



Artigo Original

## SELEÇÃO DE INDICADORES ISSR POLIMÓRFICOS PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM CACTÁCEAS

Daniel Oliveira Jordão do Amaral<sup>1\*</sup>, Daniel Rodrigo Cavalcante de Araujo<sup>1</sup>, Juliana Gomes Freitas<sup>1</sup>, Fabiane Rabelo da Costa Batista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional do Semiárido (INSA), Av. Francisco Lopes de Almeida, s/n, Bairro Serrotão, Campina Grande, PB 58429-970, Brasil

\*Autor correspondente. E-mail: [daniel.amaral@insa.gov.br](mailto:daniel.amaral@insa.gov.br)

### INFO ARTICLE

Histórico do artigo

Recebido: 11 de setembro de 2019

Aceito: 21 de novembro de 2019

Palavras-chaves:

Cactos

Caracterização Molecular

ISSR

### RESUMO

A família Cactaceae está distribuída principalmente nas Américas, apresentam uma grande importância econômica, fornecendo recursos energéticos para animais polinizadores e dispersores, podendo ser utilizadas na alimentação animal e humana, possui um grande potencial na medicina tradicional e no paisagismo. O objetivo do presente estudo foi selecionar indicadores e padronizar reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) para analisar ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) em estudos de variabilidade genética de Cactaceae. Foram testados 14 indicadores de ISSR com temperatura variando de 48° a 52°C, em espécies de *Tacinga*, e destes, 8 foram selecionados por serem polimórficos: ISSR-808, ISSR-827, ISSR-842, ISSR-845, ISSR-853, ISSR-857, ISSR-880 e ISSR-888. O número médio de sequências amplificadas por indicador foi de 11,5 bandas, com destaque para o indicador ISSR-827, que produziu 15 bandas, enquanto os indicadores ISSR-845 e ISSR-853 produziram apenas 8 bandas. Os 8 indicadores selecionados no presente estudo possibilitaram a diferenciação genética, sendo eficientes e indicando um bom nível de polimorfismo entre as espécies analisadas, dessa forma, poderão ser utilizados em futuros trabalhos para estimar a divergência genética em nível molecular em espécies da família Cactaceae.

### 1. Introdução

A família Cactaceae está distribuída principalmente nas Américas, ocupando diferentes habitats, podendo variar de regiões áridas até florestas úmidas, com enorme diversidade morfológica e formas de vida (Taylor & Zappi, 2004, Calvente et al. 2011). As cactáceas são representadas por aproximadamente 1.816 espécies, distribuídas em 124 gêneros (Hunt et al. 2006).

As Cactáceas apresentam uma grande importância econômica, sendo utilizada na alimentação animal, devido ao seu alto valor energético e succulento para os rebanhos no período de escassez de água, na alimentação humana na produção de doces e no consumo de frutos, possui um grande potencial na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades e para o paisagismo, devido a sua beleza particular, além de exigirem pouca água, elas também são de fácil adaptação às condições adversas de nutrientes no solo. (Lucena et al. 2014, Chaves & Barros, 2015, Cavalcante et al. 2017, Santos et al. 2018, Lima-Nascimento et al. 2019).

Reconhecendo a importância das cactáceas para os ecossistemas semiáridos, o INSA criou em 2014 o Cactário Guimarães Duque, que atualmente reúne uma coleção bastante representativa de espécies de cactos de ocorrência no Semiárido Brasileiro (SAB), é composta por 81 das 120 espécies com registro de ocorrência na região (Batista et al. 2018).

Os estudos de diversidade genética fornecem dados valiosos para a formulação de estratégias de manejo e conservação de plantas nativas. Esses estudos, auxiliam o acesso as informações em relação à base genética das espécies, ajudando para um melhor entendimento do status da variabilidade genética. Trabalhos realizados com espécies de cactaceas permitiram agrupar os genótipos, facilitando análises de uma dada característica pelas semelhanças ou diferenças entre os indivíduos, bem como para a sua seleção e utilização, permitindo um melhor manejo das espécies (Castro-Félix et al. 2014, Realini et al. 2015, Silva et al. 2018a, Vieira et al. 2019).

Diversas estratégias vêm sendo empregadas para ampliar o conhecimento sobre os cactos mantidos no INSA, e

uma delas é a biologia molecular, que por meio de marcadores de DNA pretende analisar o grau de variação genética e sua distribuição entre as diferentes espécies da coleção viva. O uso de marcadores moleculares nesse tipo de estudo é bastante difundido, devido a sua relativa simplicidade e a necessidade de pequenas quantidades de DNA da amostra. Essa técnica é baseada em PCR (Polymerase Chain Reaction). Dentre os diversos tipos de marcadores, ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) são fragmentos de DNA de 100 a 3.000 pb (pares de bases) gerados a partir de indicador único com 16 a 20 pb, amplificando a sequência de DNA delimitada por duas regiões de microsatélites (Gupta et al. 1994, Zietkiewicz et al. 1994, Reddy et al. 2002). As maiores vantagens do ISSR é a detecção de um alto número de bandas polimórficas por reação, com resultados que possuem repetibilidade e o fato de não haver a necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para construção dos indicadores utilizados (Faleiro, 2007, Nadeem et al. 2018). A utilização dos marcadores ISSR vem crescendo dentro da família Cactaceae, com destaque para análises de diversidade genética. Mergulhão et al. (2012) caracterizaram variedades de *Opuntia ficus-indica* utilizando marcadores moleculares ISSR e RAPD, já Domingues et al. (2017)

selecionaram indicadores de ISSR para acessos de *Cereus* sp. Provenientes dos Estados do Paraná e Piauí. Dessa forma, faz-se necessário a seleção de novos indicadores para ampliar a diferenciação dos genótipos, em especial, nos casos em que estes são muito próximos geneticamente, por exemplo, pertencentes a uma mesma espécie. Assim o presente trabalho teve como objetivo selecionar indicadores de ISSR para a análise de divergência genética em *Tacinga*, obtendo informações em nível de polimorfismo que auxiliarão futuros trabalhos de relações filogenéticas na família Cactaceae.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Material Vegetal

Os procedimentos de laboratório e análises do material foram realizados no Instituto Nacional do Semiárido (INSA), onde foram analisados 15 genótipos do gênero *Tacinga*, pertencentes a 2 espécies. *Tacinga inamoena* (K.Schum.) N. P. Taylor & Stuppye *Tacinga wernerii*, (Eggl) N. P. Taylor & Stuppy coletadas em diferentes locais do SAB, informações adicionais poderão ser obtidas na Tabela 1.

**Tabela 1-** Genótipos de *Tacinga* utilizados para a análise. Acessos pertencentes ao Cactário Guimarães Duque (CAGD), espécie avaliada e localidade de coleta.

Amostras	TOMBO CAGD	Espécie	Origem
1	763	<i>Tacinga inamoena</i>	Brejo da Madre de Deus- PE
2	762	<i>Tacinga inamoena</i>	Algodão de Jandaíra-PB
3	802	<i>Tacinga inamoena</i>	Seabra-BA
4	724	<i>Tacinga inamoena</i>	Urolândia-BA
5	747	<i>Tacinga inamoena</i>	Seabra-BA
6	796	<i>Tacinga inamoena</i>	Pedra Azul - MG
7	777	<i>Tacinga inamoena</i>	Morro do Chapéu-BA
8	794	<i>Tacinga inamoena</i>	Monteiro - PB
9	731	<i>Tacinga wernerii</i>	Pedra Azul - MG
10	742	<i>Tacinga wernerii</i>	Palmeiras-BA
11	743	<i>Tacinga wernerii</i>	Morro do Chapéu-BA
12	834	<i>Tacinga wernerii</i>	Morro do Chapéu-BA
13	865	<i>Tacinga wernerii</i>	Morro do Chapéu-BA
14	866	<i>Tacinga wernerii</i>	Morro do Chapéu-BA
15	862	<i>Tacinga wernerii</i>	Morro do Chapéu-BA

### 2.2 Análise Molecular

Cladódios de 15 genótipos foram coletados, macerados em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. Em seguida, foi adicionado tampão de extração fornecido pelo Kit DNeasy Plant Mini® (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a extração, a qualidade e a quantificação da concentração de DNA de cada amostra foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v), em tampão TBE 0,5X a 70 volts por 30 minutos. As amostras foram coradas com GelRed® – Biotium (Uniscience), a intensidade das bandas produzidas pelas amostras de DNA dos indivíduos foram comparadas com o tamanho e intensidade das bandas produzidas por amostras de concentração conhecida do 100bp DNA ladder (40e 100 ng). A imagem foi capturada pelo transiluminador L-PIX HE (Loccus Biotecnologia). Posteriormente, o DNA foi diluído (20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) para as reações de polimerase em cadeia (PCR), onde foram testados um total de 14 indicadores.

Inicialmente, a padronização para determinar uma melhor condição de amplificação entre os genótipos, foram testadas diferentes concentrações de  $\text{MgCl}_2$ : 1,0 mM e 2,0 mM, também foram testados diferentes temperaturas de anelamento, variando de 48 °C a 52 °C.

As reações de amplificação do DNA foram realizadas num volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo os seguintes reagentes: Tampão 1 X [20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl]; (1,0 mM e

2,0 mM  $\text{L}^{-1}$ )  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  dNTP's; 0,3  $\mu\text{M}$  de oligonucleotídeos iniciadores; 0,3 unidades de Taq DNA polimerase; 1  $\mu\text{L}$  de DNA (20ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e água ultra pura.

As reações foram conduzidas em termociclador Mastercycler® Nexus gradiente 96 Well (Eppendorf), sob os seguintes passos: a) 5 minutos a 94 °C para desnaturação inicial; b) 35 ciclos de: 94 °C por 1 minuto; temperatura de anelamento (48 °C a 52 °C) por 45 segundos, e; 72°C por 2 minutos; c) uma extensão final a 72°C por 7 minutos e resfriado a 4°C.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5%, corados com intercalante de DNA fluorescente GelRed® – Biotium (Uniscience), em tampão 1X TBE, a 100 volts, por aproximadamente duas horas. Foi usado o marcador molecular de 100 pb (100 pb DNA Ladder Sinapse Biotecnologia) para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. Terminada a eletroforese, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta, utilizando o sistema de foto documentação L-PIX HE (Loccus Biotecnologia).

Os indicadores ISSR-842, ISSR-853 e ISSR-857 foram utilizados para testar as diferentes concentrações de  $\text{MgCl}_2$  nas reações de PCR com o material de *Tacinga inamoena* e *Tacinga wernerii*, CAGD 762 e CAGD 742 respectivamente.

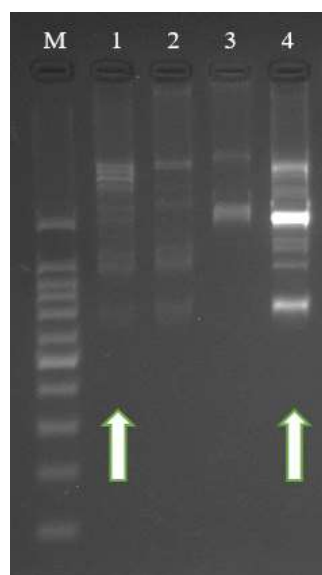
A partir dos géis fotodocumentados, foram analisados os produtos amplificados por cada indicador ISSR em cada amostra, para elaboração de uma matriz binária considerando presença (1) e ausência (0) para os fragmentos

amplificados. Além disso, os indicadores foram classificados de maneira qualitativa em “BOM” – amplificações em todas as amostras e de fácil visualização; “RUIM” – amplificação em parte das amostras e/ou com má qualidade de visualização, e; “AUSENTE” - ausência de produtos de amplificação visíveis. Também foram descritos os dados incluindo o número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) e porcentagem de bandas polimórficas (PBP). As imagens dos géis foram analisadas por dois pesquisadores, visando aumentar a confiabilidade e a reprodutibilidade das leituras/interpretações dos padrões de amplificação.

### 3. Resultados e discussão

A quantificação do DNA genômico de espécies de *Tacinga*, feito por análise de intensidade com as bandas do marcador de DNA 100bp, permitiu inferir que as concentrações dos DNAs de todos os genótipos foram superiores a 100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Assim o uso do Kit comercial mostrou-se eficaz, tanto pela quantidade de DNA obtidos, como pela sua qualidade, pois o material também se mostrou livre de contaminantes que poderiam interferir negativamente na reação de PCR. Todas as amostras de DNA foram padronizadas em 20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para as reações de PCR.

Analisando a reação de PCR em gel de agarose em relação às diferentes concentrações de  $\text{MgCl}_2$  testadas (1,0 mM e 2,0 mM), utilizando o iniciador ISSR-857 foram observadas bandas na menor concentração de  $\text{MgCl}_2$  (1,0 mM  $\text{L}^{-1}$ ), porém o resultado foi superior quando utilizou-se uma concentração maior (2,0 mM  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$ ), não apenas com o número de bandas, bem como pela melhor definição e nitidez, conforme pode ser observado na Figura (1).



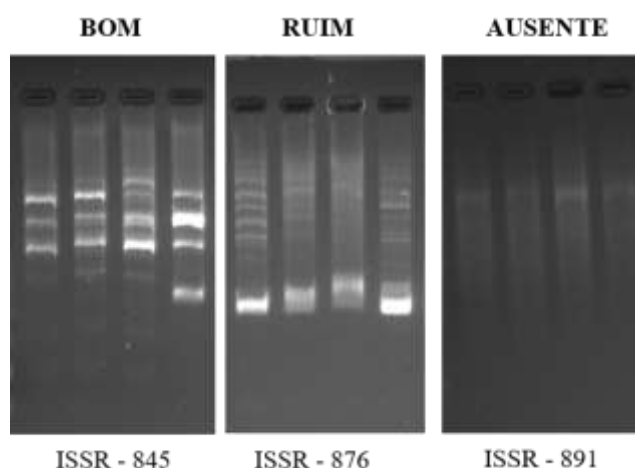
**Figura 1.** Resultado da PCR em gel de agarose 2,5% utilizando o iniciador ISSR-857, para ajuste de concentração de  $\text{MgCl}_2$ . M: Marcador de peso molecular 100 pb; 1- CAGD 762 (2,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ); 2- CAGD 762 (1,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ); 3 - CAGD 834 (1,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ); 4 - CAGD 834 (2,0 mM  $\text{MgCl}_2$ ). As setas indicam a concentração de  $\text{MgCl}_2$  mais adequada e selecionada (2,0 mM) na amplificação.

A concentração de  $\text{MgCl}_2$  pode influenciar diretamente no resultado da PCR. A utilização de pequena quantidade de  $\text{MgCl}_2$  ou mesmo sua ausência durante as reações de amplificação pode resultar na inatividade do DNA polimerase, o excesso de  $\text{MgCl}_2$ , por outro lado, pode provocar a redução da fidelidade enzimática e aumentar a formação de produtos não específicos (Ferreira & Grattapaglia, 1998, Kinsuat & Kumar, 2007). A avaliação deste componente se justifica por ter um efeito direto na PCR e ser exigido concentrações adequadas para não prejudicar a

especificidade da reação. Dessa forma, a concentração de 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$  foi definida para as reações posteriores.

Usando a temperatura de 52°C foram selecionados os indicadores: ISSR-808, ISSR-827, ISSR-842, ISSR-880, que apresentaram amplificações de DNA nítidas e bem definidas no gel de agarose a 2,5%. Já a temperatura de 48°C, foi adequada para o indicador ISSR-888, enquanto a 51°C foram obtidos os melhores resultados para os indicadores ISSR-845, ISSR-853 e ISSR-857. Esses oito indicadores foram classificados como “BONS” (amplificações visíveis em todos os genótipos) e produziram um total de 93 bandas, sendo que 87 destas foram polimórficas e 6 monomórficas. O número de bandas amplificadas por indicador variou de 8 a 15, com média de 11,5 fragmentos por indicador.

Os indicadores ISSR-810, ISSR-817, ISSR-824, ISSR-876 e ISSR-879, foram classificados como “RUINS”, por apresentarem falhas na amplificação ou má qualidade na nitidez/definição dos fragmentos amplificados. Embora outras temperaturas de anelamento tenham sido testadas na tentativa de amplificação do material genético, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Apenas o indicador ISSR-891 foi classificado como “AUSENTE”, por não apresentar fragmentos amplificados, em nenhum dos genótipos testados (Figura 2).



**Figura 2.** Exemplo ilustrativo da classificação do padrão de amplificação observado a partir dos indicadores ISSR testados para *Tacinga* em gel de agarose 2,5%. O padrão observado com o iniciador ISSR-845 também foi encontrado para outros 7 indicadores classificados como “BOM”, os indicadores classificados como “RUIM” e “AUSENTE” não apresentam o comportamento desejado no objetivo do trabalho.

Os indicadores ISSR-827 e ISSR-888 (Figura 3) foram os que mais apresentaram fragmentos polimórficos, sendo 14 fragmentos para ambos os indicadores, enquanto o indicador ISSR-845 apresentou o menor número de bandas polimórficas (8). Uma relação dos indicadores testados, suas respectivas sequências, temperaturas ótimas de anelamento, graus de polimorfismo e padrões de amplificação são apresentados na Tabela 2.

Trabalhos de caracterização e seleção de indicadores realizados em diferentes espécies de cactáceas apresentam resultados variados no que diz respeito ao número de indicadores utilizados e polimorfismo observado.

Mergulhão et al. (2012), investigando a diversidade genética em cinco variedades de *Opuntia ficus-indica*, observou 110 fragmentos polimórficos utilizando 5 indicadores ISSR. O indicador ISSR-857 foi considerado o menos polimórfico com apenas 4 bandas. Resultado diferente foi observado no presente estudo utilizando-se o mesmo indicador, onde foi possível constatar 11 fragmentos polimórficos.

Segundo Oliveira et al. (2013), uma média de 5,5 bandas por indicador dos 15 indicadores ISSR que geraram polimorfismo, foi considerada adequada. Dessa forma, foi possível determinar a diversidade genética entre variedades com e sem espinhos de *Cereus jamacaru*. Enquanto Domingues et al. (2017), testaram 23 indicadores ISSR para uma espécie do mesmo gênero (*Cereus sp.*), dos quais 15 foram polimórficos. Com média de 10,58 bandas por indicador, sendo 109 polimórficas num total de 180 bandas. O indicador ISSR-808 revelou 10 fragmentos polimórficos. Considerando os genótipos de *Tacinga*, foram observadas 12 bandas para esse mesmo indicador.

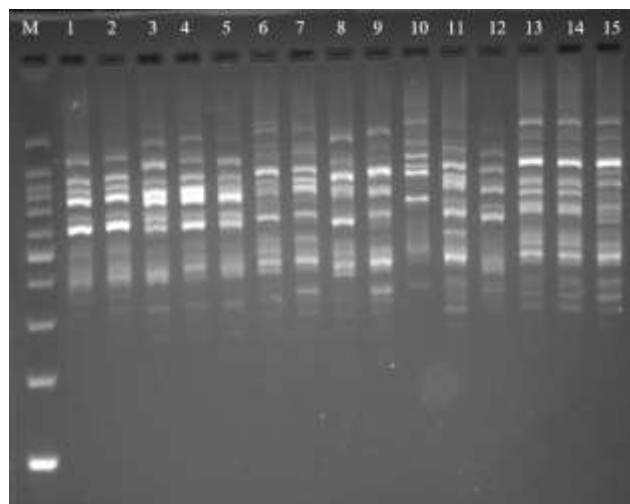
Visando auxiliar nas análises genéticas e caracterização do perfil molecular em *Melocactus conoideus*, Vieira et al. (2019) realizaram um trabalho com o objetivo de selecionar indicadores "screening" ISSR adequados para análises moleculares, eles avaliaram 23 indicadores, desses, 15 foram selecionados e geraram um total de 118 fragmentos, dos quais, 48 foram polimórficos, com média de 7,87 fragmentos por indicadores. O indicador ISSR-810 apresentou 8 bandas polimórficas, nesse estudo o referido indicador foi classificado como "RUIM".

Esses trabalhos em cactáceas evidenciam uma grande variação na atuação dos indicadores, considerando gêneros diferentes de uma mesma família. Para os quinze genótipos de *Tacinga*, os indicadores considerados como "BONS" possuem uma potencial utilização na análise da variabilidade genética por evidenciar polimorfismos em todos os genótipos analisados, além de contribuírem para uma diferenciação intraespecífica entre morfotipos e genótipos diferentes.

As variações observadas no padrão de amplificação de indicadores, no número de fragmentos e no nível de polimorfismo, está associada, entre outros fatores, às particularidades das espécies investigadas e número de indivíduos testados. Dessa forma, os indicadores com perfil monomórfico, podem apresentar polimorfismo em outros genótipos, não devendo ser desprezados (Chagas et al. 2015, Silva et al. 2018b). Essa observação mostra a importância de

realizar estudos prévios de seleção de indicadores para as espécies em análise como ferramenta complementar a estudos ligados a filogenia/diversidade genética das espécies.

Considerando a baixa quantidade de informações moleculares nesse grupo de plantas e por possuir gêneros diversificados, faz-se necessário o uso da estratégia de "screening" de indicadores em busca de polimorfismo, sendo necessário ajustes de acordo com o material vegetal a ser analisado. A seleção de indicadores funcionais é um pré-requisito para se obter as estimativas de diversidade genética em espécies. Diante dos resultados, pode-se inferir que os marcadores moleculares ISSR selecionados conseguiram evidenciar diferenças genéticas nas espécies avaliadas, podendo ser uma ferramenta útil em estudos de conservação e filogenia da família Cactaceae.



**Figura 3.** Padrão de amplificação obtido pelo indicado ISSR-888, em gel de agarose (2,5%). M – Marcador de massa molecular (100 bp Ladder); 1 a 15 correspondem aos indivíduos listados na Tabela 1.

**Tabela 2-** Marcadores ISSR utilizados na amplificação das espécies de *Tacinga* com suas respectivas sequências, temperatura de anelamento (T.A), número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), tamanho dos fragmentos amplificados em pares de base (TFA) e padrão de amplificação.

Indicador	Sequência (5' - 3')	T.A	NTB	NBP	TFA	Padrão de amplificação
ISSR-808	AGAGAGAGAGAGAGC	52	12	12	300-1500	BOM
ISSR-810	GAGAGAGAGAGAGAT	-	-	-		RUIM
ISSR-817	CACACACACACACAA	-	-	-		RUIM
ISSR-824	TCTCTCTCTCTCTCG	-	-	-		RUIM
ISSR-827	ACACACACACACACG	52	15	14	500-1500	BOM
ISSR-842	GAGAGAGAGAGAGAYG	52	13	11	300-1500	BOM
ISSR-845	CTCTCTCTCTCTCTRG	51	8	8	900-1500	BOM
ISSR-853	TCTCTCTCTCTCTCRT	51	10	8	1000-1500	BOM
ISSR-857	ACACACACACACACACYG	51	11	11	500-1500	BOM
ISSR-876	GATAGATAGACAGACA	-	-	-		RUIM
ISSR-879	CTCACTTCACTTCA	-	-	-		RUIM
ISSR-880	GGAGAGGAGAGGAGA	52	10	9	800-1500	BOM
ISSR-888	BDBCACACACACACA	48	14	14	400-1500	BOM
ISSR-891	HVHTGTGTGTGTGTG	-	-	-		AUSENTE
Total			93	87		

Em que: Y = C ou T; R = A ou G; B = C, G ou T; D = A, G ou T; H = A, C ou T; V = A, C ou G

#### 4. Conclusão

O presente trabalho representa a primeira iniciativa de caracterização molecular de cactáceas pertencentes a coleção do INSA. Foram determinadas as condições ideais de amplificação para 8 indicadores de ISSR, com o grau de polimorfismo satisfatório. Os indicadores selecionados possibilitaram observar a diferenciação genética dos indivíduos analisados, devido ao perfil eletroforético de cada amostra. Esses indicadores serão priorizados em estudos

mais amplos, que envolvam outros gêneros e espécies de cactáceas, para análise das relações filogenéticas dessa família.

#### 5. Referências

Batista, F. R. da C. et al. (2018). Cactário Guimarães Duque: espécies da coleção botânica do INSA. Campina Grande-PB, INSA.



- Cavalcante, M. Z. B. et al. (2017). Potencial ornamental de espécies do Bioma Caatinga. *Comunicata Scientiae*, 8(1), 43-68.
- Calvente, A., Zappi, D. C., Forest, F. & Lohmann, L. G. (2011). Molecular phylogeny, evolution, and biogeography of South American epiphytic cacti. *International Journal of Plant Sciences*, 172, 902-914.
- Castro-Félix, P. et al. (2014). Genetic diversity within a declining natural population of *Ferocactus histrix* (DC). *Lindsay. Plant Species Biology*, 29, 21-30.
- Chagas, K. P. T., Sousa, R. F., Fajardo, C. G., & Vieira, F. A. (2015). Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 10(1), 147-152.
- Chaves, E. M. F. & Barros, R. F. M. (2015). Cactáceas: recurso alimentar emergencial no semiárido, Nordeste do Brasil. *Gaia Scientia*, 9, 129-135.
- Domingues, S. D., Neves, A. F., Mangolin, C. A., & Machado, M. F. P. S. (2017). Seleção de primers para análise de Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) em *Cereus sp.* (Cactaceae). *Revista Biotecnologia & Ciência*, 6(2), 46-54.
- Faleiro, F. G. (2007). Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados.
- Ferreira, M. E., & Grattapaglia D. (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética (2ª ed.) Brasília: Embrapa Cenargen.
- Gupta, M., Chyi, Y., Romero-Severson, J. & Owen, Y. J. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single Primers of simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 998-1006.
- Hunt, D., Taylor, N. & Charles, G. (2006). *The New Cactus Lexicon*. Milborne Port, UK: DH books.
- Kinsuat, M. J., & Kumar, S. V. (2007). Polymorphic microsatellite and cryptic simple repeat sequence markers in pineapples (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Molecular Ecology Notes*, 7, 1032-1035.
- Lima-Nascimento, A. M. de, Bento-Silva, J. S., Lucena, C. M. de, & Lucena, R. F. P. de. (2019). Ethnobotany of native cacti in the northeast region of Brazil: can traditional use influence availability? *Acta Botanica Brasilica*, 33(2), 350-359.
- Lucena C. M., et al. (2014). Potencial medicinal de cactáceas en la región semiárida del Nordeste de Brasil. *Gaia Scientia*, 36-50.
- Mergulhão, A. C. E. S., et al. (2012). Marcadores moleculares para detecção de variabilidade genética em variedades de palma forrageira. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, 17(1), 78-82.
- Nadeem, M. A., et al. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285.
- Oliveira, F. I. C., Bordallo, P. N., Castro, A. C. R., & Correia, D. (2013). Genetic diversity of spineless *Cereus jamacaru* accession using morphological and molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, 12, 4586-4594.
- Realini, M. F. (2015). Phylogenetic relationships in *Opuntia* (Cactaceae, Opuntioideae) from southern South America. *Plant Systematics and Evolution*, 30, 1123-1134.
- Reddy, M. P., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17.
- Santos, M. O., et al. (2018). Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(3), 2767-2779.
- Silva, N. V., Bezerra, J. D. C., Nascimento Junior, J. R. S., Rego, M. M., & Andrade, A. P. (2018a). Polimorfismo em genótipos de palma forrageira com diferentes graus de resistência ao *dactylopius opuntiae*. In III Congresso Internacional das Ciências Agrárias - III Cointer pdvagro 2018, 2018, João Pessoa/PB. *Anais 2018 - III Congresso Internacional das Ciências Agrárias - III Cointer Pdvagro 2018*.
- Silva, T. S. S., Freitas, J. S., Santos, E. S. L., Dos S, C. T., & Cerqueira-Silva, C. B. M. (2018b). Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Croton linearifolius* Mull. Arg. como subsídio para estudos genéticos. *Multi-Science Journal*, 1(10), 4-8.
- Taylor, N. P. & Zappi, D. (2004). *Cacti of Eastern Brazil*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Vieira, A. C., Cardoso, T. dos S., Silva, T. S. S., Cerqueira-Silva, C. B. M. & Santos, E. S. L. dos. (2019). Seleção de primers Inter Simple Sequence Repeat em *melocactus conoideus* buin. & bred. (cactaceae), espécie endêmica do sudoeste da Bahia, Brasil. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, 16(29), 1365-1374.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.