait loci*) e grupos de ligação, análise de biodiversidade e coleções de germoplasma (Blears et al., 1998; Kumar et al., 2009), estudos de diversidade genética (Sachidanandam et al., 2001; Lynch, 2002; Sabeti et al., 2002; Foulley et al., 2006; Dagher-kharrat et al., 2007; Gonçalves et al., 2007), estrutura populacional (Nybom, 2004; McMillan et al., 2006; Sontebo et al., 2007), identificação de híbridos (Haig et al., 2004) e em estudos filogenéticos de espécies estreitamente relacionadas (Ballard e Whitlock, 2004; Korpelainen, 2004).

A técnica AFLP está baseada na amplificação por PCR seletiva de fragmentos de restrição, obtidos da digestão do DNA genômico. Ela envolve três etapas: (i) restrição do DNA e ligação aos adaptadores oligonucleotídeos, (ii) amplificação seletiva de conjuntos de fragmentos de restrição, e (iii) análise de gel dos fragmentos amplificados (Vos et al, 1995) (Figura 7).

Para que haja êxito no ALP é fundamental que a digestão do DNA seja completa, pois a digestão parcial pode revelar falsos polimorfismos. Para a obtenção da digestão total, é necessário usar DNA de alta pureza. Portanto, é necessária prestimosa atenção no método de extração e quantifição usado. A técnica baseia-se na propriedade de certas enzimas de restrição em deixar, após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de seqüências conhecidas. Assim, é possível construir seqüências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos

fragmentos de restrição, denominadas de adaptadores. Uma vez que as seqüências dos adaptadores e as dos sítios de restrição são conhecidas, pode-se construir *primers* específicos para estas seqüências e realizar a pré-amplificação dos fragmentos de restrição. Os *primers* são constituídos por uma seqüência complementar ao adaptador, seguida de outra específica do sítio de restrição da enzima e de uma extensão de nucleotídeos seletivos no terminal 3' (Lopes et al., 2002).

A combinação das enzimas *Eco*RI/*Mse*I é comumente a mais usada para clivagem de DNA. No entanto, nem sempre esta combinação resulta nos melhores perfis eletroforéticos, bem como no maior número de *loci* polimórficos. De acordo com Janssen et al. (1996), a combinação *Eco*RI/*Mse*I é mais adequada para os genomas pobres em G+C, *Hind*III/*Mse*I para os genomas com conteúdo de G+C em torno de 40% a 50% e *Apa*I/*Taq*I para os genomas ricos em G+C.

Resultados experimentais demonstraram que, para a obtenção de bons padrões de separação dos fragmentos presentes em espécies com genoma complexo, pelo menos três nucleotídeos seletivos devem ser usados em ambos os *primers*, para *Eco*RI e para *Mse*I, e que a amplificação seletiva deve ser realizada em duas etapas. Na primeira etapa de amplificação, denominada pré-amplificação, um nucleotídeo seletivo é usado no terminal 3' dos *primers*. Na segunda fase, denominada amplificação seletiva, são usados três nucleotídeos seletivos nos terminais 3' dos *primers*. Dessa maneira, apenas os fragmentos que possuam nucleotídeos complementares aos nucleotídeos seletivos (utilizados nos terminais 3' dos *primers*) serão amplificados (Lopes et al., 2002). Para a separação dos produtos de amplificação por AFLP, o método mais adequado é a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (Vos et al., 1995).

Uma limitação do AFLP é o tempo requerido para a análise visual dos dados, quando não é feita de forma automatizada, mediante programas computacionais que realizam a avaliação de bandas sobre uma foto digitalizada do gel. Também é uma técnica trabalhosa, que necessita de DNA genômico de alta qualidade e de um maior número de reagentes, tornando-a também mais cara (Lanza, 2000; Henning, 2007). Entretanto, a quantidade de marcas que pode ser gerada é virtualmente ilimitada, uma vez que o número de bandas obtidas pode ser aumentado, variando-se as enzimas de restrição e a combinação dos *primers* de natureza diversa, com um número diferente de nucleotídeos seletivos. Essa

flexibilidade permite a manipulação direta na geração de fragmentos de AFLP (Borém e Caixeta, 2009; Kumar et al., 2009).

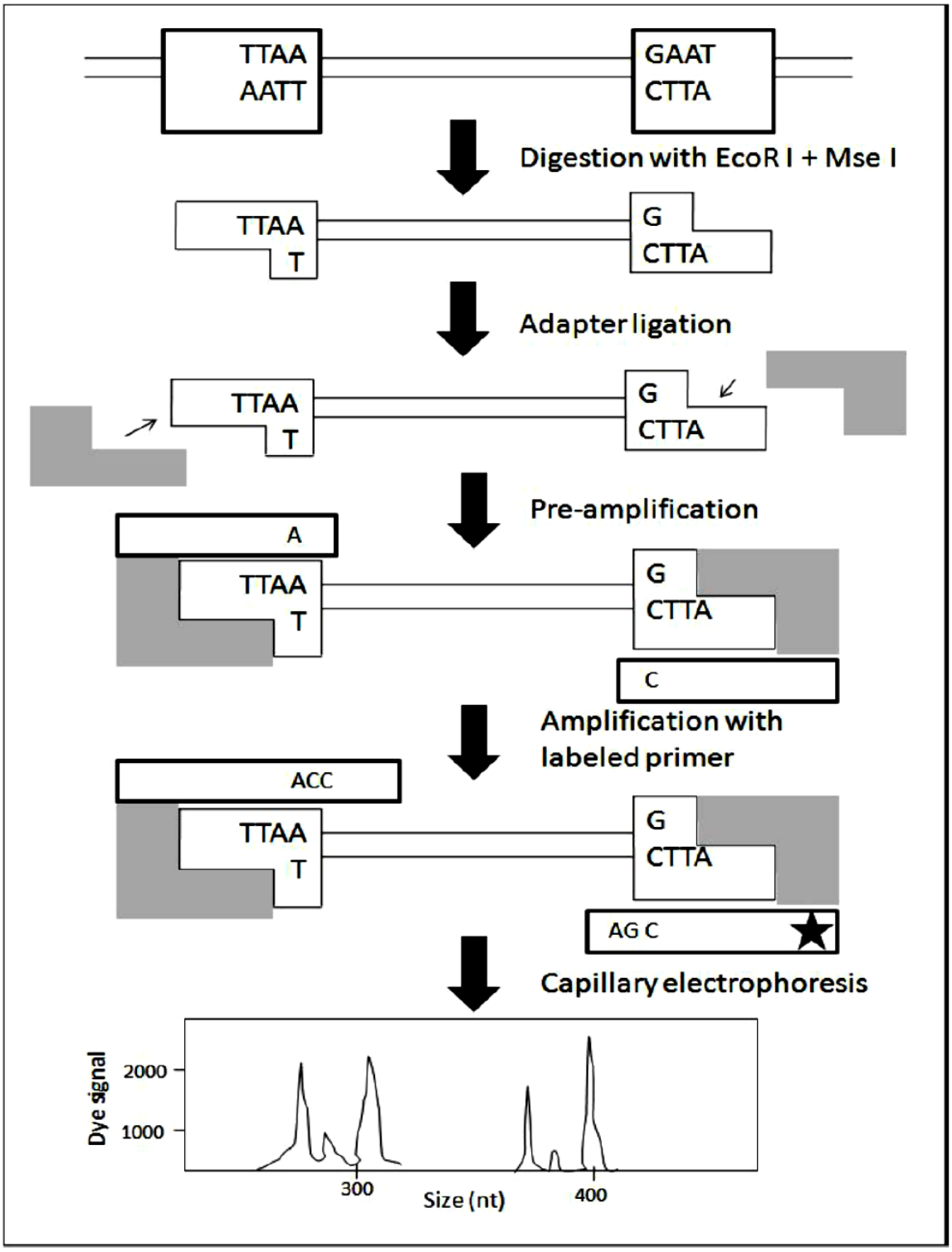


Figura 7 - Esquema das etapas do método AFLP obtido de Arif et al. (2010).

2.4.1. Uso do AFLP em cactáceas

Atualmente, ainda há poucos trabalhos pulicados sobre o uso do AFLP em cactáceas. No estudo conduzido por Labra et al. (2003), foram usados os marcadores AFLP e cpSSR (*Chloroplastic Simple Sequence Repeat*) para a caracterização de espécies de *Opuntia* e análise das relações entre as espécies diferentes. Os resultados mostraram que a combinação de marcadores cpSSR e AFLP forneceu uma estimativa quantitativa das relações genéticas entre várias espécies de *Opuntia*. Uma atenção especial foi dada à relação genética entre *Opuntia ficus-indica* e *Opuntia megacantha*: indivíduos de diferentes populações das duas espécies foram analisados com ambos os marcadores moleculares e foi detectada uma constituição genética comum de *O. ficus-indica* e *O. megacantha*. Com base em dados moleculares, características morfológicas e distribuição biogeográfica, os autores sugeriram que *O. ficus-indica* deveria ser considerada uma forma domesticada de *O. megacantha*.

Um outro estudo com o gênero *Opuntia* foi realizado por Nilsen et al. (2005). O trabalho focou seis formas tradicionalmente classificadas como *Opuntia pilífera,* usadas como alimento pelos indígenas Popoloca em San Juan Atzingo. O conhecimento tradicional de como distinguir essas formas é preservado na comunidade local, com base no sabor do fruto, na cor, no tamanho e no número de espinhos nos frutos e cladódios. O fingerprinting genético com 129 AFLPs não se correlacionou com a classificação morfológica tradicional de 67 cactos. Além disso, os AFLPs distinguiram facilmente os 67 cactos *O. pilifera* analisados do grupo composto por 17 cactos *O. Velutina* silvestres.

O AFLP foi utilizado por Faria-Tavares et al. 2013 para estimar a diversidade genética de mandacaru (gênero *Cereus*) e diferenciar 17 acessos cultivados em diferentes regiões do Brasil. Os seis pares de *primers* usados amplificaram 348 marcadores AFLP, dos quais 282 (81%) foram polimórficos. A porcentagem de fragmentos polimórficos variou de 62,5% para a combinação de *primer* E-AAC/M-CAG a 91,7% para o E-ACT/M-CAC. O maior número de marcadores informativos (67) foi detectado usando a combinação de *primer* E-ACA/ M-CAG, enquanto a combinação E-AGC/M-CTC revelou o menor número de fragmentos polimórficos (46) em plântulas de mandacaru. O valor da identidade de Nei entre os acessos de mandacaru foi de 0,6348 a 0,8343 para plantas das regiões sul e nordeste, 0,6348 a

0,6529 entre acessos das regiões sudoeste e nordeste e 0,6193 a 0,6944 entre acessos das regiões sul e sudoeste. A semelhança entre as regiões sul, nordeste e sudoeste indica que as plantas das três regiões podem ser espécies diferentes do gênero *Cereus*: *C. peruvianus* ou *C. repandus* (região sul), *C. jamacaru* (região nordeste) e *C*. *hildmaniannus* (região sudoeste). Alternativamente, os acessos podem pertencer a uma espécie em processo de especiação.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, H.F.; GONÇALVES, N.R.; PEREIRA, M.S.; PEREIRA, D.S.; REIS, R.G.E.; BEZERRA, A.M.E. Germination and morphological characterization of the fruits, seeds, and seedlings of *Pilosocereus gounellei*. **Brazilian Journal of Botany**, 35:11-16, 2012.

AGARWALL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, 27:617-631, 2008.

ALMEIDA, C.A.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M.; OLIVEIRA, F.M.N. Características físicas e químicas da polpa de xiquexique. **Revista Ciência Agronômica**, 38:440-443, 2007.

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

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

ANDRADE, A.P.; COSTA, R.G.; SANTOS, E.M.; SILVA, D.S. Produção animal no semiárido: o desafio de disponibilizar forragem, em quantidade e com qualidade, na estação seca. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, 4:01-14, 2010.

ANDRADE-LIMA, D. **Plantas das Caatingas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1989. 245p.

ARAKAKI, M.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; SPERANZA, P.R. Characterizarion of polymorphic microsatellite *loci: In Haageocereus* (Trichocereeae, Cactaceae). **American Journal of Botany**, 97:17-19, 2010.

ARIF, I.A.; BAKIR, M.A.; KHAN, H.A.; AL FARHAN, A.H.; AL HOMAIDAN, A.A.; BAHKALI, A.H.; AL SADOON, M.; SHOBRAK, M. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. **International Journal of Molecular Sciences**, 11:2079-2096, 2010.

BALLARD, J.W.; WHITLOCK, M.C. The incomplete history of mitochondria. **Molecular Ecolology**, 13:729-744, 2004.

BECKER, J.; HEUN, M. Barley microsatellites: allele variation and mapping. **Plant Molecular Biology**, 27:835-845, 1995.

BLEARS, M.J.; GRANDIS, S.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 21:99-114, 1998.

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

BOYLE, T.H.; ANDERSON, E.F. Biodiversity and conservation In: NOBEL, P.S. **Cacti:** biology and uses. Berkeley e Los Angeles: University of California Press. 2002. p. 125-141.

BRITO, A.S.; NOBRE, F.V.; FONSECA, J.R.R. **Bovinocultura leiteira:** informações técnicas e de gestão. Natal: SEBRAE/RN, 2009. 320p.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *O. sativa*. **Hereditas**, 134:59-71, 2001.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:816-827, 1998.

BUSO, G.S.C., AMARAL, Z.P.S., BRONDANI, R.P.V.; FERREIRA, M.E., Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology Notes**, 6:252–254, 2006.

BUSO, G.S.C.; BRONDANI, R.V.; AMARAL, Z.P.S.; REIS, A.M.M.; FERREIRA, M.E. Desenvolvimento de *primers* SSR para análise genética de pimentas e pimentões (C*apsicum* spp.) utilizando biblioteca genômica enriquecida. **Boletim Técnico da Embrapa/Epagri**, 15:01-27, 2000.

BUTTERWORTH, C.A. Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellite loci in *Coryphantha robustispina* ssp. *robustispina*. **Conservation Genetics Resources**, 3:247–249, 2011.

BYLES, R.S.; ROWLEY, G.D. Pilosocereus Byl. & Rowl. nom. gen. nov. *(Cactaceae)* (*Pilocereus* K. Schum, non Lem.). **The Cactus and Succulent Journal of Great Britain**. 19:66-67, 1957.

CARUSO, M.; CURRÒ, S.; LAS CASAS, G.; LA MALFA, S.; GENTILE, A. Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus-indica* cultivated genotypes and their relation with related species. **Plant Systematics and Evoution**, 290:85-97, 2010.

CASTILLO, A.; BUDAK, H.; VARSHNEY, R.K.; DORADO, G.; GRANER, A.; HERNANDEZ, P. Transferability and polymorphism of barley EST-SSR markers used for phylogenetic analysis in *Hordeum chilense.* **BMC Plant Biology**, 8:1-9, 2008.

CAVALCANTI, N.B. **O xiquexique na Caatinga**. Disponível em: http://fatosefotosda Caatinga.blogspot.com/2007/05/o-xiquexique-na-Caatinga.html. Acesso em: 20, abril, 2013.

CAVALCANTI, N.B.; RESENDE, G.M. Consumo de xiquexique [*Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Byl. ex Rowl.] por caprinos no semiárido da Bahia. **Revista Caatinga**, 1:22-27, 2007.

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. Webwr ex K. Schum.) Bly. ex Rowl.) e coroa-de-frade. **Caatinga**, 20:28-35, 2007a.

CHAPMAN, B.; JACOBO, C.M.; BUNCH, R.A.; PATERSON, A.H. Breeding and biotechnology. In: NOBEL, P.S. **Cacti: biology and uses**. Berkeley e Los Angeles: University of California Press. 2002. p. 255-271.

CHIDAMIAN, C. **The book of cacti and other succulents**. Porland, Oregon: Timber Press, 1984. 243p.

CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba) Leguminosae–Caesalpinoideae e otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multilocus. **Boletim de Pesquisa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 16:1-40, 2000.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense.* **Heredity**, 83:748–756, 1999.

CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base regions in tropical tree genomes. **Genome**, 34:66-71, 1991.

CREGAN, P.B.; JARKIK, T.; BUSH, A.L.; SHOEMAMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, 39:1464-1490, 1999.

DAGHER-KHARRAT, M.B.; MARIETTE, S.; LEFÈVRE, F.; FADY, B.; GRENIER-DE MARCH, G.; PLOMION, C.; SAVOURÉ, A. Geopraphical diversity and genetic relationship among Cedrus species estimated by AFLP. **Tree Genetics and Genomes**, 3:275-285, 2007.

DATTA, S.; KAASHYAP, M.; KUMAR, S. Amplification of chickpea-specific SSR *primers* in Cajanus species and their validity in diversity analysis. **Plant Breeding**, 129: 334-340, 2010.

DECROOCQ, V.; FAVE, M.G.; HAGEN, L.; BORDENAVE, L.; DECROOCQ, S. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite merkers across taxa. **Theoretical and Apllied Genetics**, 106:912-922, 2003.

DUTECH, C.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; DELMOTTE, F.; BARRE`S, B.; CARLIER, J.; THARREAU, D.; GIRAUD, T. Challenges of microsatellite isolation in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, 44: 933–949, 2007.

EKUÉ, M.R.M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. Transferability of simple sequence repeat (SSR) markers developed in *Litchi chinensis* to *Blighia sapida* (Sapindaceae). **Plant Molecular Biology Reports**, 27: 570-574, 2009.

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

FIGUEREDO, C.J.; NASSAR, J.M.; GARCÍA-RIVAS, A.E.; GONZÁLEZ-CARCACÍA, J.A. Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereeae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. **Journal of Arid Environments**, 74:1392- 1398, 2010.

FOULLEY, J.L.; VAN SCHRIEK, M.G.M.; ALDERSON, L.; AMIGUES, Y.; BAGGA, M.; BOSCHER, M.Y.; BRUGMANS, B.; CARDELLINO, R.; DAVOLI, R.; DELGADO, J.V.; FIMLAND, E.; GANDINI, G.C.; GLODEK, P.; GROENEN, M.A,M.; HAMMOND, K.; HARLIZIUS, B.; HEUVEN, H.; JOOSTEN, R.; MARTINEZ, A.M.; MATASSINO, D.; MEYER, J.N.; PELEMAN, J.; RAMOS, A.M.; RATTINK, A.P.; RUSSO, V.; SIGGENS, K.W.; VEGA-PLA, J.L.; OLLIVIER, L. Genetic diversity analysis using lowly polymorphic dominant markers: the example of AFLP in pigs. **Journal of Heredity**, 97:244-252, 2006.

FUGANTI, R.; BENEVENTI, M.A.; SILVA, J.F.V.; ARIAS, C.A.A.; MARIN, S.R.R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A.L. Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, 28: 125-130, 2004.

GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm – *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, 1: 86-88, 2001.

GARCIA, A.A.F.; BENCHIMOL, L.L.; BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O.; SOUZA JR., C.L.; SOUZA, A.P. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics and Molecular Biology**, 27:579-588, 2004.

GARCIA-MORENO, M.J.; VELASCO, L.; PE´REZ-VICH, B. Transferability of non-genic microsatellite and gene-based sunflower markers to safflower. **Euphytica**, 175:145–150, 2010.

GONÇALVES, S.C.; PORTUGAL, A.; GONÇALVES, M.T.; VIEIRA, R.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A.; FREITAS, H. Genentic diversity and differentiation *in vitro* responses to Ni in *Cenococcum geophilum* isolates from serpentine soils in Portugal. **Mycorrhiza**, 17:677-686, 2007.

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

GUPTA, P.K.; ROY, J.K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymosphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, 80:524-535, 2001.

GUTIERREZ, M.V.; PATTO, M.C.V.; HUGUET, T.; CUBERO, J.I.; MORENO, M.T.; TORRES, A.M. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. **Theoretical and Applied Genetics**, 110:1210–1217, 2005.

HAIG, S.M.; MULLINS, T.D.; FORSMAN, E.D.; TRAIL, P.W.; WENNERBERG, L. Genentic identification of spotted owls, barred owls, and their hybrids: legal implications of hybrid identity. **Conservation Biology**, 18:1347-1357, 2004.

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

HE, Q.; WEI LI, X.; LIANG, G.L.; JI, K.; GUO, Q.G.; YUAN, W.M.; ZHOU, G.Z.; CHEN, K.S.; VAN DE WEG, W.E.; GAO, Z.S. Genetic diversity and identity of chinese loquat cultivars/accessions (*Eriobotrya japonica*) using apple SSR markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, 29:197–208, 2011.

HEER, K.; MACHADO, C.A.; HIMLER, A.G.; HERRE, E.A.; KALKO, E.K.V.; DICK, C.W. Anonymous and EST-based microsatellite DNA markers that transfer broadly across the fig tree genus (*Ficus*, Moraceae). **American Journal of Botany**, 99:e330–e333, 2012.

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

HENNING, F.A. **Mapeamento de caracteres do tegumento da semente de soja e análise *in silico* dos marcadores microssatélites**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Semente).

HILLE, A.; JANSSEN, A.; MENKEN, S.B.; SCHLEGEL, M.; THORPE, R.S. Heterologous amplification of microsatellite markers from colubroid snakes in European natricines (serpentes: natricinae). **Journal of Heredity**, 93:63, 2002.

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

HUNT, D.; TAYLOR, N.P.; CHARLES, C. **The new cactus lexicon**, Inglaterra: dh publications, 2006. 900p.

INCE, A.G.; KARACA, M.; ONUS, A.N. Polymorphic microsatellite markers transferable across *Capsicum* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, 28:285–291, 2010.

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

KARIMI, H.R.; KAFKAS, S.; ZAMANI, Z.; EBADI, A.; MOGHADAM, M.R.F. Genetic relationships among Pistacia species using AFLP markers. **Plant Systematics and Evolution**, 279:21–28, 2009.

KORPELAINEN, H. The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. **Naturwissenschaften**, 91:505-518, 2004.

KUMAR, P.; GUPTA, V.K.; MISRA, A.K.; MODI, D.R.; PANDEY, B.K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics Journal**, 2:141-162, 2009.

KUN-SHENG, W.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular Genetics and Genomic**, 241:225-235, 1993.

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

LANZA, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, 204:97-103, 2000.

LAU, J.; FERNANDEZ-DUQUE, E.; EVANS, S; DIXSON, A.; RYDE, O.A. Heterologous amplification and diversity of microsatellite loci in three owl monkey species (*Aotus azarai*, *A. lemurinus*, *A. nancymaae*). **Conservation Genetics**, 5:727–731, 2004.

LEMES, M.R.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* king (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity**, 93:287-290, 2002.

LIMA-ROSA, C.A.V.; HUTZ, M.H.; OLIVEIRA, L.F.B.; ANDRADES-MIRANDA, J.; MATTEVI, M.S. Heterologous amplification of microsatellite loci from mouse and rat in Oryzomyine and Thomasomyine South American rodents. **Biochemical Genetics**, 38:3-4, 2000.

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**, 44:398-401, 1989.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; OLIVEIRA, A.V.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes (Rapd e Aflp). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 29:56-61, 2002.

LUCENA, C.M.; COSTA, G.M.; SOUSA, R.F.; CARVALHO, T.K.N.; MARREIROS, N.A.; ALVES, C.A.B.; PEREIRA, D.D.; LUCENA, R.F.P. Conhecimento local sobre

cactáceas em comunidades rurais na mesorregião do sertão da Paraíba (Nordeste, Brasil). **Biotemas**, 25:281-291, 2012.

LYNCH, M. Gene duplication and evolution. **Science**, 297:945-947, 2002.

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

MÁRQUEZ-LEMA, A.; VELASCO, L.; PÉREZ-VICH, B. Transferability, amplification quality, and genome specificity of microsatellites in *Brassica carinata* and related species. **Journal of Applied Genetics**, 51: 123–131, 2010.

MARTIN, P.G. **Transferabilidade de microssatélites de cactáceas para a análise de regenerantes clonais (Ro) de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2011. 72p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento

MARTINDALE, M. **The extra pharmacopeia pharmaceutical**. London: London Press, 1979. 321p.

McMILLAN, A.M.; BAGLEY, M.J.; JACKSON, S.A.; NACCI, D.E. Genentic diversity and structure of an estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) indigenous to sites associated with a highly contaminated urban harbor. **Ecotoxicology**, 15:539-548, 2006.

MISTURA, C.C.; BRANCO, J.S.C.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F. Transposição de marcadores microsatélites derivados de milho em arroz. In: XV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E VIII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, Pelotas, 2006. Resumos... Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2006, p. 33-34.

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

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

MORAES, E.M.; ABREU, A.G.; ANDRADE, S.C.S.; SENE, F.M.; SOLFERINI, V.N. Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil. **Genetica**, 125:311–323, 2005.

MORETZSOHN, M.C.; COELHO, P.J.A.; AMARAL, Z.P.S.; HERCOS, A.P.; TUPINAMBÁ, E.A. Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites na análise da variabilidade genética de ecótipos de coqueiro (*Cocos nucifera* L). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa**, 16:25-25, 2001.

MOXON, E.R.; WILLS, C. DNA Microsatellites: agents of evolution? **Science American**, 280:72-77, 1999.

MUELLER, U.R.; WOLFENBARGE, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, 14:389-394, 1999.

NASCIMENTO, V.T.; VASCONCELOS, M.A.S.; MACIEL, M.I.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Famine Foods of Brazil's Seasonal Dry Forests: Ethnobotanical and Nutritional Aspects. **Economic Botany**, 66:22-34, 2012.

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

NASSAR, J.M.; HAMRICK, J.L.; FLEMING, T.H. Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae]). **The American Genetic Association**, 93:193-200, 2002.

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

NOBEL, P.S.; BOBICH, E.G. Environmental biological. In: NOBEL, P.S. **Cacti: biology and uses**. Berkeley e Los Angeles: University of California Press. 2002. p. 57-74.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, 13:1143-1155, 2004.

OLIVATTI, A.M.; BONI, T.A.; SILVA-JÚNIOR, N.J.; RESENDE, L.V.; GOUVEIA, F.O.; TELLES, M.P.C. Heterologous amplification and characterization of microsatellite markers in the Neotropical fish *Leporinus friderici*. **Genetics and Molecular Research**, 10:1403-1408, 2011.

OTERO-ARNAIZ, A.; CASAS, A.; HAMRICK, J.L.; CRUSE-SANDERS, J. Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central Mexico. **Molecular Ecology**, 14:1603-1611, 2005.

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

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

PARIDA, S.K.; KUMAR, K.A.R.; SINGH, V.D.N.K.; MOHAPATRA, T. Unigene derived microsatellite markers for the cereal genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, 112:808–817, 2006.

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**, 15:1275–1287, 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**, 98:e204–e206, 2011.

PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. Isoenzimas e Microssatélites em plantas. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, 20:16-19, 2001.

PRADO, A.; HAWKINS, J.A.; YESSON, C.; BÁRCENAS, R.T. Multiple diversity measures to identify complementary conservation areas for the Baja California peninsular cacti. **Biological Conservation**, 143:1510–1520, 2010.

RABEL, M.; VIEIRA, E.S.N.; LANA, U.G.P.; PAIVA, E.; SEHNEM, M.A.S.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares microssatélites na avaliação de sementes de soja com variação na coloração do hilo. **Revista Brasileira de Sementes**, 32:19-25, 2010.

RIZZINI, C.T. Cactáceas**:** os segredos da sobrevivência. **Ciência Hoje**, 6:62-72, 1987.

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

SABETI, P.C.; REICH, D.E.; HIGGINS, J.M.; HANINAH, Z.P.L.; DANIEL, J. RICHTER, D.J.; STEPHEN, F.; SCHAFFNER, S.F.; GABRIEL, S.B.; PLATKO, J.V.; PATTERSON, N.J.; MCDONALD, N.J.; ACKERMAN, H.C.; CAMPBELL, S.J.; ALTSHULER, D.; COOPER, R.; KWIATKOWSKI, D.; WARD, R.; LANDER, E.S. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. **Nature**, 419:832-833, 2002.

SACHIDANANDAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S.C.; KAKOL, J.M.; STEIN, L.D., MARTH, G.; SHERRY, S.; MULLIKIN, J.C.; MORTIMORE, B.J.; WILLEY, D.L.; HUNT, S.E.; COLE, C.G.; COGGILL, P.C.; RICE, C.M.; NING, Z.; ROGERS, J.; BENTLEY, D.R.; KWOK, P.Y.; MARDIS, E.R.; YEH, R.T.; SCHULTZ, B.; COOK, L.; DAVENPORT, R.; DANTE, M.; FULTON, L.; HILLIER, L.; WATERSTON, R.H.; MCPHERSON, J.D.; GILMAN, B.; SCHAFFNER, S.; VAN ETTEN, W.J.; REICH, D.; HIGGINS, J.; DALY, M.J.; BLUMENSTIEL, B.; BALDWIN, J.; STANGE-THOMANN, N.; ZODY, M.C.; LINTON, L.; LANDER, E.S.; ALTSHULER, D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 millionsingle nucleotide polymorphism. **Nature**, 409:928-933, 2001.

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

SALA, J.; MANGOLIN, C.A.; FRANZONI, J.; MACHADO, M.F.P.S. Esterase polymorphism and the analysis of genetic diversity and structure in cactus populations descended from *Cereus peruvianus* plants regenerated in vitro. **Biochemical Genetics**, 49:270–282, 2011.

SALGADO, T.T.; MAUSETH, J.D. Shoot anatomy and morphology. In: NOBEL, P.S. **Cacti: biology and uses**. Berkeley e Los Angeles: University of California Press. 2002. p. 23-40.

SALLES, G.; BUSO, C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S. Protocolo para o desenvolvimento de marcadores microssatelites. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2003. 11p. (Comunicado Técnico).

SANTOS, G.M.M.; CRUZ, J.D.; BICHARA FILHO, C.C.; MARQUES, O.M.; AGUIAR, C.M.L. Utilização de frutos de cactos (Cactaceae) como recurso alimentar por vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) em uma área de Caatinga (Ipirá, Bahia, Brasil). **Revista Brasileira de Zoologia**, 24:1052–1056, 2007.

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

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

SCHWABE, A.L.; HUBBARD, A.R.; NEALE, J.R.; MCGLAUGHLIN, M.E. Microsatellite loci development for rare Colorado Sclerocactus (Cactaceae). **Conservation Genetics Resources**, 5:69–72, 2013.

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M.N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, 5:2540-2568, 2006.

SHEPHERD, M.; CROSS, M.; MAGUIRE, T.L.; DIETERS, M.J.; WILLIAMS, C.G.; HENRY, R.J. Transpecific microsatellites for hard pines. **Theoretical and Applied Genetics**, 104:819–827, 2002.

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

SILVA, J.G.M.; LIMA, G.F.C.; AGUIAR, E.M.; MELO, A.A.S.; RÊGO, M.M.T. Cactáceas nativas associadas a fenos de flor de seda e sabiá na alimentação de borregos. **Revista Caatinga**, 23:123-129, 2010.

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

SILVA, J.G.M.; LIMA, G.F.C.; SOUZA, N.A.; GARCIA, L.R.U.C.; MACIEL, F.C; GUEDES, F.X. Xiquexique: Alternativa alimentar para ruminantes em secas severas. In: LIMA, G.F.C.; MACIEL, F.C.; GUEDES, F.X.; TORRES, J.F.; SILVA, J.G.M; SOUZA, N.A.; AGUIAR, E.M.; LIMA, C.A.C.; PEREIRA, G.F.; MEDEIROS, H.R.; GARCIA, L.R.U.C. **Armazenamento de forragens para agricultura familiar**. Rio Grande do Norte: Secretaria de Estado da Agricultura, da Pecuária e da Pesca. 2004, p. 29-33.

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

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

SILVA, J.G.M.; SILVA, D.S.; PEREIRA, W.E.; DINIZ, M.C.N.M.; SILVA, G.J.A.M.; MEDEIROS, M.R. Características morfológicas e produção do xiquexique cultivado em diferentes densidades. **Revista Centauro,** 2:08-17, 2011.

SILVA, S.R.; ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; MACHADO, M. **Plano de ação nacional para a conservação das cactáceas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade, ICMBIO, 2011c. 112p.

SINGH, R.K.; SINGH, R.B.; SINGH, S.P.; SHARMA, M.L. Identification of sugarcane microsatellites associated to sugar content in sugarcane and transferability to other cereal genomes. **Euphytica**, 182:335–354, 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**, 9:156–158, 2009.

SONTEBO, J.H.; BORGSTROM, R.; HEUN, M. A comparison of AFLPs and microsatellites to identify the population structure of Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Hardangervidda, Norway. **Molecular Ecology**, 16:1427-1438, 2007.

SQUIRRELL, J.; HOLLINGSWORTH, P.M.; WOODHEAD, M.; RUSSELL, J.; LOWE, A.J.; GIBBY, M.; POWELL, W. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants?. **Molecular Ecology**, 12:1339–1348, 2003.

TAVARES, J.S.F. **Marcadores moleculares para a caracterização genética de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)**. Tese de Doutorado: Universidade Estadual de Maringá, 2011. 129p.

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

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

VAN DAN, N.; RAMCHIARY, N.; CHOI, S.R.; UHM, T.S.; YANG, T-J; AHN, I-O; LIM, Y.P. Development and characterization of new microsatellite markers in *Panax ginseng* (C.A. Meyer) from BAC end sequences. **Conservation Genetics**, 11:1223–1225, 2010.

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

WARD, S.M.; JASIENIUK, M. Review*:* Sampling weedy and invasive plant populations for genetic diversity analysis. **Weed Science**, 57:593-602, 2009.

WEBER, J.L.; MAY, P.E. An abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, 44:388-396, 1988.

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

WHITE, G.; POWELL, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. **Molecular Ecology**, 6: 1195-1197, 1997.

YADAV, H.K.; RANJAN, A.; ASIF, M.H.; MANTRI, S.; SAWANT S.V.; TULI, R. EST-derived SSR markers in *Jatropha curcas* L.: development, characterization, polymorphism,and transferability across the species/genera. **Tree Genetics and Genomes**, 7:207–219, 2011.

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

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

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

CAPÍTULO I

Transferibilidade de *loci* microssatélites para a caracterização genética de *Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl.

RESUMO

A proposta no presente trabalho foi verificar a transferência de *primers* microssatélites desenvolvidos para cactáceas, para a caracterização genética de *P. gounellei*, uma espécie de cacto comum no semiárido nordestino, região que está sob o domínio geoecológico do bioma Caatinga, onde esta espécie é popularmente conhecida como xiquexique. Para a caracterização de *loci* microssatélites, foram avaliados 33 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para diferentes espécies de cactáceas. Desta avaliação, foram selecionados oito pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para *Astrophytum asterias, Polaskia chichipe* e *Echinocactus grusonii*, conferindo uma transferibilidade de 24,24% destes *primers* para *P. gounellei.* O polimorfismo médio para as plântulas descendentes de 17 amostras de *P. gounellei* foi de 73,05%; os *loci* avaliados apresentaram 18 alelos, com uma média de 3,6 alelos por *locus*. A metodologia de transferência de microssatélites de diferentes espécies de cactáceas para *P. gounellei* pode ser considerada eficiente para evidenciar vários *loci* e identificar diferentes alelos. A divergência genética é baixa entre as amostras de *P. gounellei* dos três estados analisados e alta dentro das amostras de cada estado. Os *primers* AaB6, AaH11, mEgR17, *mEgR63, mEgR98, Pchi21, Pchi44* e *Pchi47* podem ser recomendados para comparar e discriminar amostras de populações de *P. gounellei.*

Palavras-chave: Cactaceae, xiquexique, polimorfismo, marcadores moleculares.

Transferability of microsatellite *loci* for genetic characterization of *Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl.

ABSTRACT

The objectives of our study were to assess the rate of transferability of primer pairs for Simple Sequence Repeats (SSRs) previously developed for Cactaceae and genetic characterization of *P. gounellei.* For the characterization of microsatellite markers a set of 33 primer pairs was evaluated. Eight primer pairs have been found to be transferable. However only five have revealed polymorphisms. Characterization of the five polymorphic markers in 85 individuals belonging to 17 different samples from Piauí, Bahia e Rio Grande do Norte states has revealed that the numbers of alleles per *locus* range from two to six with a mean number of 3.6. In this study, a total of 18 alleles has been detected. The microsatellite transferability methodology of different species of Cactaceae to *P. gounellei* can be considered efficient to reveal several *loci* and identify different alleles. The genetic divergence is low among the sample of *P. gounellei* of three States surveyed and high within the samples from each State. The primers *AaB6*, *AaH11*, *mEgR17*, *mEgR63*, *mEgR98*, *Pchi21*, *Pchi44* and *Pchi47*, should be recommended to compare and discriminate samples of populations of *P. gounellei.*

Keywords: Cactaceae, xiquexique, polymorphism, molecular markers.

1. INTRODUÇÃO

Os cactos podem se desenvolver em ambientes áridos e semiáridos e, em muitos desses locais, constituem-se em recursos importantes para animais e humanos (Nobel, 2002). É o caso de determinadas regiões semiáridas do Nordeste brasileiro, nas quais as cactáceas nativas, devido às poucas alternativas alimentares, têm sido utilizadas nos períodos de secas prolongadas como um dos principais suportes forrageiros dos ruminantes (Silva et al., 2005). Entre essas cactáceas, destacam-se o mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.), o facheiro (*Pilosocereus pachycladus* Ritter), o xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl.) e o coroa-de-frade (*Melocactus bahiensis* Britton & Rose) (Cavalcanti e Resende, 2007).

Sobre o xiquexique, ele ocorre em toda a região Nordeste, com ampla distribuição na Caatinga, sendo encontrado em solos areno-pedregosos e afloramentos rochosos (Rocha e Agra, 2002). A distribuição deste cacto ocorre principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia (Silva et al., 2005). No Ceará, foi realizado um levantamento da família Cactaceae por Menezes et al. (2011) e a respeito do xiquexique, foram obtidas as coordenadas geográficas dos locais de distribuição desse cacto em todo o estado.

O xiquexique tem sido utilizado na alimentação de vacas leiteiras (Silva et al., 2005), ovinos (Silva et al., 2010a), novilhas (Silva et al., 2010b), cabras (Silva et al., 2011a) e humanos (Lucena et al., 2012; Nascimento et al., 2012). Por ser uma espécie adaptada às condições do semiárido nordestino, é importante a realização de estudos que contribuam para que a mesma seja incluída como mais uma opção de reserva estratégica de água e alimentos para ruminantes em períodos de seca no Nordeste, além da adequação agroecológica para o manejo sustentável da espécie.

Pesquisas que tratem da estimativa de parâmetros genéticos para essa espécie são necessárias. É possível que a transferência de *primers* microssatélites desenvolvidos para outras espécies de cactáceas possa ser usada para a caracterização genética de *P. gounellei.* Os marcadores microssastélites, também designados como *locus* SSR (*Simple Sequence Repeats,* ou sequências simples repetidas de DNA), têm sido os marcadores moleculares de escolha para melhoristas moleculares devido à sua herança codominante, natureza multialélica e

fácil detecção. Os SSRs genômicos tem sido extensivamente usados para mapeamento, análise de diversidade genética e melhoramento de plantas (Castillo et al, 2008; Mokhtar et al.**,** 2011). Entretanto, devido ao consumo de tempo e ao custo alto do isolamento dos SSRs, é vantajoso utilizar em novas espécies sequências de *primers* já identificadas em outras espécies proximamente relacionadas (Ekué et al., 2009; Gutierrez et al., 2005; Mnejja et al., 2010; Datta et al., 2010). Este método tem sido proposto como muito mais fácil e barato que o desenvolvimento de novos *primers* SSR. Os marcadores SSR transferíveis são especialmente importantes quando há escassez de marcador polimórfico em regiões específicas do genoma. Marcadores de regiões comparáveis de genomas relacionados podem ser usados (Yildirim et al., 2009).

Uma vez que não foram encontrados registros na literatura sobre parâmetros genéticos da espécie *P. gounellei*, assim como não existem *primers* SSR desenvolvidos para a mesma, o objetivo no presente estudo foi investigar a transferibilidade de 33 *loci* microssatélites de cactáceas para caracterizar geneticamente essa espécie, utilizando plântulas pertencentes a amostras de populações provenientes dos estados da Bahia, Piauí e Rio Grande do Norte.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Para a análise da transferibilidade e caracterização genética da espécie *P. gounellei* com *loci* microssatélites, foram utilizadas de quatro a seis plântulas obtidas de um fruto de cada uma das 17 amostras coletadas em jardins, áreas de ocorrência natural e campo experimental e de produção, resultando em um total de 85 plântulas analisadas. As amostras foram coletadas em municípios do estado do Piauí (Campo Maior, Picos e Teresina), Rio Grande do Norte (Cruzeta) e Bahia (Oliveira dos Brejinhos, localidade Queimada Nova) (Quadro 3 e Figura 8).

Quadro 3 - Locais de coleta dos frutos de xiquexique (*Pilosocereus gounellei*), com as respectivas coordenadas geográficas e quantidade de plântulas utilizadas para a avaliação da transferibilidade e diversidade genética com o marcador molecular microssatélite

Cidade/Estado	Coordenadas geográficas e altitude	Código da amostra	Número de plântulas analisadas por amostra
1.Campo Maior (PI)	Latitude: 04º49'40"S Longitude: 42 º 16' W Altitude: 125 m	CM(PI)09 CM(PI)14	6 4
2. Picos (PI)	Latitude 07º04'37"S Longitude 41º28'01" W Altitude: 206 m	PI(PI)03	5
3. Teresina (PI)	Latitude de 5°5'20"S Longitude de 42°48'07"W Altitude de 72 m	TE(PI)01 TE(PI)02 TE(PI)16	4 4 4
4.Cruzeta (RN)	Latitude de 6º 26' S Longitude de 36º 35' W Altitude de 230m	CR(RN)04 CR(RN)05 CR(RN)06 CR(RN)08 CR(RN)10 CR(RN)15 CR(RN)17	4 6 5 5 5 5 5
5.Oliveira dos brejinhos, localidade Queimada Nova (BA)	Latitude de 10º56'9''S Longitude de 41º56'51''W Altitude de 550 m	QN(BA)07 QN(BA)11 QN(BA)12 QN(BA)13	6 5 6 6
Total			85

Figura 8 - Mapa do Brasil com a localização dos cinco pontos de coleta dos frutos de *Pilosocereus gounellei*, frutos dos quais foram obtidas as sementes que deram origem às plântulas utilizadas no presente trabalho. Bahia: Queimada Nova; Piauí: Campo Maior, Picos e Teresina; Rio Grande do Norte: Cruzeta.

2.2. Germinação das sementes

Cerca de 20 sementes de cada fruto foram embebidas em água destilada por 24 horas, para quebrar a dormência, conforme descrito por Carvalho et al. (2008). Estas sementes foram lavadas, utilizando detergente comercial por aproximadamente 25 minutos, realizando três enxágues com água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram esterilizadas em solução 1:1 de hipoclorito de sódio comercial por uma hora. Após a esterilização, em câmara de

fluxo laminar, cerca de 20 sementes foram lavadas com água destilada autoclavada e inoculadas em meio de cultura descrito por Knudson (1946), previamente acondicionado em frascos de vidros estéreis (Quadro 4). O meio de cultura K-C (Knudson, 1946) tem sido utilizado para a germinação de sementes de outras espécies de cactos desde 1990 (Oliveira et al., 1995).

Quadro 4 - Composição do meio Knudson utilizado para germinação de sementes e obtenção de plântulas de *Pilosocereus gounellei*

Composição	Grama(s)/1000 mL de meio de cultura
Macronutrientes	
$Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$	1, 00000
KH_2PO_4	0,25000
$MgSO_4$ $7H_2O$	0,25000
$(NH_4)_2SO_4$	0,50000
$FeSO_4$. $7H_2O$	0,02500
$MnSO_4$. $4H_2O$	0,00750
Complementado com micronutrientes	
H_3BO_3	0,00056
MoO_3	0,00016
$CuSO_4$	0,00040
$ZnSO_4$. $7H_2O$	0,00331
pH	5,7
Ágar	0,56%
Sacarose	2%

Após a inoculação, os frascos foram vedados com filme de PVC e mantidos em sala de aclimatação sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 30 °C. Após a germinação em meio de cultura Knudson, foram obtidas plântulas (Figura 9), para o estudo da transferibilidade e caracterização genética em *P. gounellei*. As plântulas com tamanho entre 3 cm e 5 cm e com idade entre 5 meses e 1 ano, foram retiradas dos frascos para proceder-se ao isolamento do DNA das mesmas. Foram utilizadas as plântulas inteiras com raiz.

2.3. Isolamento do DNA

O DNA genômico de 85 plântulas de 17 amostras de *P. gounellei* (Quadro 3) foi isolado, utilizando o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999) com modificações (Quadro 5). As plântulas previamente maceradas com nitrogênio líquido foram colocadas em microtubos plásticos (2 mL), sendo adicionados 300 µL de tampão de

extração e 100 µL de cada um dos reagentes de solubilização de membranas e antioxidantes. Os microtubos foram agitados para homogeneização e incubados em banho-maria, durante 1 hora e temperatura de 65 °C, realizando-se agitações suaves a cada 15 minutos. Após a retirada dos microtubos da incubação, estes foram deixados por cinco minutos em temperatura ambiente para esfriar. Em seguida, foi adicionada uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 e os microtubos foram agitados suavemente durante 5 min. As amostras foram centrifugadas por 10 min, com 10.000 rpm em temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi recuperado e transferido para um microtubo (1,5 mL) e adicionado 2,5 µL de RNase (10mg/mL). Os sobrenadantes recuperados foram mantidos em temperatura ambiente por duas horas para a digestão do RNA. Após o período de incubação com RNase, foi acrescentado 600 µL de uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1 e os microtubos foram agitados durante 5 minutos, repetindo-se o mesmo procedimento de centrifugação descrito anteriormente. O sobrenadante foi novamente coletado e transferido para outro microtubo (1,5 mL), no qual foram adicionados isopropanol e cloreto de sódio, a fim de precipitar o DNA, sendo o volume do primeiro igual ao do sobrenadante e o segundo igual a 1/6 do volume do sobrenadante. Em seguida, os tubos foram mantidos *overnight* em -20°C em após este período, foi efetuada uma centrifugação por 20 minutos, a 10.000 rpm e temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com etanol absoluto gelado por duas vezes. Após a segunda lavagem com etanol absoluto, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi seco e ressuspendido em 40 µL de TE (10mM Tris/HCl e 1mM EDTA). Na sequencia, os tubos foram vedados com filme plástico e armazenados em geladeira a 4 °C.

2.4. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% e tampão TAE 1X (Tris-Acetato 0,04M e EDTA 0,001M), submetido a 80 V por aproximadamente 1 hora (Hoisington et al., 1994). O DNA extraído de cada população foi comparado com soluções de DNA padrão (Fago λ), de concentrações gradativas e conhecidas de 50 ng e 150 ng (Figura 10a). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio, contendo 0,5 µg/mL e

a imagem foi capturada em sistema de fotodocumentação L-PIX HE, Loccus Biotecnologia. Foi realizada uma certificação da quantificação, na qual os DNAs das amostras foram diluídos para uma concentração de 10 ng/µL, sendo aplicado um volume de 10 µL de cada DNA em gel de agarose 0,8%, conforme procedimento descrito acima, acrescentando-se a concentração de 100 ng do Fago λ (Figura 10b). Dessa forma, todas as amostras quantificadas corretamente ficaram com uma concentração final de 100 ng.

Figura 9 - Plântulas de *Pilosocereus gounellei* crescendo em meio Knudson. Estas plântulas foram obtidas a partir da germinação de sementes coletadas dos frutos de diferentes plantas. (a) amostra TE(PI)02; (b) amostra CR(RN)04; (c) amostra PI(PI)03; (d) amostra QN(BA)07; (e) TE(PI)01; (f) CR(RN)05.

Quadro 5 - Protocolo utilizado para a extração de DNA de tecidos de caules de plântulas de *Pilosocereus gounellei,* segundo Aljanabi et al. (1999)

Tampão de extração	
Tris-HCL	200 mmol/L pH 8,0
EDTA	50 mmol/L pH 8,0
NaCl	2,2 mol/L
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)	0, 16 volume
Lavagem do precipitado	
Álcool absoluto (2x)	500 µL

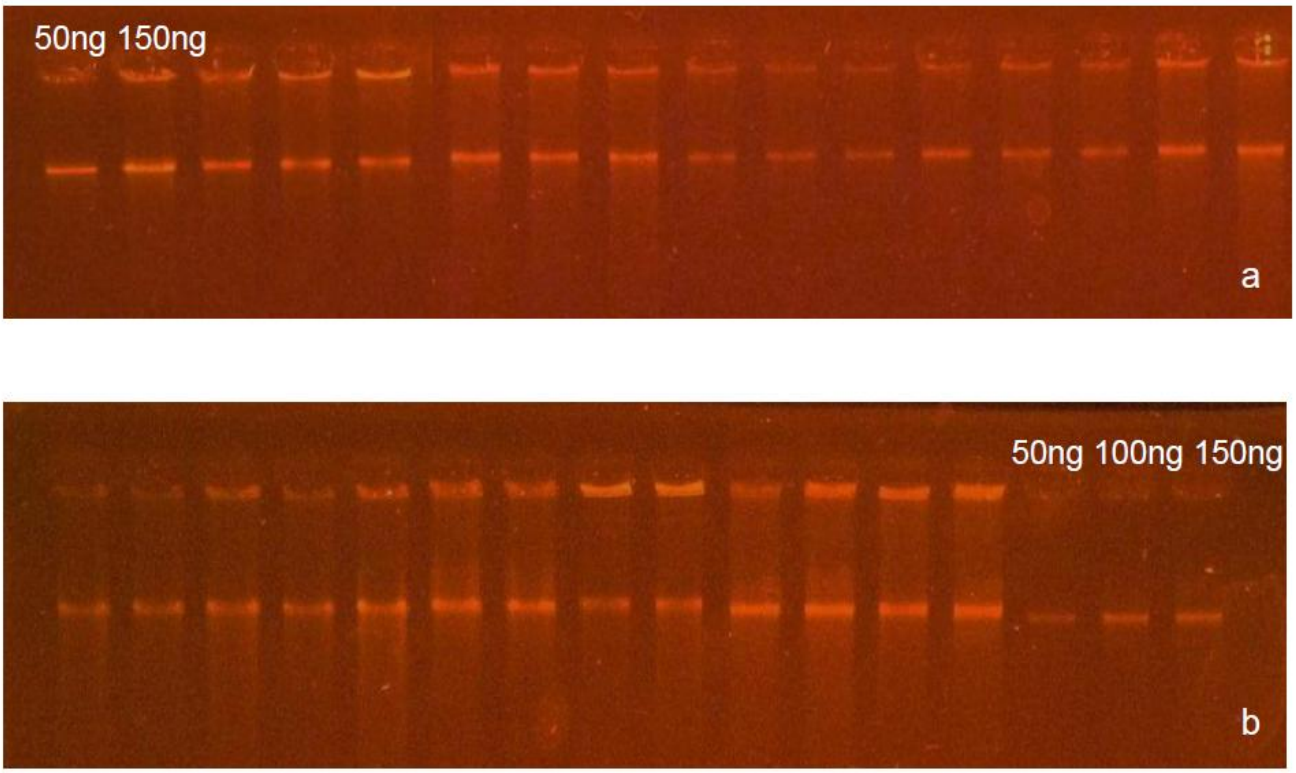


Figura 10 - Gel de agarose 0,8% utilizado para quantificação do DNA extraído de plântulas de *Pilosocereus gounellei* (a) e certificação da quantificação (b).

2.5. Amplificação e transferibilidade de marcadores microssatélites de cactáceas

Para a identificação dos marcadores polimórficos entre as plântulas de *P. gounellei* a serem avaliadas, foram testados 33 pares de *primers,* descritos na literatura para Cactáceas (Quadro 6). Inicialmente, todos os 33 *loci* amplificaram, testando-se temperaturas de anelamento encontradas na literatura para os referidos *primers* e utilizando o programa descrito por Hardesty et al. (2008) com algumas modificações. Após o teste inicial, foram realizadas modificações na temperatura de anelamento de nove *loci* que não amplificaram. Em outros 16 *loci*, foram realizados testes utilizando o programa *Touchdown PCR* (Don et al.,1991) (Quadro 7). Os testes foram realizados visando à obtenção de produtos amplificados mais nítidos. Após os testes com diferentes ciclos e temperaturas de anelamento, foram selecionados os pares de *primers* que amplificaram regiões específicas contendo polimorfismos. Os *primers* que não amplificaram fragmentos específicos foram descartados.

Quadro 6 - Condições de amplificação testadas para os 33 pares de *primers* microssatélites de cactáceas, nas populações de *Pilosocereus gounellei* utilizando diferentes números de ciclos e temperaturas de anelamento para a amplificação do DNA das plântulas

Locus	Testes com diferentes temperaturas de anelamento e respectivos Autores	*Locus*	Testes com diferentes temperaturas de anelamento e respectivos Autores
Pchi5 AY147840	60°C (Otero-Arnaiz et. al., 2004) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 59°C	*mAbR77*	51,4°C (Hughes et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 52°C
Pchi9 AY147838	60°C (Otero-Arnaiz et. al., 2004) 58°C ; 57°C	*mAbR82*	51,4°C (Hughes et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 52°C
Pchi21 AY147837	60°C (Otero-Arnaiz et. al., 2004)	*mAbR86*	53,8°C (Hughes et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 54,5°
Pchi25 AY147836	60°C (Otero-Arnaiz et. al., 2004) 58°C ; 57°C	*mAbR91*	53,8°C (Hughes et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 54,5°
Pchi44 AY147834	59°C (Otero-Arnaiz et. al., 2004)	*mEgR39*	58°C (Hardesty et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991)
Pchi47 AY147832	60°C (Otero-Arnaiz et. al., 2004)	*mEgR02*	58°C (Hardesty et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 59°C
Pchi54 AY147831	60°C (Otero-Arnaiz et. al., 2004) 58°C ; 57°C	*mEgR17*	58°C (Hardesty et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991)
AaB6	64°C (Terry et al., 2006)	*mEgR63*	58°C (Hardesty et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991)
AaH11	63°C (Terry et al., 2006)	*mEgR76*	58°C (Hardesty et al., 2008)
AaA3	64°C (Terry et al., 2006) 62°C; 59°C	*mEgR73*	58°C (Hardesty et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991)
AaC3	63°C (Terry et al., 2006) 61°C; 59°C	*mEgR78*	58°C (Hardesty et al., 2008) 57°C
AaD9	64°C (Terry et al., 2006) 62°C; 59°C	*mEgR98*	58°C (Hardesty et al., 2008)

Quadro 6, cont.

AaG3	64°C (Terry et al., 2006) 62°C; 59°C	*mEgR99*	58°C (Hardesty et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 59°C
mAbR05	53,8°C (Hughes et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 54,5°C	*mEgR51*	51,4° (Hardesty et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 52°C
mAbR28	53,8°C (Hughes et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 54,5°C	*mEgR68*	51,4° (Hardesty et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 52°C
mAbR40	51,4°C (Hughes et al., 2008)	*mEgR70*	51,4° (Hardesty et al., 2008) Touchdown PCR (Don et al.,1991) 52°C
mAbR42	53,8°C (Hughes et al., 2008) 52°C		

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foi conduzida em termociclador TC-512 (Techne). As reações de amplificação, em volume final de 20 µL, foram compostas por 10 ng de DNA, tampão de reação 1X (20 mM de Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM de KCl), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,1 mM de cada dNTP, 1U de *Taq-DNA Polimerase* (Invitrogen) e 0,8 µM de cada um dos *primers Forward* e *Reverse* específicos (Quadro 8). Para a temperatura específica a reação consistiu de aquecimento a 95°C, por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto para o anelamento variando de 51,4 °C a 64 °C, dependendo do par de *primer* (Quadro 6), e extensão por 1 minuto a 72 °C e extensão final a 72 °C, por 5 minutos (Quadro 9).

Quadro 7 - Seqüência do programa *Touchdown* utilizado para amplificação do DNA de *Pilosocereus gounellei* com 16 *primers* microssatélites testados

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94 °C	1 minuto
2	Desnaturação	94 °C	1 minuto
3	Anelamento	65 °C (-1 °C/Ciclo)	1 minuto
4	Extensão	72 °C	2 minutos
5	Voltar aos passos 2, 3 e 4 por 9 vezes		
6	Desnaturação	94 °C	1 minuto
7	Anelamento	55 °C	1 minuto
8	Extensão	72 °C	2 minutos
9	Voltar aos passos 6, 7 e 8 por 19 vezes		
10	Extensão final	72 °C	5 minutos
11	Imersão	10 °C	∞

Quadro 8 - Concentrações dos reagentes estoques e utilizados nas reações de amplificação

Reagentes	Concentração estoque dos reagentes	Concentração final dos reagentes/reação	µL/20 µL de reação
H_2O			12,4
Tampão	10 X	1 X	2,0
$MgCl_2$	25 mM	2,5 mM	2,0
dNTPs	2,5 mM/cada	0,1 M/cada	0,8
Primer (F)	10 µM	0,4 µM	0,8
Primer (R)	10 µM	0,4 µM	0,8
Taq-DNA Polimerase	5 U/µL	1 U	0,2
DNA	10 ng/µL	10 ng	1,0
Total			20 µL

Quadro 9 - Seqüência do programa utilizado para amplificação do DNA de *Pilosocereus gounellei* com os *primers* microssatélites testados

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	95 °C	4 minutos
2	Desnaturação	94 °C	1 minuto
3	Anelamento	(51,4 °C- 64 °C)	1 minuto
4	Extensão	72 °C	1 minuto
5	Voltar aos passos 2, 3 e 4 por 34 vezes		
6	Extensão final	72 °C	5 minutos
7	Imersão	10 °C	∞

2.6. Separação dos produtos das amplificações

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose Metaphor (4%), usando tampão TBE 0,5X (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Este gel foi preparado com 50% de agarose Metaphor e 50% de agarose comum (Invitrogen). A eletroforese foi realizada com 60 V por cerca de 3 horas e 30 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídio, contendo 0,5 µg/mL, e a imagem foi capturada em sistema de fotodocumentação L- PIX HE, Loccus Biotecnologia. Para a definição do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o *Ladder* (Invitrogen) de 100 pb.

O gel de poliacrilamida também foi usado para dissipar dúvidas sobre fenótipos homozigotos ou heterozigotos no gel de agarose, pois ele possui menor porosidade que o gel de agarose e permite que os segmentos de DNA com números de bases muito próximos sejam observados melhor fracionados no gel. Para o

preparo do gel foi sugerido o protocolo: 8 mL de solução acrilamida/bis-acrilamida 29:1 (8,7 g acrilamida, 0,3 g bis-acrilamida) e 9,6 g ureia. Após a dissolução da mistura em banho-maria, foi adicionado 2 mL de tampão TBE 10X (0,9 M Tris, 0,9 M ácido bórico e 0,02 M EDTA pH 8,0), 15 µL de Temed e 300 µL de Persulfato de amônio 2%. O gel polimerizado foi montado sobre a cuba de eletroforese, utilizando tampão TBE 1X para uma pré-corrida de 30 minutos e 200 V. As amostras foram desnaturadas em um termociclador Techne TC-512. Para isso, foi misturado 7 µL do produto amplificado a 10 µL de tampão desnaturante. Para a definição do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o *Ladder* (Invitrogen) de 100 pb, acrescido de tampão desnaturante. A eletroforese foi realizada em uma voltagem de 200 V por cerca de 5 horas e 30 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados com tampão *Syber Gold*. A imagem foi capturada em sistema de foto documentação L-PIX HE, Loccus Biotecnologia.

2.7. Análise dos dados

Os *loci* microssatélites polimórficos foram analisados, estimando-se o número médio de alelos por *locus*, a heterozigosidade média observada (Ho) e a esperada (He). O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi examinado para cada *locus* e para cada amostra de *P. gounellei*. Foram estimados também o coeficiente de endogamia (F_{IS}), déficit de heterozigotos (F_{IT}) e a diversidade genética entre as populações (F_{ST}). A matriz de distância genética foi calculada para todas as amostras e usada para plotar o dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Mean Average*) (Sneath e Sokal, 1973). A análise *bootstrap* (1000 repetições) foi desenvolvida para estimar a robustez dos nós. A análise foi conduzida por meio do programa POPGENE 1.32 (Yeh, et al., 1999), utilizando-se os valores da distância genética de Nei (Nei, 1978).

O programa GENAIEX 6.5 (Peakall e Smouse, 2012) foi usado para realizar a análise de variância molecular (AMOVA e Excoffier et al., 1992). Para determinar a congruência entre divergência geográfica e divergência genética, foi realizado o teste de Mantel (Mantel, 1967).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Transferibilidade de microssatélites

Dos 33 pares de *primers* microssatélites avaliados, 10 não amplificaram em nenhuma das condições testadas, 15 produziram fragmentos e oito geraram produtos de amplificação de tamanhos esperados *AaB6 mEgR17 mEgR63 mEgR98 Pchi44*. Entre os oito transferíveis, cinco foram polimórficos (Quadro 10). Desta forma, a transferibilidade média de microssatélites desenvolvidos em diferentes gêneros de cactáceas para *P. gounellei* foi de 24,24%. O que há em comum entre as espécies envolvidas nesse estudo é o fato de todas pertencerem a família Cactaceae e, segundo Decroocq et al. (2003), a transferência de marcadores de uma espécie para outra produz uma redução de polimorfismo e diversidade alélica mais pronunciada quando a transfêrencia ocorre entre espécies filogeneticamente distantes. Essa mesma observação pode ser feita em relação ao trabalho desenvolvido por García-Moreno et al. (2010), no qual foi analisada a transferência de 119 SSRs de girassol (*Helianthus annuus* L.) para cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), ambas espécies pertencentes à família Asteraceae. Dos 119 SSRs testados, somente 17,6% foram transferíveis para cártamo e 66,6% dos *loci* foram polimórficos. Os autores afirmaram que um baixo valor de transferibilidade sugere que as regiões que flanqueavam as repetições não eram altamente conservadas.

Dos seis pares de *primers* microssatélites testados de *Astrophytum asterias*, somente um (16,67%) amplificou o DNA de *P. gounellei*. De 10 *primers* desenvolvidos para *Echinocactus grusonii* foram transferidos três para *P. gounellei* (30%). Dos sete *primers* microssatélites testados de *Polaskia chichipe,* apenas um (14,28%) amplificou o DNA de *P. gounellei* (Quadro 10). Em relação aos *loci* microssatélite isolados para *Ariocarpus bravoanus,* nenhum amplificou o DNA de *P. gounellei*

A espécie *E. grusonii,* cujos *primers* mostraram maior transferibilidade, é uma espécie nativa do México Central e tem uma morfologia bem diferente da morfologia de *P. gounellei*. *E. grusonii* é um cacto globular em forma de barril, conhecido popularmente como barril dourado ou bola dourada. Por outro lado, a espécie *P. chichipe,* que apresentou a menor taxa de transferibilidade (14,28%), é um cacto colunar, assim como os cactos da espécie *P. gounellei*. Tais evidências

são indicativas de que a taxa de transferibilidade de *primers* para loci SSR em Cactáceas parecem não estar relacionadas com a morfologia dos caules das espécies. De acordo com Zucchi et al. (2002), a chance de sucesso para transferibilidade de *primers* microssatélites será maior quanto menor for a distância genética entre as espécies.

Quadro 10 - Conjunto dos *primers* microssatélites obtidos a partir de três espécies de cactáceas e número de alelos amplificados em *Pilosocereus gounellei* e na espécie de origem

Locus transferido	Espécie	Número de alelos	Número de alelos na espécie de origem
AaB6	*Astrophytum asterias*	6	7
mEgR17	*Echinocactus grusonii*	4	4
mEgR63	*Echinocactus grusonii*	2	2
mEgR98	*Echinocactus grusonii*	2	5
Pchi44	*Polaskia chichipe*	4	4
Total		18	22

3.2. Caracterização genética

Ao serem analisados em gel de agarose, os cinco *loci* microssatélites amplificados com o DNA de plântulas descendentes de 17 amostras de populações de *P. gounellei,* foi verificada a presença de 18 alelos, com uma média de 3,6 alelos por *locus* polimórfico. Com o gel de poliacrilamida, foi confirmado o número de alelos por *loci*. Para o *locus AaB6,* foram amplificados seis alelos, enquanto, para os *loci mEgR17* e *Pchi44*, quatro alelos foram amplificados e, para os *loci mEgR63* e *mEgR98*, foram obtidos dois alelos, caracterizando o menor número de alelos (Quadro 10). Embora os *primers* de *A. asterias* tenham apresentado menor transferibilidade que os *primers* de *E. grusonii*, no *locus AaB6* foi observado o maior número de alelos.

O tamanho dos alelos amplificados pelos microssatélites transferidos para *P. gounellei* foi altamente variável, de 23 pb para o *locus mEgR63* a 400 pb para o *locus mEgR17* (Quadro 11), indicando que os *primers* de cactáceas resultaram em amplificações de tamanhos diferentes daqueles observados nas espécies de origem. É provável que, nas espécies de origem, tenham ocorrido mutações que resultaram no encurtamento do tamanho dos alelos, conforme as considerações feitas por

Vigouroux et al. (2002), que registram que há maior probabilidade de mutações em alelos de tamanhos maiores.

Quadro 11 - Seqüências de nucleotídeos dos *primers* microssatélites, sequência de repetição, número e variação no tamanho dos alelos em pares de base (pb) produzidos em *Pilosocereus gounellei* e na espécie de origem

Loci	Seqüência de nucleotídeos	Bloco de repetição	Região de amplificação em *P. gounellei*(pb)	Região de amplificação na espécie de origem
AaB6	F: CATGCGAACAGATTGAAAAGAGGG R: ACTCAGGAAAGACTTACACCATGG	(GA)13	80-140	83–99
mEgR17	F: ATCGTTGAAAGAGGCGAAA R: TCCCTCTTCTTCGTCAGAGC	(AG)11	350-400	(330–347)
mEgR63	F: TTGAATTGGGTGCTTCACTG R: CCCTAAATATGCTGCCGATG	(AG)3T(GA)12	23-90	238–253
mEgR98	F: ACCCTAGTGGGGTCGAGAAT R: GTCGCCCAGAACCCTAGTCT	$(AG)_{12}AA(AG)_4$	190-367	172–187
Pchi44	F: ATTCAAACAGGCCCACACAG R:GGGTGTTAGAAGGAATAATAGCTTG	(CA)17	250-313	137

A frequência dos alelos para os diferentes *loci* foi muito variada em todas as plântulas descendentes das 17 amostras de populações analisadas (Quadro 12). Entre todos os *loci* estudados, o *locus AaB6* foi o que apresentou o maior número de alelos, seis (Figura 11), sendo o alelo $AaB6^6$ detectado somente nas plântulas provenientes das amostras TE(PI)01, TE(PI)16 e CR(RN)05. No *locus mEgR63*, foi observada a presença do alelo $mEgR63^1$ somente em plântulas descendentes da amostra da população QN(BA)07, proveniente da localidade Queimada Nova, município de Oliveira dos Brejinhos (BA), havendo fixação do alelo $mEgR63^2$ para as demais amostras.

O polimorfismo entre as plântulas descendentes das 17 amostras de *P. gounellei* analisadas variou de 60% a 100%, sendo a amostra CR(RN)06 a mais polimórfica, com 100% de *loci* polimórficos. As amostra QN(BA)11, CM(PI)14 e CR(RN)17 foram as menos polimórficas (60%). Por outro lado, as amostras TE(PI) 01, TE(PI) 02, PI(PI) 03, CR(RN) 04, CR(RN) 05, QN(BA) 07, CR(RN) 08, CM(PI) 09, CR(RN) 10, QN(BA)12, QN(BA)13, CR(RN) 15 e TE(PI) 16 apresentaram o mesmo percentual de polimorfismo, 80% (Quadro 13). O polimorfismo médio para as plântulas descendentes das 17 amostras foi 73,05%.

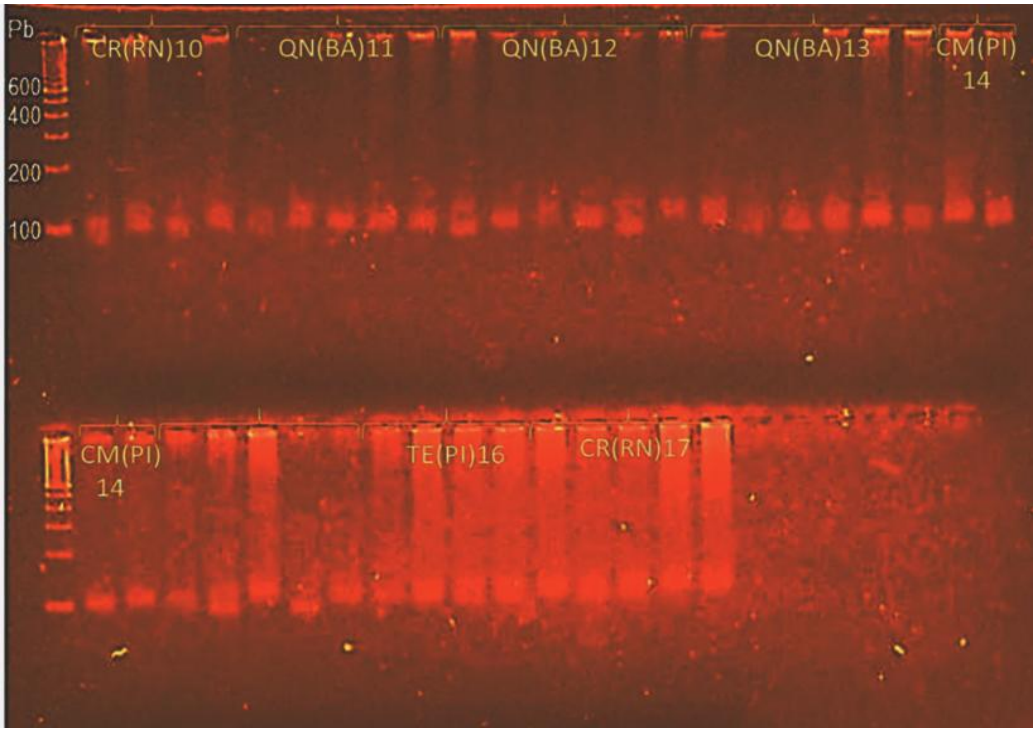


Figura 11 - Gel de agarose concentrado 4% utilizado para separar o produto da amplificação do *locus* SSR AaB6 em diferentes plântulas descendentes das amostras de *Pilosocereus gounellei*. A primeira amostra (M) do gel indica o *ladder* 100pb.

A heterozigosidade média observada variou de 0,12 (QN(BA)11) a 0,56 (CR(RN)10), enquanto a heterozigosidade média esperada variou de 0,2875 (CM(PI)14) a 0,5611 (QN(BA)7) (Quadro 14). As amostras QN(BA)11, QN(BA)12 e CM(PI)14 foram homozigotas para três *loci* e consequentemente apresentaram os menores valores de heterozigosidade média observada. O intervalo dos valores da heterozigosidade esperada nas 17 amostras de populações de *P. gounellei* foi menor que o obtido para outras espécies de Cactáceas, usando marcadores microssatélites. Otero-Arnaiz et al. (2004), ao analisarem sete *loci* polimórficos em *Polaskia chichipe*, obtiveram uma heterozigosidade entre 0,188 e 0,797. Na análise de 12 *loci* SSRs polimórficos em 30 indivíduos de *Echinocactus grusonii*, a heterozigosidade variou entre 0,235 e 0,785 (Hardesty et al., 2008). Hughes et al. (2008), ao estudarem oito *loci* polimórficos em populações de *Ariocarpus bravoanus*, obtiveram uma heterozigosidade esperada entre 0,201 e 0,688.

Quadro 12 - Frequência dos alelos para os diferentes *loci* microssatélites analisados nas plântulas descendentes das 17 amostras de *Pilosocereus gounellei.* Amostras 1, 2 e 16 (Teresina); 3 (Picos); 9 e 14 (Campo Maior); 7, 11, 12, 13 (Bahia); 4, 5, 6, 8, 10, 15 e 17 (RN). Os pontos indicam a ausência do alelo

Loci	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
AaB6																	
AaB61	…..	…..	0,1000	…..	.....	…..	…..	0,6000	…..	0,3000	…..	…..	…..	…..	0,2000	…..	…..
AaB62	…..	0,1250	…..	…..	…..	0,8000	…..	0,4000	…..	0,1000	…..	0,1667	0,2500	…..	…..	…..	…..
AaB63	0,6250	0,2500	0,8000	0,7500	0,6667	…..	0,3333	…..	0,4167	0,3000	0,9000	0,4167	0,5833	0,6250	0,2000	0,6250	0,2000
AaB64	…..	…..	0,1000	0,1250	…..	0,1000	0,2500	…..	0,5000	0,2000	0,1000	0,2500	0,1667	0,3750	0,2000	0,2500	0,8000
AaB65	…..	0,6250	…..	0,1250	0,0833	0,1000	0,4167	…..	0,0833	0,1000	…..	0,1667	…..	…..	0,4000	…..	…..
AaB66	0,3750	…..	…..	…..	0,2500	…..	…..	…..	…..	…..	…..	…..	…..	…..	…..	0,1250	…..
mEgR17																	
mEgR171	…..	…..	…..	0,6250	0,5833	0,4000	0,0833	0,6000	0,7500	0,5000	0,1000	…..	0,4000	0,5000	0,3000	…..	0,1000
mEgR172	0,8333	0,3750	0,8000	…..	.....	0,5000	0,5833	0,3000	.....	0,2000	0,5000	0,3333	0,4000	…..	…..	0,5000	0,4000
mEgR173	.....	0,2500	.....	…..	0,1667	0,1000	0,3333	0,1000	0,2500	0,3000	0,3000	0,6667	0,1000	0,5000	0,4000	0,5000	0,4000
mEgR174	0,1667	0,3750	0,2000	0,3750	0,2500	…..	…..	…..	…..	…..	0,1000	…..	0,1000	…..	0,3000	…..	0,1000
mEgR63																	
mEgR631	.....	.....	…..	.....	.....	.....	0,5000	.....	.....	.....	…..	…..	…..	…..	…..	…..	…..
mEgR632	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
mEgR98																	
mEgR981	0,7500	0,7500	0,9000	0,8750	0,5000	0,4000	0,5000	0,4000	0,5000	0,4000	.....	0,2500	0,2500	0,6250	0,8000	0,3750	0,5000
mEgR982	0,2500	0,2500	0,1000	0,1250	0,5000	0,6000	0,5000	0,6000	0,5000	0,6000	1,0000	0,7500	0,7500	0,3750	0,2000	0,6250	0,5000
Pchi44																	
Pchi441	0,1250	.....	.....	0,2500	.....	0,2000	0,1667	.....	.....	.....	0,4000	0,6667	.....	…..	…..	…..	…..
Pchi442	0,5000	0,3333	0,3000	0,6250	0,8333	.....	0,5000	0,5000	0,8333	0,3000	0,2000	0,3333	0,9167	1,0000	0,2000	0,2500	…..
Pchi443	0,3750	0,3333	0,4000	…..	0,1667	0,6000	0,3333	0,3000	0,1667	0,7000	0,4000	…..	0,0833	…..	0,8000	0,7500	1,0000
Pchi444	…..	0,3333	0,3000	0,1250	…..	0,2000	…..	0,2000	…..	…..	…..	…..	…..	…..	…..	…..	…..

Quadro 13 - Estimativas do número de *loci* polimórficos N(lp), número de *loci* monomórficos N(lm) e porcentagem de polimorfismo (%P) para as plântulas descendentes das 17 amostras de *Pilosocereus gounellei*

Amostras	N(lp)	N(lm)	%P
TE(PI) 01	4	1	80%
TE(PI) 02	4	1	80%
PI(PI) 03	4	1	80%
CR(RN) 04	4	1	80%
CR(RN) 05	4	1	80%
CR(RN) 06	5	0	100%
QN(BA) 07	4	1	80%
CR(RN) 08	4	1	80%
CM(PI) 09	4	1	80%
CR(RN) 10	4	1	80%
QN(BA)11	3	2	60%
QN(BA)12	4	1	80%
QN(BA)13	4	1	80%
CM(PI)14	3	2	60%
CR(RN) 15	4	1	80%
TE(PI) 16	4	1	80%
CR(RN) 17	3	2	60%

O gênero *Pilosocereus* tem sido descrito como um grupo de espécies da América do Sul que apresenta altos níveis de diversidade genética, usando marcadores isoenzimáticos: *P. lanuginosus* (He = 0,274), *P. aureispinus* (He = 0,284), *P. viloboensis* (He = 0,292), *P. machrissii* (He = 0,380), e *P. tillianus* (He = 0,352) (Nassar et al., 2003; Moraes et al., 2005; Figueredo et al., 2010). Com o uso dos marcadores microssatélites na espécie *P. gounellei,* o nível de heterozigosidade média foi muito superior (He = 0,5236) ao descrito para as demais espécies do gênero usando marcadores isoenzimáticos. As estimativas do número de alelos por locus polimórfico (Na), número efetivo de alelos (Ne) e heterozigosidade média observada (Ho) apresentaram os valores maiores nas plântulas de *P. gounellei* das amostras CR(RN)10 e QN(BA)7, indicando que valores maiores de diversidade genética para os *loci AaB6, mEgR17, mEgR63, mEgR98, Pchi44* são esperados em plantas de *P. gounellei* nos estados do Rio Grande do Norte e Bahia.

Quadro 14 - Parâmetros de diversidade genética avaliados para as plântulas descendentes das 17 amostras de populações de *Pilosocereus gounellei* obtidos mediante análise de cinco *loci* microssatélites

	TE(PI) 01				TE(PI) 02				PI(PI) 03			
Loci	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
AaB6	2,0000	1,8824	0,7500	0,4688	3,0000	2,1333	0,2500	0,5312	3,0000	1,5152	0,2000	0,3400
mEgR17	2,0000	1,3846	0,3333	0,2778	3,0000	2,9091	0,7500	0,6562	2,0000	1,4706	0,4000	0,3200
mEgR63	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
mEgR98	2,0000	1,6000	0,5000	0,3750	2,0000	1,6000	0,5000	0,3750	2,0000	1,2195	0,2000	0,1800
Pchi44	3,0000	2,4615	0,2500	0,5938	3,0000	3,0000	0,6667	0,6667	3,0000	2,9412	0,6000	0,6600
Média	2,0000	1,6657	0,3667	0,3431	2,4000	2,1285	0,4333	0,4458	2,2000	1,6293	0,2800	0,3000
	CR(RN) 04				CR(RN) 05				CR(RN) 06			
Loci	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
AaB6	3,0000	1,6842	0,5000	0,4062	3,0000	1,9459	0,6667	0,4861	3,0000	1,5152	0,4000	0,3400
mEgR17	3,0000	1,8824	0,7500	0,4688	3,0000	2,3226	0,5000	0,5694	3,0000	2,3810	0,2000	0,5800
mEgR63	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
mEgR98	2,0000	1,2800	0,2500	0,2188	2,0000	2,0000	0,6667	0,5000	2,0000	1,9231	0,8000	0,4800
Pchi44	2,0000	2,1333	0,2500	0,5312	2,0000	1,3846	0,0000	0,2778	3,0000	2,2727	0,6000	0,5600
Média	2,2000	1,5960	0,3500	0,3250	2,2000	1,7306	0,3667	0,3667	2,4000	1,8184	0,4000	0,3920
	QN(BA) 07				CR(RN) 08				CM(PI) 09			
Loci	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
AaB6	3,0000	2,8800	0,1667	0,6528	2,0000	2,0000	0,2000	0,5000	3,0000	2,3226	0,3333	0,5694
mEgR17	3,0000	2,1818	0,1667	0,5417	2,0000	1,9231	0,0000	0,4800	2,0000	1,6000	0,1667	0,3750
mEgR63	2,0000	2,0000	1,0000	0,5000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
mEgR98	2,0000	2,0000	0,6667	0,5000	2,0000	1,9231	0,8000	0,4800	2,0000	2,0000	1,0000	0,5000
Pchi44	3,0000	2,5714	0,3333	0,6111	3,0000	2,6316	0,6000	0,6200	2,0000	1,3846	0,3333	0,2778
Média	2,6000	2,3266	0,4667	0,5611	2,0000	1,8955	0,3200	0,4160	2,0000	1,6614	0,3667	0,3444

Quadro 14, Cont.

	CR(RN) 10				QN(BA)11				QN(BA)12			
Loci	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
AaB6	5,0000	4,1667	0,8000	0,7600	2,0000	1,2195	0,2000	0,1800	4,0000	3,4286	0,5000	0,7083
mEgR17	3,0000	2,6316	0,6000	0,6200	4,0000	2,7778	0,4000	0,6400	2,0000	1,8000	0,0000	0,4444
mEgR63	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
mEgR98	2,0000	1,9231	0,8000	0,4800	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	2,0000	1,6000	0,5000	0,3750
Pchi44	2,0000	1,7241	0,6000	0,4200	3,0000	2,7778	0,0000	0,6400	2,0000	1,8000	0,0000	0, 4444
Média	2,6000	2,2891	0,5600	0,4560	2,2000	1,7550	0,1200	0,2920	2,2000	1,9257	0,2000	0,3944
	QN(BA)13				CM(PI)14				CR(RN) 15			
Loci	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
AaB6	3,0000	2,3226	0,5000	0,5694	2,0000	1,8824	0,2500	0,4688	4,0000	3,5714	0,4000	0,7200
mEgR17	4,0000	2,9412	0,2000	0,6600	2,0000	2,0000	0,0000	0,5000	3,0000	2,9412	0,6000	0,6600
mEgR63	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
mEgR98	2,0000	1,6000	0,5000	0,3750	2,0000	1,8824	0,7500	0,4688	2,0000	1,4706	0,4000	0,3200
Pchi44	2,0000	1,1803	0,1667	0,1528	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	2,0000	1,4706	0,4000	0,3200
Média	2,4000	1,8088	0,2733	0,3514	1,6000	1,5529	0,2000	0,2875	2,4000	2,0908	0,3600	0,4040
	TE(PI) 16				CR(RN) 17							
Loci	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He				
AaB6	3,0000	2,1333	0,7500	0,5312	2,0000	1,4706	0,4000	0,3200				
mEgR17	2,0000	2,0000	0,0000	0,5000	4,0000	2,9412	0,2000	0,6600				
mEgR63	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000				
mEgR98	2,0000	1,8824	0,7500	0,4688	2,0000	2,0000	0,6000	0,5000				
Pchi44	2,0000	1,6000	0,5000	0,3750	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000				
Média	2,0000	1,7231	0,4000	0,3750	2,0000	1,6824	0,2400	0,2960				

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

Na análise global das 17 amostras de *P. gounellei*, os *loci mEgR63* e *mEgR98* apresentaram valores negativos para o coeficiente de endogamia (Fis), indicando um excesso de heterozigotos para os referidos *loci* (Quadro 15). O valor médio de Fis para os cinco *loci* foi de 0,0982. Os *loci mEgR17* e *Pchi44* apresentaram altos valores de Fis. Em se tratando de populações de cactos auto-incompatíveis, a ocorrência de altos valores de Fis é explicada por eventos, tais como endocruzamentos biparentais dentro de populações relativamente pequenas e parcialmente isoladas, ou pela vantagem adaptativa de homozigotos, ou pela estrutura clonal das populações (Moraes et al., 2005).

A análise da diferenciação genética entre as plântulas de *P. gounellei* (F_{ST} = 0,2846) é indicativo de uma diferenciação genética muito alta entre as amostras de *P. gounellei.* De acordo com os postulados de Wright (1978), valores de F_{ST} maiores que 0,25 são encontrados quando a frequência dos alelos nas populações comparadas são altamente divergentes. Para a espécie *P. gounellei,* os *loci mEgR63* e *Pchi44* apresentaram os maiores valores de F_{ST} (Quadro 15), indicando que a frequência dos alelos nestes *loci* é altamente divergente nas amostras da espécie analisada. Estes *loci* podem, portanto, serem indicados como adequados para comparar e discriminar amostras de *P. gounellei.* No Quadro 15, pode ser observado, ainda, que os *loci mEgR17* e *AaB6* também apresentaram valores de $F_{ST} > 0,25$ e, assim, o uso dos *primers* mEgR17 e AaB6 pode ser recomendado para discriminar amostras de *P. gounellei.* Embora no locus *mEgR98* tenha sido observado o menor valor de F_{ST} (0,2232), este valor está no intervalo F_{ST} de 0,15 a 0,25, considerado por Wright (1978) como indicativo de divergência genética alta entre as populações comparadas. Desta forma, o *primer* mEgR98 também pode ser recomendado para comparar e discriminar amostras de populações de *P. gounellei.* Hamrick et al. (2001) têm postulado que a diferenciação entre populações de cactos colunares está associada ao potencial dos vetores de dispersão de pólen. Um nível alto de diferenciação entre populações de *Lophocereus schottii* tem sido atribuído à limitada capacidade de dispersão do seu polinizador, a mariposa *Upiga virescens* (Fleming e Holland, 1998). Nas espécies de cactos cujo consumo e dispersão dos frutos são realizados por pássaros e morcegos, os quais podem percorrer grandes distâncias, é possível verificar menores níveis de diferenciação, porque a dispersão das sementes pode contribuir para a troca de material genético. Em *P. gounellei*, o valor do fluxo gênico (Nm = 0,628) pode ser considerado intermediário (0,25 < Nm <

0,99; Govindajaru, 1989), permitindo que a forma de dispesão dos frutos por animais, ou mesmo pela disceminação humana, determine um fluxo gênico de valor intermediário entre as amostras de *P. gounellei* localizadas em regiões diferentes do Nordeste do Brasil.

A heterozigosidade média esperada foi de 0,5236 para as plântulas obtidas das 17 amostras de *P. gounellei*, enquanto a heterozigosidade média observada foi de 0,3339. Menores valores de Ho podem estar relacionados à falta de fluxo gênico entre populações ou pequeno tamanho populacional, polinização e pequeno tamanho amostral.

Quadro 15 - Estimativa do número de alelos observados (Na) e número efetivo de alelos (Ne), coeficiente de endogamia (FIS), déficit de heterozigotos (FIT), proporção de diferenciação gênica (FST), fluxo gênico (Nm), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) para as plântulas descendentes das 17 amostras de *Pilosocereus gounellei*

Loci	N	Na	Ne	FIS	FIT	FST	Nm	Ho	He
AaB6	170	6,0000	3,2428	0,1503	0,3797	0,2699	0,6762	0,4235	0,6916
mEgR17	166	4,0000	3,5796	0,4118	0,5707	0,2703	0,6750	0,3012	0,7206
mEgR63	170	2,0000	1,0731	-1,0000	-0,0303	0,4848	0,2656	0,0706	0,0681
mEgR98	170	2,0000	2,0000	-0,4680	-0,1404	0,2232	0,8703	0,5765	0,5000
Pchi44	168	4,0000	2,7579	0,5134	0,5134	0,3436	0,4777	0,2976	0,6374
Média	169	3,6000	2,5307	0,0982	0,3548	0,2846	0,628	0,3339	0,5236

A análise das frequências genotípicas também indica que os *loci* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para a maioria das amostras analisadas (Quadro 16), estando o *locus mEgR98* em equilíbrio de Hardy-Weinberg para as 17 amostras. Dessa forma, a maior parte dos desvios das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg ocorreu por acaso. O *locus AaB6* não apresentou equilíbrio de Hardy-Weinberg para as amostras QN(BA)07, CR(RN)10, QN(BA)12 e CR(RN)15. As amostras para as quais o *locus mEgR17* não se encontrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg foram: TE(PI)02, CR(RN)05, CR(RN)10, QN(BA)13, CR(RN)15 e CR(RN)17. Em relação ao *locus Pchi44,* não houve equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras PI(PI)03, CR(RN)05, QN(BA)07 e QN(BA)11. Sobre o *locus mEgR63*, foi encontrado equilíbrio de Hardy-Weinberg somente na amostra QN(BA)07, uma vez que somente nesta amostra foi observada a existência de heterozigotos.

Quadro 16 - Teste do χ^2-quadrado para verificar o Equilíbrio de Hardy–Weinberg para os cinco *loci* de microssatélites analisados nas plântulas descendentes das 17 amostras de *Pilosocereus gounellei*

Loci / Amostras	*AaB6*	*mEgR17*	*mEgR63*	*mEgR98*	*Pchi44*
TE(PI)01	0,9000*	0,0000*	....	0,2000*	5,3333*
TE(PI)02	7,2000*	10,000	….	0,2000*	7,0000*
PI(PI)03	9,1428*	0,1428*	....	0,0000*	10,000
CR(RN)04	0,2000*	0,9000*	....	0,0000*	7,2000*
CR(RN)05	1,0714*	11,809	....	0,3555*	11,111
CR(RN)06	0,1428*	6,4000*	….	1,6000*	1,1500*
QN(BA)07	10,133	7,6190*	5,0000*	0,3555*	11,600
CR(RN)08	2,5600*	6,4000*	....	1,6000*	5,2000*
CM(PI)09	3,5333*	2,9629*	….	5,0000*	0,1111*
CR(RN)10	14,000	10,300	....	1,6000*	0,5714*
QN(BA)11	0,0000*	6,4000*	....	….	16,000
QN(BA)12	13,800	7,6190*	….	0,4166*	7,6190*
QN(BA)13	3,4285*	16,000	….	0,4166*	0,0000*
CM(PI)14	1,6000*	5,3333*	....	0,9000*	....
CR(RN)15	19,000	10,000	....	0,1428*	0,1428*
TE(PI)16	0,9000*	5,3333*	....	0,9000*	0,2000*
CR(RN)17	0,1428*	16,000	....	0,0400*	....

**Locus* em equilíbrio de Hardy-Weinberg a 5% de probabilidade.

As relações de identidade e distância genética entre as plântulas de *P. gounellei* das amostras CM(PI)9 e CM(PI)14 apresentaram o menor valor de distância genética (0,0154) e o maior valor de Identidade genética de Nei (0,9847), sendo, portanto, as mais idênticas. As amostras CR(RN)4 e CR(RN)17 foram as mais distantes, pois apresentaram o maior valor de distância genética (0,5947), assim como o menor valor de Identidade genética de Nei (0,5517). As relações de distância e identidade entre as populações podem ser observadas na Figura 12. No agrupamento apresentado no dendrograma desta Figura é possível visualizar três grupos, nos quais as amostras de *P. gounellei* foram organizadas de acordo com as distâncias genéticas entre elas, mas não foram agrupadas de acordo com os três locais de coleta (PI, RN, e BA), região nordeste do Brasil.

A análise comparativa entre as amostras de plântulas obtidas dos estados do Piaui, Bahia e Rio Grande do Norte evidenciou que o número efetivo de alelos e a heterozigosidade média esperada apresenta valores maiores nas amostras de plântulas do RN (Quadro 17), mas a divergência genética entre as amostras dos três estados é baixa (F_{ST} = 0,0561) (Quadro 18) o que pode ser confirmado pela AMOVA (Quadro 19).

Quadro 17 - Estimativa do número de alelos por *locus* (Na), número efetivo de alelos (Ne) e heterozigosidade média observada (Ho) e esperada (He) nas amostras de *Pilosocereus gounellei* dos três estados do Nordeste do Brasil: Piauí (PI), Bahia (BA) e Rio Grande do Norte (RN)

Amostras	Na	Ne	Ho	He
PI	3,4	2,2654	0,3382	0,4732
BA	3,0	2,2082	0,2711	0,5007
RN	3,4	2,5638	0,3714	0,5091
Média	3,6	2,5307	0,3339	0,5236

Valores de FST entre 0,05 a 0,25, conforme com Wright (1978), indicam diferenciação genética moderada e valores iguais ou menores que 0,05 indicam uma baixa diferenciação genética entre as populações comparadas. Em *P. gounellei*, a divergência genética entre as plântulas dentro de cada estado é muito alta, de modo que, a compração entre as amostras dos três estados demonstra que a divergência na frequência dos alelos dos *loci Pchi44*, *AaB6*, *mEgR63*, *mEgR17* e *mEgR98* é baixa.

Quadro 18- Valores do número de alelos por locus (Na), número efetivo de alelos (Ne), coeficiente de endogamia (FIS), déficit de heterozigotos (FIT), e divergência genética (FST) nos *loci* microssatélites entre as amostras de *Pilosocereus gounellei* dos três Estados do Nordeste do Brasil: Piauí (PI), Bahia (BA), e Rio Grande do Norte (RN)

Locus	N	Na	Ne	FIS	FIT	FST
Pchi44	168	4,0	2,7579	0,5210	0,5524	0,0655
AaB6	170	6,0	3,2428	0,3816	0,3930	0,0184
mEgR63	170	2,0	1,0731	-0,1500	-0,0455	0,0909
mEgR17	166	4,0	3,5796	0,5852	0,6041	0,0454
mEgR98	170	2,0	2,0000	-0,2652	-0,1298	0,1070
Média		3,6	2,5707	0,3417	0,3786	0,0561

Valores altos de heterozigosidade média esperada também foram observados nas amostras dos estados da Bahia (He = 0,5007) e do Piauí (He = 0,4732). O maior valor de identidade genética observado na comparação das amostras dos três estados foi observado entre as plântulas do Piauí e do Rio Grande do Norte (I = 0,9571) e a menor identidade foi estimada entre as plântulas da Bahia e Rio Grande do Norte (I = 0,8762), indicando que a maior identidade entre as amostras não está relacionada com a localização geográfica das mesmas. A ausência de correlação entre distância geográfica e distância genética foi conprovada pelo teste de Mantel, cujo valor de R_2 foi 4×10^{-6}.

MELHORE ESTA FIGURA. A IMPRESSÃO ESTÁ RUIM

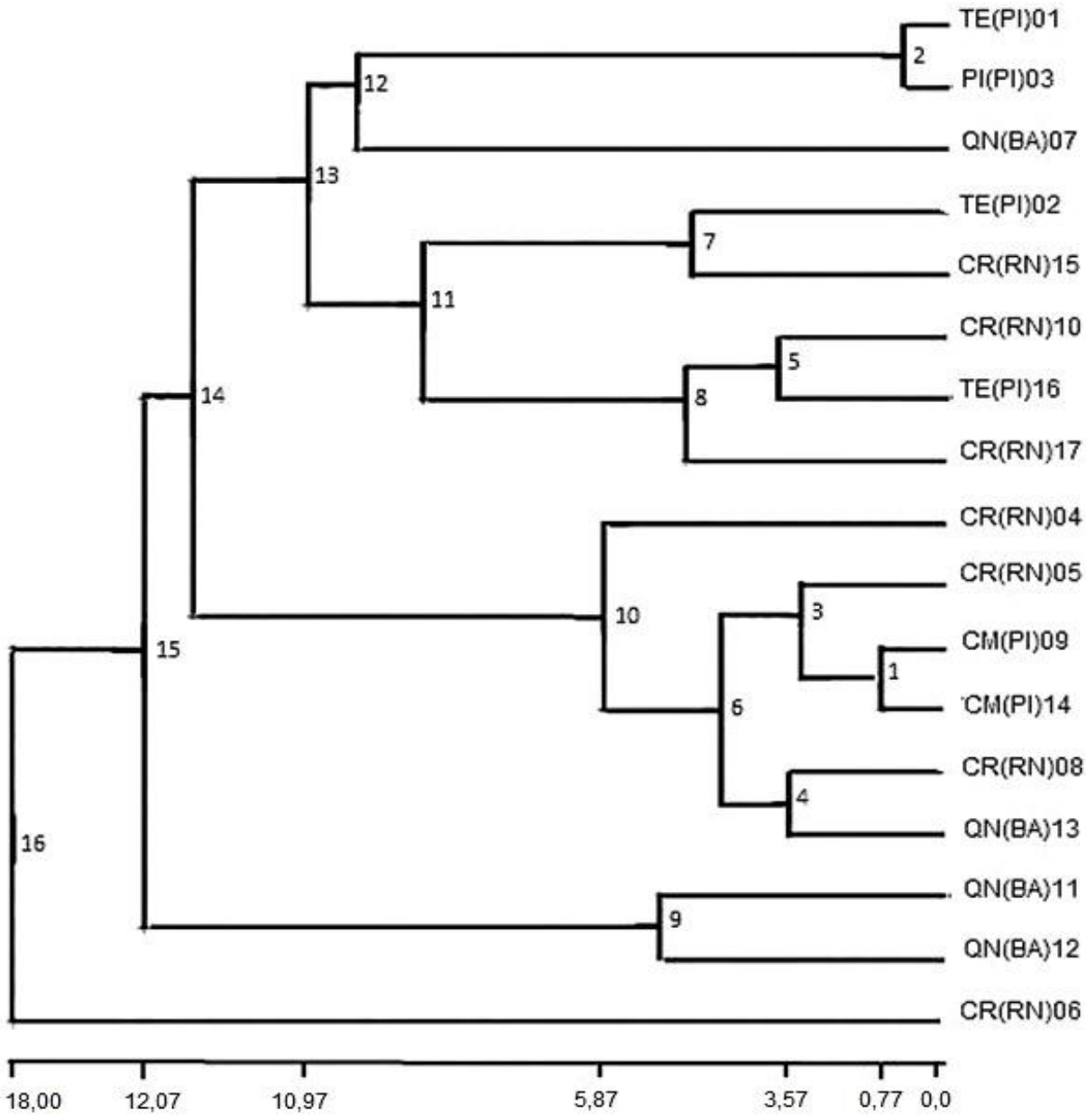


Figura 12 - Dendrograma gerado pelo método de UPGMA para distâncias genéticas obtidas pelo método de Nei (1978) entre as plântulas descendentes das 17 amostras de *Pilosocereus gounellei,* utilizando o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999).

A determinação das relações de identidade e divergência entre as populações é um fator importante para conhecer os genótipos de cada uma delas, no sentido de orientar o manejo destas, seja para organizar reservas de biodiversidade para a espécie, selecionando sementes dos locais que apresentaram maior polimorfismo, seja para programar cruzamentos entre exemplares geneticamente mais distantes e, principalmente, para ilustrar o intervalo detectado

na espécie. As amostras de *P. gounellei* de qualquer um dos três estados podem ser indicadas para compor programas de conservação da espécie.

Quadro 19 - Análise da variância molecular (AMOVA) para 85 genótipos de *Pilosocereus gounellei* de 17 amostras baseada em seis *loci* polimórficos

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentagem de variação
Entre amostras	16	97,353	6,085	28%
Dentro das amostras	68	141,800	2,085	72%
Total	84	239,153		100%

Considerando a alta divergência genética encontrada entre as amostras de um mesmo estado, as plântulas com menor identidade genética (Figura 12) podem ser selecionadas para cruzamentos, visando à ampliação da base genética da espécie para subsidiar programas de melhoramento.

4. CONCLUSÕES

A metodologia de transferência de microssatélites de diferentes espécies de cactáceas para *Pilosocereus gounellei* pode ser considerada eficiente para evidenciar vários *loci* e identificar diferentes alelos. Este procedimento foi eficiente para caracterizar geneticamente as plântulas descendentes das 17 amostras de populações e também o poderá ser para analisar a diversidade genética de populações de *P. gounellei* distribuídas em diferentes regiões.

Há baixa divergência genética entre as amostras de *P. gounellei* dos três estados analisados, sendo possível a coleta de amostras em qualquer um dos três locais para representar a diversidade genética contida na espécie. A divergência genética é alta dentro das amostras de cada estado.

Os *primers* AaB6, AaH11, mEgR17, *mEgR63, mEgR98, Pchi21, Pchi44* e *Pchi47* podem ser recomendados para comparar e discriminar amostras de populações de *P. gounellei.*

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CARVALHO, V.M.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Seed germination of the *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) somaclones follows a relatively simple protocol. **Seed Science and Technology**, 36:595-560, 2008.

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. Webwr ex K. Schum.) Bly. ex Rowl.) e coroa-de-frade. **Caatinga**, 20:28-35, 2007.

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

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131:479-491, 1992.

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

GARCÍA-MORENO, M.J.; VELASCO, L.; PÉREZ-VICH, B. Transferability of non-genic microsatellite and gene-based sunflower markers to safflower. **Euphytica**, 175:145-150, 2010.

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

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

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

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

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

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

MANTEL, N. Detection of disease, clustering and genetalized regression approach. **Cancer Research**, 27:209-220, 1967.

MENEZES, M.O.T.; TAYLOR, N.P.; MACHADO, M.C.; CORREIA, D.; COELHO, P. J.A. Diversity and distribution of Cactaceae in Ceará state, North-eastern Brazil. **Bradleya**, 29:13-42, 2011.

MORAES, E.M.; ABREU, A.G.; ANDRADE, S.C.S.; SENE, F.M.; SOLFERINI, V.N. Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil. **Genetica**, 125:311-323, 2005.

NASCIMENTO, V.T.; VASCONCELOS, M.A.S.; MACIEL, M.I.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Famine foods of brazil's seasonal dry forests: ethnobotanical and nutritional aspects. **Economic Botany**, 66: 22-34, 2012.

NEI, M. Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. **Theoretical Population Biology**, 3:460-465, 1972.

OTERO-ARNAIZ, A.; CRUSE-SANDERS, J.; CASAS, A.; HAMRICK, J.L. Isolation and characterization of microsatellites in the columnar cactus: *Polaskia chichipe* and

cross-species amplification within the Tribe Pachycereeae (Cactaceae). **Molecular Ecology Notes**, 4:265-267, 2004.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, 28:2537-2539, 2012.

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

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

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

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research. Disponível em: http://www.ualberta.ca/~fyeh/. Acesso em: 20, abril, 2013.

CAPÍTULO II

Diversidade genética de *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae), utilizando AFLP

RESUMO

Empregou-se a técnica de marcador molecular AFLP (*Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados*) para estimar a diversidade genética em 21 amostras de *P. gounellei,* provenientes dos estados do Piauí, Bahia e Rio Grande do Norte, no Brasil. As sete combinações de *primers* AFLP geraram 703 fragmentos, dos quais 700 (99,21%) foram polimórficos entre as 21 amostras estudadas. A porcentagem média de *loci* polimórficos entre as combinações utilizadas variou de 95,3%, para a combinação E-AAG/M-CTT, a 100% para as combinações E-ACC/M-CAT, E-ACC/M-CAA, EAGC/M-CAG, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTA e E-AGG/M-CTG. O maior número de *loci* informativos (126) foi detectado com a combinação E-AAC/M-CTA, enquanto a combinação E-AAG/M-CTT revelou o menor número de bandas informativas (48). O baixo valor do G_{ST} (0,1353) e alto valor de fluxo gênico (3,1968) indicam que a diferenciação gênica dentro das populações dos três estados é maior do que entre as populações dos três estados. No dendrograma baseado no Coeficiente de similaridade de Jaccard, as amostras foram distribuídas em dois grupos. Por meio deste agrupamento, ficou clara a existência de maior similaridade entre os três estados e menor similaridade dentro dos mesmos. Os marcadores AFLP foram eficientes para a caracterização genética de *P. gounellei*, gerando alto polimorfismo nas amostras das três populações analisadas.

Palavras-chave: Cactáceas, caracterização genética, polimorfismo, xiquexique.

Genetic Diversity of *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) using AFLP marker

ABSTRACT

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis was used to evaluate the polymorphism at the DNA level of *P. gounellei* and to differentiate between 21 samples grown in different regions of Brazil. The seven primer pairs used amplified 703 AFLP markers, of which 700 (99.21%) were polymorphic. The percentage of polymorphic fragments ranged from 95.3% for the primer combination E-AAG/M-CTT to 100% for E-ACC/M-CAT, E-ACC/M-CAA, EAGC/M-CAG, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTA e E-AGG/M-CTG. The largest number of informative markers (126) was detected using the primer combination E-AAC/M-CTA, while the E-AAG/M-CTT combination revealed the lowest number of polymorphic fragments (48) in the *P. gounellei* plantlets. The low value of GST (0.1353) and high amount of gene flow (3.1968) indicate that the genetic differentiation within populations of the three states is higher than among the populations of the three states. In the dendrogram based on the Jaccard similarity coefficient, the samples were divided into two groups. Through this grouping was clear that there is greater similarity between the three states and lower similarity within them. Our results demonstrated that AFLP markers were efficient to genetic characterization *P. gounellei* and yeld high polymorphism in the samples of three avaluated populations.

Key words: Cactaceas, genetic characterization, polymorphism, xiquexique.

1. INTRODUÇÃO

A família Cactaceae possui grande importância econômica, principalmente pelos valores ornamental e forrageiro. Na região semiárida do Nordeste brasileiro, ocorrem diversas Cactáceas de grande importância para fauna e flora regional. Espécies pertencentes aos gêneros *Cereus*, *Opuntia* e *Pilosocereus* são utilizadas para a alimentação de bovinos, caprinos e ovinos, principalmente na época de estiagem (Rocha e Agra, 2002). Os frutos de cactos também constituem uma fonte de recurso para a alimentação humana (Albuquerque e Andrade, 2002; Almeida et al., 2007).

O cacto conhecido popularmente pelo nome de xiquexique pertence à espécie *Pilosocereus gounellei* (Web.) Byl. & Rowl. (Byles; Rowley, 1957). Essa planta é utilizada pelos agropecuaristas, como uma alternativa para alimentar os animais (Barbosa et al., 2007). No trabalho realizado por Silva et al. (2005), os autores ressaltaram a importância dessa cactácea forrageira como reserva estratégica para sistemas pecuários do semiárido. Avaliaram os efeitos de cinco níveis de xiquexique (0%; 12,5%; 25%; 37,5% e 50%) em substituição à silagem de sorgo forrageiro em dietas para vacas pardo-suíças em lactação e concluíram que não houve efeito dos níveis de xiquexique na dieta sobre a produção e composição química do leite. Dessa forma, a inclusão de xiquexique proporcionou consumo de nutrientes suficiente para atender às exigências dos animais.

Em relação ao consumo humano de frutos de xiquexique, há registros de consumo *in natura* (Barbosa et al., 2007; Lucena et al. 2012). De acordo com Almeida et al. (2007), essa polpa tem uma consistência que lembra o mamão verde e é utilizada na elaboração de biscoitos, bolos e doces. Depois de seca e transformada em pó, ela apresenta um aroma agradável e suave, podendo ser incorporada ao trigo para a elaboração de produtos de panificação.

Com tantos usos relatados para uma planta endêmica da região semiárida, fica evidente o desafio de se utilizar os recursos da Caatinga de maneira sustentável. A esse respeito, Arif et al. (2010) afirmaram que a identificação apropriada e a caracterização de materiais vegetais é essencial para a conservação bem sucedida de recursos vegetais e também para garantir seu uso sustentável. Para isso, as ferramentas moleculares desenvolvidas nos últimos anos fornecem

meios menos laboriosos para avaliar táxons de planta conhecidos e desconhecidos. É o caso do marcador molecular AFLP (*Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados*). Segundo Vos et al. (1995), a técnica AFLP é baseada na detecção de fragmentos de restrição genômicos pela amplificação PCR e pode ser usada para DNAs de qualquer origem ou complexidade. Comparado a outros métodos moleculares, essa técnica requer uma quantidade relativamente pequena de DNA e tem grande poder discriminatório e reprodutibilidade (Georgnaras et al., 1999). A técnica AFLP vem sendo empregada em algumas Cactáceas, como as pertencentes ao gênero *Opuntia* (Labra et al., 2003; Nilsen et al., 2005, GARCÍA-ZAMBRANO et al., 2009), *Gymnocalycium* (Repka e Mrácek, 2012) e *Cereus* spp (Faria-Tavares et al., 2013).

Não foram encontradas informações na literatura sobre parâmetros genéticos da espécie *P. gounellei*. Por isso, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de estimar a diversidade genética entre 21 amostras, provenientes dos estados da Bahia, Piauí e Rio Grande do Norte, fazendo uso da técnica AFLP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Para a análise da diversidade genética da espécie *Pilosocereus gounellei* com o uso da técnica de marcador molecular AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), foram utilizadas 21 plântulas (amostras), coletadas em jardins, em áreas de ocorrência natural e de campo experimental e de produção nos estados do Piauí (Campo Maior, Picos e Teresina), Rio Grande do Norte (Cruzeta) e Bahia (Oliveira dos brejinhos, localidade Queimada Nova), (Quadro 20 e Figura 13). A germinação das sementes foi realizada conforme o procedimento descrito no capítulo 1.

Quadro 20 - Número de cada amostra de *Pilosocereus gounellei*, código da amostra, cidade e estado, de onde foram coletados os frutos para a avaliação da diversidade genética com a técnica AFLP

Número da amostra	Código da amostra	Cidade/estado
1	J1P1	Teresina (PI)
2	J2P2	
3	THE06	
4	Picos06	Picos (PI)
5	CM2	Campo Maior (PI)
6	CM4	
7	QNBA3	Oliveira dos Brejinhos, localidade Queimada Nova (BA)
8	QNBA6	
9	QNBA7	
10	QNBA8	
11	QNBA9	
12	CZRN1	Cruzeta (RN)
13	CZRN2	
14	CZRN3	
15	CZRN4	
16	CZRN5	
17	CZRN9	
18	CZRN11	
19	CZRN12	
20	CZRN13	
21	CZRN14	

Figura 13 - Locais de coleta de frutos de xiquexique.
Adaptado de http://www.not1.xpg.com.br/wp-content/uploads/2010/07/brasil-regiao-nordeste.gif.

2.2. Extração do DNA e quantificação do DNA

O DNA genômico de 21 plântulas de *P. gounellei* foi extraído utilizando o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999), com algumas modificações (Quadro 21). As plântulas previamente maceradas com nitrogênio líquido foram colocadas em microtubos (2 mL), sendo adicionados 300 µL de tampão de extração e 100 µL de cada um dos reagentes de solubilização de membranas e antioxidantes.

Os microtubos foram agitados para homogeneização e incubados em banho-maria, durante 1 hora, a 65 °C, realizando agitações suaves a cada 15 minutos. Após os microtubos terem sido retirados da incubação, foram deixados por 5 minutos em temperatura ambiente para esfriar. Em seguida, foi adicionada uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 25:24:1, e os microtubos foram agitados suavemente durante cinco minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 rpm, em temperatura ambiente. Logo após, o

sobrenadante foi recuperado e transferido para um microtubo (1,5 mL), adicionando, na sequência, 2,5 µL de RNase (10 mg/mL). Os sobrenadantes recuperados foram mantidos em temperatura ambiente por duas horas para a digestão do RNA. Após o período de incubação com RNase, foram acrescentados 600 µL de uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1 e os microtubos foram agitados durante 5 minutos, repetindo-se o mesmo procedimento de centrifugação descrito anteriormente. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo (1,5 mL), no qual foram adicionados 400 µL de Acetato de Amônio 7,5 M. Em seguida, os tubos foram vertidos suavemente e colocados no gelo por 20 minutos, sendo, depois, centrifugados por 30 minutos, a 10.000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi novamente coletado e transferido para outro microtubo (1,5 mL), no qual foi adicionado igual volume de isopropanol e cloreto de sódio, equivalente a 1/6 do volume do sobrenadante, a fim de precipitar o DNA. Em seguida, os tubos foram mantidos *overnight* em -20 °C.

Quadro 21 - Protocolo utilizado para a extração de DNA de tecidos de caules de plântulas de *Pilosocereus gounellei,* segundo Aljanabi et al. (1999)

Tampão de extração	
Tris-HCL	200 mmol/L pH 8,0
EDTA	50 mmol/L pH 8,0
NaCl	3 mol/L
CTAB	3%
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
Acetato de Amônio 7,5 mol/L	400 µL
Reagentes de Precipitação	
Isopropanol gelado	1 volume
NaCl (5 mol/L)	0, 16 volume
Lavagem do precipitado	
Álcool (70%) (2x)	500 µL

Após este período, foi efetuada uma centrifugação por 20 minutos, a 10.000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com

etanol 70% gelado, por duas vezes. Após a segunda lavagem com etanol absoluto, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi seco e ressuspendido em 40 µL de TE (10 mM Tris/HCl e 1 mM EDTA). Os tubos foram vedados com filme plástico e armazenados em geladeira a 4 °C, após 2 horas de ressuspensão na bancada.

A quantificação da concentração de DNA (ng/µL) de cada amostra foi estimada pelas medidas de absorbância de A260nm e A280nm, com o auxílio do espectrofotômetro Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer (Picodrop Limited, UK), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Logo após, os DNAs foram diluídos para uma concentração final de 300 ng.

2.3. Ensaios de AFLP

A técnica de AFLP realizada foi composta pelas etapas de digestão do DNA genômico com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Mse*I, ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos de DNA gerados pela clivagem e pré-amplificação dos fragmentos de restrição, utilizando os *primers* com um nucleotídeo seletivo e amplificação seletiva de fragmentos com *primers* possuindo três bases seletivas. Após a clivagem e amplificação do DNA, foi realizada eletroforese para a separação dos fragmentos de DNA amplificados em gel de poliacrilamida.

Para a execução dessa técnica, utilizou-se o *AFLP® Analysis System I* e o *AFLP® Starter Primer Kit* da *Invitrogen*.

2.3.1. Reação de digestão do DNA

Para a digestão, foi utilizado 300ng do DNA genômico extraído de cada plântula. Os DNAs das 21 plântulas foram duplamente e simultaneamente digeridos, utilizando uma enzima de corte raro, a *Eco*RI, e uma enzima de corte frequente, a *Mse*I (Quadro 22). A digestão foi realizada em termociclador (Techne TC-512), por 3 horas, a 37 °C, por 15 minutos de extensão a 70 °C e imersão a 10 °C. A solução de restrição foi preparada com 5 µL do tampão de reação 5X [Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), acetato de magnésio 50 mM, acetato de potássio 250 mM], 2,4 µL das enzimas *Eco*RI/*Mse*I [1,25U/µL cada, em Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), NaCl 50mM, EDTA 0,1

mM, DTT 1 mM, 0,1 mg/mL BSA, glicerol 50% (v/v), 0,1% Triton® x-100], 4,6 μL de água destilada e 12 μL de DNA (25 ng/μL), totalizado um volume de 25 μL.

2.3.2. Ligação de adaptadores

Uma vez que o DNA genômico foi digerido, foi realizada a ligação dos adaptadores aos mesmos, ligação esta necessária para gerar os DNAs moldes para a amplificação (Quadro 22). Esta tarefa foi realizada adicionando-se aos 25 μL de DNA digerido, proveniente da etapa anterior, 24 μL da solução ligante do adaptador [Adaptadores *Eco*RI/*Mse*I, ATP 0,4 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), acetato de magnésio 10 mM, acetato de potássio 50 mM] e 1μL da enzima T_4 Dna ligase [1U/μL em 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), DTT 1 mM, KCl 50 mM, glicerol 50% (v/v)]. Após uma delicada agitação, esta mistura foi colocada em termociclador Veriti, por duas horas e trinta, a 20 °C e imersão a 4 °C.

Quadro 22 - Sítios de restrição das endonucleases, seqüências dos adaptadores e dos *primers* pré-seletivos complementares aos adaptadores, utilizados para realização da técnica AFLP em plântulas de *Pilosocereus gounellei,* segundo Labra et al. (2003)

Enzima	Sítios de restrição	Adaptadores	*Primers* pré-seletivos ou Iniciadores, complementares as sequências dos adaptadores
*Eco*RI	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'	5'-GACTGCGTACCAATTC E-3'
*Mse*I	5'...T↓TAA...3' 3'...AAT↑T...5'	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'	5'-GATGAGTCCTGAGTAA E-3'

E, nucleotídeo arbitrário usado na pré-amplificação.

2.3.3. Pré-amplificação

A reação de pré-amplificação foi realizada utilizando-se *primers* pré-seletivos complementares à sequência dos adaptadores e com um nucleotídeo seletivo (Quadro 23). Para a pré-amplificação, foram utilizados 2,5 μL dos DNAs já ligados aos adaptadores (obtidos da etapa anterior), 20 μL da mistura de *primer* para a pré-amplificação, 2,5 μL do tampão PCR plus Mg (10X) [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4), $MgCl_2$ 15 mM, KCl 500 mM] e 0,5 μL de *Taq-platinum* DNA polimerase (5U/μL), totalizando um volume de 25,5 μL. Esta reação foi realizada no termociclador

Techne TC-512, utilizando os parâmetros de amplificação descritos por Labra et al. (2003) (Quadro 22).

Quadro 23 - Sequência do programa utilizado para amplificação do DNA de *Pilosocereus gounellei* com os *primers* pré-seletivos

Passo	Etapa	Temperatura	tempo
1	Desnaturação inicial	95 °C	2 minutos
2	Desnaturação	94 °C	45 segundos
3	Anelamento	52 °C	1 minuto
4	Extensão	72 °C	1 minuto
5	Voltar aos passos 2, 3 e 4 por 19 vezes		
6	Extensão final	72 °C	10 minuto
7	Imersão	10 °C	∞

2.3.4. Amplificação seletiva

As reações de amplificação seletiva foram realizadas utilizando-se sete combinações de *primers*, contendo três nucleotídeos seletivos. As combinações e sequências de *primers* utilizadas para as reações de amplificação seletiva estão apresentadas no Quadro 24.

Quadro 24 - Sete combinações e sequências dos *primers* seletivos, utilizadas para as reações de amplificação seletiva dos DNAs das plântulas de *Pilosocereus gounellei*

Primers	Seqüências
E-AAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
M-CTT	5' -GAT GAG TCC TGA GTA ACTT-3'
E-ACC	5'-GACTGCGTACCAATCACC-3'
M-CAT	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3’
E-ACC	5'-GACTGCGTACCAATCACC-3'
M-CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
E-AGC	5'- GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
M-CAG	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3’
E-AAC	5’-GACTGCGTACCAATTCAAC-3’
M-CTA	5’-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3’
E-ACT	5’-GACTGCGTACCAATTCACT-3’
M-CTA	5’-GAT GAG TCC TGA GTA ACTA-3’
E-AGG	5’-GACTGCGTACCAATTCAGG-3’
M-CTG	5’-GAT GAG TCC TGA GTA ACTG-3’

E = *primers* complementares ao sítio de restrição da enzima *Eco*RI. M = *primers* complementares ao sítio de restrição da enzima *Mse*I.

Para cada par de *primer* escolhido, foram preparadas duas soluções *Mix* para as 21 amostras de DNAs. Na solução *Mix I*, foram utilizados 5,25 μL de *primer Eco*RI e 47,25 μL do *primer Mse*I, totalizando 52,5 μL. Para a solução *Mix II,* foram utilizados 165,9 μL de água destilada, 42 μL do tampão PCR plus Mg (10X) e 2,1 μL de *Taq-platinum* DNA polimerase (5U/μL), totalizando 210 μL.

A reação de amplificação seletiva para cada amostra de DNA das 21 plântulas de *P. gounellei* foi realizada, utilizando 2,5 μL da solução *Mix I*, 5 μL da solução *Mix II* e 2,5 μL de cada amostra de DNA pré-amplificado concentrado. Estas reações foram realizadas no termociclador Techne TC-512, com o programa descrito no Quadro 25, de acordo com o protocolo do kit utilizado.

Quadro 25 - Sequência do programa utilizado para amplificação seletiva dos DNAs de *Pilosocereus gounellei*

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94 ºC	2 min
2	Desnaturação	94 ºC	30 s
3	Anelamento	54 ºC	30 s
4	Extensão	72 ºC	1 min
5	Voltar ao passo 2,3 e 4 por 29 vezes		
6	Extensão final	72 ºC	10 min
9	Imersão	10 ºC	∞

2.4. Preparo dos géis e condições da eletroforese

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

A solução estoque para a preparação do gel de poliacrilamida desnaturante foi feita segundo Creste et al. (2001). Os constituites desta solução estão apresentados no Quadro 26. Esta solução estoque foi preparada e armazenada em frasco escuro a 4 °C. A solução de acrilamida/bisacrilamida (40%) estoque foi preparada com 38,62 g de acrilamida e 1,38 g de bisacrilamida, dissolvidas em 100 mL de água ultrapura. Após dissolvida e com o volume acertado, esta solução foi filtrada em papel de filtro.

Quadro 26 - Volumes dos reagentes utilizados para o preparo da solução estoque dos géis de poliacrilamida segundo Creste et al. (2001)

Solução Estoque	Volume
Solução Acrilamida/bisacrilamida 40%*	50 mL
Tampão TBE (5x)	50 mL
Ureia	105 g
Água Milli Q	Até completar 250 mL

Para preparar cada gel de poliacrilamida desnaturante 8% e com 7M de ureia, foram utilizados 80 mL da solução estoque de poliacrilamida, 320 μL de Persulfato de Amônia 10% e 134 μL de TEMED. Depois do preparo, esta solução foi acondicionada entre as placas com o auxílio de uma seringa de tamanho grande. Este procedimento foi realizado de forma contínua e cuidadosa, com a placa na posição vertical, evitando, assim para evitar a formação de bolhas. Após o completo preenchimento desta solução entre as placas, introduziu-se o pente com a parte lisa voltada para a solução, visando a delimitar o espaço onde, posteriormente, se aplicou as amostras.

Após a polimerização do gel, realizou-se uma pré-corrida de 1 hora em cuba de eletroforese vertical (Fisher Scientific-FB-SEQ-3445), sem o pente, com tampão TBE 1X (89 mM Tris-Base, 89 mM de ácido bórico e 2 mM EDTA, pH 8), ligada a uma fonte de alta voltagem com 1700 V, 65 W e 50 mA. Em sequida à pré-corrida, foi feita a lavagem da região superior do gel, injetando tampão com uma seringa. Após a completa lavagem, o pente foi introduzido até os dentes entrarem em contato com o gel.

No intervalo da pré-corrida preparou-se as amostras de DNA amplificadas para a desnaturação. Para isso, foi adicionado 3 μL do tampão de desnaturação (Formamida 99%, EDTA 10 mM (pH 8,0), 1 mg/mL de xileno cyanol e 1 mg/mL de

azul de bromophenol) a um volume de 4 μL de cada amostra, realizando-se a desnaturação por três minutos, a 94 °C, em termociclador Techne TC-512, sendo as amostras imediatamente resfriadas em gelo e aplicadas no gel. Ao término de 3 horas e 15 minutos de corrida (sob as mesmas condições da pré-corrida), quando as placas alcançaram a temperatura ambiente e com a saída das frontes de azul do gel, a fonte foi desligada e as placas retiradas da cuba de eletroforese. A seguir, as placas foram separadas com o auxílio de uma espátula. Somente a placa tratada com *Bind Silane* foi utilizada no processo de coloração com nitrato de prata, de acordo com os procedimentos descritos por Beidler et al. (1982), alterando as concentrações das soluções fixadora I e finalizadora e também eliminando o enxágue após a impregnação com nitrato de prata (Quadro 27).

Quadro 27 - Protocolo com modificações, utilizado para coloração do gel de poliacrilamida, segundo Beidler et al. (1982)

Procedimento	Solução	Tempo
Fixação I	Ácido acético 0,5%, etanol 5%	20 minutos
Enxágüe II	Água destilada	05 minutos (2x)
Fixação II	1,5% ácido nítrico	03 minutos
Enxágüe II	Água destilada	05 minutos (2x)
Impregnação	0,2% nitrato de prata	60 minutos
Revelação	3% Na_2CO_3;0,05% de Formaldeído 37%	50 minutos
Finalização	Ácido acético 10%	20 minutos
Conservação	Água destilada	

2.5. Análise dos dados

Os fragmentos clivados com as enzimas *Eco*RI e *Mse*I, amplificados com as sete combinações de *primers* seletivos e evidenciados nos géis de poliacrilamida foram lidos. A leitura foi realizada comparando os perfis de AFLP de cada plântula em termos de presença ou de ausência de cada fragmento de DNA. A partir desta leitura, foi montada uma matriz binária de dados, sendo atribuído o valor “um” para a presença do fragmento e valor “zero” para a ausência do mesmo.

A diversidade genética dentro e entre as três populações foi determinada pela porcentagem de *loci* polimórficos. A diversidade genética das três populações analisadas foi estimada pelo coeficiente de diferenciação genética (Gst), pela diversidade genética total entre os acessos (Ht) e pelo fluxo gênico (Nm). Foi

construído o dendrograma usando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*), para as três populações analisadas, baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978). Para o cálculo dessas análises, foi utilizado o programa Popgene 1.32 (Yeh et al., 1999).

Os programas FreeTree e TreeView foram utilizados para construir o dendrograma e o fenograma para as 21 amostras de *P. gounellei*. Para estimar a robustez dos nós, foi realizada a análise bootstrap (1000 repetições) com os mesmos programas. Uma matriz binária foi usada para estimar similaridade genética entre as 21 amostras, usando o coeficiente de similaridade de Jaccard. O programa NTSYS (Rohlf, 1989) foi usado para calcular similaridades entre pares de indivíduos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sete combinações de *primers* usadas para amplificação seletiva (Quadro 28) geraram um total de 703 fragmentos, dos quais 700 (99,21%) foram polimórficos entre as 21 amostras estudadas. A porcentagem média de *loci* polimórficos entre as combinações utilizadas variou de 95,3%, para a combinação E-AAG/M-CTT, a 100%, para as combinações E-ACC/M-CAT, E-ACC/M-CAA, EAGC/M-CAG, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTA e E-AGG/M-CTG (Figura 14). O maior número de *loci* informativos (126) foi detectado com a combinação E-AAC/M-CTA, enquanto a combinação E-AAG/M-CTT revelou o menor número de bandas informativas (48) (Quadro 28).

Quadro 28 - Número de *loci* amplificados, número de *loci* polimórficos (lp), número de *loci* monomórficos (lm) e porcentagem de polimorfismo para cada combinação de *primer* AFLP nas 21 amostras analisadas de *Pilosocereus gounellei*

Combinações de *primers*	*Loci* amplificados	N(lp)	N (lm)	% P
1-E-AAG, M-CTT	48	46	2	95,3%
2-E-ACC, M-CAT	82	82	0	100%
3-E-ACC, M-CAA	96	96	0	100%
4-EAGC, M-CAG	122	122	0	100%
5-E-AAC, M-CTA	126	125	1	99,2%
6-E-ACT, M-CTA	118	118	0	100%
7-E-AGG, M-CTG	111	111	0	100%
Total	703	700	3	99,21%

As porcentagens de polimorfismo observadas revelaram eficiência da técnica AFLP. De acordo Wünsch e Hormaza (2002), embora os AFLPs sejam marcadores dominantes, eles revelam um alto nível de polimorfismo e uma grande quantidade de fragmentos por ensaio, resultando em uma elevada capacidade de discriminação para análise de germoplasma.

A análise da proporção de *loci* AFLP polimórficos para as amostras de cada uma das três populações de *P. gounellei* evidenciou um polimorfismo médio de 75,39% (Quadro 29), sendo a população 3 a mais polimórfica (82,79 %) e a população 2 a menos polimórfica (70,84 %). O valor do polimorfismo médio das amostras das três populações de *P. gounellei* foi ligeiramente mais expressivo que o polimorfismo estimado pelos marcadores microssatélites mostrados no capítulo 1,

que foi de 73,05% (Quadro 13). A população 3 também exibiu a maior diversidade genética (h=0,2949) e maior valor do índice de Shannon (0,4384). A média dos valores de diversidade genética (0,2650) de cada uma das três populações equivale à diversidade genética dentro das subpopulações (Hs) (Quadro 30).

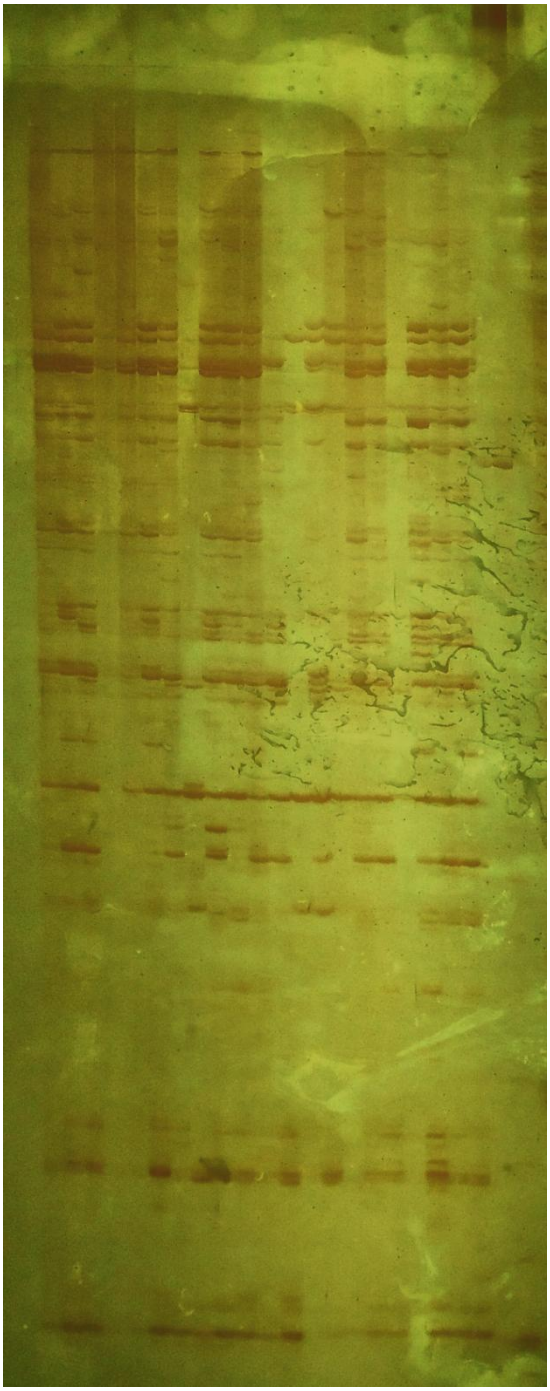


Figura 14 - Gel (8% de poliacrilamida e 7 M de ureia) utilizado para separar o produto da amplificação seletiva dos DNAs de 21 amostras de *Pilosocereus gounellei* com a combinação de *primers* AFLP E-AGG-M-CTG.

Quadro 29 - Porcentagem de *loci* polimórficos (%P) para cada uma das três populações de *Pilosocereus gounellei* analisadas com a técnica AFLP, valores de diversidade genética de Nei (h) (Nei, 1973) e índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972)

Populações	Número de *loci* polimórficos	%P	h	I
1 - Piauí	510	72,55 %	0,2628	0,3907
2 - Bahia	498	70,84 %	0,2373	0,3606
3 - Rio Grande do Norte	582	82,79 %	0,2949	0,4384
Média	530	75,39%	0,2650	0,3966

A diversidade genética na população total é $H_T = H_S + D_{ST}$, sendo H_S a diversidade genética dentro das subpopulações e D_{ST} a diversidade genética média entre subpopulações. Para medir a diferenciação da população total é usado o G_{ST}, cuja formula é $G_{ST} = D_{ST}/H_T$. O G_{ST} é equivalente ao F_{ST} de Wright e, se houver somente dois alelos no *locus* (Nei, 1973), pode ser chamado de coeficiente de diferenciação genética. Esta definição de G_{ST} não considera o número de locais, assim como diferenças nos tamanhos de amostra em diferentes locais (Slatkin e Barton,1989). Subtraindo os valores de H_T (0,3064) e H_S (0,2650) (Quadro 29), o valor encontrado será correspondente a D_{ST} (0,0414), significando que a diversidade genética entre as populações dos três estados é menor que a diversidade genética dentro destas. O baixo valor do G_{ST} (0,1353) e alto valor de fluxo gênico (3,1968) indicam que a diferenciação genética dentro das populações dos três estados é maior que entre tais populações (Quadro 30).

Quadro 30 - Estimativas da diversidade genética na população total (H_T), diversidade genética dentro das subpopulações (H_S), coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}) e estimativa de fluxo gênico de G_{ST} (Nm) para as 21 amostras de *Pilosocereus gounellei* analisadas

Parâmetros	H_T*	H_S*	G_{ST}*	Nm
Média	0,3064	0,2650	0,1353	3,1968
Desvio padrão	0,0243	0,0193	…	…

* Nei (1973); $Nm = 0,5 (1 - G_{ST})/ G_{ST}$

Os valores de Identidade genética de Nei e distância genética de Nei (Nei, 1978), apresentados no Quadro 31, evidenciaram uma grande proximidade entre as populações dos três estados, por terem sido altos os valores de identidade genética, havendo, no entanto, maior identidade genética (0,9553) entre a população 1 (Piauí)

e a população 3 (Rio Grande do Norte). Pelo fato de haver alta identidade genética entre os três estados, os valores de distância genética foram baixos, sendo observada uma menor distância genética entre as populações do Piauí e Rio Grande do Norte (0,0457). A pequena distância genética entre os dois últimos Estados pode também ser observada no dendrograma da Figura 15.

Quadro 31 - Identidade genética de Nei e distância genética de Nei entre as plântulas descendentes das 21 amostras de *Pilosocereus gounellei* analisadas com marcador AFLP

Populações	1 PI	2 BA	3 RN
1 - Piauí	********	0,9403	0,9553
2 - Bahia	0,0616	********	0,9361
3 - Rio Grande do Norte	0,0457	0,0661	********

Identidade genética de Nei (I) (acima da diagonal); Distância genética (D) (abaixo da diagonal).

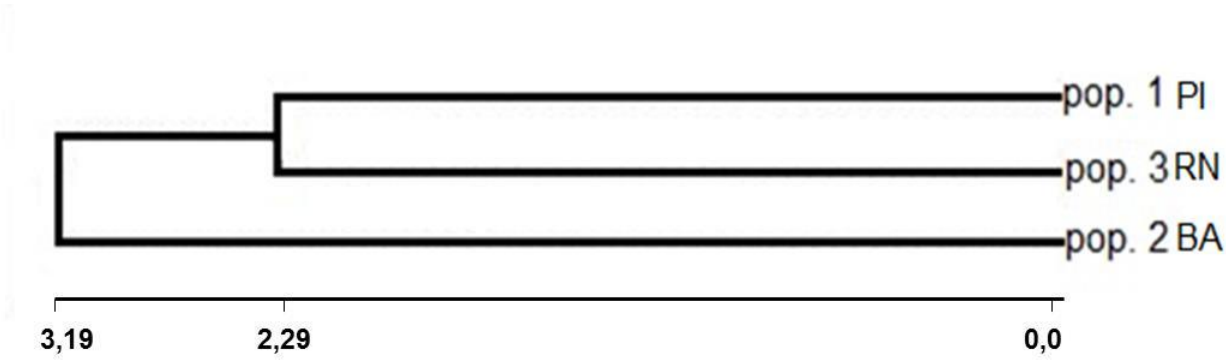
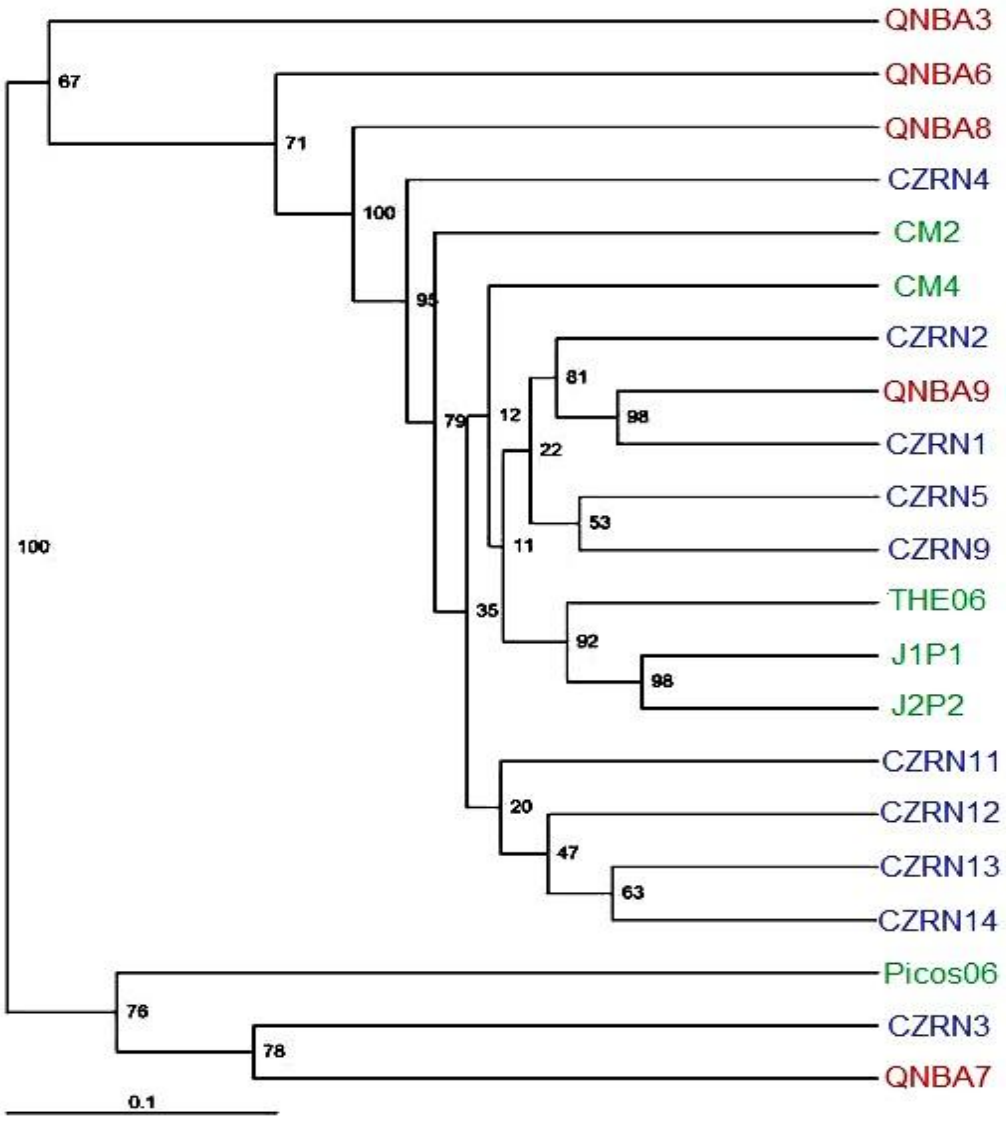


Figura 15 - Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), obtido com os dados de marcadores AFLP entre as três populações de *Pilosocereus gounellei*. Programa Popgene 1.32 (Yeh et al., 1999).

No dendrograma baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard (Figura 16), as amostras foram distribuídas em dois grupos. O grupo 1 foi constituído por 18 amostras, QNBA3, QNBA6, QNBA8, CZRN4, CM2, CM4, CZRN2, QNBA9, CZRN1, CZRN5, CZRN9, THE06, J1P1, J2P2, CZRN11, CZRN12,CZRN13 e CZRN14. No grupo 2 foram alocadas as amostras Picos06, CZRN3 e QNBA7. Por meio deste agrupamento ficou clara a existência de maior similaridade entre os três estados e menor similaridade dentro dos mesmos. Assim, o grupo 1 reuniu quase todas as amostras dos três estados. Até mesmo as amostras da Bahia, que apresentaram um valor de distância genética ligeiramente maior em relação ao Piauí e ao Rio Grande do Norte, ficaram nesse grupo. No grupo 2, por serem mais dissimilares, foi

encontrada uma amostra de cada estado, ficando as mesmas em um grupo separado.



Figrua 16 - Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, mostrando o relacionamento entre as 21 amostras de *Pilosocereus gounellei* dos estados do Piauí, Bahia e Rio Grande do Norte. Programas FreeTree e TreeView.

4. CONCLUSÕES

Os marcadores AFLP foram eficientes para a caracterização genética de *P. gounellei*, pois geraram alto polimorfismo para 21 amostras de três populações dos estados do Piauí, Bahia e Rio Grande do Norte, podendo ser recomendados como ferramentas moleculares para avaliar a diversidade genética de *P. gounellei*.

Considerando que há uma similaridade alta (I ≥ 0,93) entre as amostras dos três estados analisados, podem ser realizadas coletas em qualquer um dos três locais para representar a diversidade genética da espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciencia**, 27:336-346, 2002.

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

ALMEIDA, C.A.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M.; OLIVEIRA, F.M.N. Características físicas e químicas da polpa de xiquexique. **Revista Ciência Agronômica**, 38:440-443, 2007.

ANDRADE, A.P.; COSTA, R.G.; SANTOS, E.M.; SILVA, D.S. Produção animal no semiárido: o desafio de disponibilizar forragem, em quantidade e com qualidade, na estação seca. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, 4:01-14, 2010.

ARIF, I.A.; BAKIR, M.A.; KHAN, H.A.; FARHAN, A.H.; HOMAIDAN, A.A.l.; BAHKALI, A.H.; SADOON, M.; SHOBRAK, M. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity**. International Journal of Molecular Sciences,** 11:2079-2096, 2010.

BARBOSA, A.S.; ARAUJO, A.P.; CANUTO, T.M.; FRANCA, V.C. Caracterização física e físico-química dos frutos do mandacaru e xiquexique produzidos em região semi-árida do Nordeste Brasileiro. **Química no Brasil**, 1:71-76, 2007.

BEIDLER, J.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. **Analytical Biochemistry**, 126:374-380, 1982.

BYLES, R.S.; ROWLEY, G.D. *Pilosocereus* Byl. & Rowl. nom. gen. nov. *(Cactaceae)* (*Pilocereus* K. Schum, non Lem.). **The Cactus and Succulent Journal of Great Britain**. 19:66-67, 1957.

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

DATTA, S.; KAASHYAP, M.; KUMAR, S. **Plant Breeding**. 129: 334-340, 2010.

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

GARCÍA-ZAMBRANO, E.A.; ZAVALA-GARCÍA, F.; GUTIÉRREZ-DIEZ, A.; OJEDA-ZACARÍAS, M.C.; CERDA-HURTADO, I. Estimation of the genetic diversity of *Opuntia* spp. using molecular markers AFLP. **Phyton**, 78:117-120, 2009.

GEORNARAS, I.; KUNENE, N.F.; VON HOLY, A.; HASTINGS, J.W. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of *Pseudomonas* strains from a poultry processing. **Plant Microbiology**, 65:3828-3833,1999.

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

LEWONTIN, R.C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, 6:381-398, 1972.

LUCENA, C.M.; COSTA, G.M.; SOUSA, R.F.; CARVALHO, T.K.N.; MARREIROS, N.A.; ALVES, C.A.B.; PEREIRA, D.D.; LUCENA, R.F.P. Conhecimento local sobre cactáceas em comunidades rurais na mesorregião do sertão da Paraíba (Nordeste, Brasil). **Biotemas**, 25:281-291, 2012.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 70:3321-3323, 1973.

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

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

REPKA, R.R.; MRÁCEK, J. Gymnocalycium esperanzae: A Nothospecies?. **Haseltonia**, 18:105-115, 2012.

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

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

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

SLATKIN, M.; BARTON, N.H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, 43:1349-1368, 1989.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE,T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 21:4407-4414, 1995.

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

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research. Disponível em: http://www.ualberta.ca/~fyeh/. Acesso em: 20, novembro, 2012.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A metodologia de transferência de microssatélites de diferentes espécies de cactáceas para *P. gounellei* pode ser considerada eficiente para evidenciar vários *loci* e identificar diferentes alelos. Este procedimento foi eficiente para caracterizar geneticamente os descendentes de 85 plântulas de *P. gounellei* e também poderá ser para analisar a diversidade genética de amostras desta espécie distribuídas em diferentes regiões do Brasil.

Os marcadores AFLP podem ser recomendados como ferramentas moleculares úteis para estudos de diversidade genética em *P. gounellei*, pela alta capacidade de detectar polimorfismo genético.

Os marcadores moleculares microssatélites (codominantes) e AFLP (dominantes) foram concordantes em revelar baixa diferenciação genética entre os três estados analisados e alta diversidade dentro de cada local.

Considerando que as duas técnicas utilizadas forneceram o mesmo resultado, é recomendado o uso da técnica de microssatélites para estudos futuros com a espécie *P. gounellei*, devido ao menor custo e à menor complexidade da mesma.