

## ESTUDOS GENÉTICOS EM *Melocactus conoideus*, POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES<sup>1</sup>

Camila Gomes Lemos<sup>1,2</sup>, Geovana Carvalho Dutra<sup>3</sup>, Semaías Ribas Santos Rocha<sup>2</sup>, Beatriz Fernandes Pereira<sup>2</sup>, Elisa Susilene Lisboa dos Santos<sup>4</sup>

### RESUMO

Este estudo se concentra na espécie *Melocactus conoideus*, conhecida como coroa-de-frade. Esta espécie pertence à família Cactaceae e encontra-se classificada como criticamente ameaçada de extinção. Esta espécie é relatada como de distribuição restrita à região Sudoeste da Bahia. O objetivo deste estudo foi caracterizar as famílias de *M. conoideus* por meio de marcadores moleculares Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), a fim de viabilizar análises de fluxo gênico. A metodologia incluiu a quantificação do DNA via eletroforese em gel de agarose e espectrofotometria, seguida e amplificação via PCR utilizando marcadores ISSR e separação das bandas em gel de agarose. A análise do DNA previamente obtido, indicou a concentração de DNA, revelou variações significativas entre as famílias. Além disso, foram avaliadas as razões A260/A230 e A260/A280 para verificar a pureza do DNA. Os resultados indicam a variação na qualidade e quantidade do DNA entre as famílias e os indivíduos os valores encontrados vão de 3.218,7 ng/μl até a inexistência de DNA detectado. O valor médio de concentração do DNA foi de 225,22 μg/ml. De acordo com as análises, 57,14% das amostras estavam dentro dos limites esperados para A260/A230, enquanto 42,86% estavam fora, indicando impurezas. No caso do A260/A280 49,32% das amostras estavam dentro da faixa apropriada, indicando que contaminação de ácidos nucleicos estavam abaixo da média. Análises de amplificação com marcadores ISSR apresentaram bandas para dois marcadores analisados. Estudos de amplificação adicionais com ISSR estão sendo conduzidos a fim de otimizar a amplificação e viabilizar a observação das bandas e análises moleculares.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diversidade Genética, ISSR, Fluxo gênico, ameaça de extinção.

GENETIC STUDIES IN *Melocactus conoideus* USING MOLECULAR MARKERS.

### ABSTRACT

---

<sup>1</sup> Bolsita do Programa de Iniciação Científica Cotas Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB);

<sup>2</sup> Discente do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - (UESB);

<sup>3</sup> Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (UESB);

<sup>4</sup> Professora do Departamento de Ciências Exatas e Naturais da UESB.

This study focuses on the species *Melocactus conoideus*, known as crown-of-frade. This species belongs to the Cactaceae family and is classified as critically endangered. This species is reported to have a restricted distribution in the Southwest region of Bahia. The objective of this study was to characterize *M. conoideus* families using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular markers, in order to enable gene flow analyses. The methodology included DNA quantification via agarose gel electrophoresis and spectrophotometry, followed by amplification via PCR using ISSR markers and separation of bands on agarose gel. Analysis of previously obtained DNA, indicating DNA concentration, revealed significant variations between families. Furthermore, the A260/A230 and A260/A280 ratios were evaluated to verify DNA purity. The results indicate the variation in the quality and quantity of DNA between families and individuals, values ranging from 3,218.7 ng/μl to no DNA detected. The average DNA concentration value was 225.22 μg/ml. According to the analyses, 57.14% of the samples were within the expected limits for A260/A230, while 42.86% were outside, indicating impurities. In the case of A260/A280, 49.32% of the samples were within the appropriate range, indicating that nucleic acid contamination was below average. Amplification analyzes with ISSR markers showed bands for two markers analyzed. Additional amplification studies with ISSR are being conducted in order to optimize amplification and enable band observation and molecular analysis.

KEYWORDS: Genetic Diversity, ISSR, Gene flow, threat of extinction.

## INTRODUÇÃO

*Melocactus conoideus* Buining & Brederoo (Cactaceae) é uma espécie de Cactaceae com distribuição restrita ao sudoeste da Bahia, Brasil (Taylor & Zappi 2004; Cerqueira-Silva & Santos 2008). Esta espécie foi listada como criticamente ameaçada no Apêndice I da União Internacional para a Conservação da Natureza em 1992 (Taylor & Zappi 2004). Espécimes de *M. conoideus* sofrem com o comércio ilegal e perda de habitat devido ao crescimento urbano em Vitória da Conquista, BA. Isso, somado à sua área limitada, demanda estudos para sua conservação.

Estudos genéticos com marcadores moleculares são essenciais para conservar a flora e entender a diversidade genética de plantas. Além de possibilitar a caracterização de germoplasma, os marcadores moleculares podem ser utilizados como ferramenta para estudos de diversidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações ou espécies relacionadas (Souza et al., 2008). Os marcadores Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) são úteis na análise genética de plantas, especialmente quando o genoma é pouco conhecido, consistindo em sequências

repetitivas em torno de regiões únicas e variáveis. Os primeiros estudos utilizando marcadores ISSR para *M. conoideus* foram disponibilizados pelo grupo de pesquisa BioGen (CNPq/UESB) e indicou o potencial destes marcadores em estudos genéticos como diversidade e fluxo gênico (Vieira et al., 2019). A caracterização da diversidade e estrutura genética de *M. conoideus* por marcadores moleculares ISSR evidencia a necessidade de medidas de manejo genético no modelo de conservação in situ empregado para a espécie (Vieira, 2021).

Com intuito de contribuir com informações genético-moleculares que auxiliem na conservação de *M. conoideus*, este estudo tem como objetivo caracterizar a diversidade genética de famílias de *M. conoideus* usando marcadores moleculares ISSR.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Material Biológico.** DNA de 11 famílias e 127 indivíduos da espécie *Melocactus conoideus*, foram previamente extraídos e estão armazenados no Laboratório de Genética Molecular Aplicada da UESB.

**Quali-quantificação do DNA genômico.** Para avaliar a qualidade e quantidade de DNA nas amostras, foram realizadas análises utilizando gel de agarose 1% e espectrofotometria. Na preparação foi usado gel de agarose a 1% contendo gelRed como corante intercalante, o gel foi submerso em solução tampão Tris-Borato-EDTA e então foi submetido a uma voltagem de 120V por 2 horas. Após a corrida de eletroforese, o gel foi visualizado em um fotodocumentador (KODAK) com incidência de luz Ultravioleta para a detecção dos fragmentos de DNA.

Pelo Biodrop, um espectrofotômetro de bancada, para medir a absorbância de amostras de ácido nucleico em diferentes comprimentos de onda. Por esse equipamento foi possível verificar a concentração de DNA em µg/ml e a pureza por meio das razões de absorbância 260/230 nm e 260/280 nm.

**Amplificação do DNA via marcadores ISSR.** Foram realizados 6 testes de amplificação do DNA utilizando 13 marcadores ISSR. Para tanto, as reações foram conduzidas utilizando 127 DNAs e onde para cada reação foram utilizados: 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).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador com seguinte protocolo de amplificação: uma etapa inicial de a 95°C por 5 minutos, seguida por 34 ciclos de amplificação com três envolvendo a desnaturação a 95°C por 50 segundos, seguida pelo a 65°C graus por 50 segundos, e uma fase de extensão a 72°C por 1 minuto. Por fim foi realizada uma extensão final a 72°C por 5 minutos para garantir que todos os fragmentos restantes de DNA fossem completamente sintetizados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do gel a 1% demonstram que a maior parte das amostras possuem quantidade para seguir nos estudos de amplificação. As análises de concentração revelaram uma ampla variação, com valores indo de 3.218,7 ng/μl (família 135 - B') a 848,0 ng/μl (família 108 - L) para as concentrações mais elevadas, até ausência de amostra detectada. A média total das concentrações foi de 225,22 μg/ml. Concentrações elevadas de DNA podem afetar a resolução e migração das bandas de DNA em experimentos de eletroforese em gel, enquanto concentrações baixas podem ser problemáticas em experimentos sensíveis. A avaliação da pureza do DNA é essencial para a condução de trabalhos posteriores. A relação A260/A230 deve estar entre 1,5 e 1,8, e a relação A260/A280 deve variar de 1,8 a 2,0. Os resultados da análise mostraram que cerca de 57,14% das amostras estavam dentro dos limites esperados em relação à razão A260/A230. No entanto 42,86% não atenderam ao critério A260/A230, e estavam fora desses limites: e 50,68% não atingiram o padrão A 260/A280, entre elas algumas amostras não continham ácido nucleico.

Para testar o potencial de amplificação a partir das amostras, foram conduzidos experimentos de PCR com diferentes quantidades de DNA e primer, usando uma solução estoque de 100 μM preparada a partir de primers diluídos em água mili-Q autoclavada. A solução de trabalho incluíram volumes finais padronizados em 15 μL. Após a amplificação, os resultados da PCR foram analisados em gel de agarose sob luz ultravioleta e demonstram que as bandas de DNA na PCR variam em intensidade de acordo com a quantidade e qualidade do DNA, sendo necessários ajustes das análises para visualização de bandas mais nítidas.

## CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES

A pesquisa realizada sobre o *Melocactus conoideus* é de suma importância para a conservação da espécie. Estudos prévios já indicaram que os marcadores ISSR são eficientes e acessíveis para pesquisas em grande escala, possibilitando uma análise abrangente das populações de *M. conoideus*. Neste caso, etapas prévias de quantificação do DNA são importantes nas etapas consecutivas de amplificação. O dispositivo Biodrop detectou variações significativas na concentração do DNA nas amostras, afetando diretamente diferentes aplicações laboratoriais. A proporção A260/A230 e A260/A280 revelou impurezas em algumas amostras, que podem prejudicar análises subsequentes. Portanto, a integridade do DNA é crucial para resultados confiáveis. Esses resultados são valiosos para pesquisas futuras sobre o *M. conoideus*, uma espécie carente de estudos. A falta de informações básicas de sua biologia contribui para seu status crítico de ameaça.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

CNCFlora. *Melocactus conoideus* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Melocactus conoideus](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Melocactus_conoideus)>. Acesso em 19 setembro 2023

Souza, A. M., Souza, F. H. D., & Carneiro, P. C. S. (2008). Marcadores moleculares no estudo da diversidade genética de plantas medicinais e aromáticas. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 10(4), 80-91.

Taylor, N. P.; Zappi, D. C. *Cacti of Eastern Brazil*. Kew: Royal Botanic Gardens, 2004. 499 p.

Vieira, A. C., Cardoso, T. S., Silva, T. S. S., Cerqueira-Silva, C. B. M., Santos, E. S. L. Seleção de primers Inter Simple Sequence Repeat em *Melocactus conoideus* BUIN. & BRED. (Cactaceae), espécie endêmica do sudoeste da Bahia, Brasil. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.16 n.29; p.1366, 2019.

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>. Acesso em 15 de Setembro de 2023.