

Seleção de *primers* para análise de *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) em *Cereus* sp. (Cactaceae)

Selection of primers for Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) in *Cereus* sp. (Cactaceae)

Sanny Damazio Domingues^{1*}, Andrea Florindo das Neves², Claudete Aparecida Mangolin³, Maria de Fátima P. S. Machado³

¹Graduação em Ciências Biológicas, ²Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, ³Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5.790 Jd. Universitário, CEP 87020-900, Maringá, PR., Brasil.

* sannynomingues@gmail.com

Resumo

O objetivo no presente estudo foi selecionar *primers* e padronizar reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para analisar ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), em futuros estudos de variabilidade genética em plantas do gênero *Cereus*, popularmente conhecidas como mandacaru. Os marcadores ISSR são considerados promissores para análise molecular uma vez que anelam em regiões específicas do genoma (interlocos SSR) e os segmentos de DNA são amplificados por reações simples, produzindo um padrão reprodutivo de segmentos amplificados. Os *primers* ISSR-1, ISSR-3, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-15, ISSR-16, ISSR-813, ISSR-825, ISSR-UBC-808, ISSR-17898A e ISSR-17898B foram selecionados, por apresentarem bandas (sequências de DNA) nítidas em gel de agarose 1,7% quando submetidos à eletroforese, usando uma temperatura para ligação dos *primers* de 49°C na PCR. O número médio de sequências amplificadas por *primer* foi de 10,58 e o *primer* ISSR-4 gerou o maior número de sequências (18) ISSR, enquanto o *primer* ISSR-1 produziu o menor número (4) de sequências. Os *primers* selecionados no presente estudo, poderão ser utilizados para analisar a diversidade genética em ISSR entre as espécies do gênero *Cereus* de diferentes regiões do Brasil.

Palavras-chave: Genética, Cactos, Polimorfismo de DNA, Biotecnologia.

Abstract

The objective of this study was to select ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) primers for future genetic variability studies in *Cereus* popularly known as *mandacaru*. In addition, standardize the PCR (Polymerase Chain Reaction) reaction for the selected primers. ISSR markers are considered promising for analysis at molecular level since they recognize specific regions of the genome (interlocos of SSR) and the DNA segments are amplified by simple reactions producing a reproductive pattern of amplified segments. The primers selected for presenting a satisfactory number of clear bands (180 in total) on 1.7% agarose gel when submitted to electrophoresis were: ISSR-7, ISSR-8, ISSR-8, ISSR-825, ISSR-UBC-808, ISSR-17898A and ISSR-8, ISSR-7, ISSR-7, ISSR-7, ISSR-7, ISSR-17898B. Using a temperature for primer binding of 49 ° C in PCR. The average number of bands per primer was 10.58, and the primer ISSR-4 generated the highest number of amplified fragments, 18 ISSR regions, while the primer ISSR-1 produced the smallest number of fragments (4). The primers selected in the present study could be used to analyze the genetic diversity among the species of the genus *Cereus* from different regions of Brazil.

Key words: Cactus, Genetics, Polymorphism of DNA, Biotechnology.

Introdução

Cactaceae é uma família que apresenta cerca de 130 gêneros e 1.438 espécies divididas em quatro subfamílias:

Pereskioideae, Opuntioideae, Cactoideae e Maihuenioideae (HUNT et al., 2006), praticamente restrita às Américas. No Brasil ocorrem em quase todos os biomas, em

regiões áridas e semi-áridas. A tribo Cereeae, juntamente com a Rhipsalideae, é a mais representativa do Brasil, e o maior centro de diversidade da família se encontra na região Nordeste. Dentro da tribo Cereeae se encontra o gênero *Cereus*, que engloba algumas das espécies mais conhecidas do Brasil (TAYLOR, 1997). As plantas do gênero *Cereus* apresentam morfologia semelhante, mas algumas características as classificam como espécies diferentes. Na região Sul, a espécie é denominada de *Cereus repandus* Miller e também *C. peruvianus*; na região Sudeste do Brasil, as plantas são classificadas como *C. hildmannianus* K. Schumann, e na região Nordeste as plantas mandacaru são classificadas como *C. jamacaru* De Candolle (ZAPPI et al., 2010).

Os estudos morfoanatômicos das espécies de Cactaceae não são conclusivos sobre como as populações estão estruturadas, e não possibilitam uma classificação segura das espécies. A expectativa é de que o uso de marcadores moleculares, que detectam polimorfismos no DNA, possa contribuir com informações complementares, necessárias para classificar as plantas de *Cereus*, e diferenciar quanto ao nível taxonômico de espécie. Nos últimos anos, a utilização de marcadores moleculares para estudos de diversidade genética e filogenia em cactáceas vem aumentando consideravelmente, com destaque para o uso de marcadores dominantes do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats* = segmentos entre sequências simples repetidas de DNA), em razão da universalidade dos *primers* ISSR utilizados para amplificação do DNA (CARIAGA et al., 2005; CASTRO-FÉLIX et al., 2014; GANOPOULOS et al., 2013; TAO et al., 2014; REALINI et al., 2015; VALADEZ-MOCTEZUMA et al., 2015).

Os marcadores moleculares denominados de ISSR (GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ et al., 1994) são segmentos de DNA de 100 a 3.000 pb amplificados via PCR usando somente um *primer* com 16 a 20 pb, desenhado a partir de sequências simples repetidas (SSR) também denominadas de microssatélites. O *primer* com 16 a 20 pb é usado para amplificar a região inter-SSR. Este marcador foi criado pela necessidade de

explorar repetições de microssatélites sem a utilização do sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Na análise dos marcadores ISSR os alelos são revelados pela presença ou ausência de bandas, não sendo possível identificar se o fragmento amplificado corresponde a um alelo homozigoto ou heterozigoto (LOPES et al., 2002). Apesar disso, existem diversas vantagens na utilização do marcador ISSR, como elevado grau de polimorfismo, baixo custo, reprodutibilidade e o fato de não haver a necessidade de conhecimento prévio de sequência de DNA para a construção do *primer* utilizado (REDDY et al., 2002). Os ISSR são recomendados para análises de espécies relacionadas evolutivamente, e também, são usados para a diferenciação rápida entre indivíduos aparentados, pois apresentam resultados confiáveis, devido sua abundância e dispersão por todo o genoma (RODRIGUES, 2010). Os ISSR são marcadores de alta reprodutibilidade, abundância de locos polimórficos, apresentando facilidade, rapidez na execução do experimento e baixo custo comparado com os demais marcadores moleculares (BORBA et al., 2005).

A utilização do marcador molecular do tipo ISSR vem crescendo dentro da família Cactaceae, com destaque para análises de diversidade genética em espécies ameaçadas de extinção (CARIAGA et al., 2005; CASTRO-FÉLIX et al., 2014); espécies de interesse econômico (TAO et al., 2014; VALADEZ-MOCTEZUMA et al., 2015; GANOPOULOS et al., 2015), análise de variação somaclonal (KHATTAB et al., 2014), e estudos filogenéticos (OLIVEIRA et al., 2013; REALINI et al., 2015). Para o gênero *Cereus* ainda não foram desenvolvidas pesquisas com ISSR. Portanto,

O objetivo do presente estudo foi selecionar *primers* de ISSR polimórficos para estudos de diversidade genética em *Cereus* sp. coletados em duas regiões do Brasil (Paraná e Piauí). A expectativa é de que os *primers* selecionados possam ser aplicados para estimar a divergências genéticas em nível molecular entre as plantas do gênero *Cereus* distribuídas em diferentes regiões do Brasil.

Material e métodos

Material biológico

As amostras de *Cereus* sp. que foram analisadas encontram-se no Banco de Germoplasma de *Cereus* do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá. As sementes foram obtidas a partir de frutos coletados nas regiões Sul e Nordeste do Brasil. Para a realização dos testes foram escolhidos seis acessos provenientes dos estados do Paraná (amostras C1, C2, C3) e do Piauí (amostras C4, C5, C6).

Germinação das sementes

As sementes foram embebidas em água, onde permaneceram por 24 horas; este procedimento foi utilizado para quebrar a dormência, como descrito por Carvalho et al. (2008). Após esse período, foram adicionadas gotas de detergente, a fim de quebrar a tensão superficial da água e promover maior hidratação das sementes. Após 15 minutos, as sementes foram enxaguadas com água destilada e autoclavadas; para a desinfecção das sementes foi utilizada uma solução de hipoclorito de sódio comercial e água destilada, na proporção 1:1, por uma hora, e posteriormente foram realizados mais dois enxágues com água destilada autoclavada. Finalmente, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro estéril contendo o meio de cultura descrito por Knudson (1946), vedados e mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 30°C. Após cerca de seis meses, as plântulas crescidas a partir da germinação das sementes de *Cereus* sp., coletadas nas diferentes localidades, foram utilizadas para a extração do DNA.

Extração do DNA

O DNA foi extraído de caules frescos (40-80 mg) das plântulas de *Cereus*. As amostras foram preparadas individualmente de acordo com o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999), com modificações implementadas por Resende et al. (2007). Os caules (200-300 mg) foram pulverizados com nitrogênio líquido para obter um pó fino, que foi transferido para um microtubo de 2,0 mL e homogeneizado em 300 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mmol/L pH 8,0;

EDTA 50 mmol/L pH 8,0; NaCl 2,2 mol/L, 2% de CTAB, e 0,06% de sulfito de sódio) e 100 µL de cada um dos reagentes de solubilização de membranas e antioxidantes (CTAB 20%, N-Laurilsarcosina 5%, PVP-40 10%). Os microtubos foram incubados em banho-maria durante uma hora em 65°C, realizando-se suaves agitações a cada 15 minutos. Após o período de incubação, os microtubos permaneceram por 5 minutos em temperatura ambiente para esfriar. Em seguida, foram adicionados 600 µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico (25:24:1) e os tubos foram agitados suavemente por cinco minutos.

As amostras foram centrifugadas por dez minutos, a 10.000 r.p.m. em temperatura ambiente na centrífuga MR23i, Thermo Electron Corporation. Em seguida, o sobrenadante foi recuperado e transferido para um microtubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 2,5 µL de RNase, e mantido em temperatura ambiente por duas horas para digestão do RNA. Após essa etapa, foram adicionados novamente 600 µL de uma solução de clorofórmio:álcoolisoamílico (24:1) e repetido o mesmo processo de centrifugação descrito anteriormente. O sobrenadante foi novamente coletado e transferido para outro microtubo de 1,5mL onde foram adicionados isopropanol (0,6 do volume recuperado) e NaCl 5 mol/L (0,06 do volume recuperado), para a precipitação do DNA, e em seguida os tubos foram mantidos *overnight* à -20°C. Após este período, foi realizada uma centrifugação por 20 minutos, com 10.000 r.p.m. em 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com etanol absoluto gelado por duas vezes, com a realização do mesmo processo de centrifugação entre as lavagens. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* depois de seco foi ressuscitado em 40 µL de TE (0,0004M Tris-HCl e 0,0002M EDTA). Os tubos foram vedados com filme plástico e armazenados em geladeira a 4°C.

Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% com 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 amostra foi comparado com soluções de DNA padrão (Fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas de 50, 100 e 150 ng. Após a eletroforese o gel foi corado em solução 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio, e a imagem foi capturada em transluminador L-PIX HE, Loccus Biotecnologia.

Amplificação do DNA com primers de ISSR

Para seleção e padronização foram selecionados aleatoriamente 23 primers de 42 primers ISSR que fazem parte do banco de primers do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (DBC/UEM). Inicialmente, foram testadas diferentes concentrações de MgCl_2 : 2,0 mM, 2,5 mM, 2,7 mM, 3,0 mM e 3,2 mM. Temperaturas de anelamento de 49°C e 50°C também foram testadas.

A PCR foi preparada em microtubos de 0,2 mL, sendo utilizado para a reação 15 ng de DNA, tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,8), 3,0 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de cada dNTP, 1 U de *Taq-DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen), 0,25 μM de primer e

água mili-Q para um volume final de 20 μL de solução (Tabela 1). A PCR foi realizada em um termociclador Veriti (*Applied Biosystems*), com uma desnaturação inicial em 94°C por 5 minutos, e 35 ciclos de desnaturação em 94°C por 1 minuto, anelamento dos primers em 49°C por 1 minuto, e extensão em 72°C durante 1 minuto e 30 segundos. A extensão final foi em 72°C durante 7 minutos, e a temperatura de imersão foi 4°C. Para realização da eletroforese, foram acrescentados 2 μL de tampão *Loading* (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) ao produto de cada amplificação. A eletroforese foi feita em gel de agarose 1,7% usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA), com 60 V durante 4 horas. Para estimar o tamanho das sequências amplificadas foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb *DNA Ladder* (Invitrogen). A coloração do gel foi feita usando uma solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL, e a imagem foi capturada em transiluminador L-PIX HE, Loccus Biotecnologia.

Tabela 1. Concentrações dos reagentes nas soluções estoques e volumes utilizados para determinar as concentrações finais dos reagentes usados para as reações de amplificação de ISSR nas plantas de *Cereus* sp.

Reagentes	Concentração na solução estoque	Concentração final dos reagentes	Volume de reagente/20 μL de reação
H ₂ O	-	-	12,06
Tampão	10 X	1 X	2,0
MgCl ₂	25 mM	3,0 mM	2,4
dNTPs	2,5 mM/cada	0,1 mM/cada	0,8
Primer	10 μM	0,25 μM	0,5
Taq-DNA Polimerase	5 U/ μL	1 U	0,2
DNA	10 ng/ μL	15 ng	1,5
Total			20 μL

Análise dos dados

Para a análise dos produtos amplificados por cada primer ISSR de cada amostra, as sequências identificadas no gel de agarose foram lidas como presentes (1) ou ausentes (0), e foi construída uma matriz binária.

Resultados e discussão

A quantificação do DNA genômico extraído das plântulas de *Cereus* sp. foi realizada pela comparação visual da intensidade das bandas com o DNA fago λ em gel de agarose. A metodologia utilizada para a extração do DNA foi eficiente, sendo possível realizar uma extração livre de polissacarídeos e com qualidade. As concentrações dos DNAs extraídos variaram de 15 a 100 ng/ μL (Figura 1)

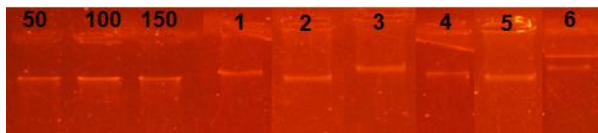


Figura 1. Gel de agarose 0,8% utilizado para quantificação das amostras de DNA. As amostras 50, 100 e 150 são DNA de fago λ utilizadas como padrão de concentração com 50, 100 e 150 ng, respectivamente. As amostras 1, 2 e 3 correspondem as plantas de *Cereus* sp. do Paraná e as amostras 4, 5 e 6 correspondem as plantas de *Cereus* sp. do Piauí.

A Figura 2 mostra o resultado do teste com diferentes concentrações de $MgCl_2$ (2,0 mM; 2,5 mM; 2,7 mM; 3,0 mM e 3,2 mM). Os *primers* ISSR-1 e ISSR-4 foram utilizados para amplificar três amostras para cada concentração de $MgCl_2$. Foi possível identificar bandas mais nítidas e bem

definidas no gel de agarose com uma concentração de 3,0 mM de $MgCl_2$, sendo esta escolhida para análises posteriores.

A temperatura considerada como mais adequada para realizar a ligação dos *primers* durante a amplificação foi 49°C. Usando a temperatura de 49°C foi possível selecionar 17 *primers* dos 23 testados: ISSR-1, ISSR-2, ISSR-3, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-15, ISSR-16, ISSR-813, ISSR-825, ISSR-UBC-808, ISSR-17898A e ISSR-17898B, que amplificaram bandas nítidas no gel de agarose 1,7%. O resultado da amplificação das amostras com os *primers* ISSR-8 e ISSR-11 estão demonstrados na Figura 3. Os demais *primers* testados (ISSR-1, ISSR-6, ISSR-10, ISSR-13, ISSR-14, ISSR-16, ISSR-811, ISSR-844B) não amplificaram ou não reproduziram bandas nítidas.



Figura 2. Visualização em gel de agarose 1,7% do DNA das plantas de *Cereus* sp. amplificadas com os *primers* ISSR-1 (amostras 1 a 15) e ISSR-4 (amostras 16 a 30), com diferentes concentrações de $MgCl_2$: 2,0 mM (amostras 1-3; 15-18); 2,5 mM (amostras 4-6; 19-21); 2,7 mM (amostras 7-9; 22-24); 3,0 mM (10-12; 25-27) e 3,2 mM (amostras 13-15; 28-30). As setas indicam a concentração de $MgCl_2$ mais adequada e selecionada (3,0 mM) para amplificar o DNA das plantas do Paraná e do Piauí.

De acordo com Oliveira et al. (2013), nos estudos realizados com a diversidade genética de variedades com e sem espinhos de *Cereus jamacaru*, 23 *primers* ISSR foram testados e 15 foram polimórficos, com média de 5,5 bandas por *primer*; o número de *primers* obtidos foi considerado adequado para determinar a diversidade genética. De acordo com Realini et al. (2015), o uso do marcador ISSR contribuiu para uma melhor

compreensão das relações filogenéticas de 15 espécies de *Opuntia* (Cactaceae, Opuntioideae) da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. Realini et al. (2015), analisaram 110 bandas de ISSR, que evidenciaram variação intraespecífica entre as espécies estudadas. Cariaga et al. (2005) utilizaram ISSR para avaliar os níveis de variação genética em duas populações de *Consolea corallicola*, espécie rara e endêmica

do Sul da Flórida. Castro-Félix et al. (2014) também fizeram uso desse marcador para analisar a diversidade genética de *Ferocactus histrix*, outra espécie ameaçada de extinção, endêmica do México. Esses trabalhos mostraram resultados consistentes, validando o uso de marcadores ISSR para indicar a variedade genética das populações e orientar programas de manejo na tentativa de impedir a extinção dessas espécies.

Entre os 17 *primers* selecionados, o *primer* ISSR-2 foi 100% monomórfico,

mostrando o mesmo padrão de bandas para todas as seis amostras analisadas. Por outro lado, os *primers* ISSR-825 e ISSR-17898A foram 100% polimórficos (Figura 4). O *primer* ISSR-4 foi o que apresentou um número maior de regiões amplificadas, com 18 bandas, sendo 11 polimórficas e 7 monomórficas (Figura 4). O total de bandas distintas obtidas foi de 180, com média de 10,58 bandas por *primer*.

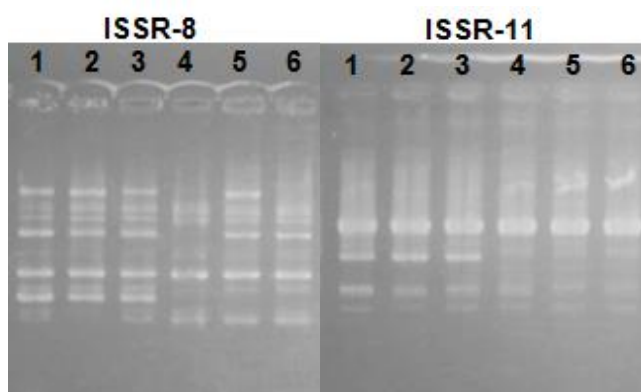


Figura 3. Visualização em gel de agarose das amostras 1, 2 e 3 (Paraná) e 4, 5 e 6 (Piauí) de *Cereus* sp., amplificadas com os *primers* ISSR-8 e ISSR-11.

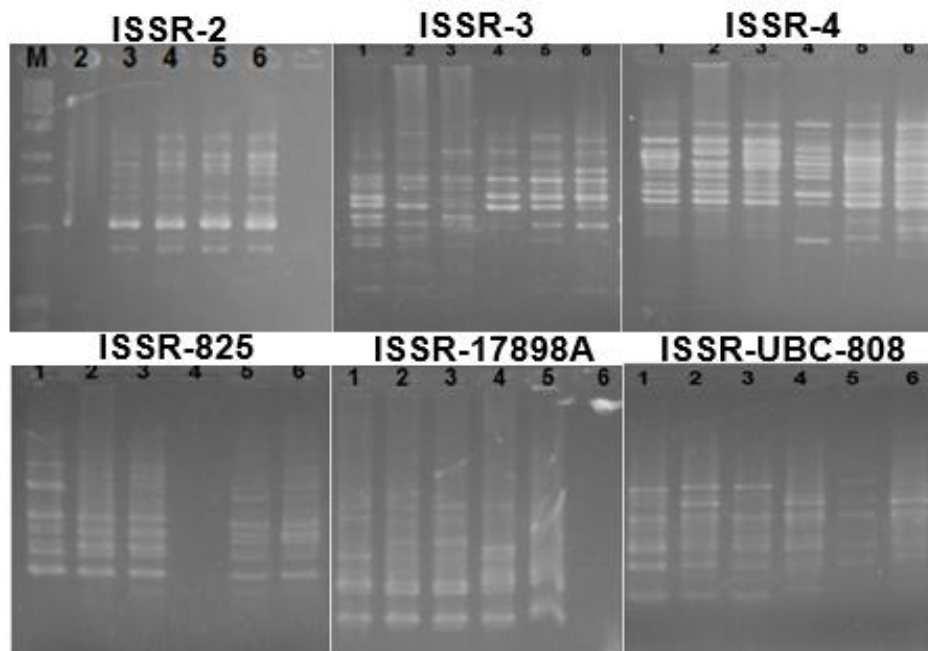


Figura 4. Visualização em gel de agarose dos produtos amplificados pelos *primers* ISSR-2, ISSR-3, ISSR-4, ISSR-825, ISSR-17898A, e ISSR-UBC-808. O *primer* ISSR-2 foi 100% monomórfico e os *primers* ISSR-825 e ISSR-17898A foram 100% polimórficos. O *primer* ISSR-4 evidenciou o maior número de ampliações, sendo 11 bandas polimórficas e 7 monomórficas. As amostras 1, 2 e 3 correspondem as plantas de *Cereus* sp. do Paraná e as amostras 4, 5 e 6 correspondem as plantas de *Cereus* sp. do Piauí.

Na Tabela 2 estão relacionados os números de segmentos monomórficos e polimórficos de DNA amplificados por cada um dos 17 *primers* ISSR, utilizados para analisar o genoma das plantas de *Cereus* sp. coletados dos estados do Paraná e do Piauí. O número de segmentos polimórficos observados com os 17 *primers* foi 109, conferindo, portanto, um polimorfismo de 60,66% para as seis plantas de *Cereus* sp. O polimorfismo estimado para os segmentos ISSR em apenas seis plantas de mandacaru pode ser considerado como alto (60,66%) quando comparado com o polimorfismo descrito para nove plantas de mandacaru, cultivadas na região Sul (PR), em 16 segmentos de DNA amplificados por *primers* aleatórios (42,57%), aplicando a técnica de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) (RESENDE et al., 2007). O polimorfismo para os segmentos ISSR também pode ser considerado alto (60,66%) quando comparado com o polimorfismo em 47 plantas *Cereus* sp. (81%) usando como marcadores moleculares segmentos de DNA cortados por enzimas de restrição e amplificados por PCR (marcadores AFLP - *amplified fragment length polymorphisms*) (FARIA-TAVARES et al., 2013). O valor alto estimado para o polimorfismo dos segmentos ISSR no presente estudo, confere um alto potencial para o uso dos referidos marcadores em estudos de diversidade genética e estrutura genética de populações de plantas do gênero *Cereus*, distribuídas em regiões diferentes do país, ou cultivadas em diferentes continentes.

O número de segmentos de DNA amplificados com os 17 *primers* ISSR (180 segmentos de DNA) no presente estudo foi menor que o número de segmentos de DNA amplificados com as técnicas usadas para evidenciar marcadores RAPD (249 segmentos de DNA; RESENDE et al., 2007) e AFLP (348 fragmentos de DNA; FARIA-TAVARES et al., 2013). Entretanto, os marcadores ISSR podem ser considerados promissores para uma análise em nível molecular das plantas de *Cereus*, frente às restrições que são impostas para os marcadores RAPD (dificuldades para estabelecer a técnica a fim de obter um padrão

reprodutivo de segmentos amplificados) e AFLP (uma técnica laboriosa que requer infra-estrutura específica, envolve várias etapas que consomem tempo e tem custo elevado; FARIA-TAVARES et al., 2013). Como pode ser constatado na metodologia do presente estudo, os *primers* ISSR anelam em regiões específicas do genoma (interlocos SSR) e os segmentos de DNA são amplificados por reações simples, equivalentes as reações de amplificações que são implementadas para o estudo de marcadores RAPD. Apesar das análises contar com apenas três amostras de cada estado (Paraná e Piauí), o presente estudo selecionou *primers* ISSR para futuras análises de plantas do gênero *Cereus*; foi possível constatar que o polimorfismo nas três plantas do Piauí foi maior (85 segmentos polimórficos; 47%) que o polimorfismo nas outras três plantas do Paraná (51 segmentos polimórficos; 28%). Tal evidência sustenta a proposta de usar os marcadores ISSR selecionados no presente estudo, para diferenciar populações de *Cereus* sp.

A perspectiva é usar os marcadores ISSR selecionados no presente estudo para diferenciar em nível molecular as populações de mandacaru dos dois estados do Brasil, que de acordo com os registros encontrados na literatura científica são descritas como espécies diferentes. Segundo a literatura científica, há dois grupos de Cactaceae distintos, um da região Nordeste e outro das regiões Sul e Sudeste do Brasil (CASTRO, 2008). Além disso, Zappi et al. (2010), classificam a ocorrência de espécies diferentes para essas regiões: *Cereus hildmannianus* no Sul e *Cereus jamacaru* no Nordeste. A divergência genética estimada com os marcadores AFLP foi alta (FARIA-TAVARES et al., 2013) e sustenta a proposta das plantas de mandacaru das regiões Sul e Nordeste serem espécies diferentes, enquanto o uso de marcadores SSR conferiu uma estimativa de divergência genética moderada entre as plantas das duas regiões e revelaram que há uma mistura dos dois genomas nas duas localidades (FERNANDES et al., 2016). Desta forma, os 17 *primers* ISSR selecionados no presente estudo poderão ser usados para ampliar os estudos em nível

molecular das plantas de mandacaru destes dois estados do Brasil, além de serem

promissores para analisar as plantas de mandacaru de outros estados.

Tabela 2. Total de segmentos de DNA amplificados com os primers ISSR nas 3 amostras de plantas de *Cereus* sp. do Paraná nas 3 amostras de *Cereus* sp. do Piauí.

Primers	Sequência de nucleotídeos	Mono/Polimórficos (nº segmentos)	Total de segmentos
ISSR-1	(AC) ₈ TT	2/2	4
ISSR-2	(AC) ₈ AG	10/0	10
ISSR-3	(AC) ₈ TG	3/12	15
ISSR-4	(GACA) ₄	7/11	18
ISSR-5	(AC) ₈ AA	4/13	17
ISSR-7	(AG) ₉	1/6	7
ISSR-8	(ACTC) ₄	1/4	5
ISSR-9	(TG) ₈ GG	11/0	11
ISSR-11	(AC) ₈ CA	4/1	5
ISSR-12	(AG) ₈ GC	2/7	9
ISSR-15	(AC) ₈ GA	4/5	9
ISSR-16	(TG) ₈ AC	5/4	9
ISSR-813	(CT) ₈ T	7/6	13
ISSR-825	(AC) ₈ T	3/10	13
ISSR UBC-808	(AG) ₈ C	3/10	13
ISSR 17898 ^a	(CA) ₆ AC	0/12	12
ISSR 17898B	(CA) ₆ GT	4/6	10
TOTAL			180

Conclusão

Os 17 *primers* selecionados no presente estudo (ISSR-1, ISSR-2, ISSR-3, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-12, ISSR-15, ISSR-16, ISSR-813, ISSR-825, ISSR-UBC-808, ISSR-17898A e ISSR-17898B) podem ser indicados como marcadores moleculares adicionais para estimar a diversidade genética em plantas de cactos do gênero *Cereus*, para estimar a divergência genética entre populações, para investigar a mistura de genomas, e para caracterizar a forma como as populações de mandacaru estão geneticamente estruturadas em regiões diferentes do Brasil.

Agradecimentos:

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 304447/2016-1) e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná - Fundação Araucária (Convênio 257/2014) pelo suporte financeiro para a realização deste estudo.

Referências

- ALJANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 17, p. 1–8, 1999.
- BORBA, R.S.; GARCIA, M.S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A.C.; ZIMMER, P.D.; BRANCO, J.S.C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. *Neotropical Entomology*, v.34, p. 565-569, 2005.
- CARIAGA, K.A.; LEWIS, C.E.; MASCHINSKI, J. WRIGHT, S.J.; ORTEGA, J. Patterns of genetic diversity in the critically endangered Florida key endemic *Consolea corallicolae* mill (Cactaceae): Evidence from Inter Simple Sequence Repeat (ISSRs) DNA Polymorphisms. *Caribbean Journal of Science*, v. 41, p. 225-233, 2005.
- 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*, v. 36, p. 595-560, 2008.
- CASTRO, J. P. Números cromossômicos em espécies de Cactaceae ocorrentes no nordeste do Brasil. 2008. Universidade Federal da Paraíba, 2008.

- CASTRO-FÉLIX, P.; ROSAS-ESPINOZA, V.C.; VALENCIA, L.I.P.; CÁRDENAS, B.D.; HUERTA-MARTÍNEZ, F.M.; SANTERRE, A. Genetic diversity within a declining natural population of *Ferocactus histrix* (DC) **Lindsay Plant Species Biology**, v. 29, p. e21-e30, 2014.
- FERNANDES, V.N.; NEVES, A.F.; MARTIN, P.G.; MANGOLIN, C.A. MACHADO, M.F.P.S. Genetics structure and molecular divergence among samples of mandacaru (*Cereus* sp.; Cactaceae) as revealed by microsatellite markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 64, p. 38-45, 2016.
- 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* sp.; Cactaceae) using amplified fragment length polymorphisms (AFLP). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 12-19, 2013.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLES-LÉON, D. CIMMYT, Mexico. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory, 1994.
- HUNT, D.; TAYLOR, N.P.E.; CHARLES, G. **The New Cactus Lexicon**. UK: DH books, 2006.
- GANOPOULOS, I.; SAKARIDIS, I.; ARGIRIOU, A.; MADESIS, P.; TSAFTARISE, A. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Fetacheese. **Food Chemistry**, v. 141, p. 835-840, 2013.
- GANOPOULOS, I.; KALIVAS, A.; KAVROULAKIS, N.; XANTHOPOULOU, A.; MASTROGIANNI, A.; KOUBOURIS, G.; MADESIS, P. Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers. **Plant Gene**, v. 2, p. 29-33, 2015.
- GUPTA, M.; CHYI, Y.S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 998-1006, 1994.
- KHATTAB, S.; EL SHERIF, F.; EL-GARHY, H.A.; AHMED, S.; IBRAHIM, A. Genetic and phytochemical analysis of the in vitro regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS-PAGE and HPLC. **Gene**, v. 533, p. 313-321, 2014.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.
- LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.D.O.; 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**, v. 5, p. 56-60, 2002.
- OLIVEIRA, F.I.C.; BORDALLO, P.N.; CASTRO, A.C.R.; CORREIA, D. Genetic diversity of spineless *Cereus jamacaru* accession using morphological and molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 4586-4594, 2013.
- REALINI, M.F. Phylogenetic relationships in *Opuntia* (Cactaceae, Opuntioideae) from southern South America. **Plant Systematics and Evolution**, v. 30, p. 1123-1134, 2015.
- REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.
- RESENDE, A.G.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic diversity in F1 descendents of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) somaclones regenerated in South Region of Brazil. **Tropical and Subtropical Agroecosystems** v. 7, p. 193-199, 2007.
- RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. Dissertação de Mestrado, 81p. ESALQ/USP. Piracicaba, 2010.
- TAO, J. Characterization of genetic relationship of dragon fruit accessions (*Hylocereus* spp.) by morphological traits and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 170, p. 82-88, 2014.
- TAYLOR, N.P. **Cactaceae. In Cactus and Succulent Plants. Status Survey and Conservation Action Plan**. Switzerland: Compiled by Sara Oldfield, 1997. 500p.
- VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; SAMAH, S.; LUNA-PAEZ, A. Genetic diversity of *Opuntia* spp. Varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). **Plant Systematics and Evolution**, v. 30, p. 737-747, 2015.
- ZAPPI, D.C.; TAYLOR, R.N.P.; MACHADO, M.C. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 1, p. 822-832, 2010.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.