

CARACTERIZAÇÃO DE FAMÍLIAS DE *Melocactus conoideus* BUIN. & BRED.
COM VISTA À CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE CRUZAMENTO¹

Laís Hanna Ferraz Amorim², Monique Brito de Moraes³, Anderson Carvalho Vieira⁴, Bernardo Pereira Cirqueira², Elisa Susilene Lisboa dos Santos⁵

RESUMO

Melocactus conoideus é uma cactácea endêmica do sudoeste baiano, ocorrendo nas imediações de Vitória da Conquista. Devido principalmente a fatores antrópicos, a espécie se encontra criticamente ameaçada de extinção. No âmbito da genética da conservação, marcadores moleculares são bastante utilizados em estudos de diversidade, estrutura e caracterização genética, com destaque para os marcadores *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR). Desse modo, objetivou-se caracterizar famílias de *M. conoideus* por meio do uso de marcadores ISSR com vistas na determinação molecular do sistema preferencial de cruzamento (autogamia, alogamia ou sistema misto). DNAs previamente obtidos de 11 famílias foram empregados no estudo. Seis DNAs foram utilizados para testar 16 *primers* ISSR quanto ao perfil de amplificação. Os *primers* com os melhores desempenhos estão sendo testados nas famílias completas. Como resultado preliminar, 3 *primers* foram classificados como ótimos, 7 como bons, 4 regulares e 2 ausentes. Até o momento, foram testados quatro *primers* em todas as famílias, sendo que a genotipagem encontra-se em andamento. Os resultados obtidos a partir deste estudo subsidiarão a determinação da preferência de *M. conoideus* quanto à sua reprodução, isto é, alogamia, autogamia ou sistema misto. Esses dados contribuirão para a melhor compreensão da dinâmica de sobrevivência e na sua conservação.

PALAVRAS-CHAVE: Cabeça-de-frade, Cactáceas, Genética da conservação, ISSR, Marcadores moleculares, Sistema de cruzamento.

CHARACTERIZATION OF *Melocactus conoideus* BUIN. & BRED. FAMILIES AIMING
AT THE CHARACTERIZATION OF THE MATING SYSTEM

ABSTRACT

Melocactus conoideus is a cactus species endemic to the southwestern region of Bahia, occurring in the surroundings of Vitória da Conquista. Mainly due to anthropic factors, the species is critically endangered. Within the scope of conservation genetics, molecular markers are widely used in studies of genetic diversity, structure, and characterization, with emphasis on *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) markers. Thus, this study aimed to characterize families of *M. conoideus* through the use of ISSR markers in order to determine, at the molecular level, the species' preferential mating system (selfing, outcrossing, or mixed). DNA previously extracted from 11 families was used in the study. Six DNA samples were employed to test 16 ISSR primers regarding their amplification profile. The primers with the best performance are currently being tested on the complete set of families. As a preliminary result, 3 primers were classified as excellent, 7 as good, 4 as fair, and 2 as non-amplifying. So far, four primers have been tested across all

¹ Programa de Iniciação Científica da UESB;

² Graduandos em Ciências Biológicas, UESB (E-mail: laishanna2@outlook.com);

³ Mestranda em Ciências Ambientais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, UESB;

⁴ Pós-Doutorando na Universidade Federal da Bahia, UFBA;

⁵ Professora Doutora em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Ciências Exatas e Naturais (DCEN), UESB.

families, and genotyping is still in progress. The results obtained from this study will support the determination of *M. conoideus*' reproductive preference—whether outcrossing, selfing, or mixed. These findings will contribute to a better understanding of the species' survival dynamics and to its conservation.

KEYWORDS: Cactaceae, Conservation genetics, ISSR, Molecular markers, Mating system, Turk's cap cactus.

INTRODUÇÃO

Melocactus conoideus é uma espécie de cactácea endêmica do sudoeste da Bahia, restrita às imediações do município de Vitória da Conquista (Silva & Santos, 2007). Assim como as demais espécies do gênero *Melocactus*, *M. conoideus* pode ser caracterizada pelo cladódio globoso e desenvolvimento de cefálio apical em sua fase reprodutiva (Correia *et al.*, 2018).

Devido a ações antrópicas, a espécie se encontra criticamente ameaçada de extinção pela lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). Os principais fatores envolvem a perda de habitat devido à urbanização desordenada e à extração do cascalho de quartzo - substrato de seu desenvolvimento, e o comércio ilegal voltado para ornamentação (Machado *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2024).

Nesse contexto, marcadores moleculares se mostram eficientes em estudos de genética voltada à conservação (Ramalho *et al.*, 2016). Segundo Brammer (2000), esses podem ser compreendidos como regiões genômicas que são herdáveis e altamente polimórficas. Se destacam na genética vegetal por serem independentes da interferência do ambiente, ao contrário dos marcadores morfológicos (Lanza; Guimarães; Schuster, 2000; Salla *et al.*, 2002).

Os marcadores denominados *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) amplificam segmentos de DNA localizados entre uma região repetitiva (microssatélite) e outra. São baseados na técnica Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), se mostrando bastante eficazes em estudos de diversidade e estrutura genética e na caracterização de variações dentro de uma mesma espécie (Reddy; Sarla; Siddiq, 2002; Ramalho *et al.*, 2016).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a seleção e testes de marcadores ISSR para a caracterização de famílias de *Melocactus conoideus* Buin. & Bred. com vistas na determinação do sistema de cruzamento da espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em amostras de DNA de *M. conoideus* extraídas a partir do pericarpo de espécimes jovens, seguindo o protocolo CTAB

descrito por Doyle & Doyle (1990), e armazenadas no banco de DNA genômico do Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA/UESB). As amostras são compostas por 11 famílias, cada uma composta por 8 a 35 indivíduos, totalizando 242 indivíduos.

Para verificar a integridade do DNA contido nas amostras, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% imerso em TBE 0,5x a 110v por 60min, registrado posteriormente em fotodocumentador sob exposição de luz ultravioleta usando o intercalante GelRed. A análise da concentração de DNA foi feita pela comparação das amostras com o DNA do fago lambda.

A partir dos resultados, os 6 indivíduos com as maiores concentrações foram submetidos ao teste de 16 *primers* ISSR. As amplificações por PCR feitas em termociclador tiveram volume final de 15µL: 10ng de DNA genômico, 50mM de tampão de amplificação, 1,2mM de MgCl₂, 2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 0,2U de Taq DNA polimerase, e 1,0µM de *primer*. A configuração dos ciclos de PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5min, 34 ciclos (94°C por 50s, 48°C por 50s e 72°C por 1min), e extensão final a 72°C por 5min.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% imerso em TBE 0,5x a 110v por 120min, registrado posteriormente em fotodocumentador sob exposição de luz ultravioleta usando o intercalante GelRed. Após análise da corrida, os *primers* testados foram classificados em “regular”, “bom” e “ótimo”. Quatro *primers* com os melhores resultados foram utilizados para amplificar o DNA das famílias, seguindo a mesma metodologia de amplificação descrita para a seleção dos *primers*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste preliminar para verificação da integridade do DNA, 115 amostras apresentaram qualidade e quantidade de DNA satisfatórias para seguir com os experimentos. Desse modo, estas foram as amostras selecionadas para os experimentos envolvendo amplificação com *primers* ISSR.

A figura 1 mostra o resultado do teste de amplificação usando os *primers* ISSR. Foram classificados, após análise, 3 *primers* ótimos (*primers* 2, 3 e 10), 7 bons (*primers* 5, 7, 9, 11, 12, 13 e 14) e 4 regulares (*primers* 1, 6, 8 e 16), classificados de acordo ao número e nitidez das bandas geradas (Figura 1).

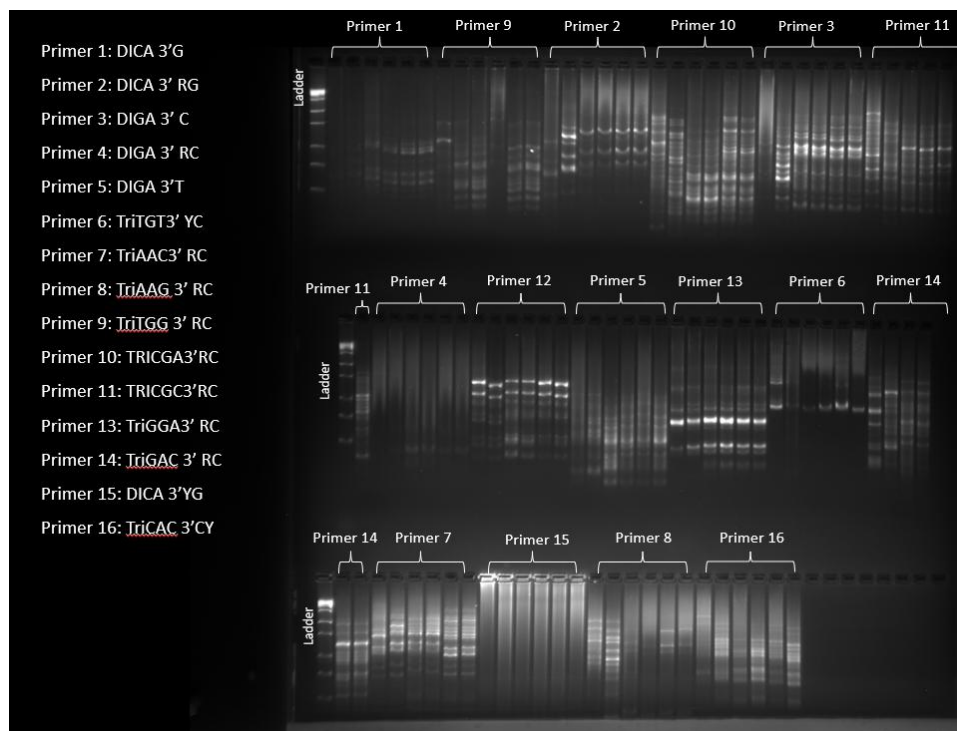


FIGURA 1. Resultado do primeiro teste com os *primers*. Os *primers* de 1 a 13 equivalem aos escolhidos por Vieira *et al.* (2019), e os *primers* de 14 a 16 são os escolhidos aleatoriamente.

Os experimentos seguintes demonstraram bom desempenho dos *primers* em questão de marcas geradas, assim como no primeiro teste (Figura 2). Até a presente etapa deste estudo, foram testados 4 *primers* em todas as famílias (*primers* 2, 3, 10 e 9), seguindo a prioridade dos que tiveram melhor desempenho no primeiro experimento. Os dados obtidos do conjunto de primers selecionados serão empregados em programas estatísticos para análise da diversidade e caracterização do sistema reprodutivo de *M. conoideus*.

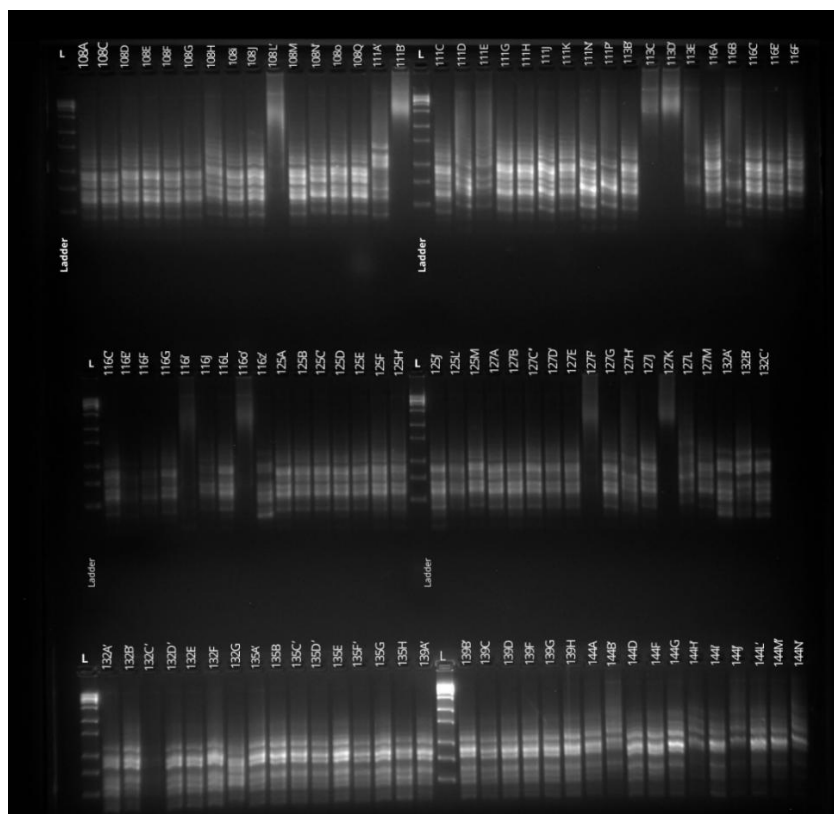


FIGURA 2. Resultado do *primer 3* em teste com as famílias.

CONCLUSÃO

A seleção de *primers* com os melhores desempenhos é fundamental para a caracterização genética das famílias, permitindo análises mais precisas. Apesar de ainda não ter sido possível testar todos os *primers* em todas as famílias, os resultados preliminares indicam a eficiência dos *primers* selecionados para as análises posteriores. Espera-se que, a partir da aplicação dos *primers* mais informativos, seja possível a caracterização das famílias de *M. conoideus* através da análise de fluxo gênico, contribuindo para estratégias de conservação da espécie.

REFERÊNCIAS

- [1] BRAMMER, S. P. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa Trigo. Documentos, v. 3, 12 p., 2000. ISSN 1518-6512.
- [2] CORREIA, D. *et al.* *Melocactus*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, v. 179, 21 p., 2018. ISSN 2179-8184.
- [3] DOYLE, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.
- [4] LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Informe Agropecuário*, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.
- [5] MACHADO, M. *et al.* *Melocactus conoideus*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2013. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/40914/2943248>. Acesso em: 09 set. 2025.
- [6] RAMALHO, A. B. *et al.* Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. *FLORESTA*, v. 46, n. 2, p. 207-214, 2016.

- [7] REDDY M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, v. 128, p. 9-17, 2002.
- [8] SALLA, M. F. S. *et al.* Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2002.
- [9] SILVA, C. B. M. C.; SANTOS, D. L. Fenologia reprodutiva de uma população endêmica de 'cabeça de frade' (*Melocactus conoideus*), na Serra do Periperi em Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*, v. 4, n. 3, p. 15-19, 2007.
- [10] VIEIRA, A. C. *et al.* Genetic diversity and structure of *Melocactus conoideus* Buin. & Bred (Cactaceae), a critically endangered species endemic to southwestern Bahia State (Brazil). *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, v. 46, p. 1-11, 2024.
- [11] VIEIRA, A. C. *et al.* Seleção de primers inter simple sequence repeat em *Melocactus conoideus* Buin. & Bred. (Cactaceae), espécie endêmica do sudoeste da Bahia, Brasil. *Enciclopédia Biosfera*, v. 16, n. 29, p. 1365-1374, 2019.