

ADRIANA GAZOLI RESENDE

**POLIMORFISMO DE DNA EM PLANTAS REGENERADAS *IN*
VITRO E NOS DESCENDENTES RF₁ DE *Cereus*
peruvianus MILL. (CACTACEAE)**

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
MARÇO - 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ADRIANA GAZOLI RESENDE

**POLIMORFISMO DE DNA EM PLANTAS REGENERADAS *IN*
VITRO E NOS DESCENDENTES RF1 DE *Cereus*
peruvianus MILL. (CACTACEAE)**

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Fátima P. S. Machado

Tese de Doutorado apresentada à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, Área de
Concentração: Biologia Celular.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
MARÇO - 2006

**Aos meus pais Ester e Geraldo,
pelo Amor e Apoio irrestritos.**

**A minha filha Eloísa,
por trazer Cores, Brilho e Energia a minha vida,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

A Jesus, Meu Mano, pela descoberta da essência da vida o AMOR

A minha orientadora, Fafa, pela nossa amizade e a oportunidade de conhecê-la integralmente, em especial sua postura humana diante da vida e de ser ética como pesquisadora

À Claudete, por ser minha irmã e por sua orientação técnica durante a realização desta pesquisa

À Sandra, por sermos amigas e compartilharmos muitos momentos de nossas vidas

Aos professores, Ana Silvia, Maria Claudia, Erasmo e José Ricardo, pela nossa convivência

A todos os alunos do laboratório, pelo convívio como família, pelo trabalho em equipe, pela amizade, brincadeiras, gargalhadas e festas, especialmente Lívia, por seu auxílio na bancada e por oferecer seu ombro quando eu precisei chorar

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética, principalmente a Leila e ao Sérgio, pela ajuda e trabalho indispensáveis e por sua amizade

Ao amigo Jayme, pela ajuda com materiais e equipamentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, seus professores e funcionários, pela ajuda e ensinamentos

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida e apoio financeiro

Especialmente a minha família, meus pais Ester e Geraldo, meus irmãos Danilo e Tiago, e minha filha Eloisa, pelo amor, carinho, dedicação e apoio

Enfim, a todos que contribuíram para a realização de mais esta etapa da minha vida

ÍNDICE

RESUMO	i
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
1. Cultura de calos de <i>Cereus peruvianus</i>	4
2. Polimorfismo de Sequências de DNA em Plantas	6
OBJETIVOS	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
ARTIGO 1	19
Polimorfismo de DNA (RAPD) em Somaclones de <i>Cereus peruvianus</i> Mill. (Cactaceae)	
Resumo	21
Introdução	21
Material e Métodos	22
Resultados e Discussão	24
Referências Bibliográficas	32
ARTIGO 2	35
Diversidade Genética em Descendentes F1 de Somaclones de <i>Cereus peruvianus</i> Mill. (Cactaceae)	
Resumo	37
Abstract	37
Introdução	38
Material e Métodos	39
Resultados e Discussão	40
Referências Bibliográficas	45

Resumo

A PROPOSTA DO PRESENTE ESTUDO FOI VERIFICAR A EXISTÊNCIA DE ALTERAÇÕES OCORRIDAS NAS MOLÉCULAS DE DNA DE INDIVÍDUOS DO CACTO *CEREUS PERUVIANUS* REGENERADOS DE CULTURA DE TECIDO *IN VITRO* E DE INDIVÍDUOS DESCENDENTES DOS REGENERANTES (RF1). MAIOR OU MENOR PROPORÇÃO DE ALTERAÇÕES NA MOLÉCULA DE DNA (PROPORÇÃO DE SEQÜÊNCIAS DE DNA ALTERADAS, DECORRENTES DE MUTAÇÕES E/OU RECOMBINAÇÕES) PODE CONTRIBUIR PARA DETERMINAR MORFOLOGIAS ATÍPICAS DOS CAULES DOS SOMACLONES DE *C. PERUVIANUS*, E PARA ESTIMAR A BASE GENÉTICA DA ESPÉCIE. EM RAZÃO DO GENOMA DE *CEREUS* SER AINDA DESCONHECIDO, PARA INVESTIGAR A PRESENTE PROPOSTA, SEQÜÊNCIAS ALEATÓRIAS DE DNA FORAM AMPLIFICADAS NUMA REAÇÃO EM CADEIA, PELA ENZIMA *TAQ POLIMERASE* E CARACTERIZADAS POR PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*), QUE É CAPAZ DE DETECTAR POLIMORFISMO EM REGIÕES CODIFICADORAS E NÃO CODIFICADORAS DA MOLÉCULA DE DNA. DEPENDENDO DA SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS UTILIZADA COMO *PRIMERS*, AS SEQÜÊNCIAS ALEATÓRIAS (*AP-PCR: ARBITRARILY PRIMER-PCR*) PODEM SER AMPLIFICADAS EM DIFERENTES INDIVÍDUOS, CONSTITUINDO-SE, PORTANTO, COMO UMA “IMPRESSÃO DIGITAL” DOS GENOMAS INDIVIDUAIS (*DNA FINGERPRINTING*), DOS SOMACLONES E DOS DESCENDENTES RF1 DE *C. PERUVIANUS*.

PALAVRAS-CHAVE: RAPD, *MANDACARU*, CACTO, VARIAÇÃO SOMACLONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA

Introdução

Cereus peruvianus é uma espécie de cacto popularmente conhecida no Brasil como mandacaru. A espécie é cultivada em jardins, apresenta interesses econômico e industrial e vem sendo recentemente domesticada na região de Israel (Nerd et al., 1993; Weiss et al., 1994; Mizrahi e Nerd, 1999), onde é caracterizada como *fruit crop*, e plantada comercialmente ainda em pequena escala. Esta espécie produz alcalóides amins (Vries et al., 1971; Oliveira e Machado, 2003; Rocha et al., 2005), ésteres de cera com potencial de aplicação como barreira impermeável (Dembitsky e Rezanka, 1996; Rezanka e Dembitsky, 1998), e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais (Alvarez et al., 1992; 1995; Nozaki et al., 1993; Barros e Nozaki, 2002; Machado et al., 2004). A origem desta espécie ainda não está esclarecida, mas alguns autores acreditam ser originária no Brasil (Mizrahi e Nerd, 1999).

A morfologia dos caules nas cactáceas pode ser considerada uma característica marcante, sendo usada há mais de 4 décadas para discriminar gêneros e espécies de cactos (Britton e Rose, 1963; Altesor e Ezcurra, 2003). O gênero *Cereus*, por exemplo, é descrito como constituído por caule do tipo colunar com um número e disposição de costelas longitudinais variáveis, onde estão inseridos os botões axilares contendo espinhos (folhas modificadas) conhecidos como aréolas (Britton e Rose, 1963). A presença de aréolas é uma característica da família Cactaceae e a organização destas estruturas nos caules parece estar fortemente ligada à distribuição dos feixes vasculares (Gibson e Nobel, 1986; Mauseth, 1988).

O número de costelas e a disposição das aréolas, bem como o tamanho e a cor dos espinhos, são algumas das características usadas para identificar espécies do gênero *Cereus* (Britton e Rose, 1963). Em populações naturais de *Cereus*, indivíduos com 7-8 costelas longitudinais regulares, cujas aréolas mostram disposição linear, são características da espécie *C. alocriportanus*; espinhos longos de cor preta ou castanha são descritos para *C. forbesii*, e espinhos curtos estão presentes em *C. validus*. Caules com costelas em espiral são características da variedade ‘tortuosus’ de *C. peruvianus*; caules com costelas quebradas formando sulcos regulares, contendo uma aréola por costela, são características descritas para a variedade ‘knobby’, e caules com costelas formando sulcos irregulares e número variável de aréolas por costela são descritos como características da variedade ou forma ‘monstrosus’. Esta última variedade também tem sido designada como *C. monstrosus* ou *C. monstrosus*, e ainda como a variedade *C. monstrosus minor* (Britton e

Rose, 1963). Deste modo, a cultura de tecidos de calos da espécie classificada como *C. peruvianus* parece ter gerado subespécies, ou plantas que mostram peculiaridades de diferentes espécies de *Cereus*.

Entretanto, em indivíduos de *C. peruvianus* regenerados a partir de tecidos de calos, foram detectados diferentes tipos morfológicos de caules (Mangolin et al., 1997). Enquanto os indivíduos de *C. peruvianus*, obtidos a partir de sementes germinadas, têm o caule formado por 4-5 costelas longitudinais e aréolas dispostas de forma linear, os somaclones regenerados *in vitro* apresentam o número de costelas e a disposição de aréolas característicos de subespécies ou outras espécies do gênero (Mangolin et al., 1997; Machado et al., 2000). O número de costelas nos somaclones variou de 4 a 9, com aréolas apresentando disposição linear. Indivíduos apresentando caules com costelas em espiral, ou costelas quebradas, formando sulcos regulares e irregulares com número variável de aréolas, também foram freqüentes dentre os somaclones de *C. peruvianus*.

Esse tipo de variação observada dentre as plantas regeneradas *in vitro*, definida como variação somaclonal (Larkin e Scowcroft, 1981), tem sido descrita em muitas espécies vegetais utilizando diferentes marcadores morfológicos, citológicos, e moleculares (Bajaj, 1990; Deverno, 1995; Isabel et al., 1996; Roth et al., 1997; Fourré et al., 1997). Na cultura de calos de *C. peruvianus*, devem ter ocorrido alterações no controle da expansão e no plano de divisão das células, eventos estes que, de acordo com Bolwell (1993), são tidos como responsáveis pela forma e direcionamento das células vegetais, e conseqüentemente, pela forma definitiva das plantas. A regulação de tais eventos pode ser gerenciada pelo DNA, ou pode ser conduzida *in vitro* por fatores tais como efeito de reguladores de crescimento, usados para promover processos de desdiferenciação e diferenciação celulares.

Assim, a proposta do presente estudo foi verificar quais alterações, ocorridas na molécula de DNA, possam estar associadas às alterações morfológicas geradas *in vitro*. Maior ou menor proporção de alterações na molécula de DNA (proporção de seqüências de DNA alteradas decorrentes de mutações e/ou recombinações) pode contribuir para alterar a forma de indivíduos de *C. peruvianus*, de modo que os somaclones, bem como certa proporção de indivíduos da geração F1 dos somaclones, expressaram uma morfologia característica de outras espécies do gênero encontradas sob condições naturais. Em razão do genoma de *Cereus* ser ainda desconhecido, para investigar a presente proposta, seqüências aleatórias de DNA foram amplificadas, numa reação em cadeia pela enzima *Taq polimerase*, caracterizada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a qual é capaz de

detectar polimorfismo em regiões codificadoras e não codificadoras de moléculas de DNA (William et al., 1990; Welsh e McClelland, 1990). Dependendo da seqüência de nucleotídeos utilizada como *primers*, as seqüências aleatórias (*AP-PCR: Arbitrarily Primer-PCR*), podem ser amplificadas em diferentes indivíduos (Sobral e Honeycutt, 1994), constituindo-se, portanto, como uma “impressão digital” dos genomas individuais (*DNA fingerprinting*).

Revisão de Literatura

1. Cultura de calos de *Cereus peruvianus*

A crescente utilização de caules de *C. peruvianus* como fonte de produtos de interesse industrial e econômico (Whistter, 1963; Mark, 1979; Martindale, 1979; Turbak, 1979; Rodrigues, 1984; Scheinvar, 1985; Alvarez et al., 1992, 1995; Nozaki et al., 1993), estimulou o desenvolvimento da técnica de cultura de tecidos de calos para a produção de plantas em larga escala, pelo Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, PR). Apesar das implicações da instabilidade genética em culturas de tecidos de calos consideradas por D'Amato (1980), Withers (1980), discutidas por Larkin e Scowcroft (1981), e revisadas por Meins (1986) e Hussey (1986), as dificuldades encontradas para obter plântulas *in vitro* de algumas espécies, como as de *C. peruvianus*, tornou a cultura de tecidos de calos inevitável e usual. A cultura de calos tem sido considerada por alguns pesquisadores como adequada para obtenção de plântulas (Doods, 1991), uma vez que um pequeno pedaço de tecido de calo pode ser multiplicado para produzir uma quantidade desejável de células, as quais podem ser induzidas a regenerar o número teoricamente desejado de plantas.

Como o número de plântulas de *C. peruvianus*, obtidas a partir de sementes germinadas *in vitro* foi baixo, e a cultura de botões axilares (aréolas) extraídos de plantas adultas resultou numa alta taxa de contaminação, as plantas foram obtidas a partir de cultura de calos, originados de caules de plântulas, induzidos e mantidos em diferentes condições de cultivo (Oliveira et al., 1995). A obtenção de plantas de *C. peruvianus* a partir de meristemas axilares (aréolas) cultivados *in vitro*, só foi possível posteriormente, usando como explantes plantas regeneradas de calos, mantidas em condições assépticas (Machado e Prioli, 1996).

Os tecidos de calos, que regeneraram plântulas de *C. peruvianus*, foram cultivados em meio de cultura contendo diferentes combinações dos reguladores de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinetina (KIN), e para conferir as possíveis variações geradas em cultura, paralelamente foram adequadas técnicas para a análise de isozimas dos tecidos manipulados em cultura. As isozimas evidenciaram alterações na expressão gênica, decorrentes dos processos de desdiferenciação/diferenciação celulares e/ou de ação dos reguladores de crescimento, 2,4-D e cinetina, usados no cultivo de tecidos de *C. peruvianus*. Das várias isozimas, que foram induzidas por ocasião da formação dos tecidos

de calos, isozimas malato desidrogenase glioxissomal (gMDH) estavam preferencialmente ausentes nos calos cultivados em meio contendo a combinação 4,0 mg/L de 2,4-D e 4,0 mg/L de KIN (Mangolin et al., 1994a), e nas plantas recentemente regeneradas de *C. peruvianus* neste meio (Machado et al., 1993); fenótipos eletroforéticos das isozimas álcool desidrogenase (ADH) foram relacionados com a mais alta proporção de KIN/2,4-D no meio de cultivo dos calos, e relacionados, portanto, com a capacidade de regeneração de plantas (Mangolin et al., 1994b). Isozimas ADH-1 e mMDH-1 (mitocondrial) foram ainda relacionadas com condições de estresse de temperatura e de cortes nos tecidos necessários para proceder a multiplicação dos calos (Torquato et al., 1995). Quando subcultivados em temperatura mais alta, e em meio de cultura contendo altas e baixas concentrações de diferentes tipos de fontes de carbono, as variações nos fenótipos eletroforéticos das isozimas ADH, MDH, sorbitol desidrogenase (SDH) e peroxidases (PER) foram concordantes com as previamente descritas, e também justificadas como devido a condições de estresse (Jorge, 1995; Jorge et al., 1997). Isto porque o desenvolvimento dos tecidos nas referidas condições foi visivelmente retardado, quando comparado com o desenvolvimento apresentado pelos calos mantidos nas condições originais, os quais vinham sendo mantidos por 4 anos.

O número de isozimas induzidas nos tecidos de calos de *C. peruvianus* foi dependente do sistema enzimático considerado, e somente uma pequena proporção (10,6%) de plantas recentemente regeneradas, com até 12 meses de idade, apresentaram todas as 23 isozimas que foram induzidas nos tecidos de calos (Prioli et al., 1995). Nenhuma das 123 plantas, regeneradas e analisadas naquela ocasião, apresentou todas as seis isozimas fosfatase ácida (ACP), esterase (EST) e PER, ou as duas isozimas MDH que foram induzidas nos calos. Somente cinco e oito plantas regeneradas mostraram as duas isozimas ADH e uma isozima isocitrato desidrogenase (IDH), respectivamente, que foram induzidas nos tecidos de calos. Estas observações conduziram à proposição de uma expressão transitória para algumas das isozimas induzidas nos tecidos de calos cultivados

2. Polimorfismo de Sequências de DNA em Plantas

O estudo de seqüências de DNA amplificadas numa reação em cadeia (PCR), usando oligonucleotídios arbitrários (William et al., 1990; Welsh e McClelland, 1990), caracterizado como RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), ou usando seqüências de DNA conhecidas como rDNA (Karvonen e Savolainen, 1992), minissatélites (Nybom et al., 1990) e microssatélites (Varshney et al., 1998; Gupta e Varshney, 2000), caracterizando o DNA *fingerprinting*, têm detectado uma alta variabilidade quando são comparados os genomas de indivíduos de uma mesma espécie (Bousquet et al., 1990; D'Ovidio et al., 1990; Klein-Lankhorst et al., 1991; Quiros et al., 1991; Wilde et al., 1992; Nybom, 1993; Hamann et al., 1995).

A técnica do *DNA fingerprinting* foi usada para discriminar espécies de *Rubus* crescendo em um mesmo habitat e de suposta propagação vegetativa (Nybom e Schaal, 1990), e permitiu a caracterização de polimorfismos em espécies selvagens e de diferentes cultivares de *Beta vulgares* (Schmidt et al., 1991; 1993). O emprego de PCR através de marcadores RAPD em espécies de café, ou SSR (*simple sequence repeats*) em genótipos de batata, salientou que as medidas baseadas no uso de PCR facilitam a avaliação e a utilização dos recursos genéticos de plantas (Powell et al., 1995).

Resultados positivos foram obtidos com o emprego de marcadores de RAPD para comparar clones de *Theobroma* (Wilde et al., 1992; Russell et al., 1993), para discriminar cultivares de *Rubus* (Graham et al., 1994) e para avaliar polimorfismos genéticos em *Pinus leucodermus* (Morgante et al., 1992), *Picea abies* (Skov e Wellendorf, 1992), *Quercus* spp. (Moreau et al., 1992), e em clones de *Picea sitchensis* (Van De Ven e McNicol, 1995). O estudo da estrutura genética de populações da espécie *Picea abies*, através de marcadores de RAPD, permitiu tecer considerações sobre as forças seletivas envolvidas nos processos microevolutivos (Bucci e Menozzi, 1995).

Polimorfismos, usando RAPD, foram também caracterizados em espécies selvagens e em cultivares de *Oryza* (Yi et al., 1995; Virk et al., 1995), e em cultivares e espécies de *Musa* (Howell et al., 1994). Variedades de *Hordeum vulgare* foram discriminadas e, foi determinada a distância genética entre elas pelo método RAPD (Sivolap e Kalendar, 1995). Este método foi aplicado para discriminar com eficiência 38 clones comerciais de *Camellia sinensis*, que não puderam ser distinguidos com base em caracteres morfológicos e fenotípicos (Wachira et al., 1995). Em exemplares selvagens da espécie *Grevillea scapigera*, o RAPD foi usado para investigar as variabilidades inter e intra-específicas, e

para agrupar as plantas com variabilidade genética alta para serem usadas em programas de melhoramento (Rossetto et al., 1995). A variabilidade entre seis espécies de *Medicago*, e entre vários acessos dessas espécies, pode ser medida usando marcadores de RAPD (Brummer et al., 1995).

Marcadores de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD foram usados em paralelo para determinar a similaridade genética entre 4 espécies de *Glycyrrhiza* (Yamazaki et al., 1994), e na investigação de variabilidade intra-específica de 4 cultivares de *Capsicum*. Os dendogramas obtidos foram similares (Prince et al., 1995).

As técnicas de cpSSR (*simple sequence repeats of chloroplast*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) foram usadas para caracterização de espécies de *Opuntia* e para estudar a relação entre diferentes espécies de cactos (Labra et al., 2003). Os resultados mostraram que há relação genética entre diferentes espécies de *Opuntia*, e similaridade genética entre espécies das séries 20 e 21 (Britton e Rose, 1919) e uma constituição genética comum entre *O. ficus-indica* e *O. megacantha*, sugerindo que *O. ficus-indica* poderia ser considerada uma forma domesticada de *O. megacantha* (Labra et al., 2003).

Estudos empregando isozimas e RAPD em genótipos da espécie *Ficus carica* revelaram maior proporção de heterozigotos, sendo que para alguns *loci* de isozimas observou-se uma redução de variabilidade genética. De acordo com Chessa e Nieddu (2005), o índice de similaridade calculado para dados obtidos com RAPD indicou redução de variabilidade genética, quando comparada à variabilidade fenotípica estudada por Nieddu et al. (2000).

O marcador RAPD foi recentemente utilizado para avaliar a importância da reprodução sexuada e propagação clonal em *Stenocereus eruca*, uma outra espécie de cacto. A diversidade genotípica observada (0,987) foi alta, maior do que a observada em cactáceas que somente se reproduzem de forma clonal, sugerindo que a propagação clonal não é o principal mecanismo de reprodução em *S. eruca* (Clark-Tapia et al., 2005).

Dez marcadores microssatélites foram desenvolvidos para o cacto colunar *Polaskia chichipe* do México central. Sete destes apresentaram polimorfismo, com número de alelos variando de dois a oito. Estes *loci* poderão ser úteis em estudos evolutivos, tais como fluxo gênico, e em programas de melhoramento (Otero-Arnaiz et al., 2004). Estudo para investigar o efeito da seleção artificial para obtenção de frutos comestíveis de *P. chichipe* foi realizado em populações simpátricas cultivadas, selvagens e manejadas silviculturalmente. A variação genética total nas diferentes populações foi estimada com cinco microssatélites (Otero-Arnaiz et al., 2005).

Gutman et al. (2001), utilizando RAPD, avaliaram a variabilidade genética de *Cereus peruvianus*. Neste trabalho foram estudados vinte e nove genótipos desta cactácea, provenientes da Califórnia, Brasil, Israel e México. Os resultados mostraram que a variabilidade genética foi baixa. Como os frutos de *C. peruvianus* são amplamente consumidos na Europa e Israel possuindo, portanto, alto valor de mercado, há um estímulo para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético que visem melhorar a qualidade destes (Gutman et al. 2001). Os autores destacam que uma forma de contribuir com os programas de melhoramento genético de *C. peruvianus* é a introdução de germoplasmas adicionais para ampliar a variabilidade genética da espécie. Estudos realizados por Mangolin et al. (2002), onde o marcador de RAPD foi utilizado para avaliar tecidos de calos usados para regenerar plantas de *C. peruvianus*, indicaram que o cultivo destes tecidos *in vitro* induziu variabilidade genética.

Objetivos

1. Investigar a existência de polimorfismo de fragmentos aleatórios de DNA amplificados em caules de plantas de *Cereus peruvianus* regeneradas *in vitro* (somaclones) que apresentam morfologias típicas e atípicas, no sentido de detectar variação no genoma das mesmas, determinada pela cultura de tecidos;

2. Investigar a existência de polimorfismo de fragmentos aleatórios de DNA amplificados em caules de descendentes F1 de plantas regeneradas de *C. peruvianus* (RF1), e em plantas obtidas a partir de sementes de somaclones (S) de *C. peruvianus* que apresentam morfologias típicas e atípicas, no sentido de detectar variação no genoma das plantas, determinadas pela cultura de tecidos, assim como examinar a relação entre os descendentes F1 de somaclones de *C. peruvianus*.

Referências Bibliográficas

- ALVAREZ, M., COSTA, S.C., HUBER, A., BARON, M., FONTANA, J.D. The cuticle of the cactus *Cereus peruvianus* as a source of a homo-D-galacturonan. *Appl. Bioch. and Biotech.* v. 51/52, p. 367-377, 1995.
- ALVAREZ, M., COSTA, S.C., UTUMI, H., HUBER, A., BECK, R., FONTANA, J.D. The anionic glycan from the cactus *Cereus peruvianus* - estrutural features and potential uses. *Applied Bioch. Biotech.* v. 34/35, p. 283-295, 1992.
- ALTESOR, A., EZCURRA, H. Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti. *J. Arid Environment*, v. 53, p. 557-557, 2003.
- BAJAJ, Y.P.S. Somaclonal variation-origin, induction, cryopreservation, and implications in plant breeding. In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Somaclonal variation in crop improvement*, Berlin: Springer-Verlag, p. 3-48, 1990.
- BARROS, M.J.; NOZAKI, J. Pollutants abatement from effluents of paper and pulp industries by flocculation/coagulation and photochemical degradation. *Quim. Nova*, v. 25, p. 736-740, 2002.
- BOLWELL, G P Dynamic aspects of the extracellular matrix *Int. Rev. Cytol* , v 46, p 6 3 4, 3
- BOUSQUET, J., SIMON, L., LANONDE, M. DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using polymerase chain reaction. *Can. J. Forest Res.*, v. 20, p. 254-257, 1990.
- BRITTON N.L., ROSE J.N. *The Cactaceae*, Carnegie Institute, Washington, 1919.
- BRITTON, N.L., ROSE, J.N. *The Cactaceae*. Description and Illustrations of Plants of the Cactus Family, Vol. II, New York: Dover, p. 3-20, 1963.
- BROWN, A.H.D.; FELDMAN, M.W.; NEVO, E. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics*, 96:523-526, 1980.
- BRUMMER, E.C., BOUTON, J.H., KOCHERT, G. Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome*, v. 38, p. 362-367, 1995.
- BUCCI, G., MENOZZI, P. Genetic variation of RAPD markers in a *Picea abies* Karst. population. *Heredity*, v. 75, p. 188-197, 1995.

CHESSA I., NIEDDU G. Analysis of diversity in the fruit tree genetic resources from a Mediterranean island. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 52, p. 267–276, 2005.

CLARK-TAPIA R., ALFONSO-CORRADO C., EGUIARTE L. E., MOLINA-FREANER F. Clonal diversity and distribution in *Stenocereus euruca* (Cactaceae), a narrow endemic cactus of sonoran Desert. *American Journal of Botany*, v. 92, p. 272-278, 2005.

CLEGG M.T.; ALLARD R.W. Pattern of genetic differentiation in the slender wild oat species *Avena barbata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 60, p. 1920-1924, 1972.

D'AMATO, F. IN: SALA, F. PASIRI, B. CELLA, R. CIFFERRI, O. (Eds.), *Plant Cell Cultures: Results and Perspectives*. Holland: Elsevier, p. 287-296, 1980.

DEMBITSKY V.M.; REZANKA T. Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. *Phytochemistry*, v. 42, p. 1075-1080, 1996.

DEVERNO, L.L. *An evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis in woody plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Press, v. 1, p. 361-377, 1995.

DOODS, J.H. Introduction: Conservation of plant genetic resource - The need for tissue culture. In: Doods, J.H. (Ed.), *In Vitro Methods for Conservation of Plant Genetics Resource*. London: Chapman and Hall, p. 1-9, 1991.

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

FOURRÉ, J.-L., BERGER, P., NIQUET, L., ANDRÉ, P. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 94, p. 159-169, 1997.

GIBSON, A.C., NOBEL, P. *The Cactus Primer*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 286 p., 1986.

GRAHAM J., MCNICOL, R.J.; GREIG, K., VAN DER VEN, W.T.G. Identification of red raspberry cultivars and an assessment of their relatedness using fingerprints produced by random primers. *J. Hort. Sci.* v. 69, p. 123-130, 1994.

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

GUTMAN F.; BAR-ZVI D.; NERD A.; MIZRAHI Y. Molecular typing of *Cereus peruvianus* clones and their genetic relationship with other *Cereus peruvianus* species evaluated by RAPD analysis. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 76, p. 709-713, 2001.

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

HARDISTY, R.M.; CAIRE, W. Eletrophoretic band patterns of phosphoglucoisomerase and malate dehydrogenase in the pear cactus *Opuntia cymochila* Engelm. and *Opuntia phaeacantha* Engelm. (Cactaceae) from southwestern Oklahoma (USA). *Proceed. of the Oklahoma Acad. Science*, v. 69, p. 5-10, 1990.

HOWELL, E.C., NEWBURY, H.J., SWENNEN, R.L., WITHERS, L.A., FORD-LLOYD, B.V. The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm. *Genome*, v. 37, p 328-332, 1994.

HUSSEY, G. 1986. Vegetative propagation of plant by tissue culture. In: *Plant Cell Culture Technology. Bot. Monographs.* v. 33. Yeoman, M.M. (Ed.). Blackwell Scientific Publications. p. 29-58.

ISABEL, N., BOIVIN, R., LEVASSEUR, C., CHAREST, P.M., BOUSQUET, J., TREMBLAY, F.M. Occurrence of somaclonal variation among somatic embryo-derived white spruces (*Picea glauca*, Pinaceae). *Amer. J. Bot.*, v. 83, p. 1121-1130, 1996.

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

JORGE, I.C. *Isozimas em Cultura de Tecidos de Calos de Cereus peruvianus (Cactaceae) Sob Diferentes Condições de Stress de Temperatura e Fonte de Carbono.* Monografia. Departamento de Biologia. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR. 68 p., 1995.

KARVONEN, P., SAVOLAINEN, O. rDNA variation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). In: *Abstracts of Molecular Biology of Forest Trees, Fifth Workshop of the IUFRO Working Party Molecular Genetics and Cytogenetics*, Careans-Maubuisson, 15-18 June, 1992.

KLEIN-LANKHORST, R.M., VERMUND, A., WEIDE, R., LIHARSKA, T., ZABEL, P. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.*, v. 83, p. 108-114, 1991.

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*, v. 165, p. 1129-1136, 2003.

LARKIN, P.J., SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, v. 60, p. 197-214, 1981.

MACHADO, M F P S , MANGOLIN, C A , OLIVEIRA, COLLET, S A Somatic crossing-over can induce isozyme variation in somaclones of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae) *Haseltonia*, v , p ,

MACHADO, M.F.P.S.; PRIOLI, A.J. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In Vitro Cell. Dev.Biol.-Plant*, v. 32, p. 199-203, 1996.

MACHADO, M.F.P.S., PRIOLI, A.J., MANGOLIN, C.A. Malato dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissue and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem. Genet.*, v. 31, p. 167-172, 1993.

MANGOLIN, C.A., OTTOBONI, L.M.M., MACHADO, M.F.P.S. RAPD markers to evaluated callus tissue of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) maintained in different growth regulator combinations. *Biochem Genet.*, v. 40, p. 351-358, 2002.

MANGOLIN, C.A., PRIOLI, A.J., MACHADO, M.F.P.S. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem. Genet.*, v. 35, p. 189-204, 1997.

MANGOLIN, C.A., PRIOLI, A.J., MACHADO, M.F.P.S. Alcohol dehydrogenase isozymes as markers at 2,4-D x kin combinations in callus and regenerated plants of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem. Genet.*, v. 32, p. 191-200, 1994b.

MANGOLIN, C.A., PRIOLI, A.J., MACHADO, M.F.P.S. Isozymes patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem. Genet.*, v. 32, p. 237-247, 1994a.

MARK, H.F. Biopolymers. In: Kirk-Othmer (Ed.), *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3^a ed.. New York: Willey-Interscience. 1979.

MARTINDALE, M. *The Extra Pharmacopeia Pharmaceutical*. 27^a ed., London: London Press, 1979.

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

MEINS, JR. F. Determination and morphogenetic competence in plant tissue culture. In: Yeoman, M.M. (Ed.), *Plant Cell Culture Technology. Bot. Monographs*. Vol. 33. London: Blackwell Scientific Publications. p. 7-25, 1986.

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

MOREAU, F., KREMER, A., MOREAU, P., PETIT, R. Intra- and interspecific variation of random amplified DNA fragments in European oaks. In: *Abstracts of Molecular Biology of Forest Trees, Fifth Workshop of the IUFRO Working Party Molecular Genetics and Cytogenetics*, Careans-Maubuisson, 15-18 June, 1992.

MORGANTE, M., VENDRAMIN, G.G., OLIVIERI, A.M. Isolation of molecular markers in *Pinus leucodermis* Ant. using random amplified polymorphic DNA's. In: *Abstracts of Molecular Biology of Forest Trees, Fifth Workshop of the IUFRO Working Party Molecular Genetics and Cytogenetics*, Careans-Maubuisson, 15-18 June, 1992.

NERD, A.; RAVEH, E.; MIZRAHI, Y. Adaptation of five columnar cactus species to various conditions in the Negev Desert of Israel. *Economic Botany*, v. 47, p. 304-311, 1993.

NIEDDU G., CHESSA I., FIORI P. P. Osservazioni su una collezione del germoplasma di fico della Sardegna. *Atti del IV Convegno Nazionale Biodiversita: "Germoplasma locale e sua valorizzazione"* II: 657-660, 2000.

NOZAKI, J., MESSERSCHMIDT, I., RODRIGUES, D.G. Tannery waters cleaning with natural polyelectrolytes: chemical speciation studies of chromium. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 36, p. 761-770, 1993.

NYBOM, H. Applications of DNA fingerprinting in plant population studies. In: Pena, S.D.J.; Chakraborty, R.; Eppelen, J.T. & Jeffreys A.J. (Eds.), *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, p. 293-309, 1993.

NYBOM, H., ROGSTAD, S.H., SCHAAL, B.A. Genetic variation detected by use of the M13 DNA 'fingerprinting' probe in *Malus*, *Prunus*, and *Rubus* (Rosaceae). *Theor. Appl. Genet.*, v. 79, p. 153-156, 1990.

NYBOM, H., SCHAAL, B.A. DNA 'fingerprints' reveal genotypec dstribution in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus*, Rosaceae). *Amer. J. Bot.*, v. 77, p. 883-888, 1990.

NOZAKI, J., MESSERSCHMIDT, I., RODRIGUES, D.G. Tannery waters cleaning with natural polyeletrolytes: chemical speciation studies of chromium. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 36, p. 761-770, 1993.

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

OLIVEIRA, S.A., MACHADO, M.F.P.S., PRIOLI, A.J., MANGOLIN, C.A. In vitro propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev.Biol.-Plant*, v. 31, p. 47-50, 1995.

OTERO-ARNAIZ A., CASAS A.,

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

RODRIGUES, D.G. *Polieletrólitos Naturais*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 87 p., 1984.

ROSSETTO, M., WEAVER, P.K., DIXON, K.W. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *Mol. Ecol.*, v. 4, p. 321-329, 1995.

ROTH, R., EBERT, I., SCHMIDT, J. Trisomy associated with loss of maturation capacity in a long-term embryogenesis culture of *Abies alba*. *Theor. Appl. Genet.*, v. 95, p. 353-358, 1997.

RUSSELL, J.R., HOSEIN, F., JOHNSON, E., WAUGH, R., POWELL, W. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Mol. Ecol.*, v. 2, p. 89-97, 1993.

SCHEINVAR, L. *Cactaceas*. Monography. Universidade Nacional Autonoma do México, Depto. Botanica. México. DF., 1985.

SCHMIDT, T., BOBLENZ, K., WEISING, K. Use of highly repeated DNA polymorphisms for genome diagnosis and evolutionary studies in the genus *Beta*. In: Pena, S.D.J.; Chakraborty, R.; Epplen, J.T. & Jeffreys A.J. (Eds.), *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, p. 453-459, 1993.

SCHMIDT, T., JUNG, C., METZLAFF, M. Distribution and evolution of two satellite DNA families in the genus *Beta*. *Theor. Appl. Genet.*, v 82, p. 793-799, 1991.

SKOV, E., WELLENDORF, H. Application of RAPD for high-density genome-mapping and marker-aided selection in Norway spruce. In: *Abstracts of Molecular Biology of Forest Trees, Fifth Workshop of the IUFRO Working Party Molecular Genetics and Cytogenetics*, Careans-Maubuisson, 15-18 June, 1992.

SOBRAL, B.W.S., HONEYCUTT, R.J. 1994. Genetic, plants and the polymerase chain reaction. In: *The Polymerase Chain Reaction*, K.B. Mullis, F. Ferré, R.A. Gibbs (Eds.). Birkhauser Boston, p. 304-319.

TORQUATO, E.F.B., PRIOLI, A.J., MACHADO, M.F.P.S. Differential alcohol dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme expression in long-term callus tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem. Genet.*, v. 33, p. 389-399, 1995.

- TURBAK, A.F. Cellulose. In: Kirk-Othmer (Ed.), *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3^a ed. New York: Willey-Interscience, 1979.
- VARSHNEY R. K, SHARMA P. C., GUPTA P. K., et al. Low level of polymorphism detected by SSR probes in bread wheat. *Plant Breeding*, v. 117, p. 182-184, 1998.
- VAN DE VEN, W.T.G., MCNICOL, R.J. The use of RAPD markers for the identification of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. *Heredity*, v. 75, p. 126-132, 1995.
- VIRK, P.S., FORD-LLOYD, B.V., JACKSON, M.T., NEWBURY, H.J. Use of RAPD for study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity*, v. 74, p. 170-179, 1995.
- VRIES, J.X.; MOYNA, P.; DIAZ, V. Alkaloides cactus Uruguay. *Revista Latinoamericana de Química*, v. 3, p. 21-23, 1971.
- WACHIRA, F.N., WAUGH, R., HACKETT, C.A., POWELL, W. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome*, v. 38, p. 201-210, 1995.
- WEISS, J.; NERD, A.; MIZRAHI, Y. flowering and pollination requirements in *Cereus peruvianus* cultivar in Israel. *Israel Journal of Plant Sciences*, v. 42, p. 149-158, 1994.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.*, v. 18, p. 7213-7218, 1990.
- WENDEL, J.F., WEEDEN, N.F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In Soltis, D. E. and Soltis, P.S. (eds). *Isozymes in Plant Biology*, Dioscorides Press, Portland, OR, pp. 5-45, 1989.
- WHISTTER, R.L. *Methods of Carbohydrate Chemistry*. London: Ed. Academic Press., 1963.
- WILDE, J., WAUGH, R., POWELL, W. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.*, v. 83, p. 871-877, 1992.
- WILLIAM, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WITHERS, L.A. *Tissue Culture Storage for Genetic Conservation*. Rome: IBPGR Technical Document, 1980.

YAMAZAKI, M., SATO, A., SHIMOMURA, K., SAITO, K., MURAKOSHI, I. Genetic relationship among *Gycyrrhiza* plants determined by RAPD and RFLP analyses. *Biol. Pharm. Bull.*, v 17, p. 1529-1531, 1994.

YI, Q-M., DENG, W-G., XIA, Z-P., PANG, H-H. Polymorphism and genetic relatedness among wild and cultivated rice species determined by AP-PCR analysis. *Hereditas*, v. 122, p. 135-141, 1995.

ARTIGO 1

**POLIMORFISMO DE DNA (RAPD) EM SOMACLONES DE *Cereus peruvianus*
MILL. (CACTACEAE)**

**POLIMORFISMO DE DNA (RAPD) EM SOMACLONES
DE *Cereus peruvianus* MILL. (CACTACEAE)**

RESUMO

A proposta do presente estudo foi investigar a existência de polimorfismo de fragmentos aleatórios de DNA amplificados em caules de somaclones que apresentam morfologias típicas e atípicas, no sentido de detectar variações no genoma das plantas, determinadas pela cultura de tecidos. Os 16 *primers* geraram 249 fragmentos reproduzíveis, dos quais 155 foram polimórficos para plantas somaclones e 106 para plantas de acessos. A similaridade entre as plantas dos acessos e entre os somaclones variou de 76,7 a 86,8% e de 70,2 a 93,7%, respectivamente. O dendrograma obtido mostrou que as plantas de somaclones formaram dois grandes grupos, enquanto as plantas dos acessos foram organizadas num grupo separado, refletindo a variabilidade genética gerada na cultura *in vitro* para obter as plantas de *C. peruvianus*. Os somaclones de *C. peruvianus* regenerados apresentaram uma base genética maior (de 70,2 a 93,7%) do que a verificada nas plantas dos acessos, em consequência da variação gerada no cultivo *in vitro* (17,67%). Este é um aspecto positivo para a espécie, pois os somaclones representam um material promissor para compor programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: RAPD, *mandacaru*, cacto, variação somaclonal.

INTRODUÇÃO

Historicamente, desde a década de 1970, a cultura de tecidos vegetais tem sido considerada uma técnica promissora para multiplicar genótipos de interesse. Por outro lado, as análises de plantas multiplicadas *in vitro* têm revelado a existência de polimorfismos, caracterizados como variações somaclonais por Larkin e Scowcroft (1981), as quais podem comprometer a estabilidade genética dos clones ou somaclones produzidos no cultivo *in vitro*. Variações na morfologia de tecidos, variações cromossômicas, bioquímicas e moleculares têm sido evidenciadas em várias espécies de plantas (Joyce et al., 2003).

A multiplicação *in vitro* de plantas de *Cereus peruvianus*, regeneradas a partir de cultura de calos (Oliveira et al., 1995), identificou variantes somaclonais com morfologias de caules típicos, característicos de plantas encontradas em acessos na natureza; e com morfologias atípicas, que simulam os fenótipos de caules descritos para variedades ou outras espécies do gênero (Britton e Rose, 1963; Mangolin et al., 1997; Altesor e Ezcurra,

2003). A cultura de tecidos de calos de *C. peruvianus* parece gerar, portanto, subespécies ou plantas mostrando peculiaridades de diferentes espécies de *Cereus* (Britton e Rose, 1963).

Na cultura de tecidos dos calos de *C. peruvianus* deve ter ocorrido alterações no controle da expansão e no plano de divisão das células, eventos estes que de acordo com Bolwell (1993), são tidos como responsáveis pela forma e direcionamento das células vegetais, e conseqüentemente, pela forma definitiva das plantas. A regulação de tais eventos pode ser gerenciada pelo DNA, ou pode ser conduzida *in vitro* por fatores diversos, tais como efeito de nutrientes do meio de cultura, de reguladores de crescimento, condições de manutenção da cultura, dentre outros, usados para promover os eventos de desdiferenciação e diferenciação celulares.

Mutações induzidas *in vitro* ou alterações na expressão de genes podem ter determinados a morfogênese diferencial dos caules de *C. peruvianus* regenerados. Assim a proposta do presente estudo foi investigar a existência de polimorfismo de fragmentos aleatórios de DNA amplificados em caules de somaclones que apresentam morfologias típicas e atípicas, no sentido de detectar variação no genoma de indivíduos determinada pela cultura de tecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de *C. peruvianus*, originadas de acessos, encontram-se sob cultivo no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, PR), e as plantas regeneradas *in vitro*, os somaclones, são cultivados no Jardim Experimental Didático da mesma Universidade.

O DNA genômico foi extraído de fragmentos de caule de *C. peruvianus* de 48 indivíduos somaclones adultos e de 9 indivíduos adultos, coletados em diferentes acessos.

Para extração do DNA foi utilizado o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999), com modificações referentes à concentração de NaCl, incubação com RNase e etapa adicional de purificação com clorofórmio:isoamílico (24:1) (Tabela 1). A quantificação do DNA extraído foi feita por análise em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Acetato de Sódio, EDTA, pH 8,0 - Hoisington et al., 1994), usando soluções de DNA padrão (Fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas.

As reações de amplificação para os ensaios de RAPD foram feitas em termociclador Techne, TC-512, conforme o protocolo original descrito por William et al.

(1990), com pequenas modificações. As reações foram realizadas em câmara asséptica, em um volume final de 20 μ L contendo 25ng de DNA genômico, 0,3 μ mol/L de *primers* (Operon Technologies Inc), 10mmol/L Tris-HCl, pH 8,8, 2,5mmol/L de MgCl₂, 0,1mmol/L de cada dNTP e 1 unidade de Taq-DNA polimerase (Invitrogen).

A desnaturação do DNA foi feita a 96°C por 5 min. Esta etapa foi seguida por 45 ciclos de amplificação (94°C: 45 seg.; 35°C: 1 min.; 72°C: 1 min. 30 seg.). Após os 45 ciclos foi realizada uma extensão de 7 min a 72°C.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 1,7% em tampão TBE 0,5X (89mmol/L Tris, 89mmol/L Ácido Bórico e 2mmol/L EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e fotografados. O marcador de peso molecular utilizado nos géis foi DNA Ladder 1Kb (Invitrogen).

Os fragmentos foram analisados comparando os perfis RAPD de cada indivíduo em termos de presença ou ausência de cada fragmento de DNA. A similaridade dos indivíduos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard, enquanto a análise do agrupamento UPGMA foi realizada com o software NTSYS-pc (Rohlf 1989).

Tabela 1 - Protocolo utilizado para extraç o de DNA de tecidos de caules de *Cereus peruvianus*

	ALJANABI et al. (1999)
TECIDO DE CAULE	300 mg
REAGENTES DE EXTRAÇÃO	
Tris-HCl	100 mmol L pH 8
EDTA	5 mmol L pH 8
NaCl	5mol L
CTAB	2%
Sulfito de S dio	0,06%
CTAB	20%
N-Lauril Sarcosina	5%
PVP-4	10%
REAGENTES DE PURIFICAÇÃO	
Fenol Clorof rmio lcool Isoamlico	1 volume
RNase A (1 mg mL)	0,1ng/μL
Clorof rmio lcool Isoamlico (4)	1 volume
REAGENTES DE PRECIPITAÇÃO	
Isopropanol gelado	0,6 volume
NaCl 5 mol L	0,06 volume
LAVAGEM DO PRECIPITADO	
lcool (X)	500μL

Resultados e Discussão

O método descrito por Aljanabi et al. (1999), com as modificações relacionadas na Tabela 1, mostrou-se mais adequado para extrair DNA de caule de *C. peruvianus*. A quantidade de DNA genômico variou de 12 a 100ng/μL por amostra.

Dos 61 *primers* testados, 16 (OPA-02, OPA-04, OPA-09, OPA-13, OPA-20, OPB-01, OPB-07, OPC-06, OPF-09, OPL-11, OPM-02, OPM-07, OPM-10, OPP-02, OPP-07, OPP-09) produziram fragmentos amplificados de DNA; após um teste inicial utilizando um indivíduo somaclone e um indivíduo de acesso, somente 16 *primers* foram usados para *fingerprint* RAPD (Tabela 2). Os 16 *primers* produziram padrões reproduzíveis para todas

as bandas registradas e foram empregadas para todos os indivíduos (48 indivíduos somaclones e 9 indivíduos de acessos). Somente um *mix* foi preparado para cada *primer*, o qual foi usado para comparar simultaneamente as 57 amostras individuais de DNA, na mesma reação de amplificação.

Tabela 2. *Primers* selecionados para análise populacional de *C. peruvianus*.

Primers RAPD	Descrição
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'
OPB-01	5'-GTTTCGCTCC-3'
OPB-07	5'-GGTGACGCAG-3'
OPC-06	5'-GAACGGACTC-3'
OPF-09	5'-CCAAGCTTCC-3'
OPL-11	5'-ACGATGAGCC-3'
OPM-02	5'-ACAACGCCTC-3'
OPM-07	5'-CCGTGACTCA-3'
OPM-10	5'-TCTGGCGCAC-3'
OPP-02	5'-TCGGCACGCA-3'
OPP-07	5'-GTCCATGCCA-3'
OPP-09	5'-GTGGTCCGCA-3'

Os 6 *primers* geraram 4 fragmentos reproduzíveis (Tabela 3), dos quais 55 foram polimórficos para indivíduos somaclones e 6 para indivíduos de acessos. O número de bandas para cada *primer* variou de 3 a 6, com uma média de 5,56 fragmentos por *primer*. O tamanho dos produtos amplificados variou de 300 a 550 bp. Os *primers* OPA₄, OPB₇ e OPM₁₀ geraram um maior número de fragmentos entre os *primers* testados, enquanto o *primer* OPB₁ mostrou uma maior capacidade para discriminar fragmentos polimórficos.

O padrão de bandas polimórficas reflete a variabilidade genética (Figura 1) em plantas somaclones (6, 4) e de acessos (4, 5). A variabilidade genética entre plantas somaclones é grande, pois um grande número de bandas polimórficas foi detectado com apenas 6 *primers*, e maior quando comparado com o polimorfismo detectado nos acessos.

Estes resultados indicam que a cultura de tecidos de calos induziu variabilidade genética nas plantas regeneradas *in vitro*

Tabela 3. Polimorfismo obtido com *primers* selecionados para avaliação de somaclones e acessos de *C. peruvianus*.

<i>PRIMERS</i>	Total de Fragmentos	Fragmentos Polimórficos	
		Somaclones	Acessos
	16	13	9
OPA-02			
OPA-04	21	14	12
OPA-09	12	6	3
OPA-13	13	8	7
OPA-20	12	11	8
OPB-01	15	9	6
OPB-07	21	13	14
OPC-06	19	14	14
OPF-09	14	10	5
OPL-11	13	8	3
OPM-02	21	15	4
OPM-07	7	4	2
OPM-10	14	7	5
OPP-02	15	8	6
OPP-07	16	1	2
OPP-09	20	14	6
Total	249	155	106
		62,24%	42,57%

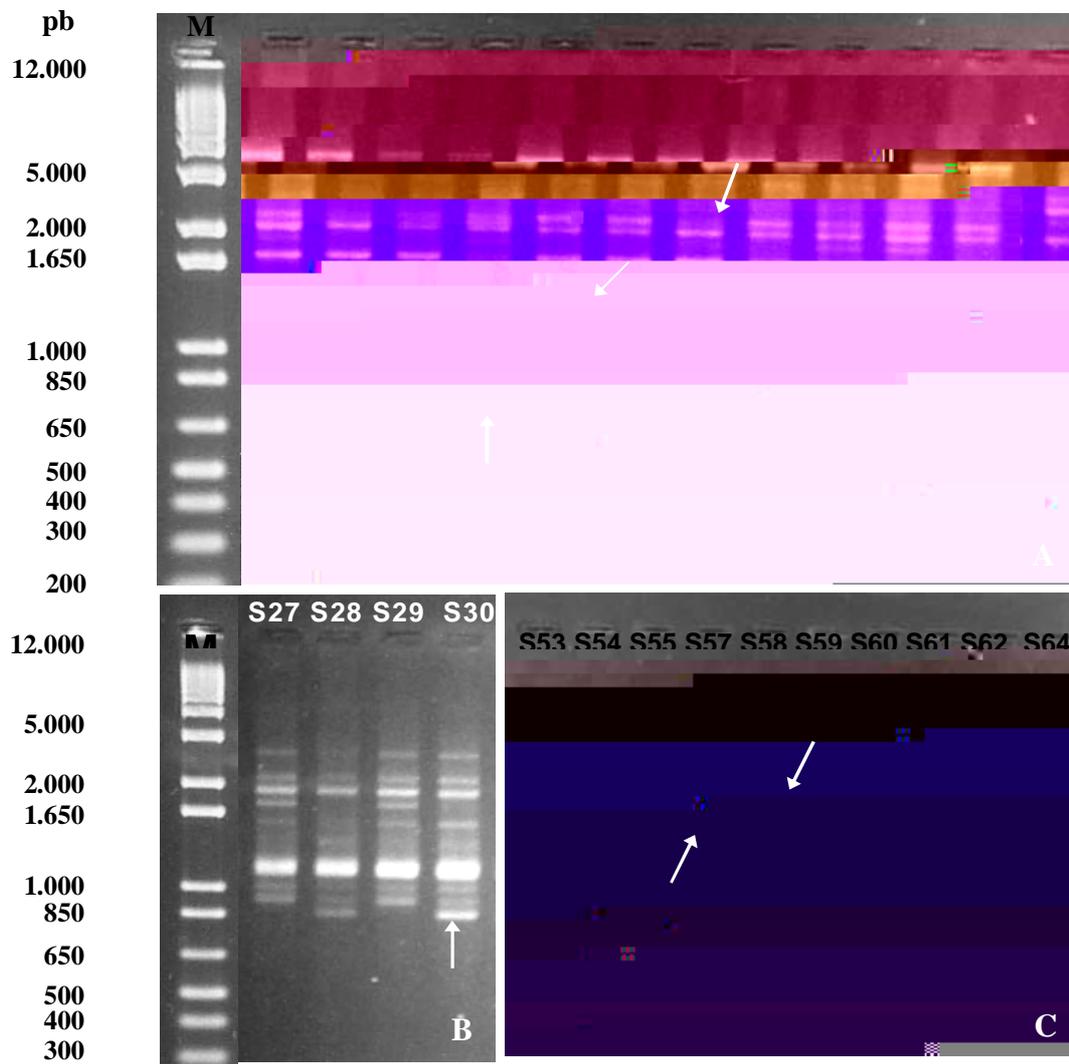


Figura 1. Fragmentos de DNA de somaclones (S) de *Cereus peruvianus* amplificados utilizando *primers* para RAPD. (A) *Primer* OPA-04, (B) OPA-09 e (C) OPM-02. M é o marcador de peso molecular DNA Ladder 1 Kb. As setas indicam fragmentos polimórficos amplificados com os diferentes *primers*.

A similaridade entre os indivíduos dos acessos e entre os somaclones variou de 6, a 6, e de 0, a 3, , respectivamente O dendrograma obtido (Figura) mostra que os somaclones formaram dois grandes grupos, enquanto os indivíduos de acessos foram organizados

num grupo separado, refletindo a variabilidade genética gerada na cultura *in vitro* para obter as plantas de *C. peruvianus*

A base genética estimada no presente estudo, para os indivíduos de acessos de *C. peruvianus*, está próxima daquela registrada por Gutman et al. (2001), que encontraram valores de 89 a 99% para a similaridade em clones desta espécie originários da Califórnia, usando o mesmo tipo de marcador molecular. Os referidos autores destacaram a base genética estreita da espécie, que tem limitado os programas de melhoramento genético no sentido de obter frutos com as características desejáveis pelos consumidores. Por outro lado, os somaclones de *C. peruvianus* regenerados apresentaram uma base genética maior (de 70,2 a 93,7%) do que a verificada nos indivíduos dos acessos, em consequência da variação gerada no cultivo *in vitro* (17,67%). Este é um aspecto positivo para a espécie, pois os somaclones representam um material promissor para compor programas de melhoramento genético.

As características florais e reprodutivas dos somaclones têm mostrado que estas são análogas às reportadas para plantas de acessos (Ruvolo-Takasusuki et al., 2006), e a análise da formação de gametas nos somaclones também foi similar a de indivíduos de acessos (Silva et al., 2006). Estas recentes evidências são importantes e sustentam a hipótese de que os somaclones passam a ampliar a base genética da espécie.

A distribuição dos somaclones S22, S26, S32, S35, S40, S45, S54, S55, S62, S66, e S69, as quais apresentam caules com morfologias atípicas (costelas formando sulcos irregulares), e dos somaclones S19, S33, S43, S47, S51, S53, S59 que apresentam caules com morfologia mista (costelas lineares e formando sulcos irregulares) no dendrograma (Figura 2), indica que o polimorfismo dos fragmentos aleatórios de DNA não está associado com a morfologia dos caules. O *primer* OPB-07 gerou um fragmento com aproximadamente 300 pb, característico de indivíduos de acessos, e o *primer* OPP-09 revelou um fragmento de aproximadamente 570 pb presente somente em somaclones (Figura 3). Entretanto, nenhum dos *primers* permitiu discriminar somaclones com morfologia de caules típicos e atípicos. Isto é um indicativo de que as variações geradas *in vitro* que afetam os somaclones são aleatórias, podendo ocorrer em ambos os tipos de somaclones, apresentando caules típicos ou atípicos.

Evidências de não associação entre variações morfológicas e polimorfismo de fragmentos aleatórios de DNA amplificados têm sido registradas para somaclones de outras espécies de plantas (Goto et al., 1998; Chen et al., 1998). Morfologias alteradas em plantas cultivadas *in vitro* têm sido explicadas por eventos de metilação diferencial, como a

metilação diferencial em decorrência da condição de estresse *in vitro* (Kaeppeler e Phillips, 1993). Eventos de hipometilação foram associados com diferentes fenótipos em regenerantes de *Solanum tuberosum* (Joyce e Cassels, 2002) e em regenerantes de *Elaeis guineensis* (Jaligot et al., 2002; Kubis et al., 2003). A reversão fenotípica que determinou a característica de caules com morfologia mista em somaclones de *C. peruvianus*, foi verificada em somaclones de outras espécies e trata-se de um evento que tem sido considerado por Joyce et al. (2003), como indicativo da ocorrência de eventos de metilação. Em adição, a hipoacetilação de histonas, que reduz a expressão de alguns genes em *Arabidopsis*, também resultou em anomalias fenotípicas (Finnegan, 2001). De acordo com Tregear et al. (2002), indicações e evidências da expressão de genes de defesa, geralmente induzidos por estresse biótico e abiótico em células cultivada *in vitro* (Yu et al., 1999), também estão relacionadas com alterações de fenótipos de plantas.

A análise de RAPD, no presente estudo, nos indivíduos de *C. peruvianus* regenerados a partir da cultura de calos, foi importante para esclarecer a suspeita de que mutações, induzidas no cultivo *in vitro*, podem determinar o surgimento de novos alelos (Mangolin et al., 1997; 2002), indicando que a cultura de tecidos pode ser usada para ampliar a base genética da espécie, que a morfologia de caules de somaclones e o polimorfismo de fragmentos aleatórios de DNA não estão associados, e conduzindo para a hipótese de que eventos de metilação devem determinar as morfologias atípicas dos somaclones.

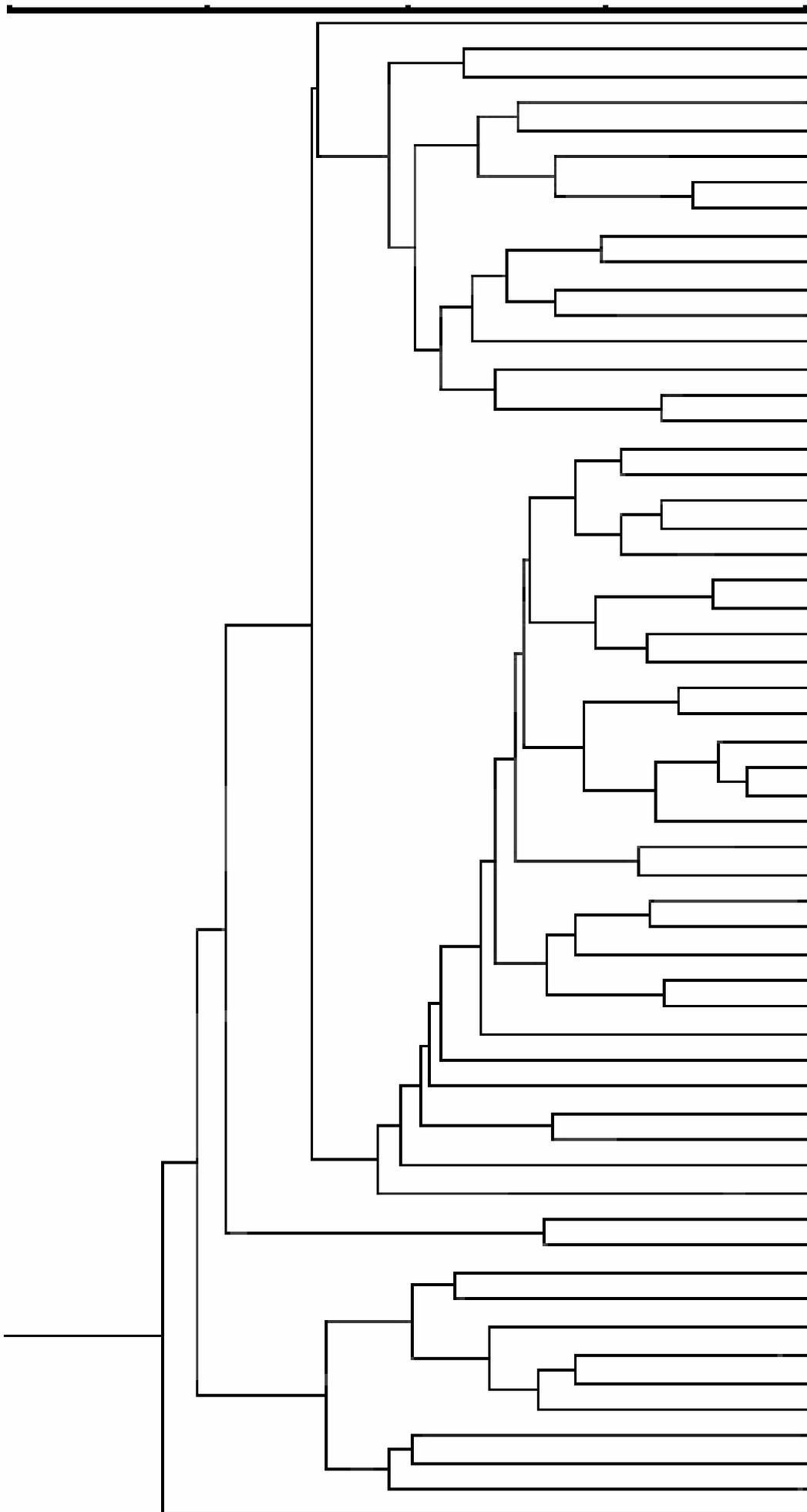
0.68

0.72

0.80

0.88

1.00



S1	- 0.765
S24	- 0.822
S26	- 0.792
S28	- 0.844
S61	- 0.828
S53	- 0.859
S54	- 0.914
S55	- 0.804
S31	- 0.878
S35	- 0.840
S64	- 0.860
S65	- 0.826
S45	- 0.814
S67	- 0.835
S68	- 0.902
S69	- 0.762
S2	- 0.886
S3	- 0.867
S5	- 0.902
S7	- 0.886
S6	- 0.850
S9	- 0.923
S11	- 0.876
S60	- 0.896
S62	- 0.846
S41	- 0.909
S44	- 0.870
S46	- 0.925
S47	- 0.937
S48	- 0.900
S49	- 0.843
S30	- 0.893
S32	- 0.835
S19	- 0.897
S33	- 0.868
S57	- 0.856
S22	- 0.903
S23	- 0.829
S40	- 0.813
S66	- 0.810
S59	- 0.805
S8	- 0.858
S18	- 0.798
S51	- 0.789
S71	- 0.728
S27	- 0.855
S29	- 0.715
A2	-
0.820	
A3	-
0.802	
A4	- 0.833
A5	- 0.868

Figura 2. Dendrograma construído a partir dos fragmentos de RAPD para os 48 somaclones (S) e 9 acessos (A) de *Cereus peruvianus*, utilizando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

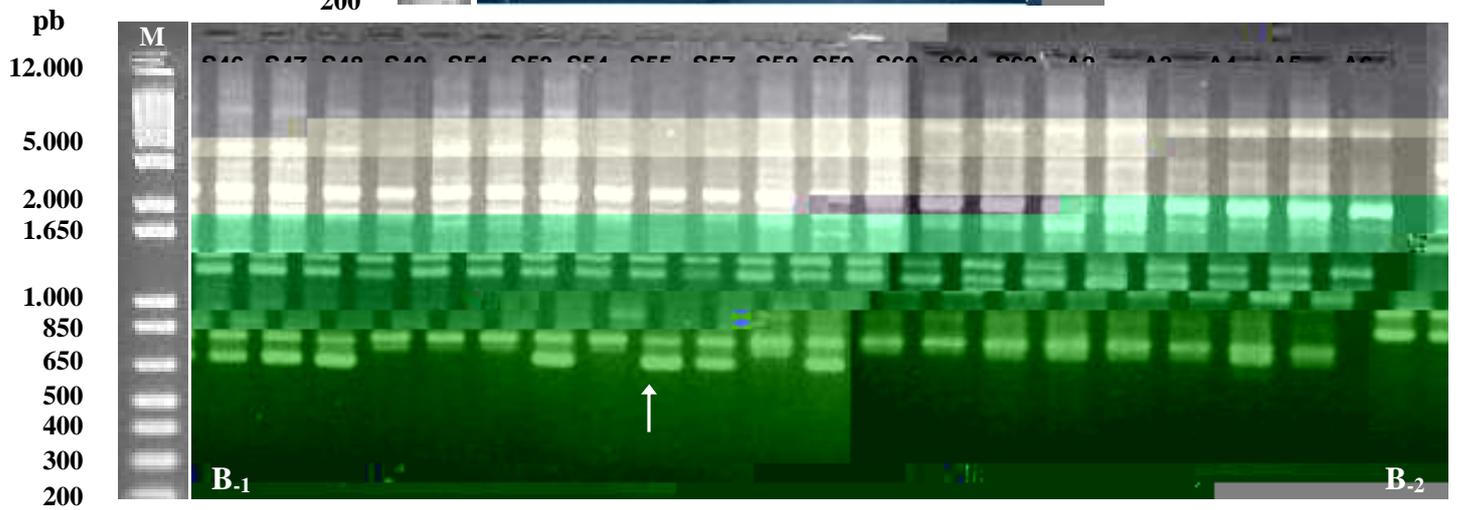
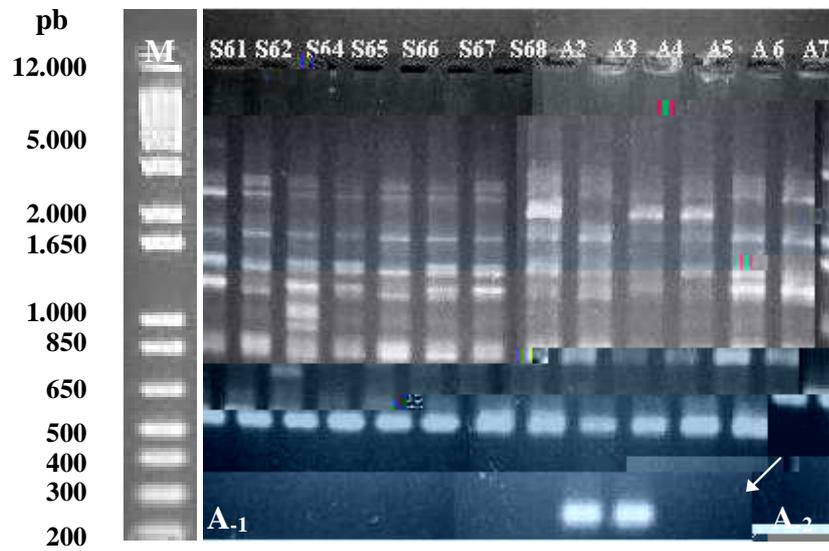


Figura 3. Fragmentos específicos de DNA de *Cereus peruvianus* amplificados com os *primers* para RAPD. **(A)** OPB-07 gerou um fragmento com aproximadamente 300 pb, característico de plantas de acessos (A₂); em A₁, plantas somaclones. **(B)** OPP-09 revelou um fragmento de aproximadamente 570 pb presente somente em somaclones (B₁); em B₂, plantas de acessos.

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 Mol. Biol. Rep.*, v. 17, p. 1-8, 1999.

ALTESOR A., EZCURRA H. Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti. *J. Arid Environment*, v. 53, p. 557-557, 2003.

BOLWELL, G.P. Dynamic aspects of the extracellular matrix. *Int. Rev. Cytol.*, v. 146, p. 261-324, 1993.

BRITTON N.L., ROSE J.N. *The Cactaceae*. Description and Illustrations of Plants of the Cactus Family, Vol. II, New York: Dover, p. 3-20, 1963.

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

FINNEGAN E. J. Epialleles - a source of random variation in times of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, v. 5, p. 101-106, 2001.

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

GUTMAN F.; BAR-ZVI D.; NERD A.; MIZRAHI Y. Molecular typing of *Cereus peruvianus* clones and their genetic relationship with other *Cereus peruvianus* species evaluated by RAPD analysis. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 76, p. 709-713, 2001.

HOISINGTON D., KHAIRALLAH M., GONZÁLEZ-DE-LEÓN D. 1994. Laboratory Protocols: *CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Second Edition, Mexico, D.F., CIMMYT, 50 p.

JALIGOT E, BEULÉ T, RIVAL A Methylation-sensitive RFLPs characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation associated polymorphism *Theor. Appl. Genet.*, v 4, p 63-66, 1990

JOYCE S M, CASSELS A C, JAIN S M Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v 4, p 3-6, 1990

3

JOYCE S M , CASSELS A C Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v 10 , p 53 , 1990

KAEPPLER S M , PHILLIPS R L Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize *PNAS*, v 70 , p 366 , 1973

KUBIS S E , CASTILHO A M M F , VERSHININ A V et al Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation *Plant Molecular Biology*, v 5 , p 63 , 1993

LARKIN P.J., SCOWCROFT W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, v. 60, p. 197-214, 1981.

MANGOLIN C.A., OTTOBONI L.M.M., MACHADO M.F.P.S. RAPD markers to evaluate callus tissue of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) maintained in different growth regulator combinations. *Biochem Genet.*, v. 40, p. 351-358, 2002.

MANGOLIN C.A., PRIOLI A.J., MACHADO M.F.P.S. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem. Genet.*, v. 35, p. 189-204, 1997.

OLIVEIRA S.A., MACHADO M.F.P.S., PRIOLI A.J., MANGOLIN C.A. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v. 31, p. 47-50.

ROHLF F J *NTSYS-pc* Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 5.1 - New York Exeter Publ New York

RUVOLO, TAKASUSUKI M C C , MANGOLIN C A , MACHADO M F P S Somaclones of *C. peruvianus* Mill (Cactaceae) may contribute towards the broadening of the species genetic basis *Research Journal of Botany*, v 3 , p 36 , 2006

SILVA N , MACHADO M F P S , MANGOLIN C A , PAGLIARINI M S Microsporogenesis in somaclones of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae) *Journal of Plant Sciences*, v 13 , p 36 , 2006

TREGEAR J W , MORCILLO F , RICHARD F , BERGER A , SINGH R , CHEAH S C , HARTMANN C , RIVAL A , DUVAL Y Characterization of a defensin gene

expressed in oil palm inflorescences induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events *Journal of Experimental Botany*, v 53, p 3 - 36, 2002

WILLIAM J G K , KUBELIK A R , LIVAK K J , RAFALSKI J A , TINGEY S V
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucleic Acid Res.* 653 - 6535

YU H. J., MOON M. S., LEE H. S. et al. Analysis of cDNA expressed during first cell division of petunia petal protoplast cultures using expressed sequence tags. *Molecules and Cell*, v. 9, p. 258-264, 1999.

ARTIGO 2

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM DESCENDENTES F1 DE
SOMACLONES DE *Cereus peruvianus* MILL. (CACTACEAE)**

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM DESCENDENTES F₁ DE
SOMACLONES DE *Cereus peruvianus* MILL.
(CACTACEAE)**

Resumo

O polimorfismo e a relação entre os descendentes F1 (plantas RF1) de somaclones (S) de *Cereus peruvianus* foram identificados e analisados por marcadores RAPD. Dezesesseis *primers* produziram um padrão repetitivo para todas as bandas registradas em 14 indivíduos RF1 de S3, 11 indivíduos RF1 de S9, 8 indivíduos RF1 de S48, e 14 indivíduos RF1 de S71. Os 16 *primers* geraram 222 fragmentos reproduzíveis dos quais 103, 100, 80 e 108 foram polimórficos para os indivíduos RF1 de S3, S9, S48, e S71, respectivamente. O número total de bandas polimórficas para os indivíduos RF1 dos quatro somaclones foi 124. Os *primers* OPC-06 e OPP-09 geraram o maior número de fragmentos entre os *primers* testados, enquanto o *primer* OPP-09 mostrou uma maior capacidade para discriminar fragmentos polimórficos. O polimorfismo entre indivíduos RF1 (55,85%) foi alto. O dendrograma gerado pelo coeficiente de Jaccard mostrou que não houve agrupamento de indivíduos RF1 de acordo com o somaclone parental (S3, S9, S48, ou S71) e que a similaridade entre indivíduos RF1 variou de 72.5% a 90.5%. Este fato suporta a hipótese de que a variabilidade induzida *in vitro* pode ser usada na ampliação da base genética de *C. peruvianus*.

Palavras-chave: RAPD, *mandacaru*, cacto, variação somaclonal, diversidade genética.

Abstract

Polymorphism and relationships among F1 descendents (RF1 plants) of *Cereus peruvianus* somaclones (S) were detected and examined by RAPD markers. Sixteen primers yielded repetitive patterns for all scored bands in 14 RF1 plants of S3, 11 RF1 plants of S9, 8 RF1 plants of S48, and 14 RF1 plants of S71. The 16 primers generated 222 reproducible fragments of which 103, 100, 80 and 108 were polymorphic in RF1 plants of S3, S9, S48, and S71, respectively. Total number of polymorphic bands for the RF1 plants from four somaclones was 124. Primer OPC-06 and OPP-09 generated the highest number of fragments among the tested primers, whereas OPP-09 primer showed the greatest capacity for discriminated polymorphic fragments. Polymorphism among RF1 plants (55.85%) is high. Dendrogram generated by Jaccard coefficient showed that there was no grouping of RF1 plants according to parental somaclone (S3, S9, S48, or S71) and that the similarity in RF1 plants ranged from 72.5% to 90.5%. This fact supports our hypothesis that *in vitro* induced variability may be used for broadening the genetic base of *C. peruvianus* species.

Key words: RAPD, *mandacaru*, cactus, somaclonal variation, genetic diversity.

Introdução

Embora *Cereus peruvianus*, conhecida no Brasil como *mandacaru*, seja um cacto utilizado como ornamental, esta espécie também tem importância econômica e industrial. Plantas de *C. peruvianus* produzem alcalóides aminos (Vries et al. 1971, Oliveira e Machado 2003), ésteres de cera com a característica de impermeabilidade à água e de potencial aplicação como barreira impermeável (Dembitsky e Rezanka 1996, Rezanka e Dembitsky 1998), e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais (Alvarez et al. 1992, 1995, Nozaki et al. 1993, Barros e Nozaki 2002). Esta espécie é cultivada comercialmente em pequena escala em Israel, onde é considerada como uma *fruit crop* (Mizrahi e Nerd 1999, Nerd et al. 1993, Weiss et al. 1993, 1994).

Como as plantas de *C. peruvianus* possuem vários compostos de interesse econômico, a cultura de tecidos é empregada para uma rápida multiplicação da espécie a partir de tecidos de calos (Oliveira et al. 1995). A indução de calos e a subsequente regeneração de plântulas produziram muitas plantas, as quais exibiram variação somaclonal (Mangolin et al., 1997). As plantas *in vitro*, regeneradas a partir da cultura de tecido de calos, são vulneráveis à

Os indivíduos de *C. peruvianus* utilizados nos ensaios propostos encontram-se sob cultivo em condições ambientais, no Jardim Experimental da Universidade Estadual de Maringá (Maringá PR Brasil; altitude 554.9m; 23° 25'S; 51° 25' W). Tais indivíduos, descendentes F1 de plantas regeneradas de *C. peruvianus* (RF1), foram obtidos a partir de sementes de somaclones (S) coletadas dos indivíduos S3, S9, S48, e S71 que tiveram polinização cruzada. A população de somaclones encontra-se sob cultivo desde 1997, no Jardim Experimental e apresentam caules com morfologia atípica. Os indivíduos RF1 com um ano de idade são mantidos em vasos e os indivíduos com 2-3 anos, sob cultivo, no Jardim Experimental.

Os fragmentos de caules frescos (100-200mg) dos indivíduos RF1 com um ano de idade foram preparados, de acordo com o protocolo de Aljanabi et al. (1999), com modificações. As amostras foram pulverizadas com nitrogênio líquido e homogeneizadas em 300-600 μ L de tampão 200mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 50mmol/L EDTA, pH 8,0, 2,2mol/L NaCl (ou 4mol/L NaCl para plantas RF1 com três anos de idade), 2% w/v CTAB, 0,06% sulfito de sódio, 20% w/v CTAB, 5% w/v lauril-sarcosina, e 10% w/v PVP-40. O DNA foi extraído com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), incubado por 2 horas com 0,1ng/ μ L de RNase (10ng/mL) e com igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Isopropanol (0,6 volume) e 5mol/L NaCl (0,06 volume) foram usados para a precipitação do DNA.

A quantificação do DNA isolado foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Acetato de Sódio, EDTA, pH 8,0 - Hoisington et al., 1994), usando soluções de DNA padrão (Fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas.

As reações de amplificação para os ensaios de RAPD foram feitas conforme o protocolo original descrito por William et al. (1990), com pequenas modificações. As reações foram realizadas em câmara asséptica, em um volume final de 20 μ L contendo 25ng de DNA genômico, 0,3 μ mol/L de *primers* (Operon Technologies Inc.), 10mmol/L de Tris-HCl, pH 8,8, 2,5mmol/L de MgCl₂, 0,1mmol/L de cada dNTP e 1 unidade de Taq-DNA polimerase (Invitrogen).

Após as reações com os *primers* OPA-12 e OPB-06 (Operon Technologies Inc.), um teste com dois indivíduos e 45 *primers* dos kits OPA, OPB, OPC, OPP, OPM foram usados nas reações de amplificação, num Termociclador Personal Eppendorf Mastercycler Gradient. As condições para PCR foram: desnaturação do DNA a 96°C por 5 min, 45

ciclos de 94°C por 30 seg, 35°C por 45 seg, e 72°C por 1 min; com uma extensão de 7 min a 72°C. Após o teste inicial utilizando DNA de dois indivíduos RF1, somente 16 *primers* foram usados para *fingerprint* RAPD.

Os produtos das ampliações foram separados em gel de agarose 1,7% em tampão TBE 0,5X (89mmol/L Tris, 89mmol/L Ácido Bórico e 2mmol/L EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e fotografados. O marcador de peso molecular utilizado nos géis foi DNA Ladder 1Kb (Invitrogen).

Os fragmentos foram analisados comparando os perfis RAPD de cada indivíduo em termos de presença ou ausência de cada fragmento de DNA. A similaridade dos indivíduos foi calculada pelo coeficiente de Jaccard, enquanto a análise do agrupamento UPGMA foi realizada com o software NTSYS-pc (Rohlf 1989).

Resultados e Discussão

A quantidade de DNA genômico variou de 4 a 30ng/mg por amostra, pelo método descrito por Aljanabi et al. (1999), com modificações. Entre os 45 *primers*, 16 (OPA-02, OPA-04, OPA-09, OPA-10, OPA-12, OPA-20, OPB-01, OPB-04, OPB-07, OPC-06, OPP-02, OPP-07, OPP-09, OPM-02, OPM-07 e OPM-10) produziram fragmentos amplificados de DNA (Tabela 2). Os 16 *primers* produziram padrões repetitivos para todas as bandas registradas e foram empregadas para todos os indivíduos (14 indivíduos RF1 de S3, 11 RF1 de S9, 8 RF1 de S48, e 14 RF1 de S71). Somente um *mix* foi preparado para cada *primer*, o qual foi usado para comparar simultaneamente as 47 amostras individuais de DNA na mesma reação de amplificação.

Os 6 *primers* geraram fragmentos reproduzíveis (Tabela) dos quais 3, 2, 1 e 1 foram polimórficos para plantas RF de S3, S9, S48, e S71, respectivamente. O número de bandas para cada *primer* variou de 6 a 10, com uma média de 7,5 fragmentos por *primer*. O tamanho dos produtos amplificados variou de 50 a 500 bp. Os *primers* OPC₆ e OPP₆ geraram um maior número de fragmentos entre os *primers* testados, enquanto o *primer* OPP₆ mostrou uma maior capacidade para discriminar fragmentos polimórficos nos indivíduos RF (Tabela).

O padrão de bandas polimórficas reflete a variabilidade genética (Figura 1) (55, 5) nos indivíduos RF de somaclones S3, S9, S4 e S71 (Tabela 1). O polimorfismo entre indivíduos RF foi grande, pois um grande número de bandas polimórficas foi detectada com apenas 6 *primers*. O polimorfismo obtido nos indivíduos RF (55, 5) foi maior do que o polimorfismo relatado por Mangolin et al. (2000), para plantas (plantas crescidas de sementes germinadas) e para somaclones (633 plantas regeneradas) de *C. peruvianus*, usando marcadores bioquímicos de *loci* de isozimas a proporção de loci polimórficos para as duas populações foi 3,6. O nível de polimorfismo nos indivíduos RF também foi maior do que o polimorfismo detectado com RAPD entre clones de *C. peruvianus* (2000) da Califórnia e 3 plantas de *C. jamacaru* (2004) do norte do Brasil (Gutman et al. 2001).

A frequência de polimorfismo foi relativamente maior entre os indivíduos RF1 do somaclone S71 (49,09%) do que o polimorfismo obtido entre os indivíduos RF1 do somaclone de S3 (46,6%), S9 (45,45%), e S48 (37,03%). Apesar destas diferenças, o dendrograma gerado pelo coeficiente de Jaccard mostrou que não houve agrupamento das plantas RF1 de acordo com o somaclone parental (S3, S9, S48, ou S71). O dendrograma também revelou que a similaridade observada nos indivíduos RF1 variou de 72,5% a 90,5% (Figura 2). Esta evidência confirma a hipótese que a variabilidade induzida *in vitro* pode ser usada para ampliar a base genética de *C. peruvianus*, pois Gutman et al. (2001) obtiveram similaridade genética variando de 89% a 99% entre clones de *C. peruvianus*. Desta forma, sementes de indivíduos RF1 de somaclones de *C. peruvianus*, apresentando caules com morfologia típica ou original, podem ser usadas para compor programas de melhoramento genético da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALJANABI S.M., FORGET L., DOOKUN A. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.* v. 17, p. 1-8.

ALVAREZ M., COSTA S.C., HUBER A., BARON M., FONTANA J.D. 1995. The cuticle of the cactus *Cereus peruvianus* as a source of a homo-D-galacturonan. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 51/52, p. 367-377.

ALVAREZ M., COSTA S.C., UTUMI H., HUBER A., BECK R., FONTANA J.D. 1992. The anionic glycan from the cactus *Cereus peruvianus* - structural features and potential uses. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.34,p. 283-295.

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

DEMBITSKY V M AND REZANKA T 6 Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus* *Phytochemistry*, v 4 , p 5

GUTMAN F , BARZVI D , NERD A , MIZRAHI Y Molecular typing of *Cereus peruvianus* clones and their genetic relationships with other *Cereus* species evaluated by RAPD analysis *J. Hort. Sci. Biotechn.*,v 6, p 3

HOISINGTON D., KHAIRALLAH M., GONZÁLEZ-DE-LEÓN D. 1994. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Second Edition, Mexico, D.F., CIMMYT, 50 p.

KARP A., BRIGHT W.J. 1985. On the causes and origins of somaclonal variation. In: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, vol. 2. Oxford, England: Oxford University Press, p. 199-243.

KLERK G.H. 1990. How to measure somaclonal variation. *Acta Bot. Neerl.*, v.39, p. 129-144.

LARKIN P., SCOWCROFT W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, v. 60, p. 197-214.

MACHADO M.F.P.S., MANGOLIN C.A., OLIVEIRA-COLLET S.A. 2000. Somatic crossing-over can induce isozyme variation in somaclones of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Haseltonia*, v. 7, p. 77-80.

MANGOLIN C.A., OTTOBONI L.M.M., MACHADO M.F.P.S. 1999. Two-dimensional electrophoresis of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) callus tissue proteins. *Electrophoresis*, v. 20, p. 626-629.

MANGOLIN C.A., PRIOLI A.J., MACHADO M.F.P.S. 1997. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochem. Genet.*, v. 35, p. 189-204.

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

NERD A., RAVEH E., MIZRAHI Y. 1993. Adaptation of five columnar cactus species to various conditions in the Negev Desert of Israel. *Economic Botany*, v. 47, p. 304-311.

NOZAKI J., MESSERSCHMIDT I., RODRIGUES D.G. 1993. Tannery waters cleaning with natural polyelectrolytes: chemical speciation studies of chromium. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 36, p. 761-770.

OLIVEIRA A.J.B., MACHADO M.F.P.S. 2003. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 104, p. 149-155.

OLIVEIRA S.A., MACHADO M.F.P.S., PRIOLI A.J., MANGOLIN C.A. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v. 31, p. 47-50.

REZANKA T , DEMBITSKY V M Very long chain alkyl esters in *Cereus peruvianus* wax *Phytochemistry*, v 4 , p 45, 4

ROHLF F J NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 5.0 - New York Exeter Publ New York

VRIES J.X., MOYNA P., DIAZ V. 1971. Alkaloides cactus Uruguay. *Revista Latinoamericana de Química*, v. 3, p. 21-23.

WEISS J., NERD, A., MIZRAHI Y. 1993. Development of *Cereus peruvianus* (apple cactus) as a new crop for the Negev desert of Israel. In: Janick J & Simon JE (eds.), *New crops*. Wiley, New York, p. 471-486.

WEISS J., NERD A., MIZRAHI Y. 1994. Flowering and pollination requirements in *Cereus peruvianus* cultivated in Israel. *Israel J. Plant Sci.*, v. 42, p. 149-158.

WILLIAMS J G K , KUBELIK A R , LIVAK K J , RAFALSKI J A , TINGEY S V
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucleic Acid Res.*, v , p 653 -6535

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)