

## ESTUDO DE DIFERENTES MORFOLOGIAS DO GÊNERO *Cereus*

Mayara Destro Passere (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Claudete Aparecida Mangolim (Orientador), e-mail: mangolimca@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular / Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

**Área: 2.02.00.00-5 Genética / Subárea: 2.02.03.00-4 Genética Vegetal**

**Palavras-chave:** mandacaru, ITS, variedades

### Resumo

O gênero *Cereus*, o qual está classificado dentro da família Cactaceae, é conhecido popularmente em diversas regiões brasileiras como mandacaru. Para a espécie *Cereus hildmannianus* duas variedades são descritas, além da morfologia ereta, sendo a variedade *tortuosus* e *monstruosus*. No presente estudo, regiões ITS de 12 amostras (4 plantas eretas, 4 plantas tortuosas e 4 plantas monstruosas) foram amplificadas utilizando os *primers* ITS1 e ITS4, os produtos amplificados das regiões nrDNA foram sequenciados para auxiliar na caracterização molecular dessas plantas. A região dos espaçadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2) é parte da unidade de transcrição do nrDNA e separam os segmentos 18S, 5,8S e 28S. Após o sequenciamento, quando submetidas ao alinhamento utilizando o BLAST, as amostras apresentaram melhor alinhamento com três espécies diferentes de cactáceas: *Cereus alacriportanus* (amostras 1, 5, 8 e 12), *Praecereus saxicola* (amostras 2, 3, 4, 6, 9, 10 e 11) e *Opuntia cochenillifera* (amostra 7). Não se encontram disponíveis no NCBI depósitos de sequências de *Cereus* sp. Frente a estes resultados pode-se assumir que as sequências avaliadas correspondem à família Cactaceae e a espécie *Cereus hildmannianus*. Devido à ausência de variações genéticas entre as amostras que apresentam diferentes morfologias, podemos sugerir que essas plantas sejam apenas variedades de uma mesma espécie e não espécies diferentes.

### Introdução

A família Cactaceae engloba vegetais caracterizados pelo caule suculento e espinhoso, adaptações importantes para plantas de regiões áridas e desérticas. O gênero *Cereus*, conhecido popularmente como mandacaru, enquadra-se dentro desta família e ocorre desde o México até a Argentina, tendo como centro de diversidade o Brasil (ZAPPI et al., 2015). Para algumas espécies de *Cereus* há diferentes morfologias de caule descritas como “ereto”, “tortuoso” e “monstruoso”. A morfologia tortuosa é caracterizada por caules com costelas em espiral, enquanto a monstruosa possui caule com costelas formando sulcos irregulares e um número variável de aréolas, e a morfologia ereta é caracterizada por caules apresentando costelas regulares. Em estudos de sistemática e taxonomia das cactáceas do

gênero *Cereus* as plantas das populações morfologicamente divergentes podem apontar os variantes morfológicos como espécies do gênero *Cereus* ou como variedades da espécie *Cereus peruvianus*. Alguns autores descrevem que para estudos filogenéticos são utilizados o sequenciamento das regiões ITS do DNA ribossomal nuclear ribossomal (nrDNA). Esta técnica para estudo em cactáceas foi iniciado após o desenvolvimento dos *primers* universais por White et al. (1990). As regiões ITS 1 e 2 estão localizadas nos genes de eucariotos que codificam rRNA e são partes da unidade de transcrição do DNA nuclear ribossomal (BALDWIN et al., 1995). Dois espaçadores internos transcritos separam os segmentos 18S, 5,8S e 28S, o ITS-1 está entre 18S e 5,8S e o ITS-2 separa os segmentos 5,8S e 28S (HILLIS; DIXON, 1991). O objetivo do presente estudo foi extrair o DNA de plantas que apresentam as diferentes morfologias, amplificar o DNA dessas plantas, sequenciar as regiões nrDNA com a finalidade de caracterizar as diferentes morfologias das plantas do gênero *Cereus* como diferentes variedades ou espécies.

## Materiais e métodos

Foi extraído o DNA de doze plantas das três morfologias de *Cereus* sp (4 plantas com caule ereto, 4 plantas com caule tortuoso e 4 plantas com caule monstruoso). As amostras analisadas neste estudo são provenientes do Banco de Germoplasma de *Cereus* do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Maringá e foram coletadas em Maringá/PR (11 amostras) e Teresina/PI (1 amostra). O DNA foi extraído de fragmentos de caules frescos seguindo o protocolo descrito por Aljanabi et al. (1999) e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop. Após a extração do DNA, a região ITS foi amplificada utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e a reação de PCR para as 12 amostras foi preparada com: 3,0 µL de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 8,4 – 500 mM KCl, 1x concentrado), 3,0 µL MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 1,2 µL de dNTPs (0,1 mM), 2,25 µL de cada um dos *primers* (0,75 mM), 0,3 µL Taq DNA polimerase (1U), 3 µL DNA (10 ng µL<sup>-1</sup>) e 15 µL de água Mili-Q, para um volume final de 30 µL. Uma alíquota de 5 µL do produto da PCR foi utilizada para realizar uma eletroforese em gel de agarose 1,2%. Uma vez confirmada a presença do fragmento, as amostras foram acondicionadas e enviadas para a empresa Genotyping Laboratório de Biotecnologia LTDA, em Botucatu/SP, para realização da purificação do produto da PCR e sequenciamento. O protocolo para reação de sequenciamento consistiu na avaliação das amostras em gel de agarose 2%, uma etapa de purificação utilizando *bead* magnética e a reação de sequenciamento propriamente dita, a qual foi realizada utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied)*. O sequenciamento automático foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI3730 *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Para análise dos dados, os 24 eletroferogramas obtidos do sequenciamento foram visualizados e editados manualmente utilizando o programa BioEdit. A obtenção das sequências consenso (*contig*) foi realizada neste mesmo programa. O *software* BLAST foi utilizado para uma comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI. O alinhamento foi realizado utilizando o programa de alinhamento múltiplo CLUSTALW, implementado com o programa MEGA 10.0.5.

## Resultados e Discussão

De acordo com a avaliação do espectrofotômetro Nanodrop, a quantificação do DNA extraído variou entre 0,7 e 90,9 ng/μL, sendo utilizadas as amostras que apresentaram concentrações superiores ou iguais a 20 ng/μL. Utilizando os *primers* ITS1 e ITS4, todas as 12 amostras de *Cereus* sp foram amplificadas e apresentaram fragmentos com aproximadamente 550 pares de bases, tamanho esperado. Dessa maneira, com a confirmação da presença dos fragmentos, as amostras puderam ser sequenciadas. Após o sequenciamento e a obtenção das sequências consenso para as 12 amostras, estas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e foram selecionados os dois melhores alinhamentos para cada *contig*, apresentados na tabela 01.

**Tabela 01** – Melhores alinhamentos obtidos pelo BLAST para os 12 *contigs*.

| Contig        | Alinhamento                   | Max score | Total score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession  |
|---------------|-------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| 1-Ereto       | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 1090      | 1090        | 90%         | 0.0     | 99.17%     | AY064344.1 |
|               | <i>Praecereus saxicola</i>    | 1077      | 1077        | 98%         | 0.0     | 96.23%     | HQ727802.1 |
| 2-Ereto       | <i>Praecereus saxicola</i>    | 1134      | 1134        | 96%         | 0.0     | 96.79%     | HQ727802.1 |
|               | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 1105      | 1105        | 86%         | 0.0     | 99.51%     | AY064344.1 |
| 3-Ereto       | <i>Praecereus saxicola</i>    | 1131      | 1131        | 48%         | 0.0     | 96.65%     | HQ727802.1 |
|               | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 1105      | 1105        | 42%         | 0.0     | 99.67%     | AY064344.1 |
| 4-Ereto       | <i>Praecereus saxicola</i>    | 1090      | 1090        | 60%         | 0.0     | 95.51%     | HQ727802.1 |
|               | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 1083      | 1083        | 53%         | 0.0     | 99.01%     | AY064344.1 |
| 5-Tortuoso    | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 514       | 514         | 73%         | 2e-141  | 83.30%     | AY064344.1 |
|               | <i>Praecereus saxicola</i>    | 505       | 505         | 76%         | 1e-138  | 82.52%     | HQ727802.1 |
| 6-Tortuoso    | <i>Praecereus saxicola</i>    | 1140      | 1140        | 71%         | 0.0     | 97.33%     | HQ727802.1 |
|               | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 1112      | 1112        | 64%         | 0.0     | 99.83%     | AY064344.1 |
| 7-Tortuoso    | <i>Opuntia cochenillifera</i> | 424       | 424         | 75%         | 4e-114  | 81.16%     | AM946679.1 |
|               | <i>Silene nivalis</i>         | 145       | 145         | 62%         | 3e-30   | 73.57%     | X86861.1   |
| 8-Tortuoso    | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 845       | 845         | 46%         | 0.0     | 91.90%     | AY064344.1 |
|               | <i>Praecereus saxicola</i>    | 813       | 813         | 48%         | 0.0     | 90.20%     | HQ727802.1 |
| 9-Monstruoso  | <i>Praecereus saxicola</i>    | 1147      | 1147        | 79%         | 0.0     | 97.08%     | HQ727802.1 |
|               | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 1109      | 1109        | 70%         | 0.0     | 99.67%     | AY064344.1 |
| 10-Monstruoso | <i>Praecereus saxicola</i>    | 1140      | 1140        | 96%         | 0.0     | 97.08%     | HQ727802.1 |
|               | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 1107      | 1107        | 85%         | 0.0     | 99.83%     | AY064344.1 |
| 11-Monstruoso | <i>Praecereus saxicola</i>    | 1101      | 1101        | 62%         | 0.0     | 95.93%     | HQ727802.1 |
|               | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 1075      | 1075        | 55%         | 0.0     | 98.68%     | AY064344.1 |
| 12-Monstruoso | <i>Cereus alacriportanus</i>  | 566       | 566         | 50%         | 9e-157  | 84.45%     | AY064344.1 |
|               | <i>Echinopsis chiloensis</i>  | 529       | 529         | 50%         | 1e-145  | 83.44%     | AY064346.1 |

As amostras 1, 5, 8 e 12 quando comparadas com as sequências do NCBI apresentaram melhor alinhamento com uma sequência de 606 pb, a qual corresponde a região completa ITS-1, 5.8S, ITS-2 de *Cereus alacriportanus* (Tabela 01). Por outro lado, com as amostras 2, 3, 4, 6, 9, 10 e 11, o melhor alinhamento ocorreu com uma sequência de *Praecereus saxicola*, com 687 pb (Tabela 01). A amostra 7, diferente das demais, apresentou um melhor alinhamento com uma sequência de *Opuntia cochenillifera*, a qual possui 646 pb (Tabela 01).

Tomando como base fatores como a espécie *Cereus alacriportanus* ser considerada uma sinonímia para *Cereus hildmannianus* e espécies de *Praecereus* que já foram classificadas dentro do gênero *Cereus*, pode-se assumir que todas as 12 amostras

correspondem à espécie do gênero *Cereus*, visto que a porcentagem de identidade apresentada na tabela 01 é próxima de 100% com estas espécies. Entre as diferentes morfologias de *Cereus* sp não foram observados padrões que possibilitasse a diferenciação entre as 12 amostras. Estes resultados podem sugerir que as diferentes morfologias estão relacionadas com alterações epigenéticas, na qual as diferentes morfologias dos caules devem ser modeladas por fatores independentes da sequência de DNA, mas ocorrem em função de metilação ou de silenciamento gênico. Podemos sugerir que as plantas que apresentam as três diferentes morfologias são variedades de uma espécie do gênero *Cereus*, não se tratando de espécies diferentes, confirmando resultados obtidos de análises realizadas com outros marcadores.

## Conclusões

Os *primers* ITS1 e ITS4 apresentaram-se eficazes para a amplificação e para o sequenciamento das regiões ITS-1 e ITS-2 em plantas de *Cereus* sp. Além disso, o fato de não observar variações genéticas entre as três morfologias indica que essas plantas são apenas variedades morfológicas de uma mesma espécie.

## Agradecimentos

Agradeço a UEM pela oportunidade, ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal por proporcionar a realização do projeto e ao CNPq/Fundação Araucária pela bolsa concedida.

## Referências

ALJANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, n. 3, p. 1-8, 1999.

BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S.; DONOGHUE, M. J. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 82, n. 2, p. 247-277, 1995.

HILLIS, D.; DIXON, M. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. **The Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.

WHITE, T. J.; BRUNS, S.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (ed.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, Academic Press, p. 315–322, 1990.

ZAPPI et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, 2015.