



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

JOSEILSON MOREIRA DE ARAÚJO

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE ESPÉCIES DE *Opuntia*
SPP. REVELADA POR MARCADOR MOLECULAR ISSR**

**AREIA
2023**

JOSEILSON MOREIRA DE ARAÚJO

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE ESPÉCIES DE *Opuntia* SPP.
REVELADA POR MARCADOR MOLECULAR ISSR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Maílson Monteiro do Rego

Co-orientadora: Profa. Dr^a Elizanilda Ramalho do Rêgo

**AREIA
2023**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A663d Araújo, Joseilson Moreira de.

Diversidade genética entre e dentro de espécies de
Opuntia spp. revelada por marcador molecular ISSR /
Joseilson Moreira de Araújo. - Areia:UFPB/CCA, 2023.
58 f. : il.

Orientação: Mailson Monteiro do Rêgo.
Coorientação: Elizanilda Ramalho do Rêgo.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. ISSR. 3. Recursos genéticos. 4.
Melhoramento genético. 5. Cactáceas. I. Rêgo, Mailson
Monteiro do. II. Rêgo, Elizanilda Ramalho do. III.
Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(043.3)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

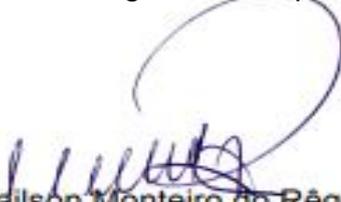
**TÍTULO: DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE ESPÉCIES DE
Opuntia SPP. REVELADA POR MARCADOR MOLECULAR ISSR**

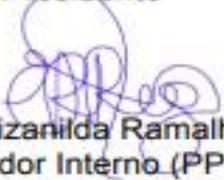
AUTOR: JOSEILSON MOREIRA DE ARAÚJO

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:


Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo
Presidente


Profa. Dra. Elizaniida Ramalho do Rêgo
Examinador Interno (PPGAgro)


Dra. Maria do Perpétuo Socorro Damasceno
Examinador Externo


Joseilson Moreira de Araújo
Discente.

Areia – PB, 31 de agosto de 2022.

Esta dissertação é dedicada

Aos meus pais, José Hermínio de Araújo (in memorian) e Maria Letice Moreira de Araújo (in memorian), que não mediram esforços para que eu trilhasse os melhores caminhos e sempre e sonharam em ter um filho formado, mesmo com todas as dificuldades impostas pela falta de oportunidade de uma cidade pequena.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus de infinita grandeza, por tudo que conquistei e o que não conquistei mais que me serviu de experiência.

Aos meus pais, José Hermínio de Araújo (*in memorian*) e Maria Letice Moreira de Araújo (*in memorian*), os quais sempre lutaram por dias melhores para mim e meus irmãos.

Aos meus irmãos, Antônio, Eliane, Vilma, Gerson (*in memorian*), Fátima e Elaine, por toda contribuição.

Aos meus filhos Robson, Arthur e Lúcia Maria, causa principal das minhas lutas diárias.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rego, por ter acreditado em meu potencial e por me garantir a oportunidade de disfrutar de seu conhecimento e poder repassá-los a outras pessoas.

Ao Dr. Daniel Oliveira Jordão do Amaral, pela disponibilidade, paciência e por me iniciar nas técnicas de biologia molecular no laboratório do INSA.

A todos os meus professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, Elizanilda, Mailson, Leonardo, Thiago, Bandeira, Gleidyane, Jacob e Walter, por todo ensinamento durante o período de mestrado.

Aos colegas do PPGAgro, Rosa, Fernanda, Jayane, Joyce, Geisa, Abdias, Karla, agradeço por todo companheirismo e ajuda nas dúvidas.

Aos colegas do Instituto Nacional do Semiárido – INSA, as Doutoradas Fabiane e Jucilene, e aos bolsistas, Daniel, Lânia, Pollyana e Thyago, Tarcísio e todos os funcionários pela contribuição direta e indireta na consolidação do meu trabalho de pesquisa.

A Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, fonte imensurável de oportunidades para todos que por eles passam, garantindo sua evolução educacional.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma ao longo desta caminhada, meus sinceros agradecimentos.

“Seja como um cacto; autossuficiente para si mesmo. Sobreviva a qualquer ambiente, se adapte às piores mudanças, supere qualquer adversidade, defenda-se com sabedoria de aproximações indesejadas e floresça apenas para quem souber te admirar além dos seus espinhos”.

Felipe Magister.

RESUMO

A palma forrageira *Opuntia* spp., pertencente a família Cactaceae, que possui 130 gêneros e mais de 2.000 espécies, tem como centro de origem o México, mais está distribuída pelas diferentes regiões do mundo, por se adaptar facilmente as condições adversas de tempo e clima, desde as áreas com temperaturas elevadas até as mais baixas. Constitui-se numa cultura economicamente importante para as áreas áridas e semiáridas, pois possibilita a regeneração de vegetação, a desaceleração do desmatamento, aumento da biodiversidade e diminuição da degradação e erosão do solo. A palma forrageira além de ser utilizada como fonte de alimentação animal e humana, possui propriedades medicinais e também é usada como planta ornamental. Devido a seus atributos econômicos é essencial conhecer ainda mais suas características genéticas para auxiliar os programas de melhoramento genético destas espécies. Uma das técnicas mais usadas, são as dos marcadores moleculares. O ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) é muito usado para determinar a diversidade genética entre e dentro de espécies. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de 40 genótipos de *Opuntia* spp. do BAG do INSA, usando marcadores moleculares ISSR. A extração do DNA dos acessos foi realizada com o Kit DNeasy Plant Mini® (Qiagen). Foram utilizados 11 oligonucleotídeos iniciadores ISSR (primers). Após Reações de (PCR), os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose a 2% e fotodocumentados. Foram amplificados 839 fragmentos, distribuídos em 91 locos, dos quais 86 foram polimórficos e 5 monomórficos, com polimorfismo de 94,50%. A matriz de dissimilaridade genética foi obtida a partir da distância genética entre pares de acessos que variou de 0,32 a 1,00. A partir das distâncias genéticas os 40 acessos foram agrupados em nove grupos, usando o método de Ward e em dez grupos usando Tocher. Conclui-se que há alta diversidade genética entre e dentro das espécies avaliadas e foi possível estabelecer as relações filogenéticas entre os acessos de *Opuntias* spp. estudados. Essa informação é útil para definir a base para novas coleções representadas por *Opuntia* spp. e para ampliar a base genética das populações segregantes, sugere-se o cruzamento intraespecífico entre os acessos 87 e 117 e interespecíficos com os acessos 1 x 119, 86 x ?(101), 86 x 135, 88 x 135, ?(101) x 135.

Palavras-Chaves: issr; recursos genéticos; melhoramento genético; cactáceas.

ABSTRACT

The forage palm *Opuntia* spp., belonging to the Cactaceae family, which has 130 genera and more than 2,000 species, has Mexico as its center of origin, but is distributed throughout the different regions of the world, as it easily adapts to adverse weather and climate conditions, from areas with high temperatures to the lowest. It constitutes an economically important crop for arid and semi-arid areas, as it enables the regeneration of vegetation, the deceleration of deforestation, the increase of biodiversity and the reduction of soil degradation and erosion. The cactus pear, in addition to being used as a source of animal and human food, has medicinal properties and is also used as an ornamental plant. Due to their economic attributes, it is essential to know even more about their genetic characteristics to help genetic improvement programs for these species. One of the most used techniques are molecular markers. The ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) is widely used to determine the genetic diversity between and within species. Within this context, the objective of this work was to evaluate the genetic diversity of 40 genotypes of *Opuntia* spp. from the INSA BAG, using ISSR molecular markers. DNA extraction from the accessions was performed using the DNeasy Plant Mini® Kit (Qiagen). Eleven ISSR oligonucleotide primers (primers) were used. After (PCR) reactions, the amplified DNA fragments were separated in a 2% agarose gel and photodocumented. A total of 839 fragments were amplified, distributed in 91 loci, of which 86 were polymorphic and 5 monomorphic, with a polymorphism of 94.50%. The genetic dissimilarity matrix was obtained from the genetic distance between pairs of accessions that ranged from 0.32 to 1.00. Based on the genetic distances, the 40 accessions were grouped into nine groups using Ward's method and into ten groups using Tocher. It was concluded that there is high genetic diversity between and within the evaluated species and it was possible to establish the phylogenetic relationships between accessions of *Opuntias* spp. studied. This information is useful to define the basis for new collections represented by *Opuntia* spp. and to expand the genetic base of the segregating populations, intraspecific crossing between accessions 87 and 117 and interspecific with accessions 1 x 119, 86 x ?(101), 86 x 135, 88 x 135, ?(101) are suggested. x 135.

Keywords: issr; genetic resources; genetic improvement; cactaceae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estados do México onde foram coletados germoplasma de *Opuntia* spp. pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do INSA, utilizados neste estudo. ..33
- Figura 2** Acessos de *Opuntia* spp. coletados do BAG do INSA: *O. fícus-indica* (1, 2, 4, 5, 16, 17, 18 e 19); *O. cochenillifera* (6, 9, 58, 63 e 67); *O. atropes* (8, 14, 76 e 85); *O. undulata* (54, 55 e 56); *O. robusta* (94); *O. megacantha* (86, 87, 88, 98, 111, 112, 113, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 123 e 125); *O. joconostle* (126); *O. dillenii* (135); acessos sem identificação no BAG (100 e 101).34
- Figura 3** Acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) cultivados em vasos de polipropileno de alta densidade com capacidade para 5L sob telado com sombreamento de 60%. (A) Os 40 acessos usados neste estudo. (B) raízes limpas com água destilada e disposta em disco de Petri.....35
- Figura 4** Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% de 19 acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.), para verificar a quantidade e a qualidade do DNA, M - marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen™ de 1 Kb Plus DNA Ladder).37
- Figura 5** Perfil eletroforético em gel de agarose 2% de 19 acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) gerados com o oligonucleotídeo iniciador ISSR UBC841. M - marcador de peso molecular ladder 100 bp.39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Acessos, nome vulgar, origem e espécies de <i>Opuntia</i> spp., analisados neste estudo conservados ex-situ e pertencentes ao BAG do INSA.....	31
Tabela 2 Oligonucleotídeos iniciadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) e suas respectivas sequências.....	38
Tabela 3 Número total de bandas amplificadas (NTA), número de locos polimórficos (NLP), número de locos monomórficos NLM, porcentagem de locos polimórficos (PLP) e tamanho dos fragmentos amplificados entre 40 acessos de palma forrageira (<i>Opuntia</i> spp.) do BAG do INSA, por oligonucleotídeos iniciadores ISSR (primers), sequências 5'- 3'.....	41
Tabela 4 Matriz de dissimilaridade genética, obtida a partir de 40 acessos de <i>Opuntia</i> spp., do Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Nacional do Semiárido (INSA), utilizando o complemento do índice de similaridade de Jaccard (1912), usando marcador molecular ISSR.....	43
Tabela 5 Agrupamento dos 40 acessos de <i>Opuntia</i> spp. do banco ativo de germoplasma do INSA, com base no método de Tocher (RAO, 1952), usando o pacote biotools no software R (SILVA et al., 2017).....	49

LISTA DE SIGLAS

AFLP - Polimorfismos de Comprimento de Fragmento Amplificado

BAG - Banco Ativo de Germoplasma

CCC - Coeficiente de Correlação Cofenética

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxinucleotídeos trifosfatos

EDTA - Ácido Etilenodiamino tetra-acético (do inglês, Ethylenediamine tetraacetic acid)

INSA - Instituto Nacional do Semiárido

SSR - Repetições de Sequência Simples

ISSR - Repetições de sequência inter-simples (do inglês, Inter Simple Sequence Repeats)

NLM - Número de locos monomórficos

NLP – Número de locos polimórficos

NTA – Número total de bandas amplificadas

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction)

PLP - Porcentagem de locos polimórficos

RAPD - DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (do inglês, Random Amplified Polymorphic DNA)

RNase - Ribonuclease

TBE - Tampão Tris-borato-EDTA

TFA - Tamanho dos Fragmentos Amplificados em pares de base

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
REFERÊNCIAS	15
REFERENCIAL TEÓRICO	18
Origem e distribuição de <i>Opuntias</i>	18
Importância Econômica.	19
Utilização de marcadores moleculares na caracterização de Palma forrageira (<i>Opuntia</i> spp.).	21
Inter Repetições de Sequência Simples – (ISSR)	23
Reação em cadeia da polimerase (PCR) (do inglês Polymerase Chain Reaction)	25
REFERÊNCIAS	26
OBJETIVO GERAL	30
OBJETIVO ESPECÍFICO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
Obtenção e plantio dos cladódios das diferentes espécies de <i>Opuntia</i> spp.	33
Extração e purificação do DNA.....	35
Oligonucleotídeos iniciadores (ISSR).	38
Reações de PCR utilizando ISSR.....	38
Análise estatística dos dados e da diversidade genética	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS	51

INTRODUÇÃO

A palma forrageira, *Opuntia* spp., pertencente à família Cactaceae, possui 130 gêneros e mais de 2.000 espécies, tem como centro de origem o México (NEFZAOU, 2016), mais está distribuída pelas diferentes regiões do mundo, por se adaptar facilmente as condições adversas de tempo e clima, desde as áreas com temperaturas elevadas até as mais baixas. Este tipo de cultura é importante economicamente para regiões de climas áridos e semiáridos, garantindo uma geração de renda a partir da alimentação dos seus rebanhos, contribui para a regeneração de vegetação, aumento da biodiversidade, diminuição da degradação e erosão do solo.

A palma forrageira além de ser utilizada como fonte de alimentação animal e humana, possui propriedades medicinais e também é usada como planta ornamental.

Segundo Reynolds (2008), o uso da fruta da palma na alimentação humana era comum no México desde o período que antecedeu a colonização espanhola. Após a conquista pelos europeus, a fruta manteve seu papel básico na dieta da população mexicana à época e, decorrido um século, já estava sendo consumida no Sul da Itália e na ilha da Sicília.

Em seus estudos Santos et al. (2006), discorre que a palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) é um alimento importante na atividade pecuária apresentando-se como uma alternativa para as regiões áridas e semiáridas do nordeste brasileiro por ser adaptada às condições climáticas da região apresentando aspecto fisiológico especial quanto à absorção, aproveitamento e perda de água, suportando prolongados períodos de estiagem, podendo alcançar produtividade de até 40 toneladas de matéria seca por hectare por colheita.

A principal utilização da *O. ficus-indica* no Nordeste do Brasil é a forragem sob condições de seca (Paiva et al., 2016). Por ser rica em água e fibra, é empregada na alimentação de bovinos, caprinos e ovinos (ANDRADE MONTEMAYOR et al., 2011; NEFZAOU et al., 2014; VAZQUEZ MENDOZA et al., 2017).

O gênero *Opuntia* apresenta alta diversidade genética. Das mais de 30 espécies cultivadas, as economicamente importantes são: *O. ficus-indica* L., *O. albicarpa* Scheinvar, *O. amyclaea* Ten, *O. cochenillifera* (L.) Miller, *O. hyptiacantha* FAC Weber, *O. megacantha* Salm Dyck, *O. robusta* Wendl e *O. streptacantha* Lem (PIMENTA BARRIOS, 1994; KIESLING et al., 1998; MONDRAGON JACOBO, 2001; LAS CASAS et al., 2017).

A alta diversidade genética de *Opuntias* estão conservadas em bancos ativos de germoplasma em todos os continentes. No hemisfério oriental, a conservação *ex situ*, vem sendo feita pela Tunísia, Marrocos, África do Sul e Itália, enquanto no ocidente, pela Argentina, Brasil, Chile, EUA e México (maior centro de diversidade). No Brasil, os esforços têm sido direcionados para a conservação de acessos voltados para forragem, com 1.417 acessos, incluindo acessos de vários países, variedades, híbridos e segregantes de cruzamentos controlados (MONDRAGÓN & CHESSA, 2017).

A Embrapa Semiárido tem feito introduções de acessos de outros países, tais como da África do Sul em 1982, e dos EUA em 1989, visando à identificação de acessos adaptados às condições climáticas do Semiárido, bem como aqueles com características apropriadas para o seu cultivo e mecanização (SILVA, SANTOS, ARAUJO, LIMA NETO, MOREIRA, FERREIRA, e ALBUQUERQUE, 2010).

Segundo Nefzaoui (2017), a caracterização de germoplasma é essencial para fornecer informação sobre os caracteres de cada acesso, promovendo sua classificação por meio das estimativas da diversidade genética dentro e entre grupos. Dentre as diversas formas de se caracterizar o germoplasma, os marcadores moleculares a nível de DNA, vem sendo usados para estudar a diversidade genética, relações e origens dos cultivares, bem como para a discriminação de cultivares e o DNA *fingerprint* de várias culturas (CERVERA et al., 1998; DIRLEWANGER et al.; 1998; FANG & ROOSE, 1997; GIANFRANCESCHI et al., 1998; HOKANSON et al., 1998; KOLLER et al., 1993).

Existem diversos tipos de marcados moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), como DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (Williams et al., 1990), polimorfismos de comprimento de fragmento

amplificado (AFLPs) (Vos et al., 1995), microssatélites, também conhecidos como repetições de sequência simples (SSR), são compostos de sequência de DNA de 2 a 5 pares de bases (pb) repetidas em tandem (Rongwen et al., 1995) e a amplificação de inter repetições de sequência simples - (ISSR) (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

O marcador ISSR é uma técnica baseada em microssatélites muito útil para estudos de genoma. Os primers usados em amplificações ISSR são baseados em sequência SSR (di, tri, tetra, ou repetições penta nucleotídeos), ancoradas em sequência genômicas que flanqueiam cada lado das repetições de sequência simples direcionadas (SSRs) (5' ou 3'), usando dois a quatro nucleotídeos arbitrários e frequentemente degenerados. Ao contrário dos SSRs, essa técnica não requer informações de sequência prévia e gera um grande número de polimorfismos (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Os marcadores ISSR são considerados particularmente úteis para o estudo de indivíduos intimamente relacionados que exigem baixos níveis de polimorfismo (ZIETKIEWICZ et al., 1994) e foram aplicados como uma alternativa muito útil para impressão digital e análise genética em frutíferas (FANG & ROOSE, 1997; FANG et al., 1998).

Bezerra et al., (2022) reportam que além do ISSR os marcadores moleculares RAPD e ITS também mostraram-se eficientes em acessar a diversidade genética e discriminar acessos de palma forrageira.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de 40 genótipos de *Opuntia* spp. do Banco Ativo de Germoplasma de palma forrageira do Instituto Nacional do Semiárido, usando marcadores moleculares ISSR.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, E. S.; NAGATY, M. A.; SALMAN, M. S.; BAZAID, S. A. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus-indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chem* 160: 31-38, 2014.
- ANDRADE-MONTEMAYOR, H. M.; CÓRDOVA-TORRES, A. V.; GARCÍA-GASCA, T.; KAWAS, J. R. Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and nopal (*Opuntia* spp.). *Small Rumin Res* 98: 83-92, 2011.
- BEZERRA, J. D. C.; ANDRADE, A. P.; RÊGO, M. M.; SILVA, D. S.; NASCIMENTO JÚNIOR, J. R. S.; ARAÚJO, F. S.; VALENÇA, R. L.; RÊGO, E. R.; BRUNO, R. L. A.; PESSOA, Â. M. S.; MEDEIROS, A. N. Diversidade genética e relações entre acessos de *Nopalea* sp. e *Opuntia* spp. revelados por marcadores moleculares RAPD, ISSR e ITS. *Molecular Biology Reports* 49(7): 6207-6213. Doi: 10.1007/s11033-022-07416-y.
- CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, J. C.; MARTINEZ-DE-TODA, F.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources: A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Genet.* 97: 51-59, 1998.
- DIRLEWANGER, E. S.; DUHA, M. A.; VIRUEL, R.; SAUNIER, R.; MONET. Identification of peach varieties using molecular markers. *Acta Hort* 465: 69-77, 1998.
- EL KHARRASSI, Y.; MAZRI, M. A.; BENYAHIA, H.; et al. Fruit and juice characteristics of 30 accessions of two cactus pear species (*Opuntia ficus indica* and *Opuntia megacantha*) from different regions of Morocco. *LWT Food Sci Technol* 65: 610-617, 2016.
- FANG, D. Q.; & ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408-417, 1997.
- FANG, D. Q.; KRUEGER, R. R.; & ROOSE, M. L. Phylogenetic Relationships among selected citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 612-617, 1998.
- GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R.; KOMJANC, M. et al. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076, (1998).
- HOKANSON, S. C.; SZEWC-MCFADDEN, A. K.; LAMBOY, W. F.; & MCFERSON, J. R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in *Malus domestica* Borkh. core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* 97: 671-683, 1998.

- KOLLER, B.; LEHMANN, A.; MCDERMOTT, J. M. & GESSLER, C. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85: 901-904, 1993.
- LAS CASAS G.; DISTEFANO, G.; CARUSO, M. et al. Relationships among cultivated *Opuntia ficus-indica* genotypes and related species assessed by cytoplasmic markers. *Genet Res Crop Evol.* 75: 518-532, 2017.
- MONDRAGÓN-JACOBO, C.; PÉREZ-GONZÁLEZ, S. Cactus (*Opuntia* spp.) as forage. *Food & Agriculture Org.*, 2001.
- MONDRAGÓN-JACOBO & CHESSA, I. Nopal (*Opuntia* spp.) genetic resources: In Iglese, P.; Mondragon, C.; Nefzaoui, A.; Sáenz, C. *Crop ecology, cultivation and uses of cactus pear.* 43-49, 2017.
- NEFZAOU, A.; BEN SALEM, H. & EL MOURID, M. Tecnologias Apropriadas para Mitigação da Seca em Áreas Agropastoris do Norte da África. *Journal of Arid Land Studies*, 24(-1): 41-46, 2014.
- NEFZAOU, M. et al. Morphological characterization of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) accessions from Agadir, Morocco. In: IX International Congress on Cactus Pear and Cochineal: CAM Crops for a Hotter and Drier World 1247. p. 163-170, 2016.
- NEFZAOU, M. et al. Avaliação da diversidade genética de cultivares de palma brasileira e mediterrânea por marcadores SSR e características morfológicas. In: IX Congresso Internacional de Cactus Pear and Cochineal: CAM Crops for a Hotter and Dry World 1247. pág. 171-182, 2017.
- PAIVA, P. M. G.; SOUZA, I. F. A. C.; COSTA, M. C. V. V. et al. *Opuntia* sp. cactus: biological characteristics, cultivation and applications. *Adv Res* 7:1-14, 2016.
- PIMIENTA-BARRIOS, E. Prickly pear (*Opuntia* spp.): a valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. *Journal of Arid Environments*, 28(1): 1-11, 1994.
- REINOLDS, S. G.; ARIAS, E. General background on *Opuntia*. Disponível em: <http://www.fao.org/DOCREP/005/2808E/y2808e04.htm>. Acessado em: 25 ago. 2022.
- RONGWEN, J.; AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; LAVI, U. & CREGAN, P. B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotypes identification. *Theor. Appl. Genet.* 90:43-48, 1995.
- SÁENZ, C. *Opuntias* as a natural resource. *Agro-industrial utilization of cactus pear.* FAO-CACTUSNET, Rome, pp 1-5, 2013.
- SANTOS, D.C.; FARIAS, I.; LIRA, M.A. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco, 2006. 48p. (Documentos, 30).

SHETTY, D. & NARESHCHANDRA. Analysis of the variants produced through tissue culture techniques in *Withania somnifera* (L) dunal. by DNA fingerprinting employing rapid method. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 3: 287-290, 2012.

VAZQUEZ-MENDOZA, P.; MIRANDA-ROMERO, L. A.; ARANDA-OSORIO, G. et al. Evaluation of eleven Mexican cultivars of prickly pear cactus trees for possibly utilization as animal feed: in vitro gas production. Agrofor Syst 91:749-756, 2017.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. & ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414, 1995.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535, 1990.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A. & LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176-183, 1994.

REFERENCIAL TEÓRICO

Origem e distribuição de *Opuntias*

Opuntia spp. são cultivadas em todo o mundo como frutas e hortaliças e são cada vez mais usados como alimento para humanos e forragem para o gado em áreas áridas e semiáridas do globo, principalmente partes do Brasil e México, e em menor grau na Ásia ocidental e norte e sul da África. No México, as espécies de *Opuntia* são cultivadas há pelo menos 14.000 anos (CASAS E BARBERA 2002; SAMAH et. al. 2016);

A palma forrageira – *Opuntia fícus-indica* (L.) Mill. – cactácea exótica originária do México (HOFFMANN, 1995), está presente em todos os continentes com diversas finalidades, destacando-se sua utilização na alimentação animal (OLIVEIRA; CAVALCANTE FILHO; RANGEL; LOPES, 2011).

Dos planaltos mexicanos a palma migrou para outras regiões, onde está sendo cultivada para produção de frutos. Atualmente, é cultivada nas zonas áridas e semiáridas do mundo inteiro, em sistemas sustentados com altos rendimentos e baixa demanda de energia (NUNES, 2011).

Sua introdução no Brasil objetivou, hospedar o inseto, conhecido como cochonilha do carmim [*Dactylopius coccus* Costa (Homóptera, Dactylopiidae)], que não causa danos à planta, quando bem manejada, e produz um corante vermelho (carmim) (BRITO; DAMASCENO; MELO; ALMEIDA; CUNHA, 2013).

A maior área de palma forrageira no Nordeste se concentra no agreste e sertão dos estados de Alagoas e Pernambuco (NUNES, 2011).

No estado da Paraíba são cultivadas duas espécies de palma com a *O. fícus-indica* Mill com as cultivares gigante, redonda, clone IPA-20 e a *N. cochenillifera* Salmy Dyck, cuja cultivar é a palma miúda ou doce (SOUZA et al. 2010).

Segundo do Censo Agropecuário IBGE (2017), a quantidade de palma produzida na Paraíba foi de 356.350 toneladas, em 12.969 hectares distribuídas em 13.795 estabelecimentos, as 10 cidades mais produtoras são: Gado Bravo 52.539 t, Monteiro 35.897 t, Barra de Santana 32.052 t, Aroeiras 24.115 t, Umbuzeiro 18.102 t, Barra de Santa Rosa 15.920 t, Santa Cecília 14.383 t, Campina Grande 14.115 t, Cuité 13.644 t e Casserengue 10.636 t.

Importância Econômica

A palma forrageira é usada para diversas finalidades podendo ser usada na alimentação de ruminantes, na alimentação humana, na produção de medicamentos, cosméticos e corantes, na conservação e recuperação de solos, produção de biogás, cercas vivas, paisagismo, além de uma infinidade de usos (NUNES, 2011).

As regiões, climaticamente, definidas como áridas e semiáridas, representam aproximadamente 48 milhões de km², distribuídas em 2/3 dos países do mundo, onde vive uma população estimada em 630 milhões de pessoas. Nestas, o fenômeno da seca é normal e causa sérios prejuízos ao setor agropecuário (OLIVEIRA, 2010).

Segundo Santos et al. (1997), A busca por alimentos que possibilitem a produção animal nos períodos críticos do ano, a palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) destaca-se por apresentar características morfofisiológicas que a tornam tolerante a longas estiagens.

A espécie apresenta-se como uma alternativa primordial para estas regiões, visto que é uma cultura que apresenta aspecto fisiológico especial quanto à absorção, aproveitamento e perda de água, sendo bem adaptada às condições adversas do cenário em questão (NUNES, 2011).

A região Nordeste do Brasil possui uma área de 550.000 ha ocupada com a plantação de palma forrageira, com destaque para Alagoas e Pernambuco, Estados com a maior área cultivada (ARAÚJO *et al.*, 2005). Segundo Lopes *et al.* (2007) a região Nordeste é a maior área cultivada do mundo, distribuídos nos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte. Trata-se de uma cultura bem adaptada às condições adversas do semiárido, é sem dúvida, uma das principais fontes de alimento para o rebanho nordestino (FERREIRA, 2005; SANTOS *et al.*, 2001, BRITO; DAMASCENO; MELO; ALMEIDA; CUNHA, 2013).

As civilizações mesoamericanas usavam os cladódios (*Opuntia* spp.) como vegetal ou alimento e principalmente como fruticultura sazonal, com frutas doces (pera espinhosa ou tunas em espanhol) ou ácidas. Eles também são considerados uma medicina alternativa natural devido a seus efeitos anti-

hipoglicêmicos, estresse oxidativo e prevenção de câncer (CHAVEZ-SANTOSCOY et al. 2009; MORALES et al. 2012; SAMAH et. al. 2016).

Os gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, estão presentes às espécies de palma mais utilizadas como forrageiras. Existem três espécies de palma encontradas no Nordeste do Brasil, a palma gigante, palma redonda e palma miúda, são cactáceas sem espinhos, de crescimento rápido e teor de umidade superior às outras cactáceas (OLIVEIRA; CAVALCANTE FILHO; RANGEL; LOPES, 2011).

É considerado o recurso mais utilizado na alimentação do rebanho bovino da região, sobretudo na época seca, não apenas por garantir alimento para os animais, mas também pelo baixo custo de produção, podendo, inclusive, contribuir com a renda direta de alguns produtores locais (BRITO; DAMASCENO; MELO; ALMEIDA; CUNHA, 2013).

O Nordeste apresenta um rebanho bovino de 28.289.850 e caprino 8.302.817, representando respectivamente, 13,78% e 90,6% do rebanho nacional. Logo, o cultivo de palma forrageira é essencial para manutenção dos rebanhos encontrados no semiárido nordestino, tendo em vista ser a palma adaptada a ambiente com déficit hídrico (BRITO; DAMASCENO; MELO; ALMEIDA; CUNHA, 2013).

Por outro lado, de acordo com Martins *et al.* (2000), na criação de ruminantes, a alimentação é responsável por grande parte dos custos (60 a 70%), sejam estes animais confinados ou criados extensivamente. Por isso, é importante utilizar alimentos que possibilitem uma máxima produção a um baixo custo. As gramíneas forrageiras normalmente é a fonte mais barata para a alimentação animal, porém está sujeita a estacionalidade de produção, limitando a disponibilidade de forragem nos períodos de prolongadas estiagens, com isso é necessário buscar fontes alternativas para a alimentação animal, como silagem, feno e a palma forrageira. Sendo esta última cultivada na maioria das vezes consorciada com outras culturas, o que reduz os custos de produção (BRITO; DAMASCENO; MELO; ALMEIDA; CUNHA, 2013).

Utilização de marcadores moleculares na caracterização de Palma forrageira (*Opuntia* spp.).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do ácido desoxirribonucleico (DNA), culminando com o surgimento dos marcadores moleculares na década de 1980. Desde então, esses marcadores têm acompanhado os avanços da era genômica, beneficiando-se do grande volume de informações de sequências de DNA disponível (GUIMARÃES; MAGALHÃES; LANZA; SCHUSTER, 2009).

Os marcadores moleculares baseados em DNA possuem características vantajosas, pois seus resultados não são afetados pelo ambiente e estão disponíveis em número quase ilimitado, abundante e aplicável a todos os organismos (NELSON RJ, 1996, LUNA-PAEZ et al, 2007).

A técnica RAPD é baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR). Tem a particularidade de ser utilizado como iniciador um oligonucleotídeo de sequência aleatória e tamanho de 10 a 12 bases, não sendo necessário conhecer o genoma da espécie (WILLIAMS et al., 1993; LUNA-PAEZ et al, 2007). RAPD são tipicamente dominantes, isto é, o fenótipo eletroforético de um indivíduo heterozigoto para um determinado loco não é geralmente distinguido de um indivíduo homozigoto para o alelo amplificado (AGENOR, 2010).

O RAPD permite criar impressões digitais genômicas de espécies nas quais a sequência a ser amplificada é desconhecida (LUNA-PAEZ et al, 2007).

Em *Opuntia* os marcadores RAPDs vem sendo usados para estimar a diversidade genética e atribuir taxonomia específica a acessos não classificados ou a aqueles incorretamente classificados pelos critérios morfológicos (LUNA-PAEZ et al, 2007; SANTO MERGULHÃO, 2012).

Algumas desvantagens desse marcador: (a) baixa reprodutibilidade; (b) é um marcador dominante, não conseguindo diferenciar o heterozigoto do homozigoto dominante; (c) difícil de analisar comparado a outros marcadores; (d) comparação entre os estudos com este marcador são difíceis; e (e) é difícil a automação da técnica (LOPES, 2018).

Outro tipo de marcador molecular empregado em estudos da diversidade é o AFLP polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado (Vos et al.,

1995). A técnica de AFLP foi mais informativa em agrupar genótipos de *Opuntia* (SÁNCHEZ et al., 2014), quando comparado ao RAPD.

A principal limitação dos marcadores AFLP é serem marcadores dominantes (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1988; LIU, 1988; RAMALHO et al., 2000). Dessa forma, apenas um alelo é detectado, ou seja, o que é amplificado e visualizado no gel (CATTANEO et al. 2015).

A combinação de marcadores AFLPs e ISSR, permitiram que Labra et al. (2003) propusessem que *O. ficus-indica* deveria ser considerada uma planta domesticada derivada de *O. megacantha* (SÁNCHEZ et al., 2014).

Outra classe importante de marcadores são os microssatélites, (SSR) (do inglês single sequense repeats), repetições de sequência simples, são regiões de DNA repetitivas e não codificantes que consistem em pequenos motivos repetidos em tandem (1-6 pb); eles estão presentes em todo o genoma de um indivíduo, tanto em regiões codificantes como não codificantes (SAMAH et. al. 2016).

Os marcadores SSR, foram empregados pela primeira vez em acessos de *Opuntia*, por Samah et. al. (2016), gerando informações da diversidade genética entre os genótipos analisados.

Quando comparado a outros marcadores moleculares, os microssatélites são os mais informativos devido à sua confiabilidade e formas multialélicas abundantes. Eles exibem taxas de mutação mais altas do que o resto do genoma (GAO et al. 2005) e podem ser facilmente analisados usando métodos baseados em PCR, incluindo genotipagem e multiplexação automatizadas fluorescentes (SAMAH et. al. 2016).

Os marcadores SSR são marcadores codominantes e altamente polimórficos e têm se mostrado muito úteis em estudos do gênero *Prunus* (CHENG & HUANG, 2009; ARANZANA et al, 2010).

Mesmo tendo algumas vantagens quando comparado com outros marcadores, Madesis et al (2013), elencou algumas desvantagens com relação ao seu uso tais como: (a) são caros para serem desenvolvidos; (b) o primer às vezes não é amplificado quando este é reproduzido; (c) os primers podem produzir um padrão difícil de interpretar, ou um padrão não específico; (d) o produto amplificado talvez não seja polimórfico e (e) podem produzir alelos nulos

que propiciam um erro na interpretação dos dados. Outros possíveis problemas são a dificuldade da determinação de bandas que diferem em um ou dois pares bases e a identificação do tamanho das bandas, tornando as comparações de resultados um trabalho difícil (MADESIS et al., 2013; LOPES, 2018).

Como técnica alternativa ao SSR, mas com uma capacidade informativa diferente, existem os ISSR; Estes marcadores detectam regiões de DNA entre dois microssatélites com núcleos que compartilham a mesma sequência de bases (LUNA-PAEZ et al. 2007).

Inter Repetições de Sequência Simples – (ISSR)

Com os avanços da biotecnologia, sobretudo o desenvolvimento dos marcadores de DNA, têm permitido estudar e caracterizar a variabilidade genética em diferentes níveis (OLIVEIRA, 2007). Os marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramentas auxiliares indispensáveis nas diferentes etapas do melhoramento genético, desde a caracterização do germoplasma até as etapas finalísticas de desenvolvimento e seleção de plantas melhoradas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre as classes de marcadores moleculares existentes, o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) constitui-se em uma técnica simples, rápida e eficiente desenvolvido a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites abundantes no genoma eucarioto sem a utilização de sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994). O princípio da técnica está baseado na reação de PCR (*Reaction Chain Polymerase*) e envolvem ampliações de segmentos de DNA, presente entre duas regiões idênticas de microssatélites orientadas em direções opostas (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

ISSRs são marcadores semi-arbitrários amplificados por PCR na presença de um primer complementar a um microssatélite alvo. Os padrões de bandas resultantes têm um padrão de herança dominante e são altamente reprodutíveis, rápidos e tecnicamente simples de manusear. ISSRs têm sido usados para analisar o parentesco genético de cultivares de amêndoa (MARTINS et al., 2003) e ameixa (GOULAO et al., 2001).

Os produtos amplificáveis são geralmente de 200-2000 pb (pares bases) de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade, possivelmente devido ao

uso de iniciadores longos e de alta temperatura de anelamento. A limitação dessa classe de marcadores está relacionada ao fato de serem dominantes que impossibilita estabelecer relações alélicas entre os indivíduos.

Os marcadores ISSR têm sido utilizados para estimar a diversidade genética em nível inter e intra-específico em uma ampla variedade de espécies. Além disso, também tem sido utilizados em estudos de DNA “fingerprinting”, seleção assistida, filogenia, formação de grupos heteróticos e mapeamento genético (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

O estudo da diversidade é o processo pelo qual a variação entre populações, entre grupos ou entre indivíduos de um mesmo grupo é avaliada por meio de um método específico ou pela combinação de métodos (PEREIRA et al., 2009). Os dados normalmente envolvem um número grande de mensurações baseados em dados morfológicos e de passaporte, dados bioquímicos, citológicos e em técnicas baseadas no polimorfismo de DNA como os marcadores moleculares que permitem a diferenciação mais realística dos genótipos (PEREIRA et al., 2009).

Normalmente, para usar a diversidade genética existente nas coleções, o melhorista precisa manipular o germoplasma disponível, buscando genótipos que, através de metodologias adequadas, possam gerar materiais genéticos superiores (GANGA et al., 2004).

O ISSR tem sido amplamente e complementares utilizado para fins de genotipagem; e geralmente os fragmentos detectados tendem a ser monomórficos quando a variabilidade genética dos organismos comparados é reduzida, de modo que se infere uma maior relação entre eles; entretanto, altos índices polimórficos permitem supor o contrário (PATZAK, 2001; IRUELA et al., 2002; MARTINS et al., 2003; LUNA-PAEZ et al. 2007).

Essa técnica, assim como a RAPD, requer um primer direcionado e em posição invertida aos núcleos de dois microssatélites adjacentes, de modo que a região entre eles seja amplificada, evidenciando possíveis polimorfismos no comprimento dos fragmentos amplificados (ISSR) (LUNA-PAEZ et al. 2007).

No entanto, os ISSR são marcadores dominantes, não permitindo distinguir o heterozigoto do homozigoto dominante (IDREES; IRSHAD, 2014). Estes mesmos autores também afirmam que os ISSR são menos polimórficos quando comparados aos microssatélites (LOPES, 2018).

Reação em cadeia da polimerase (PCR) (do inglês Polymerase Chain Reaction)

A PCR apresenta ampla gama de aplicações em vários ramos da pesquisa científica. Essa reação possibilita que determinada região do genoma de qualquer organismo seja multiplicada em milhões de cópias, o que facilita a análise genética e permite o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico muito mais sensíveis e mais específicas do que as tradicionalmente utilizadas (OLIVEIRA, 2007).

Para que ocorra a amplificação, com a síntese de novas fitas de DNA, às amostras devem ser submetidas à combinação adequada de temperatura e de tempo. Cada ciclo da PCR apresenta três fases fundamentais, que são: desnaturação, anelamento e extensão (OLIVEIRA, 2007).

REFERÊNCIAS

- AGENOR, D. Técnicas de uso corrente na avaliação da diversidade genética. 2010. Disponível em: <http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/grupoc/rapd.html>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- ARANZANA, M. J.; ABBASSI, E. W.; HOWAD & ARÚS, P. Variação genética, estrutura populacional e desequilíbrio de ligação em variedades comerciais de pêsego. *BMC Genetics* 11:1-12, 2010.
- ARAÚJO, L. F.; OLIVEIRA, L. S. C.; PERAZZO NETO, A.; ALSINA, O. L. S.; SILVA, F. L. H. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: Relação com a umidade ótima para fermentação sólida. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.9, n. 3, p. 379-384, 2005.
- ARAÚJO, S. O Cultivo da Palma Forrageira e Capacidade de Suporte no Cariri Ocidental da Paraíba. *Revista Craibeiras de Agroecologia*, v. 4, n. 2, 2019.
- BRITO, D. R.; DAMASCENO, M. F.; MELO, L. N. F.; ALMEIDA, E. S.; CUNHA, D. N. F. V. Importância da palma forrageira (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck) para a agropecuária do semiárido alagoano. *Ambientale: UNEAL, Alagoas*, v. 1, n. 4, p. 40-60, jun. 2013.
- CASAS, A.; BARBERA, G. Domesticação e difusão mesoamericana. In: Nobel PS (ed) *Cactos: biologia e usos*. University of California Press, EUA, 2002. pp 143–162.
- CATTANEO, L. F.; PEREIRA, M. G.; FERREIRA, C. F.; & SOUZA FILHO, G. A. Estudo da divergência genética em mamoeiro por meio de marcadores AFLP, 2015.
- CHÁVEZ-SANTOSCOY, R. A.; GUTIERREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Composição fenólica, capacidade antioxidante e citotoxicidade in vitro de células cancerígenas de nove sucos de figo-da-índia (*Opuntia* spp.). *Alimentos Vegetais Hum Nutr* 64:146–152, 2009.
- CHENG, Z. & HUANG, H. SSR fingerprinting cultivares e variedades de pêsego chinês (*Prunus persica*) e análise de suas relações genéticas. *Scientia Horticulturae* 120: 188-193, 2009.
- FERREIRA, M. E.; FERNÁNDEZ, J. N.; GRATTAPAGLIA, D. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. 1998.
- FERREIRA, M. A. Palma forrageira na alimentação de bovinos leiteiros. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 68, 2005.
- GANGA, Rita Maria Devós et al. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, p. 494-498, 2004.

- GAO, L. Z.; ZHANG, C. H.; JIA, J. Z. Transferência entre espécies de microssatélites de arroz em seus parentes selvagens e o potencial para estudos genéticos de conservação. *Genet Resour Crop Evol* 52:931–940, 2005.
- GOULAO, L.; MONTE-CORVO L. & OLIVEIRA, C. M. Caracterização fenética de cultivares de ameixa por marcadores de alta razão multiplex: Polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado e repetições de sequência inter-simples. *Geleia. Soc. Hort. Sci.* 126: 72-77, 2001.
- GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, L. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v. 30, n. 253, p. 10-20, nov. 2009.
- IBGE. Censo Agropecuário. 2017. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=25&tema=76625. Acesso em: 17 ago. 2022.
- IRUELA, M.; RUBIO, J.; CUBERO, J. I.; GIL, J.; & MILLÁN, E. T. Análise filogenética no gênero *Cicer* e grão de bico cultivado usando marcadores RAPD e ISSR. *Genética Teórica e Aplicada* 104(4): 643-651.
- LABRA, M.; GRASSI, F.; BARDINI, M.; IMAZIO, S.; GUIGGI, A.; CITTERROP, S.; BANFI E.; SGORBATI, E. S. Relações genéticas em *Opuntia* Mill., gênero (Cactaceae) detectado por marcador molecular. *PlantScience* 165: P. 1129-1136, 2003.
- LOPES, E. B. Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2007. 130p.
- LOPES, W. S. et al. Tendências da literatura científica sobre uso de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética de peixes. 2018.
- LUNA-PAEZ, A. et al. Characterization of *Opuntia* spp. by means of seed with RAPD and ISSR markers and its possible use for differentiation. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, v. 9, p. 43-59, 2007.
- MADESIS, P.; GANOPOULOS, L.; TSAFTARIS, A. Microsatellites: Evolution and Contribution. In: KANTARTZI, S. K. (ed.), *Microsatellites: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1006. DOI: 10.1007/978-1-62703-389-3_1, 2013.
- MARTINS, A. S.; PRADO, I. N.; ZEOULA, L. M.; BRANCO, A. F.; NASCIMENTO, W. G. Digestibilidade aparente de dietas contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte proteica em novilhas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.1, p.269-277, 2000.

- MARTINS, M.; TENREIRO, R. & OLIVEIRA, M. M. Relação genética de cultivares portuguesas de amêndoa avaliada por marcadores RAPD e ISSR. *Plant Cell Rep.* 22:71-78, 2003.
- MORALES, P.; RAMÍREZ-MORENO, E.; SANCHEZ-MATA, M. C.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Propriedades nutricionais e antioxidantes de polpa e sementes de duas cultivares de xoconostle (*Opuntia joconostle* FAC Weber ex Diguet e *Opuntia matudae* Scheinvar) de alto consumo no México. *Food Res Int* 46:279–285, 2012.
- NUNES, C. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró, v. 6, n. 1, p. 58-66, mar. 2011.
- OLIVEIRA, M. C. S. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. São Carlos: Embrapa, 2007.
- OLIVEIRA, F. T. et al. "Palma forrageira: adaptação e importância para ecossistemas áridos e semiáridos." *Green Journal of Agroecology and Sustainable Development* 5.4, 2010.
- OLIVEIRA, A. S. C.; CAVALCANTE FILHO, F. N.; RANGEL, A. H. N.; LOPES, K. B. P. A PALMA FORRAGEIRA: alternativa para o semi-árido. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró, v. 6, n. 3, p. 49-58, set. 2011.
- PATZAK, J. Comparação de métodos moleculares RAPD, STS, ISSR e AFLP utilizados para avaliação da diversidade genética em lúpulo (*Humulus lupulus* L.) *Euphytica* 121(1):9-18, 2001.
- PEREIRA, F. F. et al. Progênie de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) de diferentes idades. *Neotropical Entomology*, v. 38, p. 660-664, 2009.
- SÁNCHEZ, E. A. E. et al. Cladistics of Mexican nopal genotypes (*Opuntia* spp.) based on AFLP markers and fruit characters. *Phyton*, v. 83, p. 299, 2014.
- SAMAH, S. et al. Genetic diversity, genotype discrimination, and population structure of Mexican *Opuntia* sp., determined by SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 34, n. 1, p. 146-159, 2016.
- SANTO MERGULHÃO, A. C. E. et al. Marcadores moleculares para detecção de variabilidade genética em variedades de palma forrageira. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, v. 17, n. 1, p. 78-82, 2012.

SANTOS, D. C.; FARIAS, I.; LIRA, M. A. et al. A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck) em Pernambuco: cultivo e utilização. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 1997. 23p.

SANTOS, D. C.; SANTOS, M. V. F.; FARIAS, I.; DIAS, F. M.; LIRA, M. A. Desempenho produtivo de vacas 5/8 Holando/Zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.1, p.12-17, 2001.

SOUZA, A. E. F. et al. Occurrence and identification of the etiologic agents of plant diseases in cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill.) in the semi-arid region of Paraíba. Biotemas, v. 23, n. 3, p. 11-20, 2010.

WILLIAMS, C. E.; CLAIR, D. Relações fenéticas e níveis de variabilidade detectados por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição e análise de DNA polimórfico amplificado aleatório de acessos cultivados e selvagens de *Lycopersicon esculentum*. Genoma 36, 1993.

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a diversidade genética entre e dentro espécies de *Opuntia* spp., por meio de marcador molecular ISSR.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a diversidade genética de 40 indivíduos de *Opuntias* spp. do banco ativo de germoplasma (BAG) do Instituto Nacional do Semiárido (INSA), usando marcadores ISSR; e.
- Sugerir genótipos como potenciais genitores ao programa de melhoramento de palma forrageira do consórcio INSA, UFPB, UFV, Empaer, Emparn e Embrapa Semiárido.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Nacional do Semiárido (INSA) no município de Campina Grande-PB, e no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Foram utilizados 40 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do INSA, distribuídos em 08 espécies de *Opuntias* (Tabela 1).

Tabela 1 Acessos, nome vulgar, origem e espécies de *Opuntia* spp., analisados neste estudo conservados ex-situ e pertencentes ao BAG do INSA.

Acesso	Nome vulgar	Origem	Espécie
1	Moradilla - V03	La Purificación, Texcoco, México	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
2	Verdura Morado - V26	Faculdade Agronomia, Marín, Nuevo León, México	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
4	FX Italiana	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
5	Copena V1 - V04	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
6	Nopalea Uruapan - V20	Uruapan, Michoacán, México	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
8	Polotitlán - V09	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. atropes</i> Rose <i>O. cochenillifera</i> (L.)
9	Califórnia - V14	Nopalera UACH, Chapingo, México	Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
14	Blanco San Pedro - V19	San Pedro de los Naranjos, Guanajuato, México	<i>O. atropes</i> Rose
16	Rosa - T64	Rancho M.R. Ramos Arizpe, Coahuila, México	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
17	Rojos 3589 (s) -T26	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
18	FR mineira	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
19	Direkteur – FD	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill
54	G6. IPA-200174 - Orelha de elefante africana (OEA)	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. undulata</i> Griffiths
55	G7. IPA-100429 - Clone 1 OEA	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. undulata</i> Griffiths
56	G8. IPA-100430 - Clone 6 OEA	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. undulata</i> Griffiths
58	G10. IPA-100004 - Miúda/Doce	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
63	G15. IPA-100423 - Clone 23 (Seleção de cruzamento)	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
67	G20. IPA-100428 - Clone 28 (Seleção telado)	IPA, Arcoverde, Pernambuco, Brasil	<i>O. cochenillifera</i> (L.) Salm Dyck subgênero <i>Nopalea</i>
76		Instituto Nacional do Semiárido	<i>O. Atropes</i> Rose

85	Blanco Valtierra - F48	Valtierra, Guanajuato, México	<i>O. atropes</i> Rose
86	Rubí del Sitio (8) - T53	Ojo de Agua de la Palma, Zacatecas, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
87	Naranjona - T40	Rancho Las Papas, Zacatecas, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
88	Jarilla Grande - T14	La Victoria, Zacatecas, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
94	Tapón	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. robusta</i> Wendl
98	Amarilla San Luis Potosí - T67	Campo Narro, Matehuala, San Luis Potosí, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
100	F Espinoso	Nopalera UACH, Chapingo, México	
101	Cuijo - F45	Rancho la Cenicera, San Luis de la Paz, Guanajuato, México	
111	Penca Alargado - F34	Vivero SEMARNAP, Saltillo, Coahuila, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
112	Amarillo - T62	Rancho M.R., Ramos Arizpe, Coahuila, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
113	Colorada - T06	CRUCEN - UACH, Zacatecas, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
116	Frida (copena torreoja) - T11	Rancho Las Papas, Zacatecas, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
117	Copena Moradilla - T77	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
119	Sangre de toro - T28	Rancho Las Papas, Zacatecas, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
120	Espinhosa redonda - T23	CRUCEN - UACH, Zacatecas, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
121	Alfajayucan - T16	San Martín de las Pirámides, México, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
122	Copena de Fernando Torres (5) - T51	Ojo de Agua de la Palma, Zacatecas, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
123	Apastillada - T19	La Victoria, Zacatecas, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
125	Copena T5 - T15	Nopalera UACH, Chapingo, México	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck
126	Aguamielilla Hgo. - T72	Campo Narro, Matehuala, San Luis Potosí, México	<i>O. joconostle</i> A. Web.
135	Palma de espinho	Soledade, Paraíba, Brasil	<i>O. dillenii</i> (Ker-Gawl.)Haw.

De todos os acessos constantes na (Tabela 1), utilizados neste estudo, 75% deles foram coletados em algumas localidades do México, (Figura 1). Os demais acessos foram coletados no Brasil nas cidades de Arco Verde-PE, Campina Grande-PB e Soledade-PB.



Figura 1 Estados do México onde foram coletados germoplasma de *Opuntia* spp. pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma do INSA, utilizados neste estudo.

Obtenção e plantio dos cladódios das diferentes espécies de *Opuntia* spp.

Para a realização do experimento foram coletados 2 cladódios de 40 acessos selecionados no BAG do INSA, dentre eles, 38 pertencentes a 8 espécies e 2 acessos que não possuem identificação, (Figura 2).

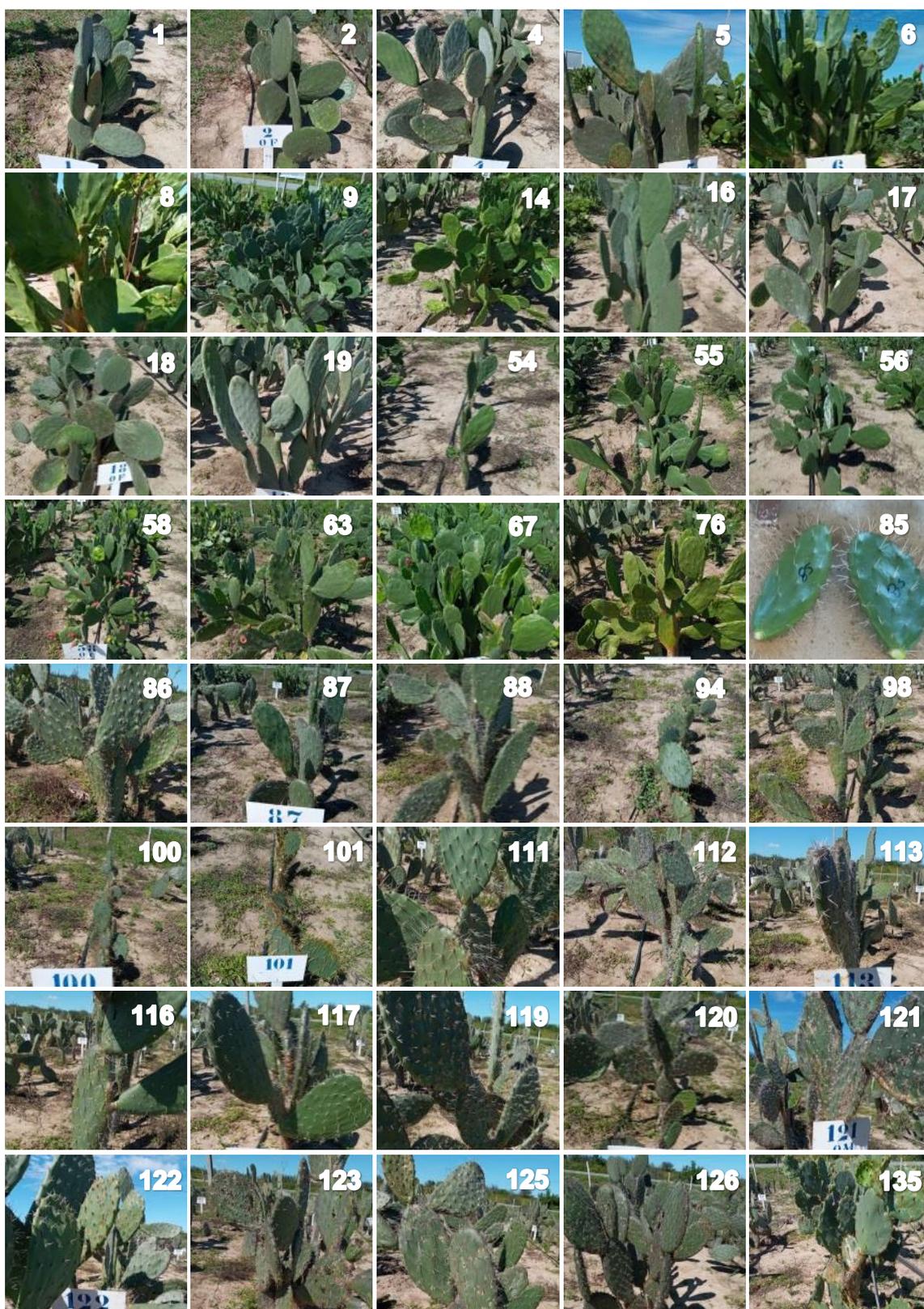


Figura 2 Acessos de *Opuntia* spp. coletados do BAG do INSA: *O. ficus-indica* (1, 2, 4, 5, 16, 17, 18 e 19); *O. cochenillifera* (6, 9, 58, 63 e 67); *O. atropes* (8, 14, 76 e 85); *O. undulata* (54, 55 e 56); *O. robusta* (94); *O. megacantha* (86, 87, 88, 98, 111, 112, 113, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 123 e 125); *O. joconostle* (126); *O. dillenii* (135); acessos sem identificação no BAG (100 e 101).

Os cladódios foram armazenados em local coberto e arejado para que pudessem passar pelo período de “cura” de 15 dias, em seguida foram plantados em vasos de polipropileno de alta densidade com capacidade para 5L, e mantidos sob telado com sombreamento de 60% (Figura 3A). Após 25 dias do transplântio as raízes foram coletadas com auxílio de pinças e armazenadas em tubos Eppendorf de 2,0 ml

As raízes foram lavadas em água destilada e posteriormente dispostas sobre papel toalha para absorver o líquido em disco de Petri (Figura 3B), após as raízes estarem limpas e secas foram inseridas em sacos de papel pardo contendo 15 g de sílica gel por 72 horas, para desidratação. Após esse período, as raízes foram introduzidas em tubos Eppendorf de 2 ml, junto com 3 “beads” de cerâmica, para o processo de maceração no equipamento *Bead Ruptor 4 OMNI*, por 5 minutos. Retirou-se os *beads*, e o material foi transferido para novos tubos Eppendorf de 2 ml com a identificação numérica do acesso e acondicionados em freezer vertical a uma temperatura de -20°C.



Figura 3 Acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) cultivados em vasos de polipropileno de alta densidade com capacidade para 5L sob telado com sombreamento de 60%. (A) Os 40 acessos usados neste estudo. (B) raízes limpas com água destilada e disposta em disco de Petri.

Extração e purificação do DNA

A extração do DNA das amostras maceradas no *Bead Ruptor*, foi realizada com o Kit DNeasy Plant Mini® (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante: inserindo 200 mg do macerado em um tubo *Eppendorf*, adicionando-se 400µl de tampão AP1 + 4 µl de RNase A, utilizando o aparelho vortex para fazer a homogeneização da solução e levado ao banho Maria por 10 minutos a 65°C, invertendo-se o tubo a cada 3 minutos; em seguida foi acrescentado 130 µl do tampão P3, após esse processo as amostras foram

colocadas no gelo por 5 minutos. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação houve uma separação entre as partes líquidas e sólidas, onde o sobrenadante foi coletado e aplicada na coluna QIAshredder Mini spine (cor lilás) e centrifugou-se o material a 14.000 rpm por 2 minutos. O material filtrado foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 600 µl de tampão AW1 misturando os líquidos com a micropipeta. Transferiu-se 650 µl da amostra para outra coluna a DNeasy Mini Spin (branca) o material passou por centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Nesse processo o material descartado foi o líquido filtrado, e manteve-se apenas o filtro da coluna. A operação anterior foi repetida utilizando-se o restante da amostra. Após filtrar o restante da amostra, a coluna DNeasy Mini Spin foi inserida em um novo tubo de 2 ml e adicionou-se 500 µl AW2, o eluído foi centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm, em seguida, descartou-se o material filtrado. Foi adicionado 500 µL de tampão AW2 e novamente o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. A coluna DNeasy Mini Spin foi inserida em um novo tubo de 1,5 ml, adicionando 100 µL de TAE e ficou em repouso por 5 minutos. Depois o material foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto e repetiu-se a etapa anterior. O processo foi concluído quando o pellet de DNA resultante foi resuspendido em 200 µl de TAE.

Quantificação e Qualidade de DNA

As amostras de DNA extraídas conforme item anterior, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando tampão TBE 1X (tris, ácido bórico e EDTA), para verificar a quantidade e a qualidade do DNA, conforme ilustrado na Figura 3.

Para a eletroforese foi retirado 10 μ L de cada amostra de DNA inserindo num tubo de 200 μ L, adicionados 5 μ L de tampão de corrida (*loading buffer*) e 2 μ L de *Sybr Green*, essa mistura foi aplicada nos poços do gel de agarose e esse por sua vez, colocado na cuba de eletroforese, a qual foi ligada a fonte de eletroforese KASVI K33-300V, a 120 Volts por 30 minutos. Após a corrida, o gel foi transferido para o fotodocumentador Gel Logic, Carestream MI SE e capturada a imagem. Foi utilizado um marcador padrão de peso molecular conhecido (Invitrogen™ de 1 Kb Plus DNA Ladder) (Figura 4).

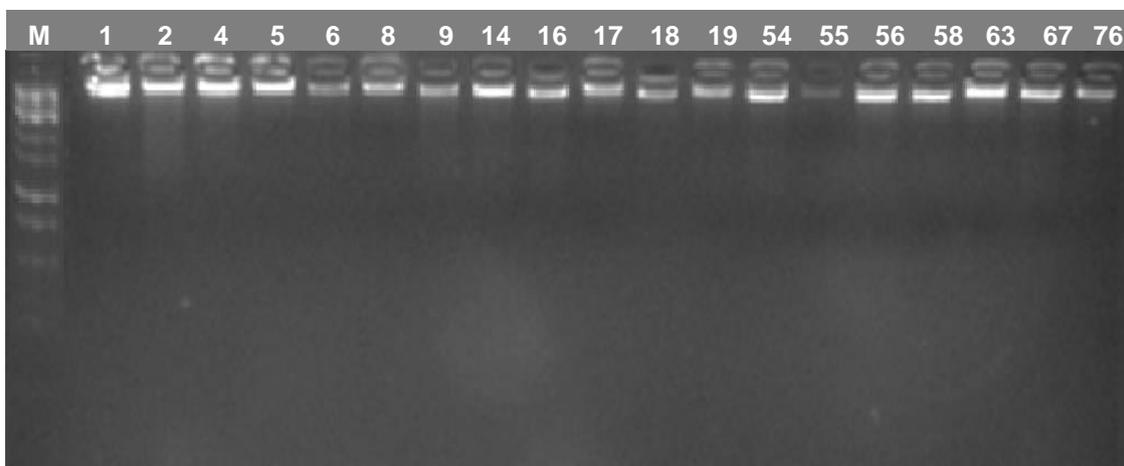


Figura 4 Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% de 19 acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.), para verificar a quantidade e a qualidade do DNA, M - marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen™ de 1 Kb Plus DNA Ladder).

As amostras que apresentaram padrão de banda com alta quantidade foram diluídas numa proporção de 5 μ L de DNA para 45 μ L de tampão AE, as amostras que não apresentaram bandas, foi feito novo procedimento de extração.

Oligonucleotídeos iniciadores (ISSR).

Foram utilizados 11 oligonucleotídeos iniciadores ISSR (primers), cuja denominação e sequências 5' - 3' encontram-se na (Tabela 2).

Tabela 2 Oligonucleotídeos iniciadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) e suas respectivas sequências.

Primers	Sequência (5' – 3')
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
UBC825	ACACACACACACACACT
UBC827	ACACACACACACACACG
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG

Reações de PCR utilizando ISSR

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em amostras de volume final de 25 µL, composta de 23 µL de Mix (água Mili-Q 18,6 µl + Tampão de reação 2,5 µl + dNTPs 0,5 µl + primer 1,0 µl + Taq polimerase 0,4 µl) e 2 µL de DNA genômico da amostra. Para realizar os ciclos de amplificação foi utilizado um termociclador GeneAmp PCR System 9700, com as seguintes temperaturas e tempo: 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 95°C (desnaturação do DNA); 35 segundos a 50°C (pareamento do primer ao DNA molde) e 50 segundos a 72°C (extensão dos primers), seguidos de 7 minutos a 72°C (extensão final dos fragmentos) e último ciclo a 4°C por 10 min.

Ao término do processo de PCR, as amostras de DNA amplificadas receberam 5µL de tampão de corrida (loading buffer) e 2µL de *Sybr Green* e misturadas por pipetagem, dessa mistura foi aplicado 15µL nos poços de gel de agarose 2,0%, e o mesmo foi inserido no aparelho de eletroforese e adicionado o tampão TBE 1X (tris, ácido bórico e EDTA), até a cobertura total do gel e submetido a corrente elétrica de 85 V, por uma hora e vinte minutos, em seguida

o gel foi colocado no fotodocumentador Gel Logic Carestream MI SE, onde foi fotografado. Os pesos moleculares dos produtos da PCR foram estimados usando um DNA padrão de 100 pb (Invitrogen™ de 1 Kb Plus DNA Ladder) (Figura 5).

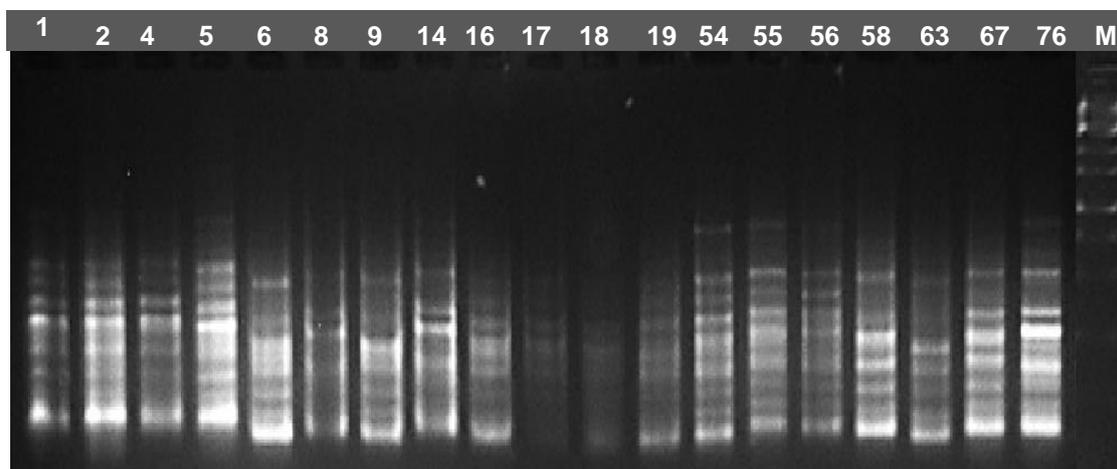


Figura 5 Perfil eletroforético em gel de agarose 2% de 19 acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) gerados com o oligonucleotídeo iniciador ISSR UBC841. M - marcador de peso molecular ladder 100 bp.

Análise estatística dos dados e da diversidade genética

A partir dos géis fotodocumentados resultantes das reações de PCR utilizando marcadores ISSR, foi elaborada uma matriz binária através da leitura das bandas, onde a ocorrência de banda no gel foi representada pelo número 1 (um) e sua ausência, pelo número 0 (zero). Para a análise da frequência dos alelos, foi considerado loco polimórfico aquele em que a frequência do alelo mais comum foi igual 0,95 (WILLS e NEI, 1976). A distância entre os pares de acessos, foram obtidas a partir da matriz binária, através do complemento do índice de similaridade de Jaccard (1912), ou seja, a dissimilaridade de Jaccard, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$d = 1 - S_j, \text{ onde;}$$

$$S_j = \frac{a}{(a + b + c)}, \text{ onde}$$

a, representa presença da banda nos dois indivíduos, *i* e *j*.

b, presença da banda no indivíduo *i* e ausência no indivíduo *j*.

c, ausência da banda no indivíduo *i* e presença no indivíduo *j*.

Para as estimativas da matriz de dissimilaridade foi usada a função `distance ()` do pacote `Ecodist` na linguagem R (GOSLEE, 2010).

Os clusters ou agrupamentos hierárquicos foram gerados a partir da matriz de distância genética utilizando-se o método de WARD (1963), que utiliza a análise de variância, a partir das somas de quadrados (SQ) dentro e entre grupos. A análise de cluster e os gráficos foram obtidos a partir do pacote `factoextra` na linguagem R (KASSAMBARA, 2017).

Para a divisão do número de grupos no dendrograma foi realizado um corte adotando-se o critério proposto por MOJENA (1977), que se baseia no tamanho relativo dos níveis de fusão (distâncias) no dendrograma, possui a finalidade de determinar o número de grupos, otimizando a qualidade do ajuste do agrupamento aos dados. Para verificar e dar suporte estatístico aos nós internos do dendrograma, foi realizada a análise de *bootstrap* e utilizando-se o pacote `shipunov` na linguagem R.

Para validar os clusters foi estimado o coeficiente de correlação cofenético (SOKAL E ROHLF, 1962), cuja finalidade é mensurar o ajuste entre o dendrograma elaborado e a matriz de dissimilaridade e sua significância foi validada pelo teste de *t* de student a 5% de probabilidade.

A matriz de dissimilaridade gerada a partir do complemento do índice de similaridade de JACCARD, gerou um agrupamento dos genótipos em diferentes clusters de acordo com o método de otimização de Tocher (RAO, 1952), conforme fórmula a seguir:

Distancia média intragrupo

$$\bar{d}_i = 2 \frac{\sum_{j>j'}^n \sum_{j''=1}^n d_{jj''}}{n(n-1)}$$

onde o n , representa o número de acessos dentro do grupo i .

Distancia média intergrupo

$$\bar{d}_{w'} = \frac{\sum_{j=1}^{n_1} \sum_{j'=1}^{n_2} d_{jj'}}{n_1 n_2}$$

Em que n_1 e n_2 , são os números de acessos dentro dos grupos i e i' , respectivamente.

Nos resultados obtidos a partir do agrupamento de Tocher, o coeficiente de correlação cofenética foi estimado conforme sugerido por SILVA *et al.*, (2013) utilizando-se a função `coph. Tocher` do pacote *biotools* da linguagem R (SILVA *et al.*, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de DNA foram submetidas a PCR utilizando-se 11 primers ISSR, originando 839 bandas, distribuídas em 91 locos, dos quais, 86 são polimórficos e 5 monomórficos, um polimorfismo de 94,50%. Os primers: 808, 810, 825, 834, 840 e 842, apresentaram 100% de locos polimórficos (Tabela 3).

Tabela 3 Número total de bandas amplificadas (NTA), número de locos polimórficos (NLP), número de locos monomórficos NLM, porcentagem de locos polimórficos (PLP) e tamanho dos fragmentos amplificados entre 40 acessos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) do BAG do INSA, por oligonucleotídeos iniciadores ISSR (primers), sequências 5'- 3'.

Primers	Sequência 5'- 3'	NTA	NLP	NLM	PLP (%)	TFA
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	69	10	1	90,91%	300-1500
UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	84	8	0	100.0%	400-2000
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	126	13	1	92,86%	200-1000
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	25	6	0	100.0%	100-1500
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	150	11	1	91,67%	300-1000
UBC825	ACACACACACACACACT	60	4	0	100.0%	300-900
UBC827	ACACACACACACACACG	19	2	1	66,67%	200-1500
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	59	4	0	100.0%	200-2000
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	44	8	0	100.0%	200-900
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	163	11	1	91,67%	100-2000
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAY	40	9	0	100.0%	200-800
G						
Total		839	86	5		

*Y = C ou T.

A estratégia de caracterização e seleção de primer é a etapa inicial em estudos relacionados a diversidade genética e esses estudos vêm sendo adotados nos mais diferentes grupos de plantas (SILVA *et al.*, 2018; BARBOSA *et al.*, 2020). Primers que apresentem perfil polimórfico devem ser priorizados para trabalhos associados à variabilidade genética, embora primers monomórficos possam também apresentar outro padrão de comportamento em amostras diferentes (CHAGAS *et al.*, 2015).

Na matriz de dissimilaridade genética obtida por meio do complemento aritmético do índice de similaridade de JACCARD (1912) (Tabela 4), observa-se que a distância genética entre pares de acessos variou de 0,32 a 1,00. A menor distância entre pares de acessos foi de (0,32) registrada entre os acessos 121 x 122, os quais pertencem a espécie *O. megacantha*.

Por outro lado, as maiores distâncias foram registradas entre os pares de acessos de DNA para 45 µL de tampão AE, as amostras que não apresentaram bandas foi feito novo procedimento de extração 1 x 119, *O. ficus-indica* e *O. megacantha*, 86 x ?(101), *O. megacantha* e acesso sem identificação no BAG, 86 x 135, *O. megacantha* e *O. dillenii*, 88 x 135, *O. megacantha* e *O. dillenii* e ?(101) x 135, acesso sem identificação no BAG e *O. dillenii*, esses apresentaram índice igual a 1,00.

O maior distanciamento genético entre acessos da mesma espécie ocorreu entre o 87 x 117, *O. megacantha*, em que a dissimilaridade foi igual a 1,00, o que possibilitará a utilização desses dois acessos em programa de melhoramento genético da espécie de *O. megacantha*. Para Borém et al., (2017), essa diversidade dentro das espécies é interessante para realizar cruzamentos entre indivíduos mais divergentes e ampliar a variabilidade genética existente para praticar seleção em populações segregantes.

A partir dos dados coletados da matriz na dissimilaridade Tabela 4, foi possível criar o dendrograma utilizando o método proposto por WARD (1963), para analisar a variabilidade genética entre e dentro espécies dos 40 acessos avaliados de *Opuntia* spp., os mesmos foram alocados em nove diferentes clusters de acordo com a similaridade genética e usando o ponto de corte de acordo com os critérios de MOJENA (1977).

A consistência das bifurcações geradas por 1.000 iterações “bootstrap” variou de 14,8 a 100% entre os pontos de fusão do dendrograma (Figura 5).

O cluster I, foi o maior de todos, formado por sete acessos, oriundos de diferentes regiões do México, dentre eles: o 101, o qual encontra-se sem identificação no BAG, e cuja origem é o Estado de Guanajuato. Já os acessos 116, 119 e 120, são originários de Zacatecas, 112 do Estado de Coahuila, um dos 31 Estados do México, localizado ao Norte do País, fazendo fronteira com o estado americano de Texas ao norte, e com os estados mexicanos de Nuevo León a leste, San Luis Potosí e Zacatecas ao sul e Durango e Chihuahua a oeste, o acesso 117, que também compõe este cluster, foi coletado na cidade de Chapingo, localizada no Estado do México, o acesso 98, tem sua origem em San Luis Potosí, (Figura 1), todos esses acessos pertencem a espécie *O. megacantha*. E, finalmente, o acesso 100, também sem identificação no BAG, que faz parte deste grupo e foi coletado na região de Chapingo, uma cidade próxima a Texcoco no Estado do México (Figura 1). Os acessos 100 e 101, que não possuem identificação no BAG, e que agruparam juntos com os acessos de *O. megacantha* neste cluster, possivelmente também pertençam a esta espécie, porém, é necessário estudos mais profundos para ratificar o fato, principalmente análise citogenética dos mesmos.

O cluster II foi composto pelos acessos 87, 88 e 86, todos coletados na região de Zacatecas no México, 111, com origem em Coahuila e 113 também coletado em Zacatecas, pertencem a mesma espécie, *O. megacantha*, o que é esperado. Os clusters I e II, são formados por 13 acessos da mesma espécie (*O. megacantha*), com variabilidade genética entre eles, o que permitirá a realização de cruzamentos entre eles e obtenção de população segregante (BORÉM et al., 2017).

O cluster III foi formado pelos acessos 6 e 9 da espécie *O. cochenilifera*, do Estado de Michoacán e da cidade Chapingo, respectivamente, e também por 8 e 14, ambos da espécie *O. atropes*, a primeira foi coletada em Chapingo e a segunda, em Guanajuato.

Esse agrupamento entre as espécies, *O. cochenilifera* e *O. atropes*, possivelmente esteja relacionado ao nível de ploidia dessas espécies, que são

diploides ($2n = 22$). Em seus experimentos, SILVA et. al. (2022), reportaram que todos os acessos de *O. atropes*, *O. cochenilifera* e *O. undulata* 'Orelha Elefante Africana', apresentaram, $2n = 2x = 22$ cromossomos.

No cluster IV estão presentes os acessos 19, 16, 17 e 18, todos da espécie *O. ficus-indica*, o primeiro e os dois últimos com origem em Chapingo, e o segundo coletado em Coahuila.

O cluster V, teve o agrupamento dos seguintes acessos: 4 e 5, da espécie *O. ficus-indica*, 94, da espécie *O. robusta* e também os acessos 1 e 2, que são *O. ficus-indica* coletados em diferentes regiões do México, os três primeiros em Chapingo, o quarto na cidade de Texcoco e o último no Estado de Nuevo León. O agrupamento dessas duas espécies distintas, pode estar relacionado ao nível de ploidia. Tanto *O. ficus-indica* quanto *O. robusta*, são considerados octoplóides (Segura, 2007), com conteúdo de DNA igual em células $2C = 4,98$ pg, corroborando os resultados encontrados neste estudo. Por outro lado, Alves (comunicação pessoal) reportou que o acesso 94, do BAG do INSA, possivelmente pertença a outra espécie de *Opuntia*, *O. Engelmannii*, cujo nível de ploidia foi determinado, é um hexaplóide ($2n = 6x = 66$) com bandas CMA+ = 4t. Portanto, é possível que tenha havido erro de identificação da espécie quando da implantação do BAG do INSA.

O cluster VI, formado pelos acessos 123, 121, 122 e 125, todas da espécie *O. megacantha*, e o acesso 126, da espécie *O. joconostle*, todos de regiões distintas do México, o primeiro tem sua origem em San Martín de las Pirâmides, cidade pertencente ao Estado do México, o segundo e o terceiro em Zacatecas, o quarto em Chapingo e o último em San Luis Potosí. Em suas análises por citometria de fluxo, Segura (2007), averiguou que *O. megacantha* Salm-Dyck tem ($2C = 4,43$ pg), enquanto que *O. joconostle* FAC Weber apresenta ($2C = 5,01$ pg), e são espécies octaploides.

O cluster VII constitui-se dos acessos 63, 58 e 67, pertencentes a espécie *O. cochenilifera* e são oriundos do IPA em Arcoverde-PE, Brasil. O acesso 76, da espécie *O. atropes* já se encontrava na área da fazenda do INSA, em Campina Grande-PB, Brasil. Essa formação possivelmente deu-se pelo fato das duas espécies serem diploides, como ocorrido no cluster III.

O cluster VIII, formado apenas pelo acesso 135, da espécie *O. dillenii*, que tem como origem no município de Soledade-Pb, Brasil, espécie mais distante

geneticamente quando comparado aos demais acessos avaliados neste estudo. Segundo Castro (2023), o nível de ploidia de *O. dillenii* é de $2n = 44$.

Por último, o cluster IX, formado pelos acessos 85, *O. atropes* originário de Guanajuato no México e os demais acessos 54, 55, 56, todos da espécie *O. undulata* que têm sua origem no IPA em Arcoverde-PE, Brasil. Possivelmente foram agrupados juntos em função de todos os indivíduos avaliados também apresentarem o mesmo nível de ploidia ($2n = 2x = 22$).

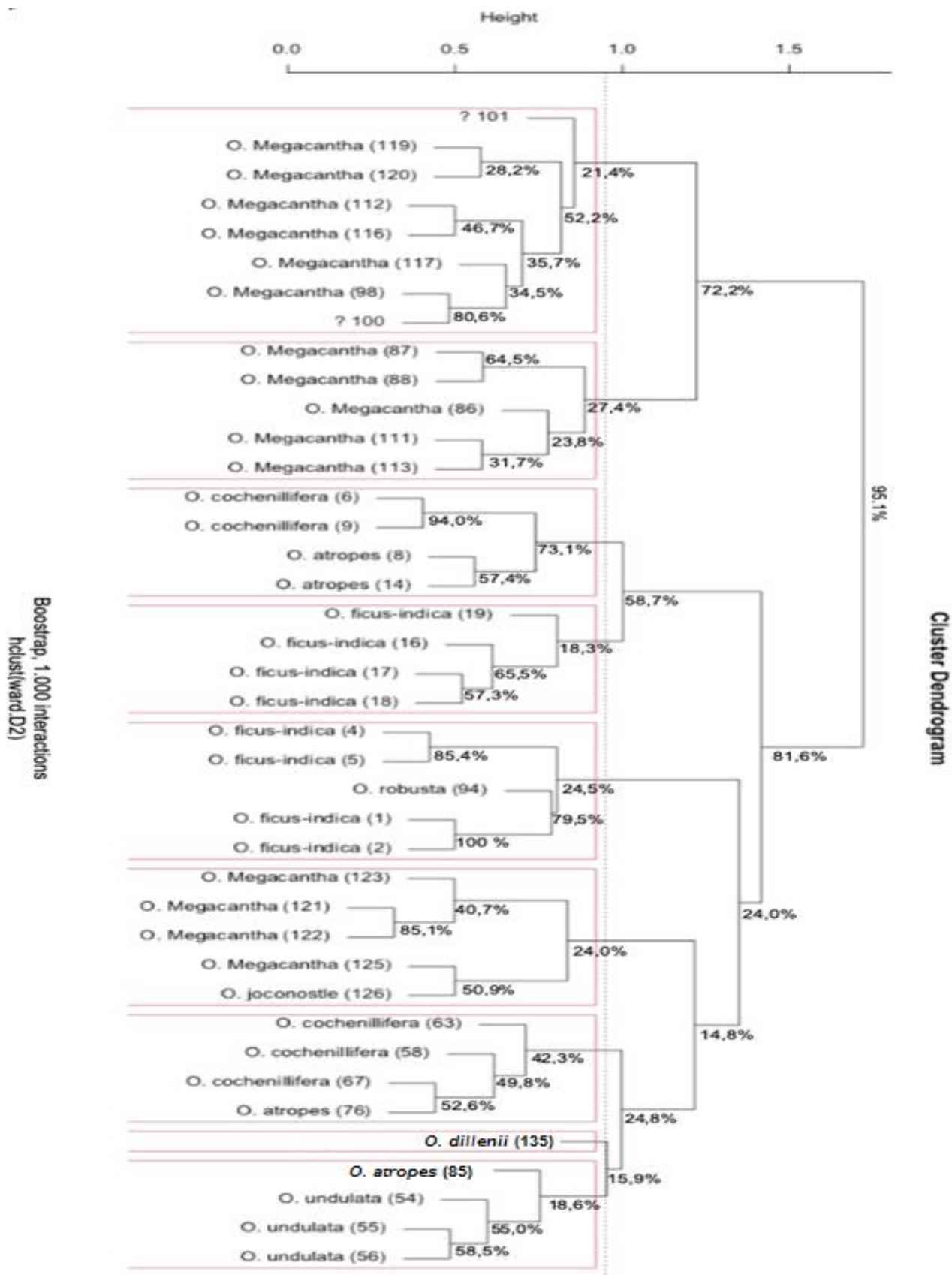


Figura 5 Dendrograma construído pelo método Ward, com base no coeficiente de dissimilaridade genética de JACCARD (1912), de 40 acessos de *Opuntia* spp. a partir de 11 marcadores ISSR.

A matriz de dissimilaridade genética entre pares de acessos (Tabela 4) também foi usada para agrupar os 40 acessos das 8 espécies de *Opuntia* utilizando o método de otimização de Tocher (RAO, 1952), formando 10 clusters (Tabela 5). No primeiro cluster foram incluídos 16 acessos (40%) dos acessos, distribuídos em 6 espécies. Foram agrupadas neste cluster acessos de espécies diploides ($2n = 2x = 22$), *O. atropes* e *O. cochenilifera* (Assis et al., 2014); tetraploides ($2n = 4x = 44$), *O. undulata* (Da Silva, 2019); e octaplóides ($2n = 8x = 88$) *O. ficus-indica*, *O. jonocostle* e *O. megacantha* (Segura et al., 2007).

O segundo cluster, composto por 8 acessos, possivelmente todos da espécie *O. megacantha* ($2n = 8x = 88$). Aqui o acesso 100 (?), sem espécie definida no BAG do INSA, possivelmente também pertença a *O. megacantha*. Contudo, sugerimos a realização de estudos citogenéticos para confirmar esta evidência. Outro fato importante foi a inclusão neste grupo do acesso 8, *O. atropes*, espécie diploide oriunda Chapingo, México.

Acessos de *O. ficus-indica* (1, 2 e 4) e *O. robusta* (94), formam o grupo III. Essas espécies são octaplóides e compartilham o mesmo *pool* gênico (Segura et al., 2007). Caruso et al., (2010) reportaram diferentes citótipos ($2n = 2x = 22$, $2n = 4x = 44$ e $2n = 8x = 88$), que também corroboram com este agrupamento.

O cluster IV, é formado por acessos da espécie *O. ficus-indica* (17, 18, 16 e 19), todos coletados na região de Chapingo (México) e introduzidos no Brasil. São todos octaplóides (8x), embora já tenham sido citados para esta espécie citótipos 2x, 6x, 7x e 8x (Segura et al., 2007).

Os últimos cinco clusters foram compostos por apenas dois acessos (grupo V) e um único acesso (grupos de VI a X). O cluster V, formado pelos acessos 87 e 88, ambos da espécie *O. megacantha*, foram coletados no Estado de Zacatecas, México (Figura 1). Estes indivíduos são possivelmente hexaplóides ou octaplóides (Segura et al., 2007; Caruso et al., 2010).

O acesso 63 da espécie *O. cochenilifera* ($2n = 2x = 22$, com bandas CMA+ = 2t), é o único elemento do cluster VI. É um clone selecionado a partir de uma população de polinização livre pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e doado ao BAG do INSA.

Os clusters VII, VIII, IX e X, formados, respectivamente, pelos acessos 85 (*O. atropes*), 86 (*O. megacantha*), 101 (?) e 135 (*O. dillenii*). Essas espécies, *O. atropes* e *O. dillenii*, já foram reportados citótipos diploides $2n = 2x = 22$ e tetraploides (Assis et al., 2014), enquanto que para *O. megacantha* pode apresentar-se como hexa (Moore, 1977) ou octoplóide (Segura et al., 2007; Goldblatt & Johnson, 1990). O acesso 101(?), possivelmente é *O. megacantha*, conforme demonstrado no dendrograma (Figura 5), e suas características morfoagronômicas e bromatológicas (Moreira-Filho, 2021), porém precisa ser investigado citogeneticamente. O agrupamento usando este critério não foi eficiente em agrupar os acessos por espécies. Segundo Nascimento (2011), o método hierárquico de Ward é a alternativa de agrupamento mais interessante, quando se pretende a formação de grupos mais homogêneos.

Tabela 5 Agrupamento dos 40 acessos de *Opuntia* spp. do banco ativo de germoplasma do INSA, com base no método de Tocher (RAO, 1952), usando o pacote biotools no software R (SILVA et al., 2017).

Grupos	Espécies	Acessos
I	<i>O. megacantha</i>	121, 122, 123, 125 e 120
	<i>O. undulata</i>	54, 56 e 55
	<i>O. joconostle</i>	126
	<i>O. cochenillifera</i>	58, 67, 6 e 9
	<i>O. atropes</i>	76 e 14
	<i>O. ficus-indica</i>	5
II	<i>O. megacantha</i>	98, 116, 119, 112, 113 e 111
	?	100
	<i>O. atropes</i>	8
III	<i>O. ficus-indica</i>	1, 2 e 4
	<i>O. robusta</i>	94
IV	<i>O. ficus-indica</i>	17, 18, 16 e 19
V	<i>O. megacantha</i>	87 e 88
VI	<i>O. cochenillifera</i>	63
VII	<i>O. atropes</i>	85
VIII	<i>O. megacantha</i>	86
IX	?	101
X	<i>O. dillenii</i>	135

Os Coeficientes de Correlação Cofenética (CCC) obtidos para ambas as metodologias foram altos e significativos, 0,86** e 0,95***, para Tocher e Ward, respectivamente, evidenciando que as duas metodologias são apropriadas para avaliar a diversidade genética entre acessos de *Opuntia*, com maior confiabilidade para o método de Ward.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, ficou constatado que há variabilidade genética entre e dentro das oito espécies que constituem os 40 acessos do banco ativo de germoplasma (BAG) do INSA avaliados neste estudo.

A partir da diversidade genética avaliada, sugerimos como potenciais genitores ao Programa de Melhoramento Genético da Palma Forrageira do consórcio INSA, UFPB, UFV, Empaer, Emparn e Embrapa Semiárido, os acessos 1, 86, 87, 88, 101, 117, 119 e 135.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMEED, E. S.; NAGATY, M. A.; SALMAN, M. S.; BAZAID, S. A. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chem* 160:31–38, 2014.
- AGENOR, D. Técnicas de uso corrente na avaliação da diversidade genética. 2010. Disponível em: <http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/grupoc/rapd.html>. Acesso em: 16 ago. 2022.
- AHUMADA, L.; MONTENEGRO, G.; TRILLO, C. et al. Citogenética do atum na Argentina (duas formas de *Opuntia ficus - indica* (L.) Mill. e *O. robusta* JC Wendl., Cactaceae). *Genet Resour Crop Evolução* 67, 645–654, 2020.
- ALVES, L. I. F. Comunicação Pessoal. INSA, 2022.
- ANDRADE-MONTEMAYOR, H. M.; CÓRDOVA-TORRES, A. V.; GARCÍA-GASCA, T.; KAWAS, J. R. Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and nopal (*Opuntia* spp.). *Small Rumin Res* 98:83–92, 2011.
- ARANZANA, M. J; ABBASSI, E. W.; HOWAD & ARÚS, P. Variação genética, estrutura populacional e desequilíbrio de ligação em variedades comerciais de pêssego. *BMC Genetics* 11:1-12, 2010.
- ARAÚJO, L. F.; OLIVEIRA, L. S. C.; PERAZZO NETO, A.; ALSINA, O. L. S.; SILVA, F. L. H. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: Relação com a umidade ótima para fermentação sólida. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.9, n. 3, p. 379-384, 2005.
- ARAÚJO, S. O Cultivo da Palma Forrageira e Capacidade de Suporte no Cariri Ocidental da Paraíba. *Revista Craibeiras de Agroecologia*, v. 4, n. 2, 2019.
- ASSIS, F. B. et al. Caracterização agrônômica e bromatológica de híbridos de milho para ensilagem. *Semina Ci. agr.*, p. 2869-2882, 2014
- BEZERRA, J. D. C; ANDRADE, A. P.; RÊGO, M. M.; SILVA, D. S.; NASCIMENTO JÚNIOR, J. R. S.; ARAÚJO, F. S.; VALENÇA, R. L; RÊGO, E. R; BRUNO, R. L. A.; PESSOA, Â. M. S.; MEDEIROS, A. N. Diversidade genética e relações entre *Nopalea* sp. e *Opuntia* spp. acessos revelados por marcadores moleculares RAPD, ISSR e ITS. Springer Nature Bv, Boa Vista. abr. 2022.
- BOREM, A.; MIRANDA, G. V. *Melhoramento de Plantas*. 6. ed. Viçosa: UFV, 2017.

BRITO, D. R.; DAMASCENO, M. F.; MELO, L. N. F.; ALMEIDA, E. S.; CUNHA, D. N. F. V. Importância da palma forrageira (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck) para a agropecuária do semiárido alagoano. *Ambientale: UNEAL, Alagoas*, v. 1, n. 4, p. 40-60, jun. 2013.

CARUSO, M. et al. Marcadores microssatélites ajudam a avaliar a diversidade genética entre genótipos cultivados de *Opuntia ficus indica* e sua relação com espécies relacionadas. *Sistemática e evolução vegetal*, v. 290, n. 1, pág. 85-97, 2010.

CASAS, A.; BARBERA, G. Domesticação e difusão mesoamericana. In: Nobel PS (ed) *Cactos: biologia e usos*. University of California Press, EUA, 2002. pp 143–162.

CASTRO, J. P. Citotaxonomia de espécies de Cactaceae ocorrentes no nordeste do Brasil. Disponível em: https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/8229?locale=pt_BR. Acesso em: 14 mar. 2023.

CATTANEO, L. F.; PEREIRA, M. G.; FERREIRA, C. F.; & SOUZA FILHO, G. A. Estudo da divergência genética em mamoeiro por meio de marcadores AFLP, 2015.

CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, J. C.; MARTINEZ-DE-TODA, F.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitisvinifera* L. genetic resources: A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Genet.* 97:51–59, 1998.

CHÁVEZ-SANTOSCOY, R. A.; GUTIERREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Composição fenólica, capacidade antioxidante e citotoxicidade in vitro de células cancerígenas de nove sucos de figo-da-índia (*Opuntia* spp.). *Alimentos Vegetais Hum Nutr* 64:146–152, 2009.

CHENG, Z. & HUANG, H. SSR fingerprinting cultivares e variedades de pêsego chinês (*Prunus persica*) e análise de suas relações genéticas. *Scientia Horticulturae* 120: 188-193, 2009.

DA SILVA, L. P. PANCs-plantas alimentícias não convencionais e seus benefícios nutricionais. *Environmental smoke*, v. 2, n. 2, p. 102-111, 2019.

DIRLEWANGER, E. S.; DUHA, M. A.; VIRUEL, R.; SAUNIER, R.; MONET. Identification of peach varieties using molecular markers. *Acta Hort* 465:69–77, 1998.

EL KHARRASSI, Y.; MAZRI, M. A.; BENYAHIA, H.; et al. Fruit and juice characteristics of 30 accessions of two cactus pear species (*Opuntia ficus indica* and *Opuntia megacantha*) from different regions of Morocco. *LWT Food Sci Technol* 65:610–617, 2016.

EPHOTOPIX. Mapa do México, estados e capitais. Disponível em: <https://pt.maps-mexico-mx.com/mapa-do-m%C3%A9xico,-estados-e-capitais>. Acesso em: 15 mar. 2023.

FANG, D. Q.; KRUEGER, R. R.; & ROOSE, M. L. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:612–617, 1998.

FANG, D. Q.; & ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:408–417, 1997.

FERREIRA, M. A. Palma forrageira na alimentação de bovinos leiteiros. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 68, 2005.

FERREIRA, M. E.; FERNÁNDEZ, J. N.; GRATTAPAGLIA, D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1998.

GANGA, R. M. D. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, p. 494-498, 2004.

GAO, L. Z.; ZHANG, C. H.; JIA, J. Z. Transferência entre espécies de microssatélites de arroz em seus parentes selvagens e o potencial para estudos genéticos de conservação. *Genet Resour Crop Evol* 52:931–940, 2005.

GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R.; KOMJANC, M. et al. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076, (1998).

GOLDBLATT, P.; JOHNSON, D. Índice para números de cromossomos de plantas. *Mongr. Sistema Bot*, v. 51, p. 267, 1990.

GOSLEE, S. C. Análise de correlação de matrizes de dissimilaridade. *Plant Ecology*, v. 206, n. 2, pág. 279-286, 2010.

GOULAO, L.; MONTE-CORVO L. & OLIVEIRA, C. M. Caracterização fenética de cultivares de ameixa por marcadores de alta razão multiplex: Polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado e repetições de sequência inter-simples. *Geleia. Soc. Hort. Sci.* 126: 72-77, 2001.

GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, L. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v. 30, n. 253, p. 10-20, nov. 2009.

HOKANSON, S. C.; SZEWC-MCFADDEN, A. K.; LAMBOY, W. F.; & MCFERSON, J. R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in *Malus domestica* Borkh. core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* 97:671–683, 1998.

IBGE. Censo Agropecuário. 2017. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=25&tema=76625. Acesso em: 17 ago. 2022.

IRUELA, M.; RUBIO, J.; CUBERO, J. I.; GIL, J.; & MILLÁN, E. T. Análise filogenética no gênero *Cicer* e grão de bico cultivado usando marcadores RAPD e ISSR. *Genética Teórica e Aplicada* 104(4): 643-651.

JACCARD, P. THE DISTRIBUTION OF THE FLORA IN THE ALPINE ZONE. *New Phytologist* v. 11, n. 2, p. 37–50, fev. 1912.

MOREIRA FILHO, J. E. Diversidade fenotípica de (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., acessada por marcadores morfológicos e bromatológicos. 2021.

KASSAMBARA, A. Practical guide to cluster analysis in R: Unsupervised machine learning. Sthda, 2017.

KOLLER, B.; LEHMANN, A.; MCDERMOTT, J. M. & GESSLER, C. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85:901–904, 1993.

LABRA, M.; GRASSI, F.; BARDINI, M.; IMAZIO, S.; GUIGGI, A.; CITTERROP, S.; BANFI E.; SGORBATI, E. S. Relações genéticas em *Opuntia* Mill., gênero (Cactaceae) detectado por marcador molecular. *PlantScience* 165: P. 1129-1136, 2003.

LAS CASAS G.; DISTEFANO, G.; CARUSO, M. et al. Relationships among cultivated *Opuntia ficus-indica* genotypes and related species assessed by cytoplasmic markers. *Genet Res Crop Evol*, 2017.

LOPES, E. B. Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino. João Pessoa: EMEPA/FAEPA, 2007. 130p.

LOPES, W. S. et al. Tendências da literatura científica sobre uso de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética de peixes. 2018.

LUNA-PAEZ, A. et al. Characterization of *Opuntia* spp. by means of seed with RAPD and ISSR markers and its possible use for differentiation. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, v. 9, p. 43-59, 2007.

MADESIS, P.; GANOPOULOS, L.; TSAFTARIS, A. Microsatellites: Evolution and Contribution. In: KANTARTZI, S. K. (ed.), *Microsatellites: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1006. DOI: 10.1007/978-1-62703-389-3_1, 2013.

MARTINS, A. S.; PRADO, I. N.; ZEOULA, L. M.; BRANCO, A. F.; NASCIMENTO, W. G. Digestibilidade aparente de dietas contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte proteica em novilhas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.1, p.269-277, 2000.

- MARTINS, M.; TENREIRO, R. & OLIVEIRA, M. M. Relação genética de cultivares portuguesas de amêndoa avaliada por marcadores RAPD e ISSR. *Plant Cell Rep.* 22:71-78, 2003.
- MOJENA R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal* 20: 359-363, 1977.
- MONDRAGÓN-JACOBO, C.; PÉREZ-GONZÁLEZ, S. Cactus (*Opuntia* spp.) as forage. *Food & Agriculture Org.*, 2001.
- MONDRAGÓN-JACOBO & CHESSA, I. Nopal (*Opuntia* spp.) genetic resources. *Crop ecology, cultivation and uses of cactus pear*, p. 43-49, 2017.
- MOORE, D. S. Inversas generalizadas, método de Wald e construção de testes de ajuste qui-quadrado. *Journal of the American Statistical Association* , v. 72, n. 357, pág. 131-137, 1977.
- MORALES, P.; RAMÍREZ-MORENO, E.; SANCHEZ-MATA, M. C.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Propriedades nutricionais e antioxidantes de polpa e sementes de duas cultivares de xoconostle (*Opuntia joconostle* FAC Weber ex Diguet e *Opuntia matudae* Scheinvar) de alto consumo no México. *Food Res Int* 46:279–285, 2012.
- NASCIMENTO, M.; SÁFADI, T.; SILVA, F. F. Aplicação da análise de agrupamento de dados de expressão gênica temporal a dados em painel. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, p. 1489-1495, 2011.
- NEFZAOUI, A.; BEN SALEM, H. & EL MOURID, M. Tecnologias Apropriadas para Mitigação da Seca em Áreas Agropastoris do Norte da África. *Journal of Arid Land Studies*, 24-1, 41-46, 2014.
- NEFZAOUI, M. et al. Morphological characterization of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) accessions from Agadir, Morocco. In: IX International Congress on Cactus Pear and Cochineal: CAM Crops for a Hotter and Drier World 1247. p. 163-170, 2016.
- NEFZAOUI, M. et al. Avaliação da diversidade genética de cultivares de palma brasileira e mediterrânea por marcadores SSR e características morfológicas. In: IX Congresso Internacional de Cactus Pear and Cochineal: CAM Crops for a Hotter and Dry World 1247. pág. 171-182, 2017.
- NUNES, C. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró, v. 6, n. 1, p. 58-66, mar. 2011.
- OLIVEIRA, M. C. S. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. São Carlos: Embrapa, 2007.

- OLIVEIRA, F. T. et al. "Palma forrageiro: adaptação e importância para ecossistemas áridos e semiáridos." *Green Journal of Agroecology and Sustainable Development* 5.4, 2010.
- OLIVEIRA, A. S. C.; CAVALCANTE FILHO, F. N.; RANGEL, A. H. N.; LOPES, K. B. P. A PALMA FORRAGEIRA: alternativa para o semi-árido. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró, v. 6, n. 3, p. 49-58, set. 2011.
- PAIVA, P. M. G.; SOUZA, I. F. A. C.; COSTA, M. C. V. V. et al. *Opuntia* sp. cactus: biological characteristics, cultivation and applications. *Adv Res* 7:1–14, 2016.
- PATZAK, J. Comparação de métodos moleculares RAPD, STS, ISSR e AFLP utilizados para avaliação da diversidade genética em lúpulo (*Humulus lupulus* L.) *Euphytica* 121(1):9-18, 2001.
- PEREIRA, F. F. et al. Progenie de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) de diferentes idades. *Neotropical Entomology*, v. 38, p. 660-664, 2009.
- PIMIENTA-BARRIOS, E. Prickly pear (*Opuntia* spp.): a valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. *Journal of Arid Environments*, v. 28, n. 1, p. 1-11, 1994.
- RAO, C. R. Advanced statistical methods in biometric research. By C. Radhakrishna Rao. John Wiley & Sons, Inc., New York, N. Y. 1952. 390 pp. *American Journal of Physical Anthropology*, v. 12, n. 2, p. 268–270, jun. 1952.
- REINOLDS, S. G.; ARIAS, E. General background on *Opuntia*. Disponível em: <http://www.fao.org/DOCREP/005/2808E/y2808e04.htm>. Acessado em: 25 ago. 2022.
- RONGWEN, J.; AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; LAVI, U. & CREGAN, P. B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotypes identification. *Theor. Appl. Genet.* 90:43–48, 1995.
- SÁENZ, C. *Opuntias* as a natural resource. Agro-industrial utilization of cactus pear. FAO-CACTUSNET, Rome, pp 1–5, 2013.
- SAMAH, S. et al. Genetic diversity, genotype discrimination, and population structure of Mexican *Opuntia* sp., determined by SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 34, n. 1, p. 146-159, 2016.
- SÁNCHEZ, E. A. E. et al. Cladistics of Mexican nopal genotypes (*Opuntia* spp.) based on AFLP markers and fruit characters. *Phyton*, v. 83, p. 299, 2014.

SANTO MERGULHÃO, A. C. E. et al. Marcadores moleculares para detecção de variabilidade genética em variedades de palma forrageira. Pesquisa Agropecuária Pernambucana, v. 17, n. 1, p. 78-82, 2012.

SANTOS, D. C.; FARIAS, I.; LIRA, M. A. et al. A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck) em Pernambuco: cultivo e utilização. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 1997. 23p.

SANTOS, D. C.; SANTOS, M. V. F.; FARIAS, I.; DIAS, F. M.; LIRA, M. A. Desempenho produtivo de vacas 5/8 Holando/Zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.1, p.12-17, 2001.

SANTOS, D.C.; FARIAS, I.; LIRA, M.A. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. Recife: Instituto Agrônomico de Pernambuco, 2006. 48p. (Documentos, 30).

SEGURA, S. et al. Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. series *Streptacanthae* Britton et Rose, *Leucotrichae* DC., *Heliabravoanae* Scheinvar and *Robustae* Britton et Rose. Genetic resources and crop evolution, v. 54, n. 5, p. 1033-1041, 2007.

SHETTY, D. & NARESHCHANDRA. Analysis of the variants produced through tissue culture techniques in *Withania somnifera* (L) dunal. by DNA finger printing employing rapd method. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 3. 287-290, 2012.

SILVA, D. M. P. et al. Genetic variability of *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera, Dactylopiidae) on forage cactus in northeast Brazil. Genetics and Molecular Research v. 12, n. 4, p. 5236–5246, 2013.

SILVA, G. et al. In vitro conservation and genetic diversity of threatened species of *Melocactus* (Cactaceae). Biodiversity and Conservation, v. 30, n. 4, p. 1067–1080, 2021.

SILVA, R. T.; NOLLET, F.; SANTOS, D. C.; FÉLIX, L. P.; BURIL, M. T.; BRUNO, R. L. A. Heterocromatina e poliploidia em *Opuntia* Mill. (Cactaceae: Opuntioideae): implicações para o melhoramento de plantas. implicações para o melhoramento de plantas. 2022.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. The Comparison of Dendrograms by Objective Methods. International Association for Plant Taxonomy, 11, 33-40, 1962.

SOUZA, A. E. F. et al. Occurrence and identification of the etiologic agents of plant diseases in cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill.) in the semi-arid region of Paraíba. Biotemas, v. 23, n. 3, p. 11-20, 2010.

VAZQUEZ-MENDOZA, P.; MIRANDA-ROMERO, L. A.; ARANDA-OSORIO, G. et al. Evaluation of eleven Mexican cultivars of prickly pear cactus trees for possibly utilization as animal feed: in vitro gas production. *Agrofor Syst* 91:749–756, 2017.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. & ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407–4414, 1995.

WARD, J. H. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association* v. 58, n. 301, p. 236–244, , mar. 1963.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531–6535, 1990.

WILLIAMS, C. E.; CLAIR, D. Relações fenéticas e níveis de variabilidade detectados por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição e análise de DNA polimórfico amplificado aleatório de acessos cultivados e selvagens de *Lycopersicon esculentum*. *Genoma* 36, 1993.

WILLS, C.; NEI, M. Molecular Population Genetics and Evolution. *Evolution* v. 30, n. 1, p. 198, mar. 1976.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A. & LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176–183, 1994.