

# CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR EM *Melocactus conoideus* POR MEIO DE MARCADORES INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq<sup>1</sup>  
Semaías Ribas Santos Rocha<sup>2</sup>, Camila Gomes Lemos<sup>3</sup>, Beatriz Fernandes Pereira<sup>4</sup>, Geovana de  
Carvalho Dutra<sup>5</sup>, Elisa Susilene Lisboa dos Santos<sup>6</sup>

## RESUMO

O objetivo deste trabalho é realizar caracterizações genético-moleculares em *Melocactus conoideus*, uma espécie de cacto criticamente ameaçada de extinção. Para tanto, onze famílias de *M. conoideus* equivalendo a 127 genótipos, tiveram seus DNAs obtidos e quantificados, com posterior teste de amplificação por meio de marcadores ISSR. Os resultados indicaram variações na qualidade e quantidade do DNA e na amplificação de acordo com o primer utilizado. Apenas alguns primers produziram bandas claramente visíveis, enquanto outros apresentaram dificuldades na amplificação. Análises adicionais estão sendo conduzidas em laboratórios a fim de viabilizar a amplificação do DNA e caracterização da população. Este estudo contribuirá para o conhecimento da diversidade genética em *M. conoideus*, fornecendo uma base para futuras pesquisas sobre a evolução e conservação desta espécie.

**Palavras-chave:** conservação, diversidade genética, genotipagem, marcadores moleculares, *Melocactus* spp.

## GENETIC-MOLECULAR CHARACTERIZATION IN *Melocactus conoideus* FROM OF INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR) MARKERS

### ABSTRACT

The objective of this work is to perform genetic-molecular characterizations in *Melocactus conoideus*, a cactus species critically endangered of extinction. For that, eleven families of *M. conoideus* equivalent to 127 genotypes, had their DNAs obtained and quantified, with subsequent amplification test by means of ISSR markers. The results indicated variations in the quality and quantity of DNA and in the amplification according to the primer used. Only some primers produced clearly visible bands, while others presented difficulties in the amplification. Additional analyses are being conducted in laboratories in order to enable the DNA amplification and characterization of the population. This study will contribute to the knowledge of the genetic diversity in *M. conoideus*, providing a basis for future research on the evolution and conservation of this species.

**Keywords:** conservation, genetic diversity, genotyping, *Melocactus* spp., molecular markers

---

<sup>1</sup> Instituição Financiadora

<sup>2</sup> Graduando em Ciências Biológicas Bacharelado – UESB, Itapetinga-Ba. E-mail: semaribas0701@gmail.com

<sup>3</sup> Graduando em Ciências Biológicas Bacharelado – UESB, Itapetinga-Ba. E-mail: camilalemos97gomes@gmail.com

<sup>4</sup> Graduando em Ciências Biológicas Bacharelado – UESB, Itapetinga-Ba. E-mail: beatrizfernandes37@gmail.com

<sup>5</sup> Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – UESB. Email: geodutra17@gmail.com

<sup>6</sup> Docente do Departamento de Ciências Exatas e Naturais – UESB, Itapetinga-Ba. Email: elisa.lisboa@uesb.edu.br

## INTRODUÇÃO

Pertencente à família Cactaceae, o gênero *Melocactus* compreende 38 espécies distribuídas principalmente na América Central e do Sul (Zappi et al., 2016). A biologia reprodutiva desse gênero é pouco estudada, mas as flores são adaptadas à ornitofilia, recebendo visitas de beija-flores e outros polinizadores (Locatelli & Machado 1999; Nassar & Ramírez 2004). Os frutos são pequenos e suculentos, com sementes pretas na polpa, que são dispersas localmente por formigas e lagartos (Fonseca, 2004).

*Melocactus conoideus* Buining & Brederoo é uma espécie criticamente ameaçada de extinção, com distribuição restrita a manchas de cascalho quartzoso em Vitória da Conquista, Bahia (Taylor & Zappi 2004; Cerqueira-Silva & Santos 2008). A espécie foi descrita em 1973 e foi listada como criticamente ameaçada no Apêndice I da União Internacional para a Conservação da Natureza desde 1992 (Taylor & Zappi 2004). É importante considerar que, a espécie possui um sistema reprodutivo misto, com ocorrência de polinização cruzada e autopolinização (Cerqueira-Silva & Santos 2007).

O grupo de pesquisa BioGen utiliza marcadores ISSR para analisar a diversidade genética de famílias de *M. conoideus* visando à conservação e ao melhoramento genético. O objetivo deste estudo é caracterizar a diversidade genética de famílias de *M. conoideus* a fim de elucidar sua base genética que será somada a outros estudos do grupo BioGen, a exemplo da caracterização de taxa de cruzamento da planta e estudos da biologia floral e reprodutiva.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados o material genético de 11 famílias e 127 indivíduos de *M. conoideus* previamente obtidos analisados quanto a sua qualidade e quantidade. Para tanto, seguiu-se com duas análises: a primeira fazendo uso de gel de agarose e a segunda, utilizando o espectrômetro de massas Biodrop. A fim de verificar a integridade do DNA foram realizadas análises via eletroforese em gel, sendo obtidos géis a 1% de concentração de agarose, posteriormente imersos em tampão Tris-Borato-EDTA para corrida a 120V por 2 horas. As amostras foram coradas com corante GelRed e após a corrida, foram visualizadas sob luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK.

Análises em espectrofotômetro de massas foram realizar para mensurar a concentração do DNA e realizar a caracterização de pureza via análise da razão de absorbância 260/230 nm e 260/280 nm. Estes dados permitem acessar a presença de proteínas, RNA e carboidratos.

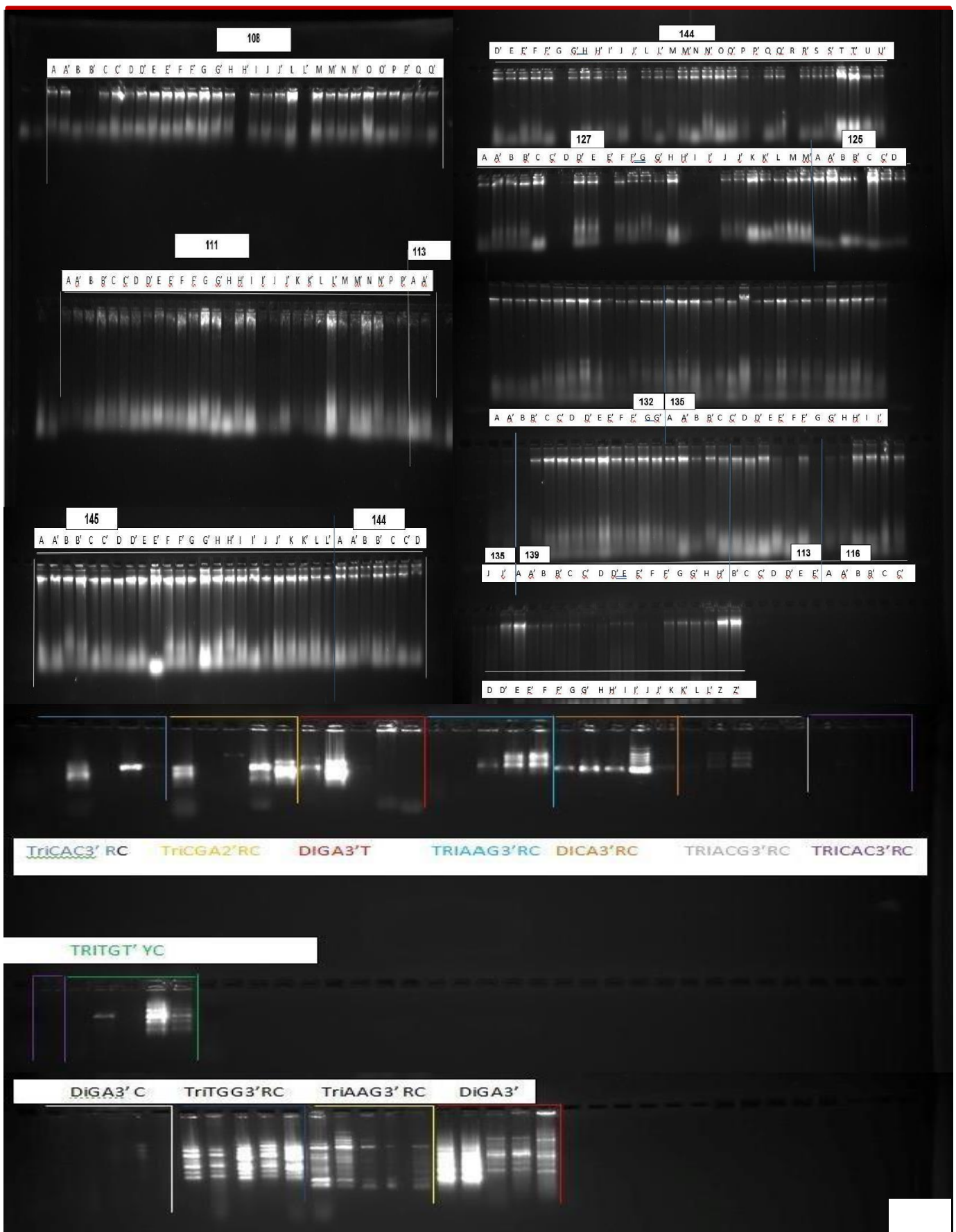
Reação de PCR foi realizada inicialmente com 5 amostras com intuito de testar a amplificação dos 11 primers. Para as amplificações foram preparados mix de reagentes contendo tampão de amplificação 10X (20 mM Tris-HCl [pH 8,4] e 50 mM de KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 1 pM de primer e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). A amplificação do DNA ocorreu em um termociclador, com o seguinte programa: 5 minutos de desnaturação inicial, 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 50 segundos, anelamento a 37°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Por fim uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos para garantir que todas as fitas seriam completadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Amostras de DNA extraídas foram inicialmente analisadas por gel de agarose, revelando arraste em algumas amostras, indicando degradação parcial do DNA (**FIGURA 1 A**). Essas amostras, coletadas em 2019 e armazenadas no freezer do laboratório, podem ter sofrido degradação devido ao armazenamento prolongado e oscilações de energia.

As relações A260/A230 e A260/A280 foram empregadas para avaliar a pureza do DNA. Variações notáveis nos valores de A260/A230 nas 127 amostras de 11 famílias de *M. conoideus* sugeriram diferentes níveis de contaminação orgânica. A família 113 apresentou uma média mais alta (5,5), indicando contaminação por carboidratos ou fenóis, enquanto a família 144 teve uma média mais baixa (0,4), sugerindo menos contaminação orgânica ou possível degradação do DNA. Os valores de A260/A280 na maioria das famílias estiveram na faixa adequada (entre 1,9 e 2,0), indicando menor contaminação proteica. No entanto, a família 113 apresentou uma média acima do normal (2,4), sugerindo maior contaminação. Todas as amostras mostraram concentrações adequadas de DNA, com a família 135 tendo a maior média (483,9 µg/ml) e a família 144 a menor (79,9 µg/ml) (**FIGURA 2**).

Na amplificação em PCR, diluímos 11 primers e conduzimos seis testes com diferentes quantidades de DNA e primers, analisando os produtos em gel de agarose. Apenas 3 dos 11 primers (27%) produziram bandas visíveis. Quatro primers (36%) tiveram eficácia insuficiente, com bandas de baixa intensidade, e outros 4 (36%) não produziram bandas visíveis. O primer TriAAG3'RC mostrou maior eficácia em comparação com os outros (**FIGURA 1 B**). A maior parte das amostras não obteve amplificação, o que pode ser atribuído à possível degradação dos primers devido às oscilações de energia, entretanto, novos testes laboratoriais estão em curso.



**FIGURA 1:** Testes realizados em PCR, com as 11 famílias do *M. conoideus* (A) e os 11 primers em estoque (B).

FAMÍLIAS	A260 / A230	A260 / A280	Concentração (µg/ml)
108	1,3	2,0	195,6
111	0,9	1,9	108,8
113	5,5	2,4	176,1
116	2,2	2,1	184,1
125	0,9	2,0	240,7
127	0,8	1,9	87,6
132	1,6	2,0	223,6
135	1,4	2,0	483,9
139	1,8	2,1	104,9
144	0,4	2,2	79,9
145	1,3	2,0	241,9

**FIGURA 2:** Média dos valores das relações A260/A230, A260/A280 que mede a pureza dos DNAs em relação a outros compostos e concentração em µg/ml das 127 amostras de DNA pertencentes as 11 famílias estudadas do *M. conoideus*

## CONCLUSÃO

Neste trabalho, realizamos uma análise genético-molecular de *Melocactus conoideus*, uma espécie ameaçada de extinção no sudoeste da Bahia, utilizando marcadores ISSR. O objetivo foi avaliar a diversidade genética e a biologia reprodutiva dessa espécie, visando sua conservação e sobrevivência no futuro. Para isso, empregamos técnicas de quantificação do DNA, diluição dos primers, amplificação do DNA por PCR e análise por eletroforese em gel. Além disso, realizamos testes de RNase para assegurar a pureza das amostras de DNA.

Os resultados obtidos mostraram que a quantificação do DNA foi bem-sucedida, mas que a relação A260/A230 nem sempre foi ideal, indicando a presença de compostos orgânicos que podem interferir nas análises genéticas. Os testes de PCR com onze primers diferentes revelaram uma eficácia variável na produção de bandas de DNA visíveis. Alguns primers mostraram resultados promissores, enquanto outros apresentaram dificuldades na amplificação.

Os dados obtidos contribuíram para o entendimento da evolução e conservação desta espécie e forneceram uma base sólida para futuras investigações. No entanto, os desafios enfrentados durante a fase prática destacam a necessidade contínua de melhorias nos processos laboratoriais e na escolha de primers para garantir resultados mais robustos em estudos futuros. Além disso, a preservação da flora é uma responsabilidade compartilhada entre governos e sociedade, e é fundamental que haja esforços conjuntos para garantir a conservação da espécie.

## REFERÊNCIAS

1. Cerqueira-Silva, C.B.M. & Santos, D.L. 2007. **Fenologia reprodutiva de *Melocactus conoideus* Buin. & Bred.: espécie endêmica do Município de Vitória da Conquista, Bahia – Brasil.** Revista Brasileira de Biociências 5: 1095-1097.
2. CERQUEIRA-SILVA, C.; SANTOS, D. **“Estado da arte” do *Melocactus conoideus*: uma espécie endêmica ameaçada de extinção.** Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas, 5, n. 3, p. 12-17, 2008.
3. FONSECA, R.B.S. 2004. **Fenologia reprodutiva e dispersão de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo e *M. paucispinus* G. Heiman & R. Paul (Cactaceae) no município de Morro do Chapéu, Chapada Diamantina - Bahia - Brasil.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
4. LOCATELLI, E. & MACHADO, I.C.S. 1999. **Comparative study of the floral biology in two ornithophilous species of Cactaceae: *Melocactus zehntneri* and *Opuntia palmadora*.** Bradleya 17:75-85.
5. NASSAR, J.M. & RAMÍREZ, N. 2004. **Reproductive biology of the melon cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae).** Plant Systematics and Evolution 248:31-44.
6. Taylor, N. & Zappi, D. 2004. **Cacti of eastern Brazil.** The Royal Botanic Gardens. Londres.
7. ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; SANTOS, M. R.; LAROCCA, J. **Cactaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016.
8. VIEIRA, Anderson, Carvalho. **Análises genético-moleculares em *Melocactus conoideus* Buin. & Bred: espécie criticamente ameaçada de extinção.** Itapetinga. 2021. Disponível em: <http://www2.uesb.br/ppg/ppgca/wp-content/uploads/2022/07/DISSERTA%C3%87%C3%83O-ANDERSON-CARVALHO.pdf>.