



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**Análises genético-moleculares em *Melocactus conoideus* Buin. &
Bred: espécie criticamente ameaçada de extinção.**

Anderson Carvalho Vieira

ITAPETINGA-BA

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**Análises genético-moleculares em *Melocactus conoideus* Buin. &
Bred: espécie criticamente ameaçada de extinção.**

Autor: Anderson Carvalho Vieira.

Orientadora: Prof^ª. D.Sc. Elisa Susilene Lisboa dos Santos

Coorientadores: Prof^ª. D.Sc. Ana Paula Lima do Couto Santos e Prof. D.Sc. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento”

ITAPETINGA-BA

2021

583.56
V713a Vieira, Anderson Carvalho
Análises genético-moleculares em *Melocactus conoideus* Buin. & Bred: espécie criticamente ameaçada de extinção. / Anderson Carvalho Vieira. – Itapetinga, BA: UESB, 2021.

96fl.

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Elisa Susilene Lisboa dos Santos e coorientação da Prof^a. D. Sc. Ana Paula Lima do Couto Santos e Prof. D. Sc. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva.

1. Família Cactaceae - Manejo genético. 2. Cactos - Diversidade genética. 3. Cactos - Marcadores moleculares - Usos. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais, *Campus* de Itapetinga. II. Santos, Elisa Susilene Lisboa dos. III. Santos, Ana Paula Lima do Couto. IV. Silva, Carlos Bernard Moreno Cerqueira. V. Título.

CDD(21): 583.56

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Cactos - Extinção - Brasil - Nordeste
2. Coroa-de-frade - Cactos
3. Cabeça-de-frade – Cactos

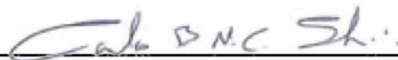
ANDERSON CARVALHO VIEIRA

“ANÁLISES GENÉTICO-MOLECULARES EM *MELOCACTUS CONOIDEUS* BUIN. & BRED: ESPÉCIE CRITICAMENTE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO.”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* de Itapetinga, BA. Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento.

Aprovada em: 28/01/2021

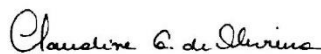
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva
(Coorientador Substituindo a Orientadora/UESB)



Prof. Dr. João Guilherme Portugal Vieira (UNICAMP)



Prof^a. Dr^a. Claudine Gonçalves de Oliveira (UNIVASF)

“A sobrevivência de um organismo depende da sobrevivência de um outro”.

Charles Darwin.

Dedico essa pesquisa a Deus, por ter me concedido a graça de vencer mais uma etapa. A minha mãe, Juralia, por todo amor. A todos os cientistas, professores, pesquisadores e divulgadores do conhecimento científico, que com recursos limitados, exercem um papel fundamental contra o obscurantismo atual.

AGRADECIMENTOS

Por essa conquista, meus sinceros agradecimentos,

A Deus, pela vida, por me proporcionar a oportunidade de vivenciar essa experiência, me dando força e discernimento ao longo dessa jornada.

A minha família, em especial a minha mãe (Juralia) a minha avó (Josefa) e a minha madrinha (Miriam). Sou eternamente grato por todo amor, carinho e esforço com a minha educação. Seus exemplos de vida construíram a minha base moral. Tenho certeza que a minha vitória também pertence a vocês.

Aos meus irmãos Adilton, Jonas e João Lucas, fundamentais em minha vida.

À minha namorada Bruna, pelo amor, incentivo e apoio por me ajudar em todas as horas em que precisei.

À minha orientadora, Elisa Susilene Lisboa dos Santos, pela condução, atenção, paciência, pelo conhecimento e confiança durante todos esses anos em minha vida acadêmica, desde a graduação. Sendo minha referência profissional.

Aos professores coorientadores Ana Paula Lima do Couto Santos e Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva, pela disponibilidade sempre que necessário, pelas sugestões, pela revisão e aperfeiçoamento desse trabalho.

Aos meus colegas membros do Laboratório de Genética Molecular Aplicada, com vocês desenvolvi todas as etapas desse trabalho, compartilhei amizades, experiências, fui corrigido e aprendi. O trabalho em grupo foi essencial para a realização dessa pesquisa e para o meu crescimento profissional durante esse período. Estendo os agradecimentos aos alunos Álefy Gonçalves de Barros e Matheus Carvalho dos Santos pela disponibilidade em me atender na preparação de parte da pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado, foi um prazer de conviver com vocês durante esse período de grande aprendizado.

Aos professores do mestrado, não só pelo conhecimento racional, mas pelas lições de vida. Por toda dedicação, meu eterno agradecimento.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais por estarem sempre dispostos a ajudar nos trâmites burocráticos, Denise, muito obrigado.

Ao Programa de pós-graduação e a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, pela concessão da bolsa que contribuiu na realização do mestrado.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, me ajudando nessa caminhada, deixo aqui expressa a minha gratidão.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 17 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 1.1 Conservação da diversidade genética | 19 |
| 1.1.1- Biologia da conservação..... | 19 |
| 1.1.2- Genética da conservação | 22 |
| 1.2 A família Cactaceae e conservação | 26 |
| 1.3 Melocactus Link. & Otto | 29 |
| 1.4 Melocactus conoideus Buin. & Bred | 33 |
| 1.5 Marcadores moleculares | 36 |
| 1.5.1- ISSR- (Inter Simple Sequence Repeat) | 39 |
| CAPÍTULO I | 41 |
| SELEÇÃO DE PRIMERS <i>INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT</i> EM <i>Melocactus conoideus</i> BUIN. & BRED. (CACTACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DO SUDOESTE DA BAHIA, BRASIL..... | 41 |
| SELECTION OF INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT PRIMERS IN <i>Melocactus conoideus</i> BUIN. & BRED. (CACTACEAE), ENDEMIC SPECIES OF SOUTHWEST BAHIA, BRAZIL | 41 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 43 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| CONCLUSÃO | 47 |
| REFERÊNCIAS..... | 47 |
| CAPÍTULO II..... | 51 |
| Diversidade e estrutura genético-molecular de <i>Melocactus conoideus</i> Buin. & Bred (Cactaceae) espécie endêmica do sudoeste baiano e criticamente ameaçada de extinção | 51 |
| Molecular-genetic diversity and structure of <i>Melocactus conoideus</i> Buin. & Bred (Cactaceae) endemic specie to the southwest Bahia and critically endangered | 52 |
| 1. INTRODUÇÃO | 53 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 54 |
| 3. RESULTADOS | 59 |
| 4. DISCUSSÃO | 66 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 71 |
| REFERÊNCIAS..... | 72 |
| PERSPECTIVAS | 77 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 79 |

| | |
|---|----|
| REFERÊNCIAS..... | 80 |
| APÊNDICES | 93 |
| APÊNDICE A- SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR EM <i>Melocactus conoideus</i> | 94 |
| APÊNDICE B- CULTIVO DE PROGÊNIES E EXTRAÇÃO DE DNA (ATIVIDADES ANTES / DURANTE A PANDEMIA POR COVID-19) | 95 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento Amplificado)

AMOVA – *Analysis of molecular variance* (Análise da Variância Molecular)

BCSS – *British Cactus and Succulent Society* (Sociedade Britânica de Cactos e Suculentas)

CAM – *Crassulacean Acid Metabolism* (Metabolismo Ácido das Crassuláceas)

CITES – *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Silvestres)

CNCFlora – Centro Nacional de Conservação da Flora

CR – *Critically Endangered* (Criticamente Ameaçada)

CSSG – *Cactus and Succulent Specialist Group* (Grupo de Especialistas em Cactos e Suculentas)

CTAB – *Cetyltrimethylammonium bromide* (Brometo de Cetiltrimetilamônio)

DD – *Data Deficient* (Deficiente de Dados)

DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

dNTP – *Deoxyribonucleotide triphosphate* (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)

EX – *Extinct* (Extinta)

EW – *Extinct In The Wild* (Extinta da Natureza)

EN – *Endangered* (Em Perigo)

F_{ST} – Índice de fixação

G_{ST} – Coeficiente de diferenciação genética

h – Índice de diversidade de Nei

H_s – Variabilidade dentro das populações

H_t – Diversidade total

IOS – *International Organization for Succulent Plant Study* (Organização Internacional para Estudo de Plantas Suculentas)

ISSR – *Inter Simple Sequence Repeats* (Inter Sequências simples repetidas)

IUNC – *International Union for Conservation of Nature* (União Internacional para Conservação da Natureza)

LC – *Least Concern* (Menos Preocupante)

LGMA – Laboratório de Genética Molecular Aplicada

ME – Marcas Exclusivas

MCMC – *Markov Chain Monte Carlo*

MR – Marcas Raras

NE – *Not Evaluated* (Não Avaliada)

NGS – *Next- Generation Sequencing* (Sequenciamento de Nova Geração)

Nm – Número de migrantes

NT – *Near Threatened* (Quase Ameaçada)

PAN – Plano de Ação Nacional

PCoA – *Principal Coordinates Analysis* (Análises de Coordenadas Principais)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PIC – *Polymorphism Information Content* (Conteúdo de Informação de Polimorfismo)

PNUMA– Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* (Amplificação aleatória de DNA polimórfico)

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)

SCB– Sociedade de Biologia da Conservação

SSR – *Single Sequence Repeat* (Sequências simples repetidas)

SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms* (Polimorfismo de nucleotídeo único)

TBE – Tris/Borato/EDTA

PLP– (Porcentagem de Locus Polimórficos)

PMSP – Parque Municipal da Serra do Periperi

RAMc– Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus*

ONG – Organização Não Governamental

UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

VU – *Vulnerable* (Vulnerável)

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Representante do gênero <i>Melocactus</i> . A- cefálio (Fonte: Autor) B- Flor de <i>M. conoideus</i> (Fonte: Autor) C- Beija-flor, vertebrado visitante floral de espécies do gênero <i>Melocactus</i> (Fonte:) D- Frutos desenvolvidos no cefálio (Fonte: Autor) E- Lagarto, vertebrado dispersor de espécies de <i>Melocactus</i> (Fonte: GOMES)..... | 31 |
| Figura 2- <i>M. conoideus</i> em <i>habitat</i> natural. (Fonte: Autor)..... | 34 |
| Figura 3- Parque Municipal da Serra do Periperi- PMSP. (Fonte: BENEDICTIS, 2007)..... | 35 |

CAPÍTULO I:

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ilustração da classificação de perfil de geração de fragmentos genômicos de <i>Melocactus conoideus</i> através da amplificação por <i>primers</i> ISSR. Classificados como: (B) Bom (R) Ruim e (A) ausente. Fonte: Autores..... | 44 |
|--|----|

CAPÍTULO II:

| | |
|--|----|
| Figura 1. Pontos de coleta de amostras de <i>Melocactus conoideus</i> Link & Otto no município de Vitória da Conquista, Bahia. QGIS.org, 2021. QGIS <i>Geographic Information System</i> . QGIS Association. http://www.qgis.org | 55 |
| Figura- 2. Resultados da análise de probabilidade logarítmica média de estrutura por agrupamento baseada no modelo bayesiano. | 63 |
| Figura- 3. Histograma para K=2. Os indivíduos são separados de acordo com a população, e a linha vertical preta no gráfico de barras é um identificador de população. | 64 |
| Figura- 4. Distribuição de genótipos de <i>M. conoideus</i> por Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Nota: A- Distribuição do conjunto de genótipos analisados; B- Distribuição dos genótipos oriundos do PMSP-RAMc; C- Distribuição dos genótipos do primeiro ponto fora dos limites da RAMc; D- Distribuição dos genótipos do segundo ponto fora dos limites da RAMc; E- - Distribuição dos genótipos do terceiro ponto fora dos limites da RAMc..... | 65 |
| Figura- 5. Comportamento da distribuição da diversidade genética populacional para <i>M. conoideus</i> de Vitória da Conquista-BA, segundo análises de diferenciação genética populacional utilizadas. Nota: A- PMSP-RAMc e FORA RAMc1; B- PMSP-RAMc e FORA RAMc2; C- PMSP-RAMc e FORA RAMc3; D- FORA RAMc1 e FORA RAMc2; E- FORA RAMc1 e FORA RAMc3; F-FORA RAMc2 e FORA RAMc3. Bing Maps for Excel (2020) | 69 |

APÊNDICES:

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Perfil de amplificação genômica para os iniciadores DiCA3`G, DiCA3`RG, DiCA3`YG, DiGA3`C, DiGA3` RC, DiGA3`T, TriCAC3`RC..... | 94 |
| Anexo 2. Perfil de amplificação genômica para os iniciadores TriCAC3`YC, TriCAC5`CY, TriCAG3`RC, TriGTG3`YC, TriTGT3`YC, TriAAC3`RC, TriAAG3`RC, TriACG3`RC, TriAGA3`RC. | 94 |
| Anexo 3. Perfil de amplificação genômica para os iniciadores TriTGG3`RC, TriCGA3`RC, TriCGC3`RC, TriGAC3`RC, TriGCA3`RC, TriGCC3`RC, TriGGA3`RC | 94 |
| Anexo 4. Procedimentos de montagem de banco de DNA genômico de progênies de <i>M. conoideus</i> : Coleta e germinação das sementes, manutenção das progênies e extração de DNA genômico..... | 95 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Definição das categorias de ameaça IUCN (2001) | 21 |
| Tabela 2- Resumo dos critérios de ameaça das categorias da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) (2001). A- Redução do tamanho populacional. B- Extensão da área geográfica de ocorrência. C- Tamanho da população estimado em número de indivíduos maduros e estimativa de declínio. D- Tamanho da população estimado em número de indivíduos maduros. E- Quantitativo de probabilidade de extinção na natureza. | 23 |
| Tabela 3. Espécies do gênero <i>Melocactus</i> (Cactaceae) encontradas no Brasil. | 30 |
| Tabela 4- Características dos Marcadores moleculares clássicos (NADEEM; NAWAZ; SHAHID <i>et al.</i> , 2018). | 38 |
| Tabela 5- Potencial informativo dos tipos de marcadores em questões de conservação (ROSSETTO; RYMER, 2013). Nota: NA- Não Aplicável. | 39 |

CAPÍTULO I:

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Perfil de segregação de fragmentos amplificados e polimorfismo para os 23 <i>primers Inter Simple Sequence Repeat</i> (ISSR) no acesso às regiões genômicas de <i>Melocactus conoideus</i> | 45 |
| Tabela 2. Conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e Heterozigosidade esperada (H_e) a partir de <i>primers</i> ISSR na análise em de <i>Melocactus conoideus</i> | 46 |

CAPÍTULO II:

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Iniciadores ISSR usados para caracterização da diversidade genética em <i>M. conoideus</i> | 56 |
| Tabela 2. Perfil de amplificação genômica para iniciadores ISSR usados para caracterização da diversidade genética em <i>M. conoideus</i> . PMSP-RAMc=Parque Municipal da Serra do Periperi – Reserva Ambiental do <i>Melocactus conoideus</i> , N= Número de marcas, PLP= porcentagem de <i>locos</i> polimórficos, MR= Marcadores raros ME= Marcadores exclusivos. | 59 |
| Tabela- 3. Índices usados para caracterizar a diversidade genética em <i>M. conoideus</i> : PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) (BOTSTEIN; WHITE; SKOLNICK <i>et al.</i> , 1980); h (diversidade genética de Nei) (NEI, 1978). PMSP-RAMc=Parque Municipal da Serra do Periperi – Reserva Ambiental do <i>Melocactus conoideus</i> | 60 |
| Tabela- 4. Índices usados para calcular a diferenciação genética de Nei. (NEI, 1987). Diversidade genética total (H_t); diversidade genética dentro de populações (H_s); coeficiente de divergência genética entre populações (G_{ST}); número de migrantes por geração (N_m). | 61 |
| Tabela- 5. Análise de variância molecular (AMOVA) baseada em marcadores ISSR para <i>M. conoideus</i> . Nota: GL graus de liberdade, SS Soma dos quadrados, MS Média dos quadrados, EVar. Variação estimada, PhiPT Valor para a variabilidade genética para marcadores dominantes, P (rand \geq data) Probabilidade, para o PhiPT baseado na permutação padrão em todo o conjunto de dados. | 61 |
| Tabela- 6. Valor de PhiPT relativo a cada local de ocorrência de <i>M. conoideus</i> . PMSP-RAMc=Parque Municipal da Serra do Periperi – Reserva Ambiental do <i>Melocactus conoideus</i> . 1, 2 e 3 pontos de coleta. | 62 |
| Tabela- 7. Diversidade e diferenciação genética em espécies de cactos. Nota- Categorias de ameaça da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN): CR- Criticamente Ameaçada; EN- Em perigo; LC- Menos Preocupante; NT- Quase ameaçada. | 67 |

Análises genético-moleculares em *Melocactus conoideus* Buin. & Bred: espécie criticamente ameaçada de extinção.

RESUMO

Dentre as medidas para a proteção da biodiversidade, a manutenção da diversidade genética se insere como essencial para a sobrevivência de espécies ameaçadas. Dessa forma, informações sobre a dinâmica populacional dessas espécies no ambiente estão diretamente relacionadas a genética da conservação, e devem contribuir com ações que visem reduzir as taxas de extinção de espécies ameaçadas no planeta. A família Cactaceae é caracterizada por colonizar ambientes estressantes e, portanto, possui vários representantes endêmicos, estando entre os táxons mais ameaçados avaliados atualmente. *Melocactus conoideus* é um cacto globoso endêmico do sudoeste baiano e criticamente ameaçado de extinção, membro de um gênero que possui sua maior diversidade e endemismo no estado da Bahia. A espécie possui um histórico de pressões ambientais, mas, nos últimos anos têm se aumentado a base de conhecimento científico em conservação e recebido intervenções para o seu controle demográfico em uma área destinada à sua proteção. Devido à falta de dados em genética da conservação para a espécie, este estudo tem o objetivo de contribuir com informações acerca da biologia populacional de *M. conoideus* a partir de análises genético-moleculares de diversidade e estrutura genética. A análise do padrão de geração de marcadores por 23 iniciadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) forneceu informações para seleção de 15 *primers* adequados para a caracterização da diversidade e estrutura genética da espécie, dos quais 13 foram utilizados com essa finalidade em genótipos oriundos de regiões de dentro e fora de uma zona protetiva sob responsabilidade do Município de Vitória da Conquista - BA. As análises genéticas revelaram um nível de diversidade genética moderado, mas com uma estrutura genética que evidencia a diferenciação entre genótipos oriundos de dentro e fora da área de proteção a espécie. A dinâmica no comportamento genético populacional de *M. conoideus* sugere que a autoecologia da espécie relacionada à ocorrência de acasalamento misto, intermediada por polinizadores naturais territorialistas e o modo de sobrevivência na formação de agregados em ambiente natural, bem como a fragmentação ambiental ocorrente nessas regiões, tenha influência na restrição do fluxo gênico. Os dados aqui apresentados podem ajudar no planejamento da conservação genética da espécie *in situ*, orientando no manejo demográfico especialmente ao já realizado dentro da área de proteção a espécie. Estudos em andamento, referentes à biologia floral e reprodutiva, incluindo a elucidação do sistema reprodutivo via marcadores moleculares, podem ampliar o arcabouço de conhecimento científico para o manejo e manutenção populacional de *M. conoideus*.

Palavras-Chave: Manejo genético, Marcadores moleculares, Variabilidade genética.

Molecular genetic analysis in *Melocactus conoideus* Buin. & Bred: critically endangered species.

ABSTRACT

Among the measures for the protection of biodiversity, the maintenance of genetic diversity is essential for the survival of threatened species. Thus, information about population dynamics of these species in the environment is related to conservation genetics and should contribute to actions aimed at reducing the extinction rates of threatened species. The Cactaceae family is characterized by colonizing stressful environments and it has several endemic species, being among the most threatened taxa evaluated today. *Melocactus conoideus* is a globose cactus endemic to the southwest of Bahia and critically endangered; also, it is as a member of a genus that has its greatest diversity and endemism in the state of Bahia. The species has a history of environmental pressures; but in recent years the scientific knowledge on conservation has increased and interventions for its demographic control in an area for its protection, has been occurred. Due to the lack of data in conservation genetics for the species, this study aims to contribute with information about the population biology of *M. conoideus* from genetic-molecular analysis of the genetic diversity and structure. The analysis of the pattern of markers from of 23 primers *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) provided information for the selection of 15 primers suitable for molecular genetic studies of the species. Thirteen primers were used for characterizing the diversity and genetic structure in genotypes from a protective zone under the responsibility of the Municipality of Vitória da Conquista – BA and natural areas outside from there. The analysis revealed a moderate level of genetic diversity but with a genetic structure that shows the differentiation between genotypes from within and outside the species' protection area. The dynamics in the genetic behavior of the population of *M. conoideus* indicate that the autoecology, with the occurrence of mixed mating by natural pollinators and the way of formation of aggregates in the natural environment, as well as, the environmental fragmentation occurring in these regions, influence in the restriction of gene flow. The data here presented can help in the conservation *in situ* for these species, especially in the protection area. Studies in progress about floral e reproductive biology, including the reproductive system by molecular markers, should expand the scientific knowledge for the management and maintenance of the populations of *M. conoideus*.

Key words: Genetic variability, Genetic management; Molecular markers.

INTRODUÇÃO

A conservação da diversidade genética é um dos principais objetivos da biologia da conservação (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). O gerenciamento de ações que visam minimizar a perda de informações genéticas em espécies ameaçadas é um grande desafio diante da fragmentação e da degradação de *habitats* e dos recursos econômicos e sociais limitados, o que leva a decisões genéricas de proteção de parcelas relativas a subconjuntos populacionais sem uma fundamentação científica adequada, onde o perigo de extinção por causas genéticas se mantém ou avança (FRANKHAM, R. J. C. G., 2010; FRANKHAM; BRADSHAW; BROOK, 2014).

Avaliando os representantes da família Cactaceae um percentual significativo de espécies está listado como ameaçadas de extinção, estando dentre os grupos taxonômicos mais ameaçados até o momento (GOETTSCHE; HILTON-TAYLOR; CRUZ-PIÑÓN *et al.*, 2015; CSSG, 2020). O gênero *Melocactus* Link & Otto apresenta cerca de 50% de suas espécies reconhecidas dentro das categorias de ameaça da *International Union for Conservation of Nature* (IUNC) (GOETTSCHE; HILTON-TAYLOR; CRUZ-PIÑÓN *et al.*, 2015). Seu centro de diversidade e endemismo está localizado no Nordeste brasileiro, onde o estado da Bahia lidera em número de espécies, bem como espécies endêmicas e ameaçadas (ZAPPI; TAYLOR, 2020), estando dentre estas *Melocactus conoideus* Buin. & Bred de nome popular “cabeça-de-frade-do-Periperi” (RIZZINI, 1982; TAYLOR, 1992)

M. conoideus possui o *status* de criticamente ameaçada de extinção devido a um longo histórico de pressões ambientais em sua região de ocorrência, em manchas de vegetação em meio a cascalho no alto da Serra do Periperi, onde se encontra a maior predominância de indivíduos relatados, nas proximidades do município de Vitória da Conquista - BA (CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008; CNCFLORA, 2020).

Nos últimos 30 anos ações de conservação foram direcionadas para a manutenção demográfica de *M. conoideus* em ambiente natural, a citar a proibição da comercialização de espécimes coletados em ambientes naturais, a criação de uma área de proteção para a espécie dentro da Unidade de Conservação - Parque Municipal da Serra do Periperi e a ampliação do tamanho populacional *in situ* a partir da produção de mudas (CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008; PMVC, 2013; 2016; 2017). Contudo, o arcabouço científico com informações relacionadas a reprodução e sobrevivência da espécie é relativamente novo, com exceção a descrição morfológica e taxonômica da espécie (TAYLOR, 1992; SANTOS; CERQUEIRA SILVA, 2007; BRITO-KATEIVAS, 2012; LUZ-FREIRE; TRINDADE; SÁ-NETO *et al.*, 2014).

Informações a respeito da distribuição da informação genética a nível populacional podem contribuir com as principais questões dentro da genética da conservação, tais como a identificação

de homozigose por endogamia, frequência de alelos deletérios dentro de populações, e a perda do potencial adaptativo e evolutivo, visando o gerenciamento genético propício a ser aplicado (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). Dessa forma, técnicas moleculares baseadas em amplificação de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), acessíveis a espécies silvestres de interesse ecológico, como os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) podem, a partir de análises bioinformáticas, quantificar e verificar a distribuição da variabilidade genético-populacional da espécie (MILLIGAN; LEEBENS-MACK; STRAND, 1994; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; NG; TAN, 2015). Esses dados, aliados ao contexto ecológico em biologia floral e reprodutiva sobre as relações entre planta e o ambiente, podem ser norteadores para a melhor eficiência no manejo da espécie.

O objetivo desta dissertação é contribuir com informações acerca da biologia populacional de *M. conoideus* a partir de análises genético-moleculares de diversidade e estrutura genética.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Conservação da diversidade genética

1.1.1- Biologia da conservação

A biologia da conservação surgiu como forma de integralização de fundamentos teóricos de maneira empírica, com o foco em questões de conservação, diante dos impactos relacionados as atividades humanas sobre a diversidade biológica em todos os seus níveis de organização, a exemplo da destruição de *habitats*, proliferação de espécies invasoras, poluição e exploração excessiva (caça, pesca e coleta) (PRIMACK; RODRIGUES, 2006). Por consequência, cria-se um novo paradigma enquanto área do conhecimento científico, propondo-se a desenvolver abordagens estratégicas para tratar das ameaças à biodiversidade (SOULÉ, 1985; PRIMACK; RODRIGUES, 2006).

Esse modelo teórico foi intensamente discutido a partir do final da década de 60 e durante a década de 70 até ser formalmente idealizado como campo do conhecimento científico em maio de 1985, após a segunda Convenção sobre Diversidade Biológica (*Conference on Conservation Biology*) realizada em Ann Arbor, Michigan, EUA, motivando a organização da Sociedade de Biologia da Conservação (SCB) e a fundação da revista *Conservation Biology* (SARKAR, 2005).

Dessa forma, o desenvolvimento da biologia da conservação pode ser entendido como resposta ao clímax da produção científica visando o delineamento de normas direcionadas para a proteção ambiental (SARKAR, 2005). A publicação de Soulé (1985) intitulada “*O que é biologia da conservação? Uma nova disciplina sintética aborda a dinâmica e os problemas de espécies, comunidades e ecossistemas perturbados*” sintetizou os pressupostos básicos para um modelo teórico em que a ciência tem a função primordial de prescrever planos de manejo para situações específicas através do conhecimento multi e interdisciplinar, na perspectiva de teorias biológicas ligadas a diferentes áreas, tais como a biologia evolutiva, ecologia, biogeografia de ilhas e genética populacional, base para as primeiras ideias com o foco em planejamento em estratégias de proteção a biodiversidade (SOULÉ, 1985; SARKAR, 2005; PRIMACK; RODRIGUES, 2006).

Considerada uma disciplina de crise, a biologia da conservação tem o diferencial de tratar de ameaçadas intrínsecas a extinção e o foco de ações que prezam a manutenção da viabilidade de populações estão relacionados a condições gerais de vulnerabilidade, tais como: espécies com área de ocorrência limitada; endêmicas ou de ocorrência a uma área geográfica com condições específicas, sob pressão ambiental; e espécies com populações reduzidas (PRIMACK; RODRIGUES, 2006). Por esta razão, a biologia da conservação encontra-se em constante transformação e expansão teórica em seu modelo científico diante da multidimensionalidade em

que o debate ambiental contemporâneo se encontra (PRIMACK; RODRIGUES, 2006; KAREIVA; MARVIER, 2012; ODENBAUGH, 2019).

Devido a isso, uma característica disciplinar da biologia da conservação está no estabelecimento de uma conexão política, a ponto de ser considerada como uma “ciência reguladora” por estar ligada ao desenvolvimento de estratégias de gerenciamento, cada vez mais estabelecidos e habilitados por leis (MEFFE; VIEDERMAN, 1995; VAN DYKE, 2008). Nesse sentido, os dados empíricos foram importantes para compreensão teórica necessária para ações em respostas a questões específicas sobre a conservação de espécies e *habitats*, na tentativa de harmonização das preocupações conservacionistas com as necessidades do povo e governo locais visando a construção de uma política ambiental eficiente (MEFFE; VIEDERMAN, 1995; PRIMACK; RODRIGUES, 2006)

Hoje, a conservação é um esforço internacional que envolve todas as nações modernas e essa condição foi criada através de ferramentas advindas das regulamentações ambientais internacionais, conquistadas por meio de articulações de organizações científicas fundamentais para o direcionamento de esforços conjuntos para a preservação de espécies ameaçadas (LAUSCHE, 2008; VAN DYKE, 2008). A *International Union for Conservation of Nature – União Internacional para Conservação da Natureza (IUNC)* insere-se nesse sentido, desde sua fundação em 1948, com o objetivo de proteger locais naturais e ameaças às espécies de outras destruições e uso indevido pelo homem, encaixando nos planos das Nações Unidas de reconstrução mundial devido ao pós-guerra (LAUSCHE, 2008).

A IUNC ganhou reconhecimento e influência política internacional através de suas conferências nas quais eram divulgados dados oriundos de investigações científicas no âmbito de questões de conservação e da publicação de relatórios de status de espécies ameaçadas, os *Red Data Books* e *Red Lists*, que se tornaram a fonte mais importante e a autoridade mais respeitada para identificar as espécies ameaçadas de extinção e seu status (LAUSCHE, 2008; VAN DYKE, 2008).

A *Red list* ou lista vermelha unificou a linguagem relativa aos critérios de avaliação de status de conservação de espécies. A IUCN (2001) conta com nove categorias de avaliação de táxons (Tabela 1): Extinta (EX), Extinta na natureza (EW), Criticamente em perigo (CR), Em perigo (EN), Vulnerável (VU), Quase ameaçada (NT), Menos preocupante (LC), Deficiente de dados (DD) e Não avaliada (NE), com modificações para uma avaliação regional, levando em consideração as limitações em obtenção de dados devido a diferentes contextos políticos e sociais (IUCN, 2012). Esse modelo sistematizou as espécies com base em sua autoecologia ou história

natural, enquadrando os grupos em categorias de ameaça com base na estimativa de condições de vulnerabilidade existentes que não cumprem com um critério ou subcritério definido (Tabela 1).

Tabela 1- Definição das categorias de ameaça IUCN (2001)

| | |
|-----------------------------------|---|
| Extinta (EX) | Inexistência de indivíduos em habitat conhecido e / ou esperado, em épocas apropriadas (diurna, sazonal, anual), em toda a sua faixa histórica, não restando dúvidas de que o último indivíduo morreu. |
| Extinta da Natureza (EW) | Indivíduos só sobrevivem na forma de cultivo, em cativeiro ou como uma população naturalizada (ou populações) bem fora da sua área de distribuição original. |
| Criticamente Ameaçada (CR) | Atende qualquer um dos critérios A a E* para Ameaça Crítica, e é, portanto, considerado com um risco extremamente alto de extinção na natureza. |
| Em Perigo (EN) | Atende qualquer um dos critérios A a E* para Ameaça de extinção, e é, portanto, considerado com um risco muito alto de extinção na natureza. |
| Vulnerável (VU) | Atende qualquer um dos critérios A a E* para vulnerável, e é, portanto, considerado com um alto risco de extinção na natureza. |
| Quase Ameaçada (NT) | Táxon avaliado de acordo com os critérios, mas não se enquadram em categorias de perigo, porém está perto de se qualificar para ou é provável que se qualifique para uma categoria ameaçada em um futuro próximo. |
| Menos Preocupante (LC) | Um táxon é o que menos preocupa quando é avaliado com base nos critérios de ameaça. |
| Deficiente de Dados (DD) | Não há informações para fazer uma avaliação de seu risco de extinção com base em sua distribuição e / ou população status. |
| Não Avaliada (NE) | Ainda não foi avaliado com base nos critérios para classificar o táxon dentro das categorias de ameaça. |

A a E* Critérios obtidos a partir da análise quantitativa de parâmetros incluindo a redução populacional (A), a distribuição geográfica e o tamanho populacional e a probabilidade de extinção (E).

Ao chamar a atenção da comunidade internacional para a situação das espécies ameaçadas de extinção, os relatórios da IUCN estimularam o debate político-científico, significativos para ações como: a criação de parques nacionais, construção de tratados bilaterais ou multilaterais entre nações, atos vinculativos de organizações internacionais e a criação de regras do direito internacional (VAN DYKE, 2008). Em 1973, o debate no Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) foi fundamental para a conferência de negociação intergovernamental alcançar o texto da Convenção sobre Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Flora e Fauna Silvestre (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora - CITES*). A Convenção entrou em vigor em 1975, sendo um instrumento para a proteção da vida selvagem ou um meio de regulação do seu comércio (VAN DYKE, 2008; CITES, 2020).

O tratado é dividido em três anexos, o apêndice I lista espécies ameaçadas e vulneráveis ao comércio existente ou potencial, o Apêndice II são aquelas que podem ser ameaçadas por grandes volumes de comércio ou que não podem ser distinguidas de espécies ameaçadas e o Apêndice III lista espécies que não são ameaçadas globalmente, mas podem ser listadas por iniciativa de um estado individual que busca cooperação internacional para a proteção dessa espécie. O comércio das espécies do Apêndice I é proibido, e as autorizações do país importador e exportador devem ser obtidas mesmo para transporte não comercial. O comércio envolvendo espécies do apêndice II requer uma licença do país exportador, e nas espécies do Apêndice III, pede-se às nações que não permitam a importação das espécies sem uma licença de exportação do país listado (VAN DYKE, 2008; CITES, 2020).

As partes do tratado se reúnem a cada 2 anos para fazer emendas aos apêndices e desenvolver novas listas de espécies e produtos de origem animal e manuais de identificação para melhorar a aplicação (VAN DYKE, 2008). Atualmente, 183 países aderiram aos acordos e os diferentes níveis de proteção se estendem a mais de 35 mil espécies de plantas e animais, com 1045 (707 da fauna e 338 da flora) listadas no apêndice I, 34.608 (4.964 da fauna e 29.644 da flora) no apêndice II e 217 (204 da fauna e 13 da flora) no apêndice III, entre espécies, subespécies e variedades (CITES, 2020).

1.1.2- Genética da conservação

O reconhecimento da genética de populações para a conservação ocorreu em produções científicas que destacavam sua importância a partir dos anos 70, através da percepção da relação descrita entre diversidade genética e a extinção (FRANKEL, 1970; FRANKEL; SOULÉ, 1981; FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). O entendimento de como age as forças naturais que moldam a dinâmica de distribuição de informação genética e a mudança em sua composição em populações no tempo e no espaço ajudou a definir aquelas espécies ditas “raras” ou ameaçadas

para o direcionamento esforços de conservação naquelas com maior probabilidade de extinção (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002; FLATHER; SIEG, 2007). A IUCN incorporou com objetividade científica esses elementos relativos à biologia populacional em seus critérios de ameaça para atender as probabilidades de extinção e restauração ecológica em cada nível (MACE; LANDE, 1991) (Tabela 2).

Tabela 2- Resumo dos critérios de ameaça das categorias da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) (2001). **A-** Redução do tamanho populacional. **B-** Extensão da área geográfica de ocorrência. **C-** Tamanho da população estimado em número de indivíduos maduros e estimativa de declínio. **D-** Tamanho da população estimado em número de indivíduos maduros. **E-** Quantitativo de probabilidade de extinção na natureza.

| Critérios (A-E) | | Criticamente Ameaçada (CR) | Em Perigo (EN) | Vulnerável (VU) |
|-----------------|-------------|--|--|------------------------------------|
| A | A1 | $\geq 90\% \geq$ | $\geq 70\% \geq$ | $\geq 50\% \geq$ |
| | A2, A3 e A4 | 80% | 50% | 30% |
| B | B1 | $<100 \text{ Km}^2$ | $<5.000 \text{ Km}^2$ | $<20.000 \text{ Km}^2$ |
| | B2 | $<10 \text{ Km}^2$ <250 | $<500 \text{ Km}^2$ <2.500 | $<2.000 \text{ Km}^2$ <10.000 |
| C | C1 | 25% em 3 anos ou 1 geração | 20% em 5 anos ou 2 gerações | 10% em 10 anos ou 3 gerações |
| D | | <50 | <250 | <1.000 |
| E | | $\geq 50\%$ em 10 anos ou 3 gerações | $\geq 20\%$ em 20 anos ou 5 gerações | $\geq 10\%$ em 100 anos |

Nota: Nas categorias Criticamente em Perigo, Em Perigo e Vulnerável existe um sistema hierárquico de numeração alfanumérica (1– 4; a – e; i– v) de critérios e subcritérios que fazem parte da avaliação da lista vermelha, com base nas evidências disponíveis relativas aos seus números, tendências e distribuição, além particularidades em ameaças específicas IUCN (2001).

Deste modo, esses critérios incidem em características relacionadas ao alcance geográfico, a especificidade de *habitat* e a abundância local, sendo determinantes para a identificação do grau de ameaçada das espécies (RABINOWITZ, 1981). Do ponto de vista genético, populações sob essas condições tem grandes probabilidades de exibir características genético-populacionais inevitáveis, como a redução da variabilidade genética, que implica em diferenças na taxa reprodutiva, na sobrevivência ou comportamento, diminuindo o potencial adaptativo e evolutivo diante de novas doenças, pragas, parasitas, competidores e predadores, poluição, ciclos climáticos, entre outros fatores, aumentando o risco de extinção progressivamente ao longo do tempo (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996; FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002; FRANKHAM, 2003; 2005).

De maneira geral, as forças antagônicas da deriva genética e do fluxo gênico ditam a dinâmica da distribuição de variação genética dentro e entre populações em locais seletivamente neutros

(WRIGHT, 1978; MILLIGAN; LEEBENS-MACK; STRAND, 1994). Dentro de uma população, a frequência genotípica de alelos pode variar de comum a muito rara. Considerando populações ameaçadas, em que a influência da deriva genética é maior, as frequências gênicas são modificadas de uma geração para outra, aleatoriamente, dependendo simplesmente do acasalamento e reprodução dos indivíduos da mesma população (PRIMACK; RODRIGUES, 2006). Quando a frequência de um alelo em uma população pequena é baixa, este tem grandes possibilidades de se perder a cada geração que passa o que leva a um fenômeno chamado de efeito *bottleneck* (gargalo de garrafa), caracterizado pelo declínio de heterozigosidade, ou seja, a redução da variabilidade genética devido a ausência da distribuição de alelos raros em uma população quando os indivíduos que os possuem não sobrevivem até a maturidade reprodutiva (CARSON, 1983; YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996; PRIMACK; RODRIGUES, 2006).

Isso revela o impacto de uma instabilidade demográfica na diversidade genética. Em condição de consanguinidade, essas populações tendem a aumentar as correlações entre a união de gametas. Como resultado, homogeneiza genótipos produzidos dentro de uma linhagem familiar com a probabilidade de acúmulo de mutações de alelos deletérios e aumenta o potencial de diferenciação genética entre famílias em curto prazo, isso pode ocorrer devido a um declínio no tamanho da população, perda de polinizadores ou introdução ao cativeiro (LOVELESS; HAMRICK, 1984; MILLIGAN; LEEBENS-MACK; STRAND, 1994). E na medida em que se diminui o tamanho populacional por vias naturais ou por atividades associadas ao homem, mais vulnerável ela fica ao conjunto de variações ambientais e genéticas que tendem a reduzir o seu tamanho e homogeneizar a informação genética ainda mais, agindo em conjunto rumo a um vórtice de extinção (GILPIN; SOULÉ, 1986)

Em plantas, devido às limitações na capacidade de deslocamento de polinizadores e da dispersão limitada de sementes, a agregação entre progênies relacionadas é mais comum, gerando subdivisão genética intrapopulacional, caracterizando uma metapopulação geneticamente estruturada (LOVELESS; HAMRICK, 1984; OUBORG; VERGEER; MIX, 2006). Os sistemas de cruzamento constituem o maior fator de influência na estruturação populacional (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Nesse sentido, uma evidência evolutiva direta como resposta para evitar a perda de diversidade, os efeitos deletérios da endogamia e a consequente estruturação genética provém da capacidade de espécies de plantas com flores de impedirem a fertilização quando os gametas vêm da mesma planta (RICHARDS, 1997). Caso um dos 50 ou mais alelos que regulam a autoincompatibilidade estiver presente no grão de pólen e no estigma, a fertilização não será bem sucedida (FRANKHAM, 2003).

A genética da conservação foi desenvolvida com o propósito de identificar tais processos e manejar situações que implicam em risco de extinção de espécies, visando preservá-las como entidades dinâmicas capazes de resistir as mudanças ambientais (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). Esse modelo, focado no conhecimento evolutivo e na genética quantitativa sistematizou 11 questões prioritárias, que incluem (1) os efeitos deletérios da consanguinidade na reprodução e sobrevivência (depressão por endogamia); (2) a perda de diversidade genética e capacidade de evoluir em resposta a problemas relacionados às mudanças ambientais (perda de potencial evolutivo); (3) a fragmentação de populações e redução no fluxo gênico; (4) a deriva genética substituindo a seleção natural como principal processo evolutivo; (5) a acumulação de mutações deletérias; (6) o manejo genético de pequenas populações em cativeiro e os efeitos adversos; (7) o efeito da adaptação ao cativeiro na reintrodução; (8) resolução de incertezas taxonômicas; (9) definição de unidades de manejo dentro das espécies; (10) uso de análises genético-moleculares em análises forenses e (11) elucidação de aspectos da biologia das espécies importantes para a conservação (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002).

Para essas questões, o corpo teórico vem em síntese, sendo construído, através das ferramentas moleculares e bioinformáticas, onde os fenômenos populacionais se comportam como unidades analisáveis geneticamente e estatisticamente e relacionáveis aos aspectos de autoecologia ou a história natural e evolutiva de cada espécie (MILLIGAN; LEEBENS-MACK; STRAND, 1994; FRANKHAM, R. J. C. G., 2010). Exemplos vão desde o progresso das resoluções taxonômicas e as análises tradicionais de estimativas de distribuição de uma variedade de marcadores moleculares neutros dentro e entre as populações para avaliação de padrões de acasalamento e conectividade, com o potencial de informar indiretamente a capacidade adaptativa de uma espécie, até as perspectivas de abordagens genômicas de análise em larga escala (PRIMMER, 2009; FRANKHAM, R. J. C. G., 2010).

No entanto, um desafio tão grande quanto compreender tais padrões é implementar a genética no manejo de espécies ameaçadas na natureza, e devido à falta de dados complementares para casos específicos, espécies ameaçadas acabam tendo atenção limitada (FRANKHAM, R. J. C. G., 2010; FRANKHAM, R. J. B. C., 2010). Estabelecer uma relação efetiva entre o tamanho populacional mínimo e a capacidade de evitar depressões de causa genética com o passar das gerações faz parte de um debate complexo (OUBORG; VERGEER; MIX, 2006; FRANKHAM; BRADSHAW; BROOK, 2014). Diferentes evidências mostram que a proteção de um subconjunto populacional pode ter consequências genéticas para a conservação em populações fragmentadas, e ainda assim a diversidade genética não é um critério decisivo quando se trata de seleção de reservas ambientais (NEEL; CUMMINGS, 2003; OUBORG; VERGEER; MIX, 2006; AGUILAR; QUESADA; ASHWORTH *et al.*, 2008). Condições ecológicas, características

demográficas e considerações práticas, como a disponibilidade de terras geralmente são mais significativas para essas decisões (NEEL; CUMMINGS, 2003)

A Convenção sobre Diversidade Biológica em seu plano estratégico 2011-2020 recomendam a conservação de 70% da diversidade genética, embora essa recomendação não tenha sido acompanhada de orientações detalhadas para esse objetivo, e questões como qual tipo de diversidade genética essa recomendação se aplica (cultivadas ou silvestres) e quantas populações devem ser conservadas no local, ainda não estão claras (WHITLOCK; HIPPERSON; THOMPSON *et al.*, 2016).

Dessa forma, a conservação *ex situ* ganhou várias diretrizes para complementar a manutenção da informação genética, mas a baixa representação em coleções e a possibilidade de diferenciação genética e redução da capacidade adaptativa são limitações para as coleções em bancos de germoplasma (GODEFROID; RIVIÈRE; WALDREN *et al.*, 2011; LAUTERBACH; BURKART; GEMEINHOLZER, 2012). Portanto, o manejo *in situ* é fundamental para salvaguardar a variabilidade genética. Manter o cruzamento é a alternativa para diminuir as correlações entre a união de gametas, onde o fluxo genético de longa distância pode evitar a diferenciação populacional (LEVIN; KERSTER, 1974; LOVELESS; HAMRICK, 1984). Informações consistentes sobre a biologia reprodutiva, relativas as proporções de autogamia e alogamia, bem como aspectos funcionais que estejam correlacionados ao mecanismo de polinização, a exemplo das recompensas de néctar e pólen e sua relevância para as taxas de cruzamento são determinantes para previsões sobre a diversidade e estrutura genética dessas espécies (LOVELESS; HAMRICK, 1984; PRIMACK; RODRIGUES, 2006).

1.2 A família Cactaceae e conservação

Cactaceae Juss. é uma família grande, importante e talvez o mais conhecido grupo de plantas suculentas, apresentando uma alta diversidade adaptada a sobreviver em ambientes variados, desde áridos, semiáridos, zonas tropicais e subtropicais (ANDERSON, 2001). Com exceção ao gênero *Rhipsalis*, a família é endêmica do Novo Mundo, apesar de que várias espécies terem colonizado ambientes nas regiões mais quentes do Velho Mundo, após serem introduzidas (OLDFIELD, 1997; ANDERSON, 2001).

Os cactos são caracterizados por possuir as mais amplas modificações para o reino vegetal em diferentes níveis, seja morfológico, anatômico, celular ou metabólico (GIBSON; NOBEL, 1986). Dentre as formas, exibe variedade entre simples, ramificadas, globosos, colunares e alguns são essencialmente subterrâneos (ANDERSON, 2001). Possuem características xerófitas com adaptações para ambientes áridos, homogêneas dentro do grupo, como o metabolismo

fotossintético do tipo CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*) e estratégias para a absorção, uso e armazenamento de água, este graças a especializações morfológicas, tais como o cladódio e a presença de espinhos (GIBSON; NOBEL, 1986; ANDERSON, 2001).

Os cactos apresentam um dos sistemas reprodutivos mais variáveis dentro das angiospermas, onde suas flores podem variar em cor, forma, tamanho e época da antese e possuem a capacidade de atração de uma variedade de grupos de polinizadores, desde vertebrados e invertebrados, o que sugere uma dependência de polinizadores bióticos para o seu sucesso reprodutivo e uma plasticidade em resposta evolutiva para a reprodução e sobrevivência em ambientes variados (ANDERSON, 2001; DEL CARMEN MANDUJANO; CARRILLO-ANGELES; MARTÍNEZ-PERALTA *et al.*, 2010; GUTIÉRREZ-FLORES; COTA-SÁNCHEZ; LEÓN-DE LA LUZ *et al.*, 2017). Geralmente suas flores são autoincompatíveis, mas também há registro de autogamia, apesar de apenas cerca de 2% das espécies da família tem sua biologia reprodutiva estudada (DEL CARMEN MANDUJANO; CARRILLO-ANGELES; MARTÍNEZ-PERALTA *et al.*, 2010). As informações relacionadas à hipóteses evolutivas indicam uma tendência de hibridação entre linhagens como sistemas simpátricos de especiação, além dos alopátricos, predominantes dentro do grupo (GUERRERO; MAJURE; CORNEJO-ROMERO *et al.*, 2019; KHAN; FRANCO; SILVA *et al.*, 2020)

Estima-se que a origem dos cactos ocorreu a cerca de 48 milhões de anos, como grupo monofilético da Ordem das Caryophyllales (SILVA; ANTONELLI; LENDEL *et al.*, 2018). Possuem quatro subfamílias (Cactoideae, Maihuenioideae, Opuntioideae e Pereskioideae) com provável origem na região Andina da Argentina, Bolívia e Peru e diversificação em três principais centros de diversidade e endemismo (TAYLOR, 2000; ANDERSON, 2001; SILVA; ZAPPI; TAYLOR *et al.*, 2011; GOETTSCHE; HILTON-TAYLOR; CRUZ-PIÑÓN *et al.*, 2015). O primeiro centro está localizado no deserto de Chihuahuan e na região de Tehuacán-Cuicatlán, no norte e no centro do México, seguido pela porção central dos Andes na América do Sul (segundo centro), no sul da Bolívia e o terceiro centro compreendendo a região leste do Brasil (TAYLOR, 2000; SILVA; ZAPPI; TAYLOR *et al.*, 2011; GOETTSCHE; HILTON-TAYLOR; CRUZ-PIÑÓN *et al.*, 2015).

A família Cactaceae possui cerca de 176 gêneros e 2.233 espécies, segundo o The Plant List (2020). Em uma ampla avaliação com 1.478 espécies, Goettsch *et al.*, (2015) relataram que um terço das Cactaceae analisadas estavam sobre o perigo de extinção dentro das diferentes categorias de risco da lista vermelha da IUCN, colocando os cactos como quinto táxon com maior proporção de espécies ameaçadas, dentre diferentes grupos taxonômicos avaliados. No levantamento, 6,7% das espécies de cactos foram classificadas como Criticamente em Perigo, 12% em Perigo e 9,4%

como Vulnerável e dentre as principais causas de extinção está o uso para fins ornamentais e pressões exercidas pela agricultura e pecuária. Ainda segundo a análise, 86% dos cactos ameaçados (203 espécies) são extraídos de seu *habitat* natural devido ao comércio ornamental, 18% das espécies não são protegidos adequadamente em áreas de proteção e 32% dos cactos ameaçados estão desprotegidos (GOETTSCHE; HILTON-TAYLOR; CRUZ-PIÑÓN *et al.*, 2015; CSSG, 2020).

Ações de conservação de Cactaceae, bem como das suculentas em geral são promovidas desde 1950, a citar as atividades da *International Organization for Succulent Plant Study* -IOS (Organização Internacional para Estudo de Plantas Suculentas) que forneceu base para a formação do Grupo de Especialistas em Cactos e Suculentas (CSSG) da Comissão de Sobrevivência da IUCN em 1984 (SMITH; IHLENFELDT; THIEDE *et al.*, 1999). Todas as espécies da família estão incluídas no Apêndice II da CITES, com as espécies em maior grau de ameaça listadas no Apêndice I (MCGOUGH; GROVES; SMITH *et al.*, 2000). Em pesquisas relacionadas a diferentes áreas, tais como ecologia, planejamento e legislação de conservação, gerenciamento de informações, desenvolvimento de planos de recuperação e cultivo, entre outras, até 2013, 11% dos cactos estavam avaliados segundo os critérios de ameaça da IUCN e somente após a iniciativa da Estratégia Global de Conservação de Plantas (2011-2020) essa avaliação foi ampliada, isso devido ao não cumprimento dessa meta, que estava anteriormente estabelecida para 2010 (OLDFIELD, 1997; GOETTSCHE; HILTON-TAYLOR; CRUZ-PIÑÓN *et al.*, 2015; CSSG, 2020)

O Brasil apresenta um total de 37 gêneros de cactos nativos, representando 21% dos gêneros existentes no Novo Mundo, dos quais 14 são endêmicos. Das 270 espécies reconhecidas no país, 200 são endêmicas, 131 estão ameaçadas e 31 são consideradas criticamente ameaçadas, o que torna o país, e mais especificamente algumas regiões, como o sul do Rio Grande do Sul, o leste da Bahia e norte de Minas Gerais entre os *hotspots* de espécies de cactos ameaçados (GOETTSCHE; HILTON-TAYLOR; CRUZ-PIÑÓN *et al.*, 2015; CORREIA; DO NASCIMENTO; GOMES FILHO *et al.*, 2018; CSSG, 2020; ZAPPI; TAYLOR, 2020). A distribuição dos cactos brasileiros ocorre com maior ênfase em ambientes fragmentados e irregulares, restritos a enclaves de *habitats* xéricos nos biomas Caatinga, Cerrado e na Mata Atlântica (SILVA; ZAPPI; TAYLOR *et al.*, 2011; ZAPPI; FILARDI; LEITMAN *et al.*, 2015). No semiárido brasileiro, as espécies ocorrem no agreste, ecótonos entre Caatinga e Floresta Atlântica, em campos rupestres associadas a formações rochosas, como as matas secas ou Florestas Estacionais Deciduais sobre afloramentos, como bastante observadas nos cerrados (SILVA; ZAPPI; TAYLOR *et al.*, 2011).

A produção de conhecimento científico relacionada à conservação de cactos é diversificada, onde dados de biologia populacional demonstram padrões relacionados a características da história

evolutiva dentro de linhagens, baseados na forma de crescimento, acasalamento, e sistemas de polinização (HAMRICK, 2002). De maneira geral, existe uma base de dados filogenéticos importantes para o auxílio em estratégias de conservação (GUERRERO; MAJURE; CORNEJO-ROMERO *et al.*, 2019). Entretanto, nos últimos anos vem crescendo a frequência de divulgação de estudos de genética da conservação que dão ênfase aos efeitos da fragmentação ambiental sobre a diversidade genética em populações naturais de cactos ameaçados, estes com efeitos locais importantes para a manutenção da informação genética dessas espécies *in situ* (SOLÓRZANO; CUEVAS-ALDUCIN; GARCÍA-GÓMEZ *et al.*, 2014; SOLÓRZANO; DÁVILA, 2015; SOLÓRZANO; ARIAS; DÁVILA, 2016).

Em 2011, foi elaborado o primeiro Plano de Ação Nacional para Conservação (PAN) das Cactaceae do Brasil, e dentre suas metas está à identificação de *loci* de DNA microssatélite de uma espécie de cada gênero de cacto presente na lista oficial da flora brasileira ameaçada de extinção, para que estas informações sejam utilizadas visando promover mais estudos genéticos com um número maior de espécies da família (SILVA; ZAPPI; TAYLOR *et al.*, 2011). Desde então, a identificação de iniciadores para o estudo da diversidade genética de espécies de cactos ameaçados em território nacional foram desenvolvidas, além da tentativa de transferibilidade de *primers* entre espécies, sinal de progresso em relação a meta proposta (MONTEIRO; MANGOLIN; DAS NEVES *et al.*, 2015; BOMBONATO; BONATELLI; SILVA *et al.*, 2019).

Ainda no âmbito das iniciativas em conservação de representantes da família Cactaceae em níveis de ameaça, há registro da produção de conhecimento e mesmo medidas implementadas por programas de conservação da diversidade genética *ex situ*, *in vivo* por meio de coleções e banco de sementes ou *in vitro*, através de técnicas biotecnológicas como a cultura de tecidos (SILVA; ZAPPI; TAYLOR *et al.*, 2011; CAVALCANTE; GOMES; DE VASCONCELOS *et al.*, 2017; TORRES-SILVA; RESENDE; LIMA-BRITO *et al.*, 2018; CORREIA; DO NASCIMENTO; GOMES FILHO *et al.*, 2018).

1.3 *Melocactus* Link. & Otto

Melocactus Link & Otto (subfamília Cactoideae) é o gênero de cactos que apresenta o caule globoso e possui 38 espécies representantes (RIZZINI, 1982; TAYLOR, 1991; HUNT; TAYLOR; CHARLES, 2006; ZAPPI; TAYLOR, 2020). O gênero tem relevância em termos de conservação no Brasil, centro de diversidade em que possui 24 espécies nativas, sendo 22 destas endêmicas do território nacional. No Nordeste brasileiro, ocorrem 21 espécies, com o Estado da Bahia sendo considerado como o centro de diversidade e endemismo do gênero no país, com 19 espécies, entre elas dez são endêmicas e dez estão classificadas em perigo de extinção (Tabela 3) (ZAPPI; TAYLOR, 2020).

Tabela 3. Espécies do gênero *Melocactus* (Cactaceae) encontradas no Brasil.

| ESPÉCIE | IUCN | ESTADO DE OCORRÊNCIA | ENDÊMICA |
|--|------|--|----------|
| <i>Melocactus azureus</i> Buin. & Bred. | EN | BA | SIM |
| <i>Melocactus bahiensis</i> (Britton & Rose) Luetzelb. | LC | BA, MG, PE | SIM |
| <i>Melocactus braunii</i> Esteves | CR | BA | SIM |
| <i>Melocactus brederooianus</i> Buin. | CR | BA | SIM |
| <i>Melocactus concinnus</i> Buin. & Bred. | LC | BA, MG | SIM |
| <i>Melocactus conoideus</i> Buin. & Bred. | CR | BA | SIM |
| <i>Melocactus deinacanthus</i> Buin. & Bred. | EN | BA | SIM |
| <i>Melocactus ernestii</i> Vaupel | LC | AL, BA, CE, MG, PB, PE, SE | SIM |
| <i>Melocactus estevesii</i> P.J.Braun | DD | RR | SIM |
| <i>Melocactus ferreophilus</i> Buin. & Bred. | CR | BA | SIM |
| <i>Melocactus glaucescens</i> Buin. & Bred. | EN | BA | SIM |
| <i>Melocactus inconcinnus</i> Buin. & Bred. | LC | BA, PB, PE | SIM |
| <i>Melocactus lanssensianus</i> P.J.Braun | EN | PE | SIM |
| <i>Melocactus levitestatus</i> Buin. & Bred. | LC | BA, GO, MG, TO | SIM |
| <i>Melocactus longicarpus</i> Buin. & Bred. | NE | BA | SIM |
| <i>Melocactus neryl</i> K.Schum. | LC | AM | NÃO |
| <i>Melocactus oreas</i> Miq. | LC | BA, CE | SIM |
| <i>Melocactus pachyacanthus</i> Buin. & Bred. | VU | BA | SIM |
| <i>Melocactus paucispinus</i> Heimen & R.J.Paul | LC | BA | SIM |
| <i>Melocactus salvadorensis</i> Werderm. | VU | BA, MG | SIM |
| <i>Melocactus sergipensis</i> N.P.Taylor & M.V.Meiado | CR | SE | SIM |
| <i>Melocactus smithii</i> Buin. ex G.D.Rowley | LC | RR | NÃO |
| <i>Melocactus violaceus</i> Pfeiff. | VU | AL, BA, CE, ES, MG, PB, PE, RJ, RN, SE | SIM |
| <i>Melocactus zehntneri</i> (Britton & Rose) Luetzelb. | LC | AL, BA, CE, MA, PB, PE, PI, PN, SE, TO | SIM |

Fonte: ZAPPI; TAYLOR (2020)

Nota- Categorias de ameaça da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN): CR- Criticamente Ameaçada; DD- Deficiente de Dados; EN- Em perigo; LC- Menos Preocupante; NE- Não Avaliada; VU- Vulnerável.

Estima-se que a diversificação do gênero é recente, onde *Melocactus* e sua linhagem irmã - *Discocactus* se separaram a aproximadamente 6,77 a 1,07 milhões de anos, com a idade do gênero estimada em 3,81 milhões de anos (SILVA; ANTONELLI; LENDEL *et al.*, 2018). As espécies de *Melocactus* estão distribuídas ao longo da América Central e do Sul envolvendo desde as restingas litorâneas próximas ao estado do Rio de Janeiro, passando por estados do Nordeste e do Norte do Brasil e chegando até o México e Ilhas do Caribe (TAYLOR, 1991). Informações sobre reprodução e sobrevivência de espécies do grupo ajudaram a entender a história evolutiva por trás do gênero que é marcado por microendemismos, provavelmente causados pelo efeito vicariante, onde acredita-se que o centro de origem do clado foi nos Andes e sua diversificação no Estado da Bahia (TAYLOR; ZAPPI, 2004). Evidências morfológicas e genéticas também sugerem a capacidade de espécies de hibridar com outras, onde espécies promíscuas teriam poucas barreiras para polinização cruzada, em verdadeiras zonas híbridas, dessa forma, o sistema simpátrico teria influência na diversificação do gênero e no conseqüente conflito de identificação taxonômica

específica e subespecífica para alguns representantes (TAYLOR, 1991; KHAN; FRANCO; SILVA *et al.*, 2020).

O gênero *Melocactus* compartilha as características gerais das Cactaceae relacionadas à adaptação as zonas áridas e semiáridas, tais como as folhas modificadas em espinhos, variáveis em quantidade e organização e o caule suculento ou cladódio, pequenos e globosos com um ou vários gomos clorofilados, tendo função fotossintetizante (TAYLOR, 1991; TAYLOR; ZAPPI, 2004; MACHADO, 2009). Na fase reprodutiva, as flores desenvolvem-se em seu ápice agrupadas em um cefálio (Figura 1), que para algumas espécies do gênero significa o fim do crescimento em altura de sua estrutura vegetativa (TAYLOR, 1991). O cefálio (Figura 1-A), responsável pela proteção das flores e frutos (Figura 1-B e 1-D), apresenta espinhos modificados em formato discoide, exibindo uma coloração magenta-rosada (TAYLOR, 1991; MACHADO, 2009). Portanto, para o gênero, essa estrutura indica a idade da planta na fase adulta, com seu desenvolvimento variável, levando até dez anos para ocorrer, além de ser uma marca de onde se originou seu nome científico e seus nomes populares, conhecidos como “coroa-de-frade”, “cabeça-de-frade” “coroinha” “aleija-cavalo” e “tamborete-de-sogra”(RIZZINI, 1982; BRAVO FILHO; SANTANA; SANTOS *et al.*, 2018).

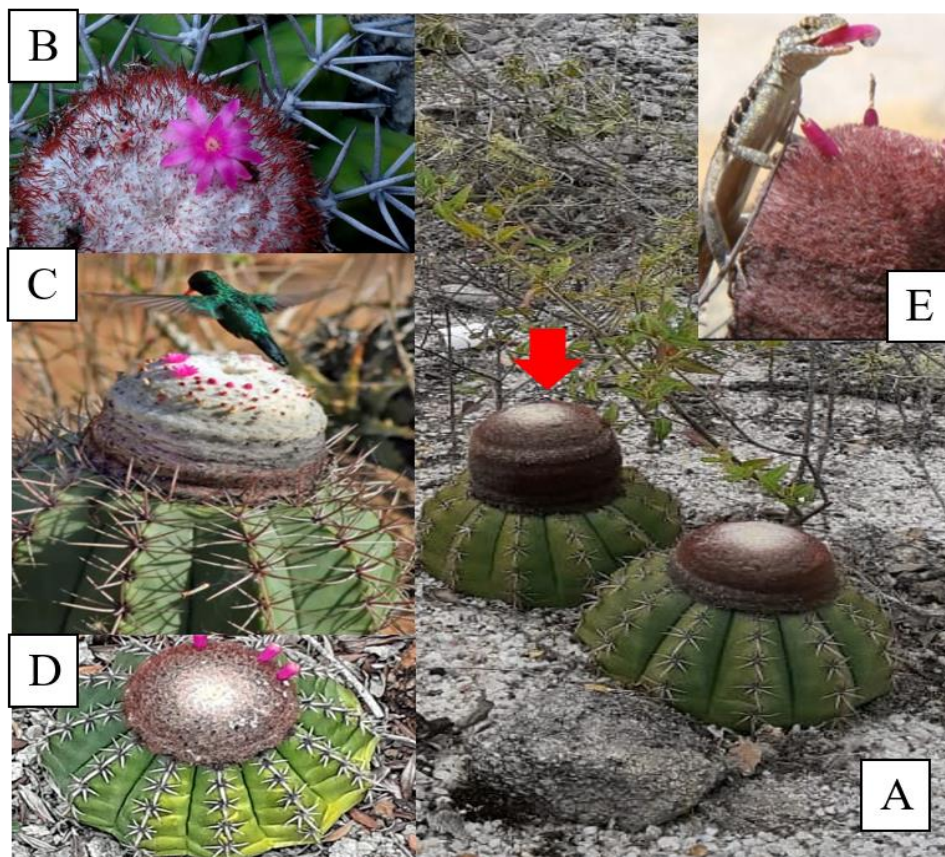


Figura 1- Representante do gênero *Melocactus*. A- cefálio Fonte: (Autor) B- Flor de *M. conoideus* Fonte: (Autor) C- Beija-flor, vertebrado visitante floral de espécies do gênero *Melocactus* Fonte: (COLAÇO; FONSECA; LAMBERT *et al.*, 2006) D- Frutos desenvolvidos no cefálio Fonte: (Autor) E- Lagarto, vertebrado dispersor de espécies de *Melocactus* Fonte:(GOMES; QUIRINO; MACHADO, 2014)

As flores são inconspícuas e de vida curta, apresentam câmaras nectarinas dentro de um tubo longo onde está presente o ovário e conseqüentemente originam-se os frutos, do tipo baga, que quando maduros ascendem e caem (TAYLOR, 1991; TAYLOR; ZAPPI, 2004). Em algumas espécies do gênero ocorrem autopolinização e podem formar frutos sem polinizadores, mas em geral, as características dos elementos florais indicam uma adaptação à polinização cruzada (TAYLOR, 1991; NASSAR; RAMÍREZ, 2004; MALUF; CARDOSO; JR *et al.*, 2009; MACHADO, 2009). Com base no estudo da sua biologia floral, é observada a tendência de sobreposição de fases fenológicas reprodutivas e características para a ornitofilia (Figura 1-C) (COLAÇO; FONSECA; LAMBERT *et al.*, 2006; ROMÃO; HUGHES; VIEIRA *et al.*, 2007; SANTOS; CERQUEIRA SILVA, 2007; FONSECA; FUNCH; BORBA, 2008). Também é relatada a presença de insetos e lagartos que são considerados como visitantes florais (NASSAR; HAMRICK; FLEMING, 2001; NASSAR; RAMÍREZ, 2004; COLAÇO; FONSECA; LAMBERT *et al.*, 2006; ROMÃO; HUGHES; VIEIRA *et al.*, 2007).

Os frutos são desenvolvidos na parte interna do órgão florífero, quando maduros são suculentos e apresentam coloração que varia de branca à vermelha, contendo várias sementes globosas ou ovoides. Os frutos são dispersos por animais vertebrados como lagartos e aves (Figura 1-E) ou invertebrados como formigas (TAYLOR; ZAPPI, 2004; NASSAR; RAMÍREZ, 2004; COLAÇO; FONSECA; LAMBERT *et al.*, 2006; BRITO-KATEIVAS, 2012). Destaca-se aqui, a importância ecológica do oferecimento de recurso tanto pelas flores quanto pelos frutos de maneira assíncrona a outras espécies em um ambiente de extrema seca e com escassez de alimento (LEAL; LOPES; MACHADO, 2006; MORAIS, 2018).

Com relação a estudos que abordem a características citogenéticas do grupo, foram observados um conjunto cromossômico básico de 11 cromossomos, com espécies com 22 cromossomos (diploide, 2n) e espécies com 44 cromossomos (tetraploide, 4n), com predominância de indivíduos tetraploides, incluindo o *M. conoideus*. Os cromossomos são pequenos, com tamanhos de 2 µm e com comprimento médio total de 40 µm nos diploides e 75 µm nos tetraploides (ASSIS; OLIVEIRA; RESENDE *et al.*, 2003). É provável que os híbridos do gênero sejam homoploides, ou seja, a hibridização ocorre sem duplicação do genoma inteiro e, portanto, sem aumento na ploidia (KHAN; FRANCO; SILVA *et al.*, 2020).

Os estudos de caracterização da variabilidade genética e sua distribuição são escassos, mas ressaltam a baixa diversidade genética populacional e a alta diferenciação entre populações, decorrente do isolamento genético em suas espécies por autoincompatibilidade ou por restrições na polinização (NASSAR; HAMRICK; FLEMING, 2001; LAMBERT; BORBA; MACHADO, 2006; LAMBERT; BORBA; MACHADO *et al.*, 2006; KHAN; FRANCO; SILVA *et al.*, 2020).

Quanto a sua utilidade econômica, o uso ornamental é a principal utilização do gênero, este graças a sua beleza exótica e resistência à seca por períodos longos e devido a isso, geralmente os indivíduos são removidos inteiros, quando adultos, do seu *habitat* para a comercialização. Também é relatado uso na alimentação animal, terapêutico em xaropes e melaços para gripe e como iguaria em alguns pratos regionais (NASSAR; RAMÍREZ, 2004; SILVA; ZAPPI; TAYLOR *et al.*, 2011).

1.4 *Melocactus conoideus* Buin. & Bred

Melocactus conoideus, nome popular “cabeça-de-frade-do-Periperi”, foi descrito por Albert Buining e Arnold J. Brederoo, em 1974, descoberto no Morro do Cruzeiro, também conhecido como Serra do Periperi. Desde 1989, a espécie é considerada endêmica do sudoeste baiano, de ocorrência em substrato de cascalho de quartzo em manchas de vegetação entre arbustos, próximos a cidade de Vitória da Conquista, apesar de que o raio de distribuição estimado para a espécie chegue ao Estado de Minas Gerais (RIZZINI, 1982; TAYLOR, 1992; CNCFLORA, 2020)

M. conoideus se distingue morfológicamente e ecologicamente das demais espécies do gênero em regiões próximas, conhecidos como o complexo *M. oreas*, que inclui *M. conoideus* e mais três espécies e pares subespecíficos, como *Melocactus oreas* subsp. *oreas* e subsp. *cremnophilus*, *M. ernestii* subsp. *ernestii* e subsp. *longicarpus* e *M. bahiensis* subsp. *bahiensis* e subsp. *amethystinus*) (TAYLOR, 1991; HUGHES, 2014). O número de aréolas, o comprimento do espinho radial, e distância entre aréolas, estão entre as principais características morfológicas que discriminam *M. conoideus* dos demais membros do complexo *M. oreas*, além do seu *habitat* de ocorrência, não compartilhado por nenhum outro membro do grupo (HUGHES, 2014). Entre as características morfológicas de *M. conoideus* estão: Corpo globoso-cônico com gomos roliços, cefálio apical esbranquiçado, espinhos marginais pardos rosados, espinho central solitário, frutos lilases e sementes brilhantes (RIZZINI, 1982; TAYLOR, 1992).

M. conoideus está na lista vermelha da IUNC de espécies ameaçadas de extinção e do CNCFlora (*Centro Nacional de Conservação da Flora*) com o status de criticamente ameaçada de extinção (CR), reflexo do histórico de pressões ambientais relacionadas à área na qual se encontra a espécie. A região é caracterizada pela transição entre Mata Atlântica, Mata de Cipó, Cerrado e Caatinga com 1.000 m de altitude, onde a ocorrência e propagação das populações da espécie são inferiores a 10 Km² (TAYLOR, 1992; CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008; CNCFLORA, 2020). Além disso, o comércio ilegal de espécimes para o mercado nacional e internacional de

horticultura levou a uma redução crítica no número de exemplares de *M. conoideus* (Figura 2) (TAYLOR, 1992; GODINHO; SCALDAFERRI; SANTOS *et al.*, 2010).



Figura 2- *M. conoideus* em *habitat* natural. (Fonte: Autor).

Soma-se aos fatores citados a expansão urbana e os impactos ambientais gerados na Serra do Periperi, área de preservação permanente de acordo com a Lei Federal nº 4. 771/ 65, e que vem sendo ocupada há mais de 60 anos, desde a construção da BR-116, através de invasões, loteamentos clandestinos e pela exploração de seus recursos naturais utilizados na construção civil, como areia, cascalho, saibro (tipo de areia grossa de rio), pedra e madeira, além da realização de queimadas (BENEDICTIS, 2007; CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008). A prática extrativista foi inicialmente realizada por moradores locais e esse impacto foi intensificado com a participação de empresas privadas que passaram a utilizar máquinas para aumentar a mineração de quartzo e para auxiliar o seu transporte (CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008).

Nos últimos 30 anos, mobilizações em prol da conservação e manutenção populacional de *M. conoideus* foram desenvolvidas, a citar a inserção da espécie no anexo I da CITES (TAYLOR, 1992; CITES, 2020). Em decorrência de ações, pesquisas e articulações com o poder público diante da perturbação resultante para a fauna, flora e para os recursos hídricos na região de ocorrência da espécie, que foi delimitado uma área de 1.300 ha por meio do Decreto Municipal nº 9.480, chamada de Parque Municipal da Serra do Periperi (PMSP), Unidade de Conservação integral desde 1999 (Figura 3) (BENEDICTIS, 2007; CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008).

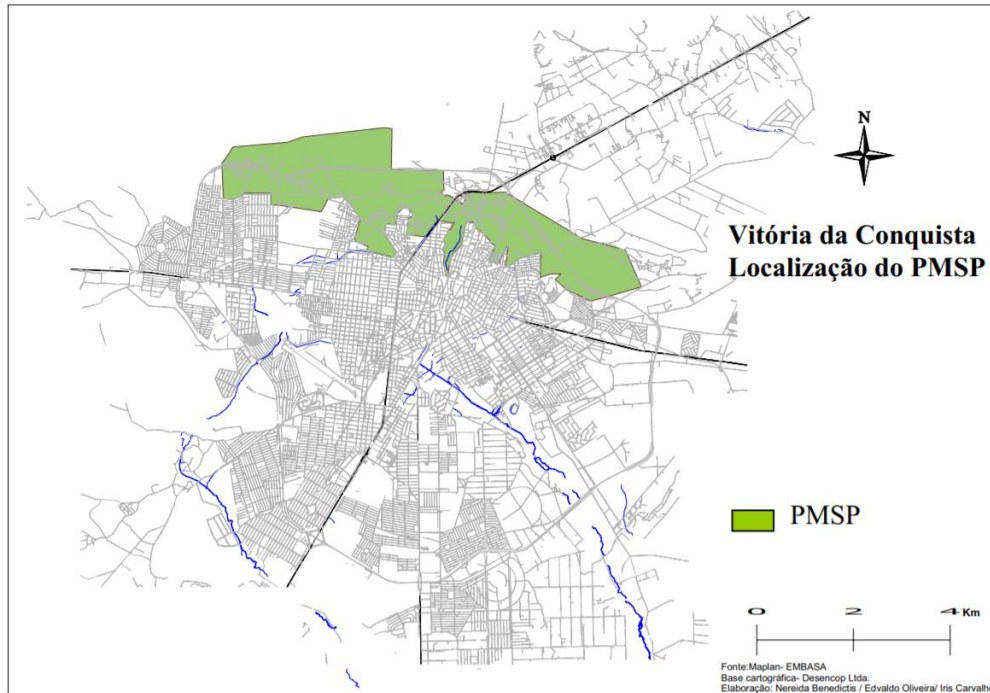


Figura 3- Mapa da cidade de Vitória da Conquista situada no sudoeste da Bahia. Em verde, destaca-se o Parque Municipal da Serra do Periperi- PMSP, que é uma área de conservação e manutenção de populações de *Melocactus conoideus*, espécie que está criticamente ameaçada de extinção. Fonte: (BENEDICTIS, 2007)

Em 2002, a associação de Orquidófilos (ANCOR), através de articulações com a prefeitura obtiveram uma área no parque de 115.644 m² onde está localizada a Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus* (Decreto Municipal N^o 10.999). Em 2003, a Organização não Governamental Meta Ambiental *Haué-dea*, apresentou uma proposta de conservação da espécie à Sociedade Britânica de Cactos e Suculentas (BCSS), conseguindo o isolamento de uma zona de recuperação, além de permitir ações de pesquisa e extensão relacionados a educação ambiental e ao conhecimento de aspectos reprodutivos da espécie e das suas interações com o meio ambiente (BENEDICTIS, 2007; CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008; GODINHO; SCALDAFERRI; SANTOS *et al.*, 2010).

A prefeitura local se comprometeu em garantir a segurança da cerca que protege a reserva ambiental do *M. conoideus*, entretanto, já foi relatado por agentes ambientais a falta de recursos para manter a segurança da área (CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008). A pressão antrópica ainda é realidade na região, onde a urbanização irregular aliada ao descarte de resíduos sólidos em diversos pontos do parque infelizmente acontece com frequência (OLIVEIRA; SOUZA; ANDRADE *et al.*, 2017).

A gerência de defesa e fiscalização ambiental realiza ações para controlar a urbanização desordenada e o desmatamento sob a área do PMSP. A prefeitura atua em ações de conservação através da promoção de atividades de educação ambiental junto à produção de mudas *in vitro* no Herbário Sertão da Ressaca, que possui atividade desde 2000 e reproduziu cerca de quarenta

espécies com finalidade de preservação, dentre elas o *M. conoideus* (PMVC, 2013; 2016). Estima-se que existam mais de 12 mil mudas cultivadas das diferentes espécies do parque, além disso, existe a proposta de elaboração de um plano de manejo visando expandir as propostas para amenizar os impactos ambientais na região (PMVC, 2017).

O estado da arte relativo ao conhecimento científico de *M. conoideus* vem crescendo com base em estudos que caracterizam aspectos relacionados a reprodução e sobrevivência da espécie, desenvolvidos em parte dentro da Reserva Ambiental do *M. conoideus*. Considera-se para a espécie o perfil relativamente próximo ao reprodutivo do gênero, onde as fenofases de floração e frutificação possuem similaridade relacionada ao período de ocorrência. As mesmas ocorrem praticamente o ano inteiro, com apenas uma interrupção na floração no mês de novembro e um pico em janeiro, sendo o pico de frutificação no mês de abril (SANTOS; CERQUEIRA SILVA, 2007). Quanto aos visitantes florais, foram observados formigas, insetos das ordens Orthoptera, Hemíptera, Microcoleoptera, Diptera e Hymenoptera (Formicidae), uma espécie de aranha (Araneae) e de beija-flor (Apodiformes) (VIEIRA, 2005).

O padrão de distribuição da espécie indica a provável ocorrência de dois sistemas de dispersão de sementes: um para distâncias longas, realizadas por animais que percorram por uma maior área de extensão e outro sistema que favorece a dispersão para curtas distâncias, realizadas por um animal com um raio de deslocamento menor, como lagartos e formigas, ou pela ausência de dispersores (OLIVEIRA; BRITO; MORAIS *et al.*, 2007; BRITO-KATEIVAS, 2012).

As sementes de *M. conoideus* são fotoblásticas positivas, possuindo maior germinabilidade quando expostas a luz por maiores períodos de tempo (REBOUÇAS; SANTOS, 2007), não compatíveis com métodos de criopreservação (CIVATTI; MARCHI; BELLINTANI, 2015). No que tange a sobrevivência em seu *habitat* natural, a espécie depende de condições relacionadas à densidade populacional, onde agregados de indivíduos formados nos fragmentos de *habitat* tendem a favorecer a sua sobrevivência, do mesmo modo que a sazonalidade em seu desenvolvimento inicial também é significativo em sua sobrevivência e a localização. Contudo, a viabilidade da espécie não variou entre regiões protegidas ou particulares, ambas com muitos sinais de influência antrópica (LUZ-FREIRE; TRINDADE; SÁ-NETO *et al.*, 2014). No entanto, os aspectos genético-moleculares não foram considerados na sobrevivência no quesito de viabilidade da espécie, o único estudo relacionado à base genética de *M. conoideus* é preliminar, relacionado a seleção de marcadores moleculares dominantes para este estudo de diversidade genética (VIEIRA; CARDOSO; SILVA *et al.*, 2019).

1.5 Marcadores moleculares

Um marcador genético é qualquer caráter que serve como ponto de referência para a análise de regiões cromossômicas, podendo ser oriundo de expressão gênica, visível ou não, mas que de alguma forma seja analisável para o qual os alelos em *loci* individuais segregam de maneira mendeliana (HENRY, 2013; TURCHETTO-ZOLET; TURCHETTO; ZANELLA *et al.*, 2017). Nesse sentido, a análise de marcadores genéticos esteve presente desde o primeiro estudo dessa natureza, tal como está o exemplo clássico das características das ervilhas estudadas por Mendel, que avaliou a manifestação fenotípica de produtos da interação entre gene e o ambiente, como por exemplo, na cor ou a textura das ervilhas, analisando esses padrões por meio de marcadores genético-morfológicos (TURCHETTO-ZOLET; TURCHETTO; ZANELLA *et al.*, 2017).

As técnicas de marcação genética evoluíram para diminuir os vieses de análise, como o número limitado de caracteres e a força da influência do ambiente na expressão gênica, com o objetivo de aumentar a especificidade de análise para responder diferentes perguntas científicas. Assim, marcadores detectados ao nível subcelular, os genético-bioquímicos como os denominados metabólicos secundários a exemplo das antocianinas e compostos fenólicos, e as enzimas como aloenzimas e isoenzimas foram utilizadas como alternativas antes das técnicas de marcação de DNA (HEDRICK, 1999; TURCHETTO-ZOLET; TURCHETTO; ZANELLA *et al.*, 2017).

Nos últimos 30 anos, as técnicas que permitem a análise de polimorfismos em nível de DNA, ou seja, que inferem diretamente as variações sequenciais que surgem como resultado de mutações, os marcadores de DNA, também conhecidos como genético-moleculares estiveram em plena evolução e entre os avanços mais significativos da biologia molecular (MILLIGAN; LEEBENS-MACK; STRAND, 1994; TURCHETTO-ZOLET; TURCHETTO; ZANELLA *et al.*, 2017). Os marcadores genético-moleculares são uma das principais ferramentas para obtenção de dados científicos em genética da conservação, partindo do pressuposto de que o nível de variação detectado no marcador *loci* reflete diretamente o nível de variabilidade existente sem sofrer influência do ambiente (MILLIGAN; LEEBENS-MACK; STRAND, 1994). De maneira geral, as vantagens na sua utilização incluem a neutralidade, o número ilimitado de informações distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma, além de ser um instrumento facilitador comparado com outros tipos de marcadores, pelo número de polimorfismos detectados e por ser relativamente fácil de recolher as amostras necessárias para a análise molecular no campo e transportá-las para o laboratório (MILLIGAN; LEEBENS-MACK; STRAND, 1994; TURCHETTO-ZOLET; TURCHETTO; ZANELLA *et al.*, 2017).

Dentre as diferentes classes de marcadores moleculares são distintas as informações que podem ser obtidas (MILLIGAN; LEEBENS-MACK; STRAND, 1994). Eles podem ser classificados como dominantes ou codominantes de acordo com sua capacidade de identificar

locus em regiões específicas, permitindo discriminar heterozigosidade de genótipos (codominante) ou não (dominante) (TURCHETTO-ZOLET; TURCHETTO; ZANELLA *et al.*, 2017). Quanto ao método de detecção, têm-se aqueles baseados em hibridização; os baseados em amplificação via PCR (Reação em cadeia da Polimerase – *Polymerase Chain Reaction*) e os marcadores baseados em sequenciamento de DNA (TURCHETTO-ZOLET; TURCHETTO; ZANELLA *et al.*, 2017). E quanto ao modo de transmissão pode-se classificar os marcadores em herança de organelas maternas, nuclear biparental, herança nuclear materna (NADEEM; NAWAZ; SHAHID *et al.*, 2018).

Dentre os marcadores baseados em PCR pode-se citar abordagens clássicas, como por exemplo: RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), ISSR (*Inter-simple sequence repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (TURCHETTO-ZOLET; TURCHETTO; ZANELLA *et al.*, 2017). Cada tipo de marcador molecular difere entre si quanto à composição e tamanho das sequências do genoma em que acessa, bem como a porcentagem de *locus* polimórficos que pode ser detectado, além da abundância no genoma, metodologias de execução, reprodutibilidade e o custo, que também tem variações significativas (NADEEM; NAWAZ; SHAHID *et al.*, 2018) (Tabela 4).

Tabela 4- Características dos Marcadores moleculares clássicos (NADEEM; NAWAZ; SHAHID *et al.*, 2018)

| Características | RAPD | AFLP | ISSR | SSR | SNP |
|------------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Modo de ação gênica | Dominante | Dominante | Dominante | Codominante | Codominante |
| Reprodutibilidade | Alta | Média | Média/ Alta | Alta | Alta |
| Nível de polimorfismo | Muito Alto | Alto | Alto | Alto | Alto |
| Qualidade de DNA requerida | Alta | Alta | Baixa | Baixa | Alta |
| Quantidade de DNA requerida | Média | Baixa | Baixa | Baixa | Baixa |
| Abundância no genoma | Alta | Alta | Média | Média | Alta |
| Custo | Baixo | Alto | Alto | Alto | Variável |
| Sequenciamento prévio | Não | Não | Não | Sim | Sim |
| Status | Ultrapassada | Ultrapassada | Atual | Atual | Atual |

Dessa forma, a capacidade informativa do marcador é relativa à pergunta biológica a ser respondida e da estrutura para realização das análises. Dentro das abordagens analíticas priorizadas para a genética da conservação, as técnicas de marcação molecular podem contribuir em diferentes graus na geração de informações para a orientação ao manejo genético (ROSSETTO; RYMER, 2013) (Tabela 5). A perspectiva futura é que técnicas com utilização das plataformas de NGS (*Next-Generation Sequencing*) possam ser utilizadas na medida em que essa tecnologia seja acessível, mas ainda existem barreiras importantes como os altos custos e o

desenvolvimento de modelos e padronização de análises bioinformáticas, o que torna as análises por técnicas clássicas de marcação molecular com importância significativa, sobretudo para análises de espécies silvestres em condições de vulnerabilidade que necessitam de gerenciamento genético (ROSSETTO; RYMER, 2013; SHAFER; WOLF; ALVES *et al.*, 2015; GARNER; HAND; AMISH *et al.*, 2016).

Tabela 5- Potencial informativo dos tipos de marcadores em questões de conservação (ROSSETTO; RYMER, 2013). NA- Não Aplicável.

| Questões em conservação | Dominante | Codominante |
|--|------------------|--------------------|
| Consanguinidade | Médio | Alto |
| Depressão por consanguinidade | NA | NA |
| Perda de diversidade genética | Médio | Médio |
| Perda de potencial adaptativo | Médio | Baixo |
| Fluxo gênico | Alto | Alto |
| Identificação de unidades de conservação | Alto | Alto |
| Aumento do potencial adaptativo | Médio | Baixo |
| Processos temporais | Baixo | Médio |

1.5.1- ISSR- (*Inter Simple Sequence Repeat*)

A técnica de marcação molecular por ISSR surgiu no início dos anos 90, sendo divulgada por diferentes grupos de pesquisa (MEYER; MITCHELL; FREEDMAN *et al.*, 1993; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; GUPTA; CHYI; ROMERO-SEVERSON *et al.*, 1994). É altamente polimórfico, podendo ser aplicado para analisar quase qualquer organismo eucarioto. Essa técnica baseada em PCR supera a maioria das limitações observadas em técnicas como o AFLP, RAPD e SSR, onde métodos como RAPD exigem um alto controle experimental para garantir reprodutibilidade, o AFLP possui um alto custo em sua metodologia laboriosa e o SSR necessita do conhecimento prévio das sequências de flanqueamento para desenvolver *primers* específicos para acesso ao polimorfismo (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; ROSSETTO; RYMER, 2013). O ISSR, contudo, utiliza sequências entre duas regiões microssatélites idênticas como iniciadores presentes a uma distância que possa ocorrer a amplificação de segmentos de DNA orientadas em direções opostas (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; NADEEM; NAWAZ; SHAHID *et al.*, 2018).

A técnica usa um único *primer*, normalmente longo, que se ancora em regiões repetitivas que podem ser de di, tri, tetra ou penta-nucleotídeos em *tandem* que geralmente tem de 15 a 30 pb (pares de bases) distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma. Isto permite a amplificação de sequências ISSR de tamanhos diferentes, geralmente entre 200 a 2.000 pb, podendo ser detectados em eletroforese utilizando gel de agarose ou poliacrilamida (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; NADEEM; NAWAZ; SHAHID *et al.*, 2018). Dessa forma as sequências microssatélites servem

de maiores fontes de polimorfismos devido à maior taxa de mudanças que recebem ao longo da evolução como as resultantes de falhas no mecanismo de replicação de DNA e mutações, que passadas através das gerações geram variabilidade nos polimorfismos de comprimento de fragmento (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

Os marcadores ISSR são dominantes e não necessitam do conhecimento prévio do genoma para a sua obtenção, fazendo com que sejam facilmente transferidos para outras espécies. Segregam por leis mendelianas de herança e podem ser usados para o desenvolvimento de marcadores codominantes (NG; TAN, 2015; NADEEM; NAWAZ; SHAHID *et al.*, 2018). São simples e de fácil interpretação em comparativo com o RAPD e por isso são amplamente usados para identificar, classificar e quantificar a diversidade genética de espécies silvestres, bem como para o estudo de algumas doenças genéticas, caracterização de germoplasma, melhoramento genético e para reconstrução filogenética de taxons intimamente relacionados, através de programas de mapeamento (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; NG; TAN, 2015).

Os marcadores ISSR já foram empregados em estudos recentes envolvendo Cactaceae, a exemplo dos gêneros: *Opuntia* (REALINI; GONZÁLEZ; FONT *et al.*, 2015; VALADEZ-MOCTEZUMA; SAMAH; LUNA-PAEZ *et al.*, 2015), *Cereus* (DOMINGUES; MACHADO; MANGOLIN *et al.*, 2017), *Hylocereus* (TAO; QIAO; WEN *et al.*, 2014) para a espécie *Rhipsalis dissimilis* (GIOVANONI, 2014), *Ferocactus histrix* (CASTRO-FELIX; ROSAS-ESPINOZA; DÍAZ-CÁRDENAS *et al.*, 2014), *Discocactus zehntneri* (JESUS; CONCEIÇÃO; SCHNADELBACH *et al.*, 2019) em trabalhos com ênfase a estudos de diversidade genética para conservação, para interesse econômico ou análises filogenéticas. Não há muitas informações a respeito de trabalhos envolvendo o gênero *Melocactus*, Torres-Silva *et al.* (2018) utilizaram ISSR na busca para estabelecer um protocolo para produção *in vitro* de *M. glaucescens* avaliando a relação de alterações morfológicas e genéticas com e sem o uso de reguladores de crescimento vegetal, possibilitando analisar uma alternativa de propagação da espécie *in vitro*.

Nesse contexto, trabalhos envolvendo marcadores ISSR para *Melocactus conoideus*, espécie criticamente ameaçada de extinção, são inexistentes. Dessa forma, a caracterização por marcadores ISSR para acessar a variabilidade genética de populações *M. conoideus* tem o potencial para expandir as informações relativas ao comportamento populacional e direcionar estratégias de conservação para essa espécie.

CAPÍTULO I



SELEÇÃO DE PRIMERS *INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT* EM *Melocactus conoideus* BUIN. & BRED. (CACTACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DO SUDOESTE DA BAHIA, BRASIL

Anderson Carvalho Vieira¹, Tarcísio dos Santos Cardoso², Thalana Souza Santos Silva³, Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva^{1,2,3}, Elisa Susilene Lisboa dos Santos^{1,2,3*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

² Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

³ Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia *Autora de Correspondência (elisa.lisboa@uesb.edu.br)

Recebido em: 06/04/2019 – Aprovado em: 10/06/2019 – Publicado em: 30/06/2019
DOI: 10.18677/EnciBio_2019A122

RESUMO

O *Melocactus conoideus* é uma espécie listada como criticamente ameaçada de extinção, o que evidencia a necessidade de ações de pesquisa que contribuam para a sua proteção. No entanto, são poucos os estudos acerca da espécie em diversos aspectos, sobretudo os embasados em informações genéticas com o uso de marcadores moleculares. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de segmentos de DNA amplificados e selecionar *primers Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) visando subsidiar análises genéticas em *M. conoideus*. Quatro genótipos da espécie foram utilizados para a análise molecular com 23 *primers* ISSR. Foram observadas 118 marcas (40,7% polimórficas) com média de 7,87 marcadores por iniciador. Com base no padrão de geração de marcas, 15 *primers* se mostraram adequados, exibindo de 4 a 11 marcadores com boa qualidade de visualização. A heterozigosidade esperada e o Conteúdo de Informação Polimórfica também foram estimados, exibindo valores médios de 0,43 e 0,33, respectivamente. Estes marcadores possuem potencial uso em estudos moleculares em *M. conoideus* incluindo estimativas de variabilidade e estruturação genética visando conhecer a base genética da espécie e auxiliar no manejo para a conservação.

PALAVRAS -CHAVE: Cabeça-De-Frade; Espécie Criticamente Ameaçada; Marcadores Moleculares.

SELECTION OF INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT PRIMERS IN *Melocactus conoideus* BUIN. & BRED. (CACTACEAE), ENDEMIC SPECIES OF SOUTHWEST BAHIA, BRAZIL

ABSTRACT

Melocactus conoideus is a species listed as critically endangered, which evidences the need for research actions that contribute to its protection. However, there are few studies about the species in several aspects, mainly genetic information from of

molecular markers. In this context, the present work aimed to characterize the profile of amplified DNA segments and to select Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) primers to support genetic analysis in *M. conoideus*. Four genotypes of the species were used for molecular analysis with 23 ISSR primers. A total of 118 markers (40.7% polymorphic) were observed and a mean of 7.87 markers per primer. Based on the pattern of band generation, 15 primers appeared adequate, displaying from 4 to 11 markers with good quality of visualization. The means of the expected heterozygosity and polymorphic information content were 0.43 and 0.33, respectively. These markers have potential use in genetic-molecular studies in *M. conoideus* including genetic variability and structure in order to know the genetic basis and to aid in the conservation strategies.

KEYWORDS: Cabeça-De-Frade; Critically Endangered Species; Molecular Markers.

INTRODUÇÃO

O gênero *Melocactus* Link & Otto (família Cactaceae) possui cerca de 38 espécies distribuídas pela América Central e do Sul, comuns em zonas áridas e semiáridas, e apesar da ampla distribuição é um grupo marcado por endemismos (RIZZINI, 1982; TAYLOR, 1991; CORREIA et al., 2018). No Brasil, atualmente 23 espécies são encontradas na região leste do país, ocorrendo nos estados do Amazonas, Roraima, Piauí, Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (ZAPPI et al., 2018). O estado da Bahia contém a maior diversidade e número de espécies endêmicas do gênero; das 19 espécies que ocorrem no estado, 10 são endêmicas e sete classificadas dentro das diferentes categorias de risco da lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) (CORREIA et al., 2018; ZAPPI et al., 2018).

Dentre as espécies ocorrentes na Bahia, destaca-se o *Melocactus conoideus* Buin. & Bred conhecido popularmente como “cabeça-de-frade-do-Periperi” (RIZZINI, 1982; TAYLOR, 1992; CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008). A espécie ocorre em manchas de vegetação com solo rico em cascalho de quartzo, dentro dos limites da mesorregião do município de Vitória da Conquista - BA. *M. conoideus* é classificado como criticamente ameaçado na lista vermelha da IUNC, devido ao histórico de pressão antrópica envolvendo a comercialização ilegal da espécie para fins ornamentais em mercado nacional e internacional e a fragmentação ambiental gerada a partir da urbanização irregular (TAYLOR, 1992; CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008; MACHADO et al., 2013; LUZ-FREIRE et al., 2014).

Para a conservação e manutenção populacional de *M. conoideus*, medidas contra a comercialização ilegal foram criadas pela *International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES), além da destinação de uma área específica dentro da Unidade de Conservação do Parque Municipal da Serra do Periperi (TAYLOR, 1992; MACHADO et al., 2013). Na Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus* são realizados estudos associados ao conhecimento ecológico da espécie (CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008; MACHADO et al., 2013). Também é realizada a produção de mudas no Herbário Sertão da Ressaca, com a finalidade de aumento populacional de *M. conoideus* dentro da área da reserva (PMVC, 2016; PMVC, 2017).

Em detrimento ao *status* de ameaça do *M. conoideus*, ainda é relativamente baixa a produção científica acerca da espécie em diversos aspectos, o que impossibilita o desenvolvimento de ações de proteção e manejo efetivas. Nesse sentido, as análises genético-moleculares podem auxiliar no acesso a informações

acerca da base genética da espécie, contribuindo para a compreensão do *status* de variabilidade genética bem como das interações ecológicas relacionadas aos aspectos reprodutivos que influenciam na sobrevivência de populações em ambiente natural, indispensáveis para o sucesso em ações de programas de proteção de espécies (FARJADO et al., 2016).

Uma importante ferramenta para se adquirir dados em nível de DNA são os marcadores moleculares. Dentre os marcadores baseados na PCR (*Polymerase Chain Reaction*) está o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), que explora regiões repetitivas (microssatélites) distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). A técnica utiliza um único iniciador (*primer*) possuindo entre 16 a 25 pares de bases (pb), que se ancora nas regiões repetitivas, amplificando regiões inter-SSR, geralmente entre 200 a 2000 pb (REDDY et al., 2002). Tais marcadores são amplamente usados em análises genéticas relacionados à identificação, classificação e quantificação da variabilidade genética de espécies silvestres de interesse ecológico, graças ao seu nível de reprodutibilidade, além de não exigirem o conhecimento prévio do genoma para sua aplicação (REDDY et al., 2002).

Um estágio que antecede o início de análises baseadas em marcação molecular é a descrição do perfil de marcação e seleção de *primers* adequados, sendo uma fase preliminar de triagem daqueles que possuam a melhor visualização dos *amplicons*, reprodutibilidade e existência de polimorfismo, subsidiando informações cruciais para os resultados posteriores em estudos de genética populacional (COSTA et al., 2015; MATOS-OLIVEIRA, et al., 2018; SILVA et al., 2018). Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de geração de marcadores e selecionar *primers* ISSR adequados para emprego em análises moleculares em *Melocactus conoideus*.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA) localizado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) *campus* Juvino Oliveira, Itapetinga, Bahia. Foi usado como fonte de DNA genômico de *M. conoideus* frutos coletados de quatro espécimes oriundas da Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus*, dentro do Parque Municipal Serra do Periperi (14°49'49"S; 40°50'0.3"W), em Vitória da Conquista – Bahia. O DNA foi obtido através do protocolo CTAB (*Cetyl Trimetil Amônio Bromide*) seguindo a rotina estabelecida por Doyle e Doyle (1990).

A qualidade e quantidade do DNA genômico foi avaliado através da técnica de eletroforese em malha de agarose 1% (m/v) mergulhado em tampão Tris, Borato, EDTA (TBE) 1X a 70 volts por 120 minutos. A geração das imagens resultantes da corrida foi realizada por meio do sistema de fotodocumentação Kodak, sob exposição à luz ultravioleta usando o intercalante GelRed® (BIOTIUM) e a avaliação da concentração de DNA genômico foi realizada através da comparação de intensidade das amostras com o DNA do fago lambda (Lambda DNA/HindIII Marker).

Foram realizadas ampliações via PCR utilizando 23 sequências de *primers* ISSR, realizadas utilizando termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) em um volume total de 16 µL, correspondendo a 15 ng de DNA genômico, tampão de amplificação 10X (20 mM Tris-HCl [pH 8,4] e 50 mM de KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 1 pM de primer e 1U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, EUA). A configuração

dos ciclos de PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, 34 ciclos (94°C por 50 segundos, 48°C por 50 segundos e 72°C por um minuto), e extensão final a 72°C por cinco minutos, seguindo o protocolo sugerido por Santos et al. (2011).

Os *amplicons* foram corados com GelRed® (BIOTIUM) e separados por corrida eletroforética em malha de agarose a 2% (m/v) mergulhado em tampão TBE 1X a 120 volts por 120 minutos. A geração das imagens resultantes da corrida foi realizada por meio de fotodocumentação, através da exposição à luz ultravioleta.

Da análise do gel foi construída uma base de dados binários sendo atribuído 0 para ausência, 1 para a presença de marcadores e 9 para dados inconclusivos. Os *primers* foram classificados através do padrão de geração de fragmentos observados, em (i) Bom - *amplicons* visíveis em todos os genótipos; (ii) Ruim - *amplicons* em todos os genótipos com má qualidade de visualização, e; (iii) Ausente - ausência de *amplicons* visíveis.

A tabela de dados binários em Excel® serviu para o cálculo das frequências alélicas para a determinação do índice de heterozigosidade esperada (H_e) e do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC, *Polymorphism Information Content*), avaliados com o *software* GENES (CRUZ, 2006). A H_e do *locus* foi calculada pela fórmula proposta por NEI (1973), onde é considerada que as populações estudadas estão em equilíbrio: $H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$. Onde: $x_i =$ Frequência de alelo i , $k =$ Número de alelos. O PIC quantifica a informação do *locus* marcador, calculado de acordo a seguinte fórmula: $PIC = 1 - \left[\sum_{i=1}^k x_i^2 \right] - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i x_j$ (BOLSTEIN et al., 1980).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de geração de marcas dos iniciadores foi classificado considerando a quantidade de geração de marcas das amostras avaliadas e a qualidade de visualização das mesmas, exemplificadas na Figura 1.

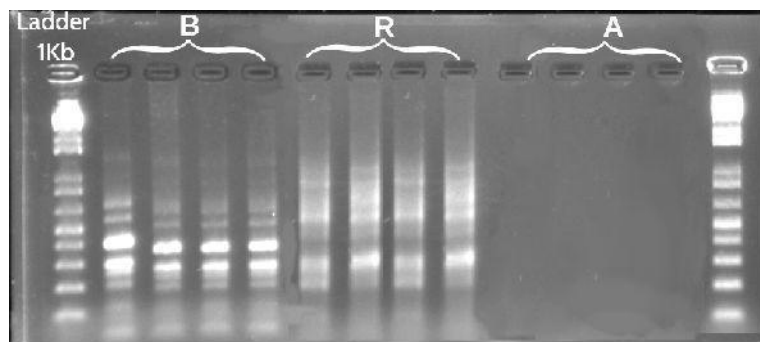


FIGURA 1. Ilustração da classificação de perfil de geração de fragmentos genômicos de *Melocactus conoideus* através da amplificação por *primers* ISSR. Classificados como: (B) Bom (R) Ruim e (A) ausente. Fonte: Autores.

Do total de 23 *primers* ISSR testados, 15 (65,2%) apresentaram marcas nítidas e possibilitaram a realização da análise de polimorfismo (Tabela 1). Para estes iniciadores, foi observado 118 marcadores no total, com média de 7,87 marcadores por *primer*. A quantidade de marcações por *primer* variou de quatro

(TriCAC3`RC) a 11 (TriCGA3`RC). Quarenta e oito marcadores foram polimórficos, sendo o *primer* DiGA3`T o que apresentou o maior número de marcadores polimórficos (8). Dois iniciadores (TriCAC3`RC e TriTGT3`YC) apresentaram apenas marcadores monomórficos.

TABELA 1. Perfil de segregação de fragmentos amplificados e polimorfismo para os 23 *primers Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)* no acesso às regiões genômicas de *Melocactus conoideus*.

| Iniciadores Código | Sequência | N | MP | P(%) | PA |
|-----------------------|-----------------------|------------|-----------|--------------|----------|
| DiCA3`G | (CA) ₈ G | 7 | 3 | 42,8 | B |
| DiCA3`RG | (CA) ₈ RG | 6 | 2 | 33,3 | B |
| DiCA3`YG | (CA) ₈ YG | - | - | - | A |
| DiGA3`C | (GA) ₈ C | 10 | 3 | 30 | B |
| DiGA3`RC | (GA) ₈ RC | 10 | 5 | 50 | B |
| DiGA3`T | (GA) ₈ T | 10 | 8 | 80 | B |
| TriCAC3`RC | (CAC) ₅ RC | 4 | 0 | 0 | B |
| TriCAC3`YC | (CAC) ₅ YC | - | - | - | R |
| TriCAC5`CY | CY(CAC) ₅ | - | - | - | A |
| TriCAG3`RC | (CAG) ₅ RC | - | - | - | R |
| TriGTG3`YC | (GTG) ₅ YC | - | - | - | R |
| TriTGT3`YC | (TGT) ₅ YC | 5 | 0 | 0 | B |
| TriAAC3`RC | (AAC) ₅ RC | 9 | 7 | 77,7 | B |
| TriAAG3`RC | (AAG) ₅ RC | 10 | 2 | 20 | B |
| TriACG3`RC | (ACG) ₅ RC | 5 | 1 | 20 | B |
| TriAGA3`RC | (ACG) ₅ RC | 7 | 2 | 28,5 | B |
| TriTGG3`RC | (CGC) ₅ RC | 7 | 2 | 28,5 | B |
| TriCGA3`RC | (GCA) ₅ RC | 11 | 4 | 36,3 | B |
| TriCGC3`RC | (GGA) ₅ RC | 9 | 6 | 66,6 | B |
| TriGAC3`RC | (GAC) ₅ RC | - | - | - | R |
| TriGCA3`RC | (GCA) ₅ RC | - | - | - | R |
| TriGCC3`RC | (CGC) ₅ RC | - | - | - | A |
| TriGGA3`RC | (GGA) ₅ RC | 8 | 3 | 37,5 | B |
| TOTAL | | 118 | 48 | 40,7% | |

Nota: **N** número de marcas, **MP** Marcas polimórficas, **P(%)** Percentual de polimorfismo, **PA** Perfil de Amplificação, **B** Bom, **R** Ruim e, **A** Ausente.

Estudos prévios de caracterização de sequências de *primers* ISSR realizados para diferentes espécies vegetais e animais apresentaram resultados variáveis no que diz respeito ao número de marcadores observados e polimorfismo. Neste sentido, análise em *Croton linearifolius* a partir dos mesmos *primers* utilizados neste estudo, permitiu a geração de 136 marcadores e 22,8% de polimorfismo (SILVA, et al., 2018). Em *Atta sexdens*, dos 23 *primers* testados 12 foram considerados ideais para a espécie, apresentando 88 marcadores e 59% de polimorfismo (MATOS-OLIVEIRA, et al., 2018). Em espécies do gênero *Passiflora* foram testados alguns

dos *primers* usados neste estudo, mostrando um alto percentual de marcas polimórficas (SANTOS, et al., 2011).

Para a família Cactaceae, a análise de 17 sequências de *primers* ISSR em *Cereus* sp. permitiu a geração de 180 marcadores e a seleção de 15 *primers* polimórficos (DOMINGUES et al., 2017). Esses dados mostram que um conjunto de *primers* ISSR evidenciam uma variedade de padrões de geração de marcas para diferentes organismos, o que implica na necessidade de análise prévia destes *primers* antes de começar o estudo para uma espécie. Para *M. conoideus* os 15 marcadores considerados como bons neste trabalho (Tabela 1) possuem potencial uso em estudos moleculares, mesmo aqueles considerados como monomórficos, já que estes podem evidenciar polimorfismos em número maior de genótipos analisados.

Os índices: conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e heterozigidade esperada (He) foram gerados para os *primers* que permitiram a genotipagem molecular. O PIC atingiu valores entre 0,29 e 0,37, com valor médio de 0,33. A He exibiu valores entre 0,36 a 0,49, com média de 0,43 (Tabela 2). O PIC corresponde à eficiência do iniciador em detectar polimorfismo, valores acima de 0,5 indicam que o *primer* é altamente informativo, entre 0,25 e 0,5 moderadamente informativo e abaixo de 0,25 pouco informativo (BOLSTEIN et al., 1980). Nesse sentido, utilizando esse parâmetro, pode-se considerar que os *primers* usados neste estudo são moderadamente informativos para a análise genética de *M. conoideus*.

TABELA 2. Conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e Heterozigidade esperada (He) a partir de *primers* ISSR na análise em de *Melocactus conoideus*.

| Iniciadores | He | PIC |
|--------------|------|------|
| DiCA3`G | 0,40 | 0,31 |
| DiCA3`RG | 0,41 | 0,32 |
| DiGA3`C | 0,43 | 0,33 |
| DiGA3`RC | 0,36 | 0,29 |
| DiGA3`T | 0,36 | 0,29 |
| TriCAC3`RC | 0,49 | 0,37 |
| TriTGT3`YC | 0,49 | 0,37 |
| TriAAC3`RC | 0,41 | 0,32 |
| TriAAG3`RC | 0,44 | 0,34 |
| TriACG3`RC | 0,46 | 0,35 |
| TriAGA3`RC | 0,47 | 0,36 |
| TriTGG3`RC | 0,47 | 0,36 |
| TriCGA3`RC | 0,42 | 0,32 |
| TriCGC3`RC | 0,43 | 0,33 |
| TriGGA3`RC | 0,44 | 0,34 |
| MÉDIA | 0,43 | 0,33 |

A He é um índice de estimativa de variabilidade genética destinada para o estudo de genética de populações que utiliza as frequências de ocorrência de *loci*

monomórficos e polimórficos dentro e entre populações para estimativa do grau de estruturação genética ocorrente (NEI, 1973). Neste estudo, esse parâmetro foi usado como forma de observar o quanto os *primers* ISSR acessam de variação dentro de uma amostra pequena de genótipos de *M. conoideus*.

Os *primers* ISSR demonstraram acessar uma diversidade genética relativamente alta para a espécie, considerando estudos de variabilidade genética para membros da família, tal como *Ferocactus histrix* com valores médios de $H_e = 0.178$ à 0.195 (CASTRO-FELIX et al., 2014). Contudo, na medida em que se aumenta o número de genótipos avaliados os valores tanto de H_e quanto de PIC podem sofrer variação.

Os *primers* ISSR têm sido aplicados em diferentes espécies de Cactaceae a fim de desvendar questões diversas a exemplo de estudos de variabilidade genética (CASTRO-FELIZ et al., 2014; GANOPOULOS, 2015), análises filogenéticas (REALINI et al., 2015) e identificação de variação somaclonal em raízes cultivadas *in vitro* (TORRES-SILVA et al., 2018). A maior parte destes trabalhos visa contribuir com informações que permitam auxiliar no manejo das espécies para sua conservação. Tendo em vista a baixa quantidade de informações moleculares em bancos de dados acerca de muitas espécies de Cactaceae, o uso de marcadores informativos e que não exigem informações prévias do genoma como os ISSR, configuram em excelentes meios de obter informação genético-molecular de forma segura, rápida e de relativo baixo custo.

Trabalhos de seleção de marcadores moleculares com o gênero *Melocactus* são escassos e estudos com ênfase aos efeitos da fragmentação ambiental sobre a diversidade genética de espécies da família das cactáceas com marcadores moleculares também, sobretudo com espécies endêmicas e dentro das categorias de ameaça da IUNC (CERQUEIRA -SILVA; SANTOS, 2008; ZAPPI et al., 2011; MACHADO et al., 2013). Portanto, a perspectiva desse estudo é servir como fonte de informação para análises moleculares futuras com a espécie, com vistas à compreensão de aspectos ecológicos que influenciam na reprodução, sobrevivência e diversidade da espécie, que conseqüentemente impactam na melhoria do manejo de *M. conoideus*, podendo servir de extensão para outras espécies do gênero.

CONCLUSÃO

Este trabalho representa os primeiros esforços para análise genético-molecular em *Melocactus conoideus*. Os quinze marcadores ISSR aqui caracterizados com bom perfil de amplificação atestam a eficiência destes iniciadores em acessar regiões genômicas de *M. conoideus* e possuem potencial uso em diversas análises genéticas, devendo, portanto ser priorizados em futuros estudos. Neste contexto, os marcadores ISSR selecionados estão sendo empregados em análise de diversidade e estrutura genética de populações naturais de *M. conoideus* e os futuros resultados deverão auxiliar no manejo consciente visando à conservação da espécie.

REFERÊNCIAS

BOLSTEIN, D; WHITE, R.L; SKOLNICK, M; DAVIS, R.W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686077/pdf/ajhg00189-0020.pdf>>

CASTRO-FELIZ, P.; ROSAS-ESPINOSAS, V. C.; DÍAZ -CÁRDENAS, B.; PÉREZ-VALENCIA, L. I HUERTA-MATÍNEZ, F. M. et al. Genetic diversity within a declining natural population of *Ferocactus histrix* (DC) L. **Plant species biology**, v. 29, n. 3, p. E21-E30, 2014. ISSN 0913-557X. DOI: <<https://doi.org/10.1111/1442-1984.12028>>.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, D. L. 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**, v. 5, n.3, p. 12-17, 2008. Disponível em: <http://www.ibiologia.unam.mx/slccs/www/pdf/Boletin/Vol_5_No_3_Sep_Dic_2008.pdf>

CORREIA, D.; DO NASCIMENTO, E. H. S.; GOMES FILHO, A. A. H.; LIMA, M.; DE ALMEIDA, J. V. F. *Melocactus Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E)*, 2018. Disponível em:<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1088141/1/DOC18001.pdf>>

COSTA, D. F.; VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)(Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-246/14>>. doi: 10.1590/0100-2945-246/14

CRUZ, C. D. **Programa Genes: estatística experimental e matrizes**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 382 p. 2006.

DOMINGUES, S. D.; NEVES, A. F.; MANGOLIN, C. A. Seleção de primers para análise de Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) em *Cereus* sp . (Cactaceae) Selection of primers for Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) in *Cereus* sp (Cactaceae). **Revista Biotecnologia & Ciência**, v.6(ss), p. 46–54, 2017. Disponível em: < <http://www.revista.ueg.br/index.php/biociencia/article/view/6799>>

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.

FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A.; & MOLINA, W. F. Conservação Genética de Populações Naturais: Uma Revisão para Orchidaceae. **Biota Amazônia**, v. 6, n. 3, p. 108–118. 2016. DOI: <<https://doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n3p108-118>>

GANOPOULOS, I.; KALIVAS, A.; KAVROULAKIS, N.; XANTHOPOULOU, A.; MASTROGIANNI, A. et al. Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers. **Plant Gene**, v. 2, p. 29-33, 2015. ISSN 2352-4073. DOI: <10.1016/j.plgene.2015.04.001>

LUZ-FREIRE, H. P.; TRINDADE, D. P. F. D.; SÁ-NETO, R. J. D; CORRÊA, M. M. Survival dynamics of *Melocactus conoideus* Buining & Brederoo (Cactaceae), a threatened species endemic to northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasileira.**, Feira de Santana, v. 28, n. 2, p. 293-297, Jun. 2014 DOI:< 10.1590/S0102-33062014000200016>

MACHADO, M.; TAYLOR, N.P.; BRAUN, P. & ZAPPI, D. *Melocactus conoideus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2013**: e.T40914A2943248, 2013. DOI: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20131.RLTS.T40914A2943248.en>>. Downloaded on 03 December 2018.

MATOS-OLIVEIRA, C. F.; DIAS, C. S.; SANTOS, E. S. L.; & SILVA, C. B. M. C. Caracterização e seleção de marcadores ISSR para análise genético-populacional de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 9, p. 4-6, 2018. Disponível em:<https://ifgoiano.edu.br/periodicos/index.php/multiscience/article/viewFile/353/460>

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.70, p.3321-3323, 1973. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC427228/pdf/pnas00139-0051.pdf>>

PMVC- Prefeitura Municipal de Vitória da Conquista. 2016. Disponível em:<<http://www.pmvc.ba.gov.br/herbario-municipal-produz-mais-de-3-mil-mudas-em-quatro-meses/>> Acesso em: 13 de novembro de 2018, 7:00.

PMVC- Prefeitura Municipal de Vitória da Conquista. 2017. Disponível em: <<http://www.pmvc.ba.gov.br/herbario-municipal-auxilia-no-reflorestamento-da-serra-do-periperi/>> Acesso em: 13 de novembro de 2018, 7:00.

RIZZINI, C. T. *Melocactus* no Brasil. IBDF, Jardim Botânico, 1982.

REALINI, M. F.; GONZÁLEZ, G. E.; FONT, F.; PICCA, P. I.; POGGIO, L. et al. Phylogenetic relationships in *Opuntia* (Cactaceae, Opuntioideae) from southern South America. **Plant systematics and evolution**, v. 301, n. 4, p. 1123-1134, 2015. ISSN 0378-2697. DOI: <10.1007/s00606-014-1154-1>

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002. Disponível:< <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020691618797>>

SANTOS, L. F.; DE OLIVEIRA, E. J.; DOS SANTOS SILVA, A.; DE CARVALHO, F. M.; COSTA, J. L. et al. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, v. 49, n. 7-8, p. 540-554, 2011. ISSN 0006-2928.

SILVA, T. S. S.; FREITAS, J. S.; SANTOS, E. S. L.; DOS SANTOS CARDOSO, T.; & CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Croton linearifolius* Mull. Arg. como subsídio para estudos genéticos. **Multi-**

Science Journal, v. 1, n. 10, p. 4-8, 2018. Disponível em:<
<https://www.ifgoiano.edu.br/periodicos/index.php/multiscience/article/view/354>>

TAYLOR, N. P. **The genus Melocactus (Cactaceae)** in Central and South America. *Bradleya*, 9, 1-80, 1991. DOI:<10.25223/brad.n9.1991.a1>

TAYLOR, N. P. Plants in peril, 17 melocactus conoideus. **Curtis's Botanical Magazine**, v. 9, n. 3, p. 138-141, 1992. DOI:< 10.1111/j.1467-8748.1992.tb00086.x>

TORRES-SILVA, G.; RESENDE, S.; LIMA-BRITO, A.; BEZERRA, H.; DE SANTANA, J. et al. In vitro shoot production, morphological alterations and genetic instability of *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), an endangered species endemic to eastern Brazil. **South African journal of botany**, v. 115, p. 100-107, 2018. ISSN 0254-6299. DOI:< 10.1016/j.sajb.2018.01.001>

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; PASSAIA, G.; ZANELLA, C. M. Capítulo 1 Marcadores genéticos baseados em DNA. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**, – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 12, 2017. Disponível em:<
https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e_book_marcadores_moleculares_sbg_2017_final.pdf>

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; RIBEIRO-SILVA, S.; MACHADO, M.; MORAES, E. D. et al. Plano de ação nacional para a conservação das cactáceas. *Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade*, 2011. Disponível em:<
http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan_cactaceas/livro_cactaceas_web.pdf>

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; SANTOS, M. R.; LAROCCA, J. **Cactaceae** in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB1558>>

CAPÍTULO II

Diversidade e estrutura genético-molecular de *Melocactus conoideus* Buin. & Bred (Cactaceae) espécie endêmica do sudoeste baiano e criticamente ameaçada de extinção

Anderson Carvalho Vieira¹, Carlos Bernard Moreno Cerqueira Silva e Elisa Susilene Lisboa dos Santos²

¹Mestrando em Ciências Ambientais pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia(UESB)/Campus de Itapetinga-BA e-mail: anderson_vieira2@hotmail.com.br

²Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (PPGCA / UESB) e-mail: elisa.lisboa@uesb.edu.br

Resumo: *Melocactus conoideus* Buin. & Bred é um cacto criticamente ameaçado de extinção de acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) e carece de estudos genéticos para embasar estratégias de conservação. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a diversidade e estrutura genética de *Melocactus conoideus* por meio de marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). Foram realizadas amplificações do DNA genômico de 126 genótipos de *M. conoideus* obtidos em Vitória da Conquista, Bahia, dentro e fora dos limites da Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus*. Para tanto, foram utilizados 13 iniciadores ISSR sendo o perfil de amplificação genética submetido a análises estatísticas de diversidade e estrutura genética. Cento e noventa e uma marcas foram analisadas, sendo 188 destas (97,7%) polimórficas. Foi observada diversidade genética moderada ($h = 0,29$), com uma variação significativa quando consideradas regiões protegidas e não protegidas. O conjunto de marcadores variou entre informativos e pouco informativos (PIC médio = 0,24) e a diferenciação genética foi de moderada a alta ($G_{ST} = 0,32$) entre as populações de dentro e fora da reserva ambiental. O fluxo gênico entre populações (N_m) foi estimado em 1,02. A análise dos resultados de variância molecular revelou 33% da variação genética entre as populações e 67% dentro das populações. A análise bayesiana e a análise de coordenadas principais confirmam a existência de dois grupos ($K=2$), com os indivíduos oriundos da reserva apresentando homogeneidade para um único *pool gênico*, evidenciando a influência de regiões genômicas exclusivas na estruturação genética da espécie. Estes resultados sugerem que a autoecologia de *M. conoideus* influencia nos níveis de variabilidade e diferenciação e contribui para uma estruturação genética em subpopulações. Esses resultados podem ajudar no planejamento em conservação genética e manejo, bem como na ampliação demográfica *in situ* empregada pelos órgãos responsáveis pela manutenção populacional da espécie.

Palavras-Chave: Marcadores Moleculares; Conservação Genética; ISSR.

Molecular-genetic diversity and structure of *Melocactus conoideus* Buin. & Bred (Cactaceae) endemic specie to the southwest Bahia and critically endangered

Abstract: *Melocactus conoideus* Buin. & Bred is a cactus critically endangered according with International Union For Conservation of Nature (IUCN) and lacks genetic studies to support conservation strategies. The aim of this study was to characterize the genetic diversity and genetic structure of *Melocactus conoideus* by markers *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). Were carried out amplifications of the genomic DNA of 126 genotypes of *M. conoideus* from Vitoria da Conquista, Bahia, inside and outside from the limits of the Environmental Reserve for *Melocactus conoideus*. Thirteen ISSR primers were used and the genetic amplification profile was subjected to statistical analyzes of diversity and genetic structure. One hundred and ninety-one markers were analyzed and 188 (97.7%) of which are polymorphic. Moderate genetic diversity ($h = 0,29$) was observed with significant variation when considering protected and unprotected regions. The set of markers varied between informative and few informative (mean PIC = 0,24) and the genetic differentiation was moderate to high according to the indicators used ($G_{ST} = 0,32$) inside and outside of the reserve. Gene flow between populations (N_m) was estimated at 1,02. Molecular variance analysis revealed 33% of the genetic variation between populations and 67% within populations. The Bayesian structure and the main coordinates analysis confirmed the existence of two groups (K=2) with individuals from the reserve presenting homogeneity for a single *gene pool*, evidencing the influence of exclusive genomic regions on the genetic structure of the species. These results suggest that the autoecology of *M. conoideus* influences the levels of variability and differentiation and contribute for the genetic structure in subpopulations. These results will help in planning in genetic conservation and management, as well as in the demographic expansion *in situ* employed by the agencies responsible for maintaining the population of the species.

Key words: Molecular Markers; Conservation Genetic; ISSR.

1. INTRODUÇÃO

A biologia da conservação foi criada com o intuito de prescrever planos de manejo em conservação para situações específicas através do conhecimento científico multi e interdisciplinar, incorporando ideias e especificidades de várias áreas, em especial da ecologia, biogeografia e genética de populações (SOULÉ, 1985; PRIMACK; RODRIGUES, 2006). Nesse sentido, espécies em níveis de ameaça, tais como as listadas nas “Red Data Books” e “Red Lists” pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) são o foco de suas ações, pois esses grupos estão relacionados a condições gerais de vulnerabilidade, tais como: espécies com área de ocorrência limitada; endêmicas ou de ocorrência a uma área geográfica com condições específicas, sob pressão ambiental; além de possuírem populações reduzidas (PRIMACK; RODRIGUES, 2006; IUCN, 2012).

Metade das espécies do gênero *Melocactus* Link & Otto estão ameaçadas de extinção, segundo os critérios de ameaça da IUCN (GOETTSCHE; HILTON-TAYLOR; CRUZ-PIÑÓN *et al.*, 2015). O gênero possui 38 espécies descritas aceitas, distribuídas ao longo da América Central e do Sul envolvendo desde as restingas litorâneas próximas ao estado do Rio de Janeiro, passando pelos estados do Nordeste do Brasil e chegando até o México e Ilhas do Caribe (TAYLOR, 1991; ZAPPI; TAYLOR, 2020). No Brasil, encontra-se 24 espécies nativas, 22 destas endêmicas do território nacional. No Nordeste brasileiro, ocorrem 21 espécies, com o estado da Bahia sendo considerado como o centro de diversidade e endemismo do gênero no país, com 19 espécies, sendo dez destas endêmicas e também dez classificadas em perigo de extinção (ZAPPI; TAYLOR, 2020).

Dentre as espécies endêmicas e ameaçadas, insere-se o *M. conoideus*, descrito por Albert Buining e Arnold J. Brederoo, em 1974, descoberto no Morro do Cruzeiro, uma região de transição entre Mata Atlântica, Mata de Cipó, Cerrado e Caatinga com 1.000 m de altitude, também conhecido como Serra do Periperi. É estimada que sua área de ocorrência e propagação seja inferior a 10 Km², estando em condição de endemismo desde 1989 (TAYLOR, 1992). Entre suas características morfológicas estão: Corpo globoso-cônico com gomos roliços, cefálio apical esbranquiçado, espinhos marginais pardos rosados, espinho central solitário, frutos lilases e sementes brilhantes (RIZZINI, 1982; TAYLOR, 1992). Esta espécie é conhecida como “cabeça-de-frade-do-Periperi” e encontra-se classificada como criticamente ameaçada de extinção (CR) pela IUCN (RIZZINI, 1982; TAYLOR, 1992; MACHADO *et al.*, 2013). A espécie é considerada endêmica da região sudoeste do Estado da Bahia desde 1989, com a maior

predominância de ocorrência relatada em regiões próximas ao município de Vitória da Conquista - BA (RIZZINI, 1982; TAYLOR, 1992).

M. conoideus possui um histórico de pressões ambientais relacionados à comercialização ilegal para fins ornamentais, fragmentação ambiental e a pressão antrópica gerada a partir da urbanização irregular na cidade (TAYLOR, 1992; CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008). Por esta razão, nos últimos anos, ações de conservação e manutenção populacional da espécie são desempenhadas, a citar as medidas contra a comercialização ilegal, estabelecidas pela *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES), além da criação e destinação de uma área de 115.644 m² específica para sua conservação dentro da Unidade de Conservação - Parque Municipal da Serra do Periperi, onde são desenvolvidas pesquisas e a produção de mudas no Herbário Sertão da Ressaca, com a finalidade de aumento populacional dentro da área protegida (CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008); PMVC, 2013; PMVC, 2016; PMVC, 2017).

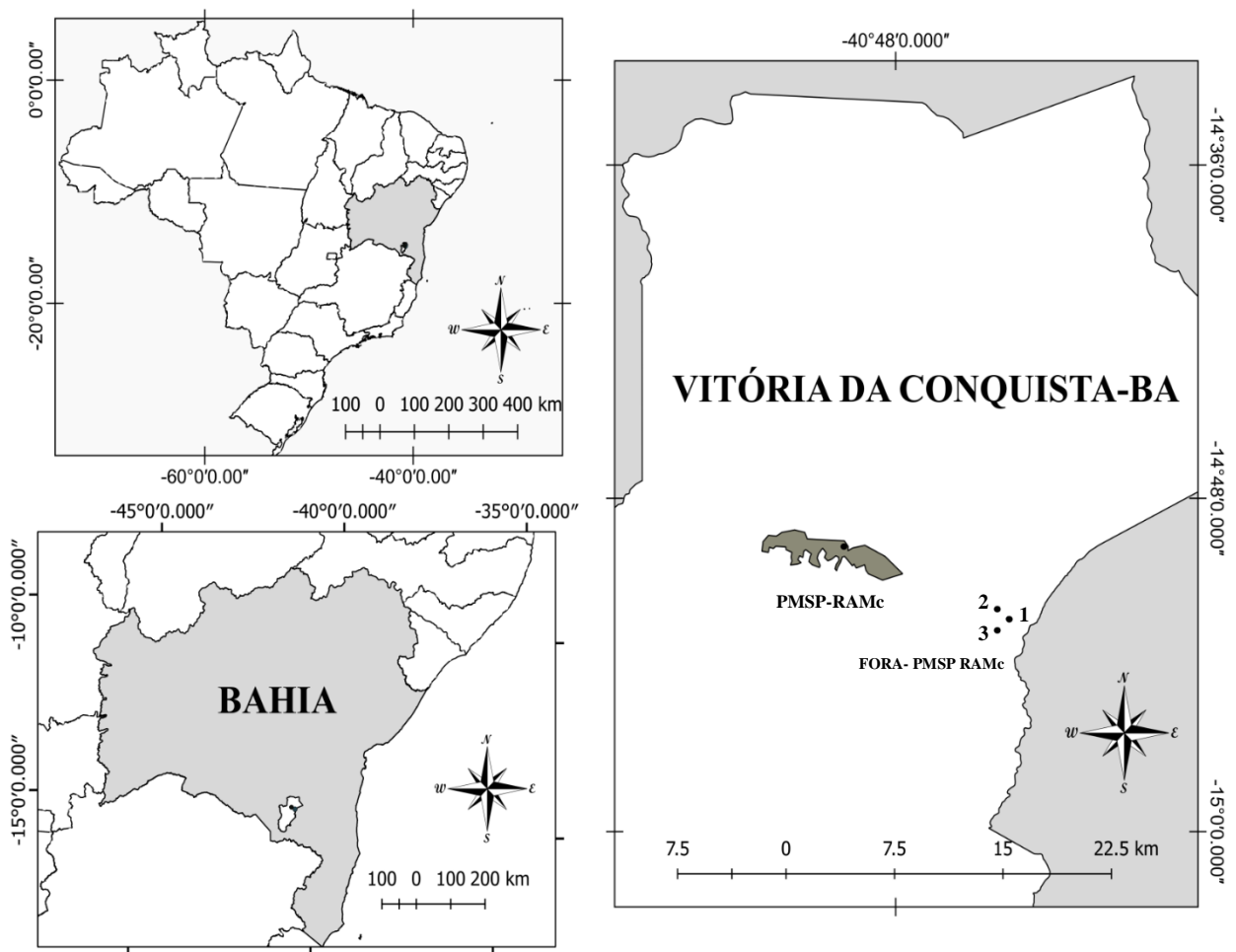
Poucos são os estudos genéticos e relativos a autoecologia de *M. conoideus* para embasar a elaboração de práticas de manejo, visando reduzir o risco de extinção da espécie (CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008). A genética da conservação se insere nesse sentido como o núcleo de pesquisa que lida com os fatores genéticos que afetam o risco de extinção, com a capacidade de através das análises moleculares, quantificar a variabilidade genética e descrever como age as forças naturais que moldam a dinâmica de distribuição de informação genética em populações (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002; FRANKHAM, 2003).

Este estudo tem como objetivo caracterizar a diversidade e estrutura genética de *M. conoideus* através dos marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR). Além de descrever a distribuição da variação genética foi possível discutir possíveis implicações dos dados genéticos visando contribuir com informações para o manejo populacional da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Frutos de *M. conoideus* foram usados como fonte do DNA genômico. A coleta foi realizada em duas regiões do município de Vitória da Conquista-BA. A primeira ($14^{\circ}49'49''\text{S}$; $40^{\circ}50'0.3''\text{W}$), localizada no Parque Municipal da Serra do Periperi (PMSP) na Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus* (RAMc). A segunda é composta por três regiões, ($14^{\circ}52'21.7''\text{S}$ $40^{\circ}43'42.1''\text{W}$), ($14^{\circ}52'01.7''\text{S}$ $40^{\circ}44'04.9''\text{W}$) e ($14^{\circ}52'46.2''\text{S}$ $40^{\circ}44'04.6''\text{W}$), próximo a BA-265, localizados fora dos limites do PMSP, em propriedades privadas a aproximadamente 12,5 km do primeiro ponto (Figura 1).



Legenda

- Pontos de coleta
- Parque municipal da serra do periperi

Figura 1. Pontos de coleta de amostras de *Melocactus conoideus* Link & Otto no município de Vitória da Conquista, Bahia. Destaca-se em cinza no município de Vitória da Conquista a área referente ao Parque Municipal da Serra do Periperi (PMSP), local onde encontra-se a Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus* (RAMc) e enumera-se os pontos amostrados fora dos limites do (PMSP-RAMc). QGIS.org, 2021. QGIS *Geographic Information System*. QGIS Association. <http://www.qgis.org>

O DNA genômico do pericarpo dos frutos foi extraído através do protocolo CTAB (*Cetyl Trimetil Amônio Bromide*) de acordo com a rotina proposta por Doyle, (1990) no Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA) localizado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) campus Itapetinga – Bahia. Ao todo, foi usado para análise 126 genótipos. Destes, 53 foram do PMSP-RAMc, 43 do primeiro ponto (FORA-RAMc 1) 17 do segundo (FORA-RAMc 2) e 13 do terceiro (FORA-RAMc 3), totalizando 73 genótipos de fora dos limites do PMSP-RAMc

A qualidade e quantidade das amostras de DNA foram avaliadas por meio de corrida eletroforética em gel de agarose 1% (m/v) mergulhado em tampão de corrida TBE 1X a 70 volts por 2 horas. A geração das imagens resultantes da corrida foi realizada a partir de fotodocumentador L-Pix-EX (LOCCUS), sob incidência de luz ultravioleta usando o intercalante GelRed® (BIOTIUM).

2.2. Genotipagem Molecular

Foram utilizados 13 *primers Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) pré-selecionados por Vieira, *et al.* (2019). As amplificações foram conduzidas em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) usando volume final de 16 µL contendo 15 ng de DNA genômico, 50 mM de tampão 10X, 1,2 mM de MgCl₂ (50mM), 2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 0,2 unidade de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 1,0 µM de *primer*. As configurações de temperatura para amplificação dos iniciadores foram: 5 minutos a 95°C; seguido de 34 ciclos (50 segundos a 94°C, 50 segundos a 48°C, 1 minuto a 72°C); e extensão final de 5 minutos a 72°C, seguindo o protocolo usado por DOS SANTOS; DE OLIVEIRA; DOS SANTOS SILVA *et al.* (2011).

Os produtos de amplificação foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 2% (m/v) mergulhado em tampão de corrida TBE 1X por 120 minutos. A geração das imagens resultantes da corrida foi realizada a partir do sistema de fotodocumentação L-Pix-EX (LOCCUS), sob incidência de luz ultravioleta, utilizando como intercalante de DNA o GelRed® (BIOTIUM).

Tabela 1. Iniciadores ISSR usados para caracterização da diversidade genética em *M. conoideus*.

| Código | Sequência |
|---------|-------------------------------|
| DiCA3'G | 5`-CAC ACA CAC ACA CAC AG- 3` |

| | |
|------------|---------------------------------|
| DiCA3`RG | 5`-CAC ACA CAC ACA CAC ARG- 3` |
| DiGA3`C | 5`-GAG AGA GAG AGA GAG AC- 3` |
| DiGA3`RC | 5`- GAG AGA GAG AGA GAG ARC- 3` |
| DiGA3`T | 5`- GAG AGA GAG AGA GAG AT- 3` |
| TriTGT3`YC | 5`- TGT TGT TGT TGT TGT YC-3` |
| TriAAC3`RC | 5`- AAC AAC AAC AAC AAC RC-3` |
| TriAAG3`RC | 5`-AAG AAG AAG AAG AAG RC3` |
| TriAGA3`RC | 5`-AGA AGA AGA AGA AGA RC-3` |
| TriTGG3`RC | 5`- TGG TGG TGG TGG TGG RC-3` |
| TriCGA3`RC | 5`- CGA CGA CGA CGA CGA RC-3` |
| TriCGC3`RC | 5`- CGC CGC CGC CGC CGC RC-3` |
| TriGGA3`RC | 5`- GGA GGA GGA GGA GGA RC-3` |

2.3. Análises Estatísticas

As imagens dos géis de agarose foram analisadas por dois pesquisadores, a fim de diminuir o viés de análise de falsos positivos, servindo de base para construção manual de uma tabela de dados binários em Excel® (0 para ausência de marcadores, 1 para a presença e 9 para dados inconclusivos). As análises estatísticas descritivas, referentes à caracterização do perfil de amplificação dos iniciadores diante da população, tais como a porcentagem de locos polimórficos (PLP), média de marcadores por iniciador, porcentagem de marcas raras, em até 5% da amostragem (MR) e marcas exclusivas (ME) de cada população estudada, foram conduzidas em Excel®.

A diversidade, diferenciação e estrutura genética em populações foram estimadas por meio dos seguintes parâmetros: Índice de diversidade de Nei (h) (NEI, 1978), onde,

$$h = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2,$$

diversidade total (H_t), variabilidade dentro das populações (H_s), diferenciação genética (G_{ST}) (NEI, 1987)

$$G_{ST} = \frac{(H_T - H_S)}{H_T} = 1 - \frac{H_S}{H_T}$$

e o número de migrantes

$$Nm = 0.5 (1 - G_{st})/G_{st}.$$

O PIC (*Polymorphism Information Content*) Botstein; White; Skolnick *et al.* (1980), calculado por meio da equação:

$$PIC = 1 - \left[\sum_{i=1}^k x_i^2 \right] - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2$$

O PIC quantifica a informação do *locus* marcador, sendo assim, um parâmetro diretamente relacionado aos alelos e sua frequência. Os índices abaixo de 0,25 são poucos informativos; entre 0,25 e 0,50, informativos; e acima de 0,50 muito informativos, onde 0,50 é o valor máximo alcançado em marcadores dominantes, como o ISSR (BOTSTEIN; WHITE; SKOLNICK *et al.*, 1980; CHESNOKOV; ARTEMYEVA, 2015).

A análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) foi calculada considerando 999 permutações do conjunto de dados para particionar a variação genética geral em diferentes níveis hierárquicos de diferenciação populacional, baseado no valor de PhiPT médio, análogo ao índice de fixação de Wright F_{ST} (WRIGHT, 1965). PhiPT > 0 indica diferenças genéticas entre as populações, seu valor é determinado pela equação,

$$(PhiPT = AP / (WP + AP) = AP / Total Est.Var),$$

onde AP é a variação estimada entre populações e WP é a variação estimada dentro das populações. PhiPT \geq 0,25 indicam uma grande diferenciação entre subpopulações, entre 0,15 e 0,25 diferenciação moderada e abaixo de 0,05 uma diferenciação insignificante. A fim de visualizar as relações genéticas entre as populações, os gráficos de Análises de Coordenadas Principais (PCoA) foram gerados.

A análise Bayesiana foi utilizada para alocar os agrupamentos em um número pré-determinado de populações (K). A escolha do valor de K testado foi baseado no método descrito por Evanno; Regnaut; Goudet (2005), implementado na ferramenta *online Structure Harvester* versão 0.6.8 (EARL; VONHOLDT, 2012). O modelo que prevê a possibilidade de fluxo gênico ou miscigenação entre as populações (*admixture model*) foi utilizado em 20 simulações para cada um dos possíveis *pools* gênicos “K” testados, com *burn-in* de 100.000 e 1.000.000 randomizações coletadas via Cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC). O conjunto de análises foi realizado usando diferentes *softwares* de bioinformática, tais como o programa POPGENE versão 1.32 (YEH; YANG; BOYLE *et al.*, 1997), a plataforma GENES (CRUZ, 2006), o suplemento GenALEX v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) e o programa STRUCTURE versão 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

3. RESULTADOS

3.1. Diversidade e diferenciação genética

Foram analisados 191 produtos de amplificação para caracterização do perfil de geração de marcas pelos treze iniciadores ISSR utilizados. O nível de polimorfismo detectado pelos iniciadores foi alto (97,76%). Somente três iniciadores não alcançaram 100% de marcas polimórficas (DiGA3`C, TRIAGA3'RC e TRIGGA 3' RC). O número médio de marcas geradas por iniciador foi de 14,7, sendo o máximo 23 marcadores (TRICGA3'RC; TRIAAC3'RC) e o mínimo 9 (TRIGGA 3' RC). Considerando marcadores raros como aqueles que apresentaram baixa frequência de ocorrência na amostragem, em até 5% dos genótipos analisados, foi possível detectar 18 destes (9,4%) (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil de amplificação genômica para iniciadores ISSR usados para caracterização da diversidade genética em *M. conoideus*. PMSP-RAMc=Parque Municipal da Serra do Periperi – Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus*, N= Número de marcas, PLP= porcentagem de *locos* polimórficos, MR= Marcadores raros ME= Marcadores exclusivos.

| Iniciadores ISSR | Total | | | Dentro PMSP-RAMc | | | Fora PMSP-RAMc | | |
|---------------------|-------|----------------|----|------------------|----|----|-----------------|----|----|
| | N | PLP | MR | PLP | MR | ME | PLP | MR | ME |
| DICA3`G | 13 | 13 (100%) | 2 | 11 (84,6%) | 0 | 0 | 13 (100%) | 2 | 4 |
| DiCA3' RG | 11 | 11(100%) | 3 | 9 (81,8%) | 0 | 0 | 11 (100%) | 2 | 2 |
| DiGA3`C | 15 | 14 (93%) | 3 | 10 (66,6%) | 0 | 0 | 13 (86,6%) | 2 | 4 |
| DIGA3'RC | 14 | 14 (100%) | 2 | 10 (71,4%) | 3 | 2 | 14 (100%) | 0 | 0 |
| DiGA3`T | 10 | 10 (100%) | 0 | 10 (100%) | 0 | 0 | 10 (100%) | 2 | 0 |
| TriTGT3`YC | 17 | 17 (100%) | 0 | 13 (76,4%) | 1 | 2 | 17 (100%) | 1 | 1 |
| TRIAAC3'RC | 23 | 23 (100%) | 4 | 19 (82,6%) | 3 | 3 | 23 (100%) | 0 | 3 |
| TRIAAG 3' RC | 14 | 14 (100%) | 0 | 14 (100%) | 0 | 0 | 11 (78,5%) | 0 | 0 |
| TRIAGA3'RC | 11 | 10 (91%) | 2 | 8 (72%) | 1 | 1 | 11 (100%) | 1 | 2 |
| TRITGG 3' RC | 12 | 12 (100%) | 1 | 10 (83%) | 2 | 0 | 11 (91,7%) | 1 | 2 |
| TRICGA3'RC | 23 | 23 (100%) | 1 | 21 (91,3%) | 3 | 1 | 23 (100%) | 1 | 0 |
| TRICGC 3' RC | 19 | 19 (100%) | 0 | 19 (100%) | 1 | 0 | 19 (100%) | 1 | 1 |
| TRIGGA 3' RC | 9 | 8 (89%) | 0 | 3 (33%) | 1 | 0 | 8 (88,9%) | 0 | 0 |
| TOTAL | 191 | 188 (97,7%) | 18 | 137 (71,3%) | 15 | 9 | 173 (90,58%) | 13 | 19 |

MARCAS/ PRIME 14,7

Ainda segundo a (Tabela 2), observa-se a distinção do perfil de amplificação genômica para os genótipos amostrados dentro e fora dos limites da área de proteção designada para a espécie. Nesse sentido, houve uma variação no percentual de marcadores polimórficos entre

as regiões, com 71,3% de polimorfismo para os 53 genótipos oriundos de dentro da reserva e 90,58% para os 73 genótipos amostrados fora dos limites da reserva de proteção, indicando um maior número de regiões polimórficas acessadas nestes genótipos.

O número de iniciadores que alcançaram 100% de polimorfismo foi contrastante entre as regiões, com três *primers* para os genótipos de dentro da reserva e nove para os genótipos de fora da reserva de proteção. O *primer* TRIGGA 3' RC apresentou o menor percentual de polimorfismo para dentro da reserva (33%) e o TRIAAG 3' RC com 78,5% para fora. Com relação aos marcadores raros, 15 foram observados dentro da reserva e 13 fora desta. Os marcadores exclusivos para cada região também foram contabilizados, com 9 marcadores amostrados exclusivamente em genótipos de dentro da Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus* e 19 em genótipos fora desta (Tabela 2).

Ao analisar os índices usados para a caracterização da diversidade genética de *M. conoideus* (Tabela 3), considerou-se uma avaliação global e a distinção entre regiões de ocorrência. Considerando os valores gerais, a média de PIC foi de 0,24, valor que permaneceu sem variações significativas quando analisado para as regiões de ocorrência da espécie.

Tabela- 3. Índices usados para caracterizar a diversidade genética em *M. conoideus*: PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) (BOTSTEIN; WHITE; SKOLNICK *et al.*, 1980); *h* (diversidade genética de Nei) (NEI, 1978). PMSP-RAMc = Parque Municipal da Serra do Periperi – Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus*.

| Iniciadores ISSR | TOTAL | | Dentro PMSP-RAMc | | Fora PMSP-RAMc | |
|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|----------------|-------------|
| | PIC | <i>h</i> | PIC | <i>h</i> | PIC | <i>h</i> |
| DICA3'G | 0,21 | 0,27 | 0,10 | 0,13 | 0,22 | 0,27 |
| DiCA3' RG | 0,16 | 0,19 | 0,14 | 0,17 | 0,15 | 0,17 |
| DiGA3' C | 0,21 | 0,27 | 0,11 | 0,13 | 0,20 | 0,26 |
| DIGA3'RC | 0,19 | 0,23 | 0,11 | 0,13 | 0,21 | 0,26 |
| DiGA3' T | 0,30 | 0,37 | 0,28 | 0,35 | 0,28 | 0,36 |
| TriTGT3' YC | 0,25 | 0,30 | 0,21 | 0,27 | 0,19 | 0,23 |
| TRIAAC3'RC | 0,23 | 0,28 | 0,14 | 0,17 | 0,24 | 0,30 |
| TRIAAG 3' RC | 0,24 | 0,28 | 0,24 | 0,29 | 0,20 | 0,25 |
| TRIAGA3'RC | 0,21 | 0,27 | 0,10 | 0,13 | 0,21 | 0,26 |
| TRITGG 3' RC | 0,20 | 0,25 | 0,10 | 0,13 | 0,23 | 0,28 |
| TRICGA3'RC | 0,27 | 0,34 | 0,21 | 0,26 | 0,28 | 0,35 |
| TRICGC 3' RC | 0,30 | 0,38 | 0,26 | 0,32 | 0,30 | 0,39 |
| TRIGGA 3' RC | 0,26 | 0,33 | 0,06 | 0,07 | 0,27 | 0,35 |
| MÉDIA | 0,24 | 0,29 | 0,24 | 0,20 | 0,23 | 0,28 |

Os iniciadores DiGA3`T e TRICGC 3' RC se destacaram por serem informativos (PIC= 0,30) e por manter esse valor para genótipos das duas localidades, dentro e fora dos limites da reserva de proteção ao *M. conoideus*, respectivamente (DiGA3`T PIC= 0,28; TRICGC 3' RC PIC= 0,26 / 0,30), indicando a boa qualidade das regiões genômicas marcadoras exploradas pelos iniciadores para estudos genético-populacionais com a espécie. Os demais valores de PIC variaram entre localidades dentro da faixa pouco informativa, com exceção ao TRICGA3`RC (PIC = 0,27, 0,21 e 0,28, para valores total, dentro e fora da Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus*, respectivamente).

A diversidade genética de Nei (h) foi estimada em 0,29, variando para os genótipos de dentro (0,20) e fora da reserva (0,28). A diversidade genética total (Ht) é ligeiramente maior que a diversidade genética dentro de populações (Hs) (Tabela 4). A magnitude relativa à diferenciação genética (G_{ST}) está para *M. conoideus* em 0,32, e o N_m em 1,02, este último representando uma taxa mínima de fluxo gênico para a espécie, considerando que um migrante por geração é um critério indicativo para o domínio do processo dispersivo em uma metapopulação e valores < 5 indicam uma diferenciação desprezível (Tabela 4) (MILLS; ALLENDORF, 1996; WANG, 2004).

Tabela- 4. Índices usados para calcular a diferenciação genética de Nei. (NEI, 1987). Diversidade genética total (Ht); diversidade genética dentro de populações (Hs); coeficiente de divergência genética entre populações (G_{ST}); número de migrantes por geração (N_m)

| Ht | Hs | G_{ST} | N_m |
|------|------|----------|-------|
| 0,28 | 0,25 | 0,32 | 1,02 |

As estimativas geradas através da AMOVA indicam o maior percentual de variação dentro das populações (67%) que entre as populações (33%). A Tabela 5 contém o resumo do cálculo a partir dos dados matriciais relativos à geração do percentual de variação molecular, baseado no valor de PhiPT médio, estimado em 0,33.

Tabela- 5. Análise de variância molecular (AMOVA) baseada em marcadores ISSR para *M. conoideus*. Nota: GL graus de liberdade, SS Soma dos quadrados, MS Média dos quadrados, EVar. Variação estimada, PhiPT Valor para a variabilidade genética para marcadores dominantes, P (rand \geq data) Probabilidade, para o PhiPT baseado na permutação padrão em todo o conjunto de dados.

| | GL | SS | MS | E. Var | % |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|---------------|----------|
| Entre pop. | 3 | 1089,6 | 363,2 | 11,9 | 33 |
| Dentro pops | 122 | 2891,7 | 23,7 | 23,7 | 67 |
| Total | 125 | 3981,4 | | 35,6 | 100 |

PhiPT= 0,33 P(rand \geq data) 0,001

A AMOVA também forneceu PhiPT de acordo com as regiões de ocorrência de *M. conoideus*, segundo a Tabela 6. Nesse sentido, é possível traçar o comparativo de divergência genética entre a Reserva Ambiental do *M. conoideus* e os pontos de coleta em ambiente não protegido. É possível observar níveis altos de diferenciação genética tanto entre genótipos oriundos da reserva quanto entre os locais que possuem uma distância geográfica menor, fora dos limites de proteção.

Tabela- 6. Valor de PhiPT relativo a cada local de ocorrência de *M. conoideus*. PMSP-RAMc=Parque Municipal da Serra do Periperi – Reserva Ambiental do *Melocactus conoideus*. 1, 2 e 3 pontos de coleta.

| Local 1 | Local 2 | PhiPT |
|--------------------|----------------|--------------|
| PMSP-RAMc | Fora RAMc 1 | 0,247 |
| PMSP-RAMc | Fora RAMc 2 | 0,433 |
| Fora RAMc 1 | Fora RAMc 2 | 0,428 |
| PMSP-RAMc | Fora RAMc 3 | 0,341 |
| Fora RAMc 1 | Fora RAMc 3 | 0,331 |
| Fora RAMc 2 | Fora RAMc 3 | 0,318 |

3.2. Estrutura genética

A abordagem Bayesiana permitiu a identificação de dois agrupamentos correspondentes ao nível hierárquico mais provável de estrutura genética entre populações. O modelo de Evanno; Regnaut; Goudet (2005), estimou valor de ΔK (561.59) mais provável para *M. conoideus*, podendo ser observado na Figura 2.

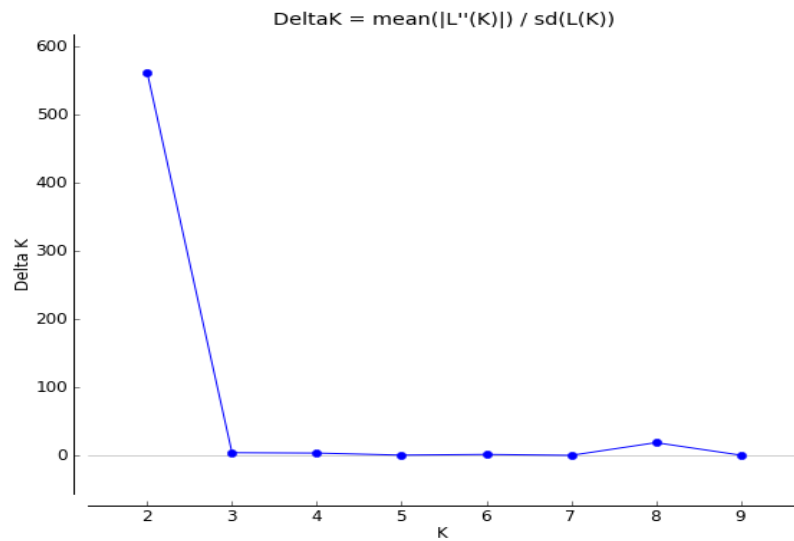


Figura- 2. Resultados da análise de probabilidade logarítmica média de estrutura por agrupamento baseada no modelo bayesiano.

O histograma geral relativo ao ΔK ($K=2$) identificado pode ser observado na Figura 3. Na figura, observa-se a distribuição dos genótipos dentro do *pool gênico* seguido do coeficiente de associação (Q), que representa o nível de correlação das frequências alélicas para cada *pool gênico*, o número de genótipos segue os pontos de coleta, onde os 53 genótipos amostrados são oriundos da reserva ambiental do *M. conoideus* e demais correspondem aos três pontos de coleta fora dos limites da reserva (54-96; 97-113; 114-126). Se por um lado observa-se um *pool* homogêneo para os genótipos de dentro da RAMc, representado pela cor vermelha no histograma; por outro observa-se que genótipos coletados no ponto 1 (fora dos limites da reserva) apresenta uma homogeneidade semelhante à RAMc, indicando um compartilhamento alélico entre estes locais. De forma interessante, os genótipos do ponto dois constituem, em sua maioria, um grupo distinto, com *pool* gênico próprio (marcado pela cor verde), diferente da RAMc. Já o terceiro ponto de coleta apresenta genótipo com mistura de *pools* gênicos (valores de $Q \leq 0,7$ para qualquer um dos *pool* gênicos, não havendo identidade específica para um *pool* gênico).

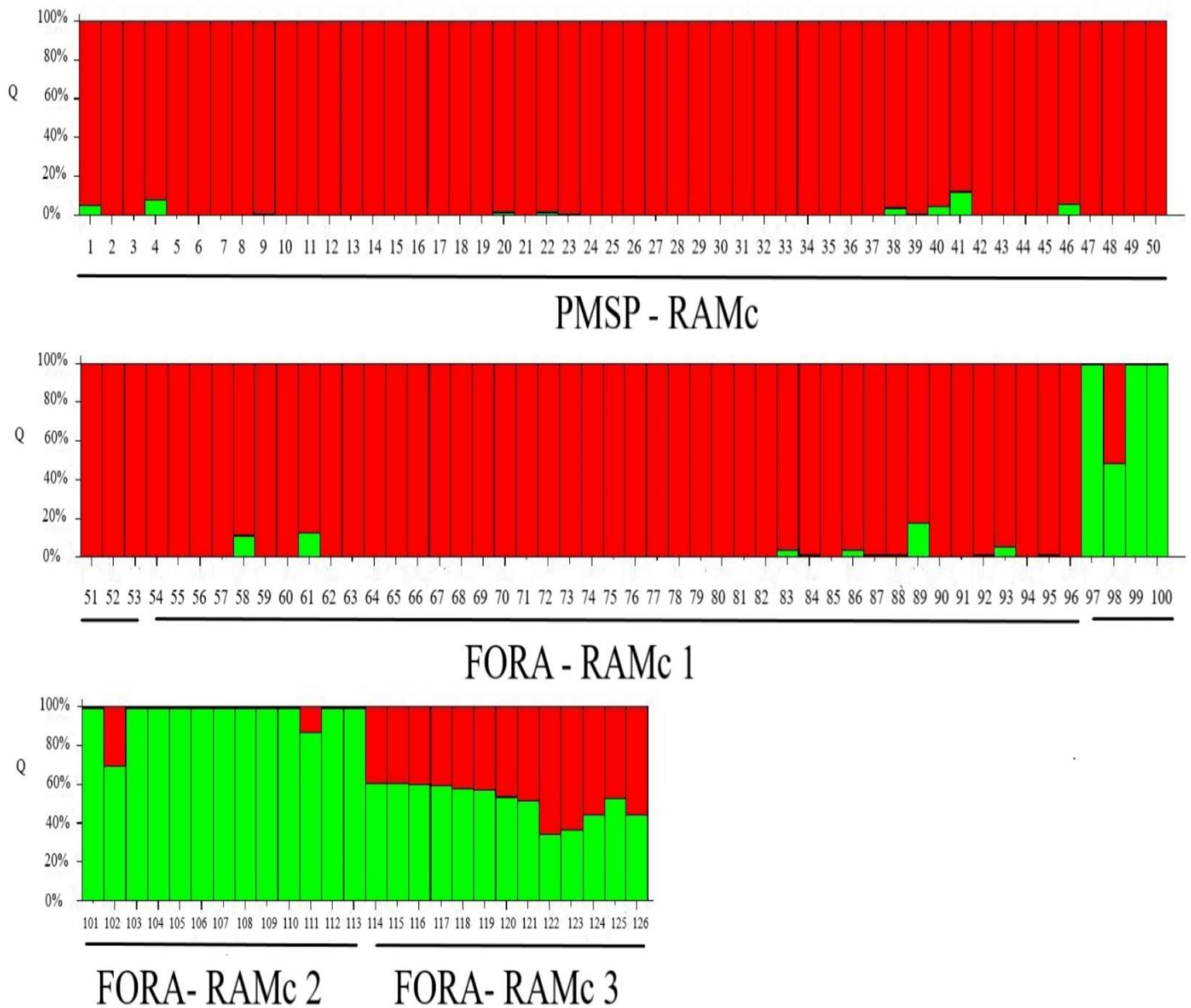


Figura- 3. Histograma para $K=2$. Os indivíduos são separados de acordo com a população, e a linha vertical preta no gráfico de barras é um identificador de população.

Já a abordagem multivariada estabelecida pelo PCoA distribuiu os genótipos analisados com base no padrão de distância genética em quatro eixos (Figura 4). Pode-se observar a relação de similaridade genética entre os indivíduos de dentro da reserva e do ponto de coleta 1 de fora da reserva, confirmando a existência de um *pool* gênico similar entre os genótipos. Também foi observado como a variabilidade genética entre os diferentes pontos localizados fora dos

limites da reserva afetou proporcionalmente a distribuição dos genótipos. Os gráficos individualizados mostram o comportamento dos genótipos no plano bidimensional.

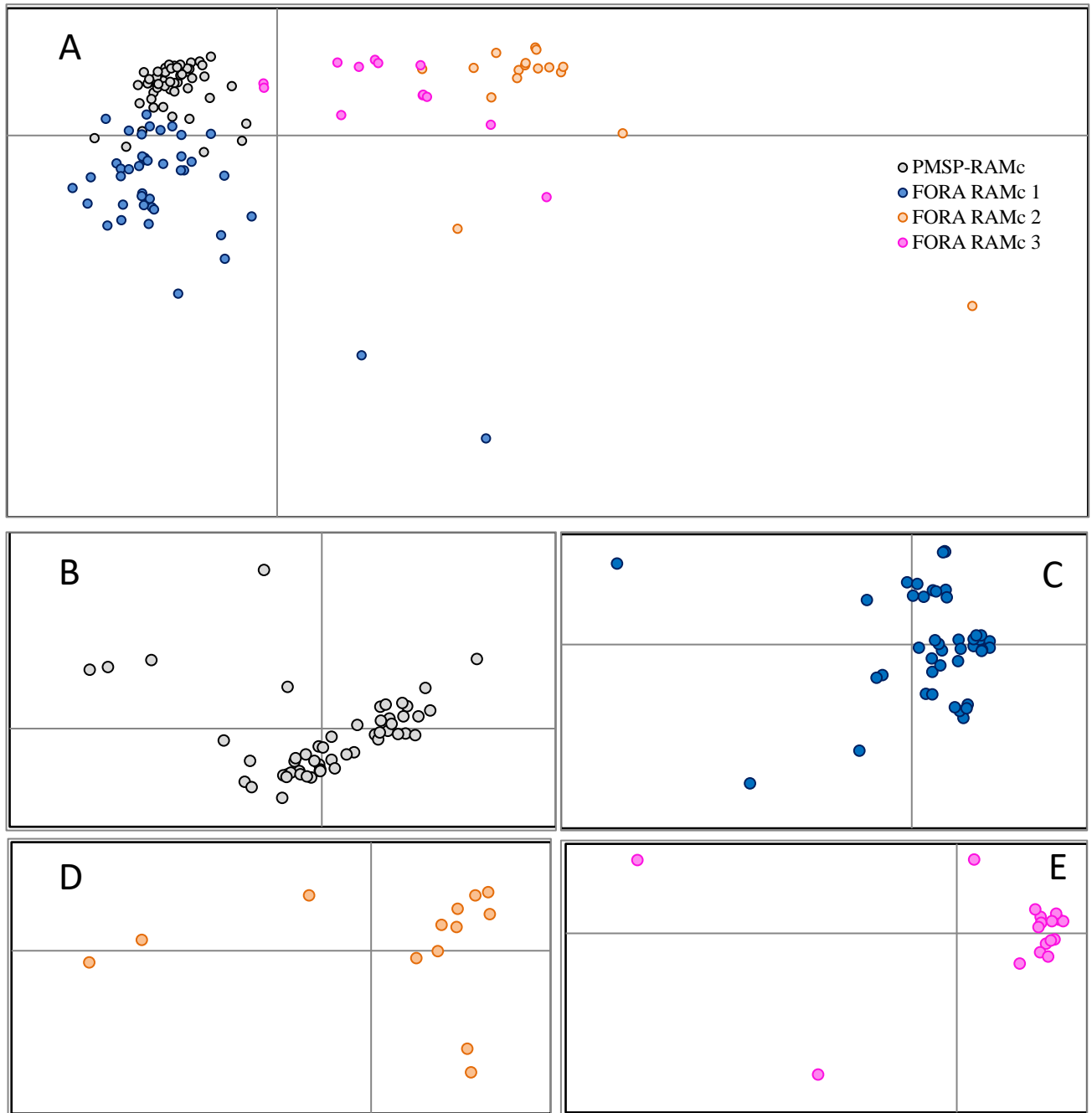


Figura- 4. Distribuição de genótipos de *M. conoideus* por Análise de Coordenadas Principais (PCoA). **Nota:** A- Distribuição do conjunto de genótipos analisados; B- Distribuição dos genótipos oriundos do PMSP-RAMc; C- Distribuição dos genótipos (FORA-RAMc 1); D- Distribuição dos genótipos (FORA-RAMc 2); E- - Distribuição dos genótipos (FORA-RAMc 3).

4. DISCUSSÃO

4.1. Diversidade e Estrutura genética

M. conoideus é uma espécie criticamente ameaçada, e portanto, os dados genéticos devem ser analisados considerando as condições de vulnerabilidade, que incorrem, em teoria, em características genético-populacionais inevitáveis, como a diversidade genética reduzida em função dos efeitos da deriva genética e da endogamia, e conseqüentemente, a ocorrência de subestruturação genética. Esse é o consenso científico relativo aos fenômenos genético-populacionais e evolutivos nesses grupos (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002; PRIMACK; RODRIGUES, 2006).

Ao analisar os dados de diversidade e estrutura genética de *M. conoideus* sob uma perspectiva filogenética, observa-se que baseado em estudos genético-populacionais em cactos com diferentes técnicas de marcação molecular, a existência de tendências relativas à distribuição da variabilidade genética entre Cactaceae oriundas das Américas do Norte, Central e do Sul, incluindo representantes com o *status* de ameaça. Gêneros de cactos globosos, como o *Melocactus*, indicam ter tendências de diversidade intrapopulacional moderada ou baixa em maior frequência e de moderado a alto grau de diferenciação populacional (SOLÓRZANO; DÁVILA, 2015; SOLÓRZANO; ARIAS; DÁVILA, 2016).

Neste estudo, foi observado para *M. conoideus* uma diversidade genética intrapopulacional maior (0,29) em comparação às espécies do gênero estudadas, tais como *M. concinnus*, *M. ernestii*, *M. glaucescens*, *M. paucispinus* e *M. zehntneri*, onde foi estimada a diversidade genética por marcadores SNP's, que variaram (H_E entre 0,005 a 0,23) e a diferenciação genética (F_{ST} entre 0,46 a 0,70) (KHAN; FRANCO; SILVA *et al.*, 2020). Índices similares a abordagem por marcadores baseados em alozimas, onde foi observado uma variação entre (H entre 0,009 a 0,14) e (F_{ST} entre 0,045 a 0,34) (NASSAR; HAMRICK; FLEMING, 2001; LAMBERT; BORBA; MACHADO, 2006; LAMBERT; BORBA; MACHADO *et al.*, 2006). Os maiores níveis de diversidade amostrados para *M. conoideus* em comparação a essas espécies pode ser explicados por uma vantagem adaptativa de *M. conoideus* por colonizar uma região distante de zonas híbridas com espécies do gênero simpátricas, e conseqüentemente não ocorrendo cruzamentos interespecíficos nesses locais (HUGHES, 2014; KHAN; FRANCO; SILVA *et al.*, 2020).

Os cactos colunares, por outro lado, aparentam possuir uma condição geral ligada a níveis de variabilidade genética que variam entre moderados ou altos e exibem moderada ou baixa diferenciação genética entre populações (HAMRICK, 2002; NASSAR; HAMRICK; FLEMING, 2003; FIGUEREDO; NASSAR; GARCÍA-RIVAS *et al.*, 2010; BUSTAMANTE; BÚRQUEZ; SCHEINVAR *et al.*, 2016). Essas informações somadas a dados ecológicos, biogeográficos e climáticos embasam as principais teorias sobre a história evolutiva da família (GUERRERO; MAJURE; CORNEJO-ROMERO *et al.*, 2019). Comparativamente com representantes da família em diferentes classificações de ameaça (Tabela 7), *M. conoideus*, apresenta um nível de moderado a alto de diversidade genética para a espécie e alta diferenciação genética nas abordagens estatísticas utilizadas ($G_{ST}=0,32$; $\Phi_{PT}=0,33$).

Tabela- 7. Diversidade e diferenciação genética em espécies de cactos. Nota- Categorias de ameaça da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN): CR- Criticamente Ameaçada; EN- Em perigo; LC- Menos Preocupante; NT- Quase ameaçada.

| Espécie | IUCN | H | F_{ST} | Marcador | Referência |
|-------------------------------------|-------------|----------|-----------------------|-----------------|--|
| <i>Discocactus zehntneri</i> | NT | 0,080 | - | ISSR | (JESUS; CONCEIÇÃO; SCHNADELBACH <i>et al.</i> , 2019) |
| <i>Coleocephalocereus purpureus</i> | CR | 0,55 | 0,22-0,27 | SSR | (FRAGA; DE CARVALHO; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2020) |
| <i>Ferocactus histrix</i> | NT | 0,17 | - | ISSR/ISTR | (CASTRO-FELIX; ROSAS-ESPINOZA; DÍAZ-CÁRDENAS <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>Mammillaria crucigera</i> | EN | 0,54 | 0,23 | SSR | (SOLÓRZANO; DÁVILA, 2015) |
| <i>M. huitzilopochtli</i> | LC | 0,8 | 0,23 | SSR | (SOLÓRZANO; CUEVAS-ALDUCIN; GARCÍA-GÓMEZ <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>M. pectinifera</i> | EN | 0,7~0,8 | 0,09 | SSR | (MAYA-GARCÍA; ARIZAGA; CUEVAS-REYES <i>et al.</i> , 2017) |
| <i>M. supertexta</i> | EN | 0,76 | 0,15 | SSR | (SOLÓRZANO; CUEVAS-ALDUCIN; GARCÍA-GÓMEZ <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>Melocactus conoideus</i> | CR | 0,29 | 0,33 | ISSR | Vieira <i>et al.</i> (2021) |
| <i>Stenocereus thurberi</i> | LC | 0,22 | 0,19 | ISSR | (BUSTAMANTE; BÚRQUEZ; SCHEINVAR <i>et al.</i> , 2016) |

Uma hipótese a ser considerada para a interpretação dos níveis de variabilidade e diferenciação genética para *M. conoideus* pode estar associada a uma possível superestimação dos parâmetros devido a condição tetraploide da espécie ($4n= 44$) (ASSIS; OLIVEIRA; RESENDE *et al.*, 2003). A condição de poliploidia é bastante presente em espécies de Cactaceae, e através de uma avaliação por marcadores cromossômicos foi observada uma duplicidade em número e posição de regiões genômicas, onde sítios com ocorrência em dois locais em diploides estavam presentes em quatro locais em espécies poliploides, incluindo representantes do gênero *Melocactus* (CASTRO; MORAES; CHASE *et al.*, 2019). Embora o conhecimento sobre a forma de avaliação de padrões de distribuição da informação genética não estejam totalmente claros aos poliploides, esses processos ocorrem de maneira diferente dos diploides e acarretam a vieses de interpretação das análises de dados genéticos (MEIRMANS; LIU; VAN TIENDEREN, 2018). Dessa forma, a literatura mostra que o maior número de cópias de cromossomos reduz a força dos efeitos da deriva genética e causa um maior nível de variabilidade detectado estatisticamente, onde marcadores com baixas taxas de mutação, poderiam apresentar até duas vezes mais variabilidade que em uma população diploide (DE SILVA; HALL; RIKKERINK *et al.*, 2005; MEIRMANS; LIU; VAN TIENDEREN, 2018).

As análises de estrutura genética revelaram a existência de duas populações de *M. conoideus* no município de Vitória da Conquista-BA, segundo o paradigma evolutivo de populações (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006). A dinâmica da distribuição genética das análises de variância molecular, bayesiana e de coordenadas principais sugerem um efeito vicariante mais provável como mecanismo microevolutivo para os pontos amostrados, onde ocorrem três grupos no que tange a composição genética, formados por dois extremos homogêneos e uma zona de transição (Figura 5). Nesse sentido, considera-se que a baixa variabilidade genética dos genótipos da reserva caracterize a influência das pressões ambientais ocorridas ao longo de 60 anos sob a composição genética dos genótipos oriundos da reserva de proteção a espécie, que inclui a construção da BR-116, invasões, loteamentos clandestinos e o extrativismo de recursos naturais utilizados para a construção civil e da realização de queimadas (BENEDICTIS, 2007; CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008). Dessa forma, marcadores considerados pouco informativos resultam na amplificação de regiões conservadas, pouco variáveis, resultando na baixa frequência de ocorrência de regiões marcadoras raras e exclusivas entre pontos amostrados, podendo explicar o comportamento da análise bayesiana ao considerar como um único *pool* gênico para genótipos oriundos de regiões de dentro e fora da reserva. No entanto,

a baixa mistura entre os *pools* gênicos detectados nas manchas em propriedades particulares sugere a possibilidade de uma diferenciação genética significativa entre regiões mais distantes da zona urbana, assim como mostrado com maior detalhamento nos percentuais de variância molecular entre indivíduos com ocorrência a aproximadamente 1 km de distância.

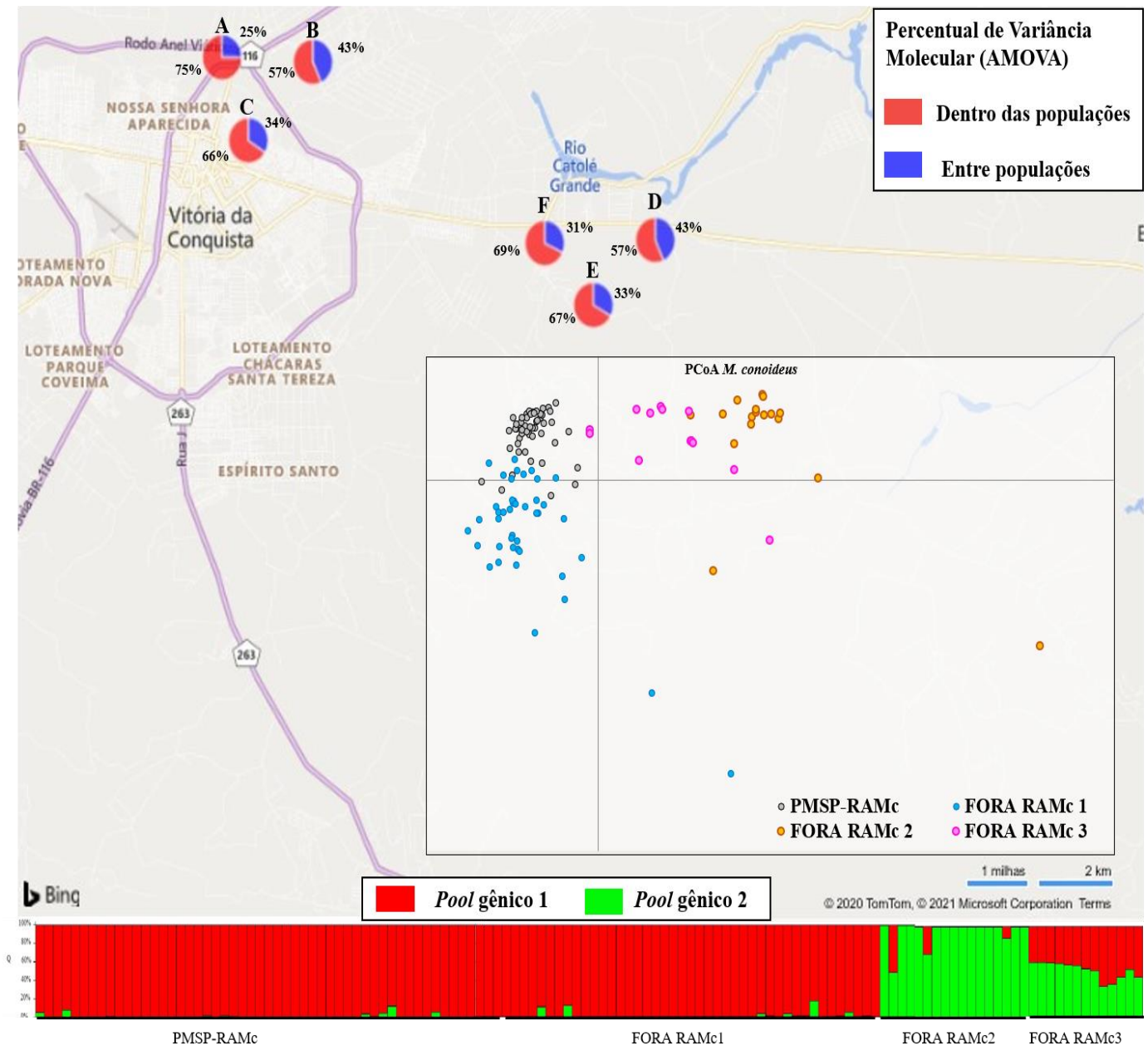


Figura- 5. Comportamento da distribuição da diversidade genética populacional para *M. conoideus* de Vitória da Conquista-BA, segundo análises de diferenciação genética populacional utilizadas. **Nota:** A- Variância molecular entre PMSp-RAMc e FORA RAMc1; B- Variância molecular entre PMSp-RAMc e FORA RAMc2; C- Variância molecular entre PMSp-RAMc e FORA RAMc3; D- Variância molecular entre FORA RAMc1 e FORA RAMc2; E- Variância molecular entre FORA RAMc1 e FORA RAMc3; F- Variância molecular entre FORA RAMc2 e FORA RAMc3. Bing Maps for Excel (2020)

Geralmente, o comportamento populacional tende a ser um reflexo da autoecologia da espécie, em especial entre as Cactaceae, dependentes de guildas de polinizadores e dispersores bióticos. As espécies do gênero *Melocactus* são predominantemente alógamas, apesar de que para alguns representantes ocorrem autopolinização, polinizadas por espécies territorialistas e competitivas, tais como beija-flores, e suas sementes são dispersas por lagartos, o que limita o fluxo de pólen e de sementes entre populações, levando ao seu isolamento reprodutivo (TAYLOR, 1991; COLAÇO; FONSECA; LAMBERT *et al.*, 2006; ROMÃO; HUGHES; VIEIRA *et al.*, 2007; MACHADO, 2009). Apesar de escassos, os estudos que caracterizam a ecologia reprodutiva de *M. conoideus* seguem em linha com o consenso científico para o gênero (ROMÃO; HUGHES; VIEIRA *et al.*, 2007; MALUF; CARDOSO; JR *et al.*, 2009; BRITO-KATEIVAS, 2012).

Provavelmente, as três regiões amostradas fora dos limites da reserva faziam parte de um único *pool gênico* e a estruturação genética da espécie está associada a fatores ecológicos, como o seu modo de sobrevivência, que é influenciado pela densidade populacional com alta especificidade edáfica, evidenciado também no PCoA (LUZ-FREIRE; TRINDADE; SÁ-NETO *et al.*, 2014), e seu modo de reprodução que é compatível com a autopolinização, além das restrições para polinização cruzada e dispersão devido às espécies de beija-flores e insetos territoriais (ROMÃO; HUGHES; VIEIRA *et al.*, 2007; MALUF; CARDOSO; JR *et al.*, 2009; BRITO-KATEIVAS, 2012). Entretanto, também é observada a sensibilidade da espécie diante da fragmentação ambiental em decorrência das atividades de extração de cascalho nessas regiões, fazendo com que o aumento da distância entre manchas de cascalho de quartzo intensifique a limitação do movimento de alelos por polinização cruzada, contribuindo consequentemente para a deriva e para o isolamento genético (CERQUEIRA-SILVA; SANTOS, 2008). Com relação aos vieses estatísticos para a estimativa de estrutura genética em *M. conoideus*, o modelo de abordagem bayesiano de agrupamento estabelecido pelo STRUCTURE é reconhecido como ideal para análises em poliploides (MEIRMANS; LIU; VAN TIENDEREN, 2018; STIFT; KOLÁŘ; MEIRMANS, 2019).

4.2. Implicações para a conservação

A partir do conjunto de análises estatísticas, foi possível observar a presença de regiões genômicas exclusivas para indivíduos fora de uma zona protetiva, seu impacto na compreensão da dinâmica populacional de *M. conoideus* e a possibilidade para a erosão genética da espécie em caso de extinção local ou de intensificação das forças da deriva genética. As análises

também mostram como as próprias políticas de manejo relativas a ampliação demográfica na região da reserva, ao utilizar indivíduos com alta similaridade genética, como amostrado nesse estudo, aumentam os riscos de uma eventual depressão por endogamia (FRANKHAM, 2005; FRANKHAM, R. J. C. G., 2010).

Os dados genético populacionais complementam as informações sobre a autoecologia da espécie, onde os agregados de indivíduos tendem a se isolar reprodutivamente, portanto é possível que, ao se analisar agregados de indivíduos de *M. conoideus* distantes, maiores as chances de se encontrar variabilidade de informações genéticas, daí a necessidade de conservação dessas regiões. Para fins de manejo, se faz necessário uma ampliação das ações de conservação nas manchas de *M. conoideus* distantes das zonas urbanas. Mesmo não havendo diferenças nas condições de *habitat* para as populações, a translocação de indivíduos desses locais para o manejo demográfico dentro da reserva representaria uma medida de conservação genética adequada para *M. conoideus*, visando estimular o fluxo gênico artificialmente, pois o objetivo da região protegida é servir de abrigo para a maior diversidade genética da espécie para que, com o tempo, a diminuição da participação antrópica contribua para a sua recuperação ambiental e demográfica (FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002; LUZ-FREIRE; TRINDADE; SÁ-NETO *et al.*, 2014).

5. CONCLUSÃO

A caracterização da diversidade e estrutura genética de *M. conoideus* por marcadores moleculares ISSR evidência a necessidade de medidas de manejo genético no modelo de conservação *in situ* empregado para a espécie. Os dados genético-populacionais aqui apresentados devem ser priorizados na orientação ao plano de manejo genético visando a eficiência na conservação da espécie.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, J. G.; OLIVEIRA, A. L.; RESENDE, S. V.; SENRA, J. F. *et al.* Chromosome numbers in Brazilian Melocactus (Cactaceae). **Bradleya**, 2003, n. 21, p. 1-7, 2003.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, 32, n. 3, p. 314, 1980.
- BRITO-KATEIVAS, K. S. Ants interacting with fruits of Melocactus conoideus Buining & Brederoo (Cactaceae) in southwestern Bahia, Brazil. **Biotemas**, 25, n. 3, p. 153-159, 2012.
- BUSTAMANTE, E.; BÚRQUEZ, A.; SCHEINVAR, E.; EGUIARTE, L. E. Population genetic structure of a widespread bat-pollinated columnar cactus. **PloS one**, 11, n. 3, p. e0152329, 2016.
- CASTRO-FELIX, P.; ROSAS-ESPINOZA, V. C.; DÍAZ-CÁRDENAS, B.; PÉREZ-VALENCIA, L. I. *et al.* Genetic diversity within a declining natural population of Ferocactus histrix (DC) Lindsay. **Plant species biology**, 29, n. 3, p. E21-E30, 2014.
- CASTRO, J. P.; MORAES, A. P.; CHASE, M. W.; SANTOS, A. M. S. *et al.* Karyotype characterization and evolution of chromosome number in Cactaceae with special emphasis on subfamily Cactoideae. **Acta Botanica Brasilica**, 34, 2019.
- 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.
- CHESNOKOV, Y. V.; ARTEMYEVA, A. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. **Сельскохозяйственная биология**, n. 5 (eng), 2015.
- COLAÇO, M. A.; FONSECA, R. B.; LAMBERT, S. M.; COSTA, C. *et al.* Biologia reprodutiva de Melocactus glaucescens Buining & Brederoo e M. paucispinus G. Heimen & R. Paul (Cactaceae), na Chapada Diamantina, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 29, n. 2, p. 239-249, 2006.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: estatística experimental e matrizes**. UFV, 2006. 8572692452.
- DE SILVA, H.; HALL, A.; RIKKERINK, E.; MCNEILAGE, M. *et al.* Estimation of allele frequencies in polyploids under certain patterns of inheritance. **Heredity**, 95, n. 4, p. 327-334, 2005.
- DOS SANTOS, L. F.; DE OLIVEIRA, E. J.; DOS SANTOS SILVA, A.; DE CARVALHO, F. M. *et al.* ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in Passiflora. **Biochemical Genetics**, 49, n. 7-8, p. 540-554, 2011.
- DOYLE, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12, p. 13-15, 1990.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation genetics resources**, 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131, n. 2, p. 479-491, 1992.
- FIGUEREDO, C.; NASSAR, J.; GARCÍA-RIVAS, A.; GONZÁLEZ-CARCACÍA, J. J. J. o. A. E. Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. **Journal of Arid Environments**, 74, n. 11, p. 1392-1398, 2010.
- FRAGA, D. A.; DE CARVALHO, A. F.; RIBEIRO, C. J. B.; SANTANA, R. S. *et al.* Establishing population boundaries and conservation proposals for *Coleocephalocereus purpureus*, a critically endangered cactus species microendemic from Caatinga biome. **Molecular Biology Reports**. p. 125823, 2020.
- FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biologies**, 326, p. 22-29, 2003.
- FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological conservation**, 126, n. 2, p. 131-140, 2005.
- FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge university press, 2002. 0521639859.
- FRANKHAM, R. J. C. G. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? **Conservation Genetics**, 11, n. 2, p. 661-663, 2010.
- GUERRERO, P. C.; MAJURE, L. C.; CORNEJO-ROMERO, A.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, T. J. J. o. H. Phylogenetic relationships and evolutionary trends in the Cactus family. **Journal of Heredity**, 110, n. 1, p. 4-21, 2019.
- GOETTSCHE, B.; HILTON-TAYLOR, C.; CRUZ-PIÑÓN, G.; DUFFY, J. P. *et al.* High proportion of cactus species threatened with extinction. **Nature plants**, 1, n. 10, p. 15142, 2015.
- HAMRICK, J. Genetic diversity in columnar cacti. **Ecology Conservation Biology**, 2002.
- HUGHES, F. M. **Biosistemática, filogeografia, estrutura microespacial e dinâmica populacional do complexo *Melocactus oreas* (Cactaceae) no Brasil**. 2014. -, PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
- IUCN. Guidelines for application of IUCN red list criteria at regional and national levels: version 4.0. : IUCN Gland, Switzerland and Cambridge, UK 2012.
- JESUS, I. S. D. d.; CONCEIÇÃO, L. P.; SCHNADELBACH, A. S.; ASSIS, J. G. d. A. *et al.* Genetic evidence of multiple reproductive strategies in a microendemic and threatened cactus (Cactaceae: *Discocactus Pfeiff*) in Bahia, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, 33, n. 3, p. 437-445, 2019.
- KHAN, G.; FRANCO, F. F.; SILVA, G. A.; BOMBONATO, J. R. *et al.* Maintaining genetic integrity with high promiscuity: Frequent hybridization with low introgression in multiple

- hybrid zones of *Melocactus* (Cactaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, 142, p. 106642, 2020.
- LAMBERT, S. M.; BORBA, E. L.; MACHADO, M. C. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus* × *albicephalus* (*Melocactus ernestii* × *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, 21, n. 2, p. 93-108, 2006.
- LAMBERT, S. M.; BORBA, E. L.; MACHADO, M. C.; ANDRADE, S. C. D. S. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. **Annals of Botany**, 97, n. 3, p. 389-403, 2006.
- LUZ-FREIRE, H. P.; TRINDADE, D. P. F. d.; SÁ-NETO, R. J. d.; CORRÊA, M. M. Survival dynamics of *Melocactus conoideus* Buining & Brederoo (Cactaceae), a threatened species endemic to northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, 28, n. 2, p. 293-297, 2014.
- MACHADO, M. The genus *Melocactus* in eastern Brazil: part I-an introduction to *Melocactus*. **CactusWorld**, 27, n. 1, p. 5-20, 2009.
- MALUF, R. P.-.; CARDOSO, C. M. P.; JR, J. G. A.; ABREU, S. A. *et al.* VISITANTES FLORAIS E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MELOCACTUS CONOIDEUS BRUIN. & BED. (CACTACEAE), ESPECIE ENDÊMICA DA SERRA DO PERIPERI, VITORIA DA CONQUISTA, BA. . Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia, São Lourenço - MG 2009.
- MAYA-GARCÍA, R.; ARIZAGA, S.; CUEVAS-REYES, P.; PEÑALOZA-RAMÍREZ, J. M. *et al.* Landscape genetics reveals inbreeding and genetic bottlenecks in the extremely rare short-globose cacti *Mammillaria pectinifera* (Cactaceae) as a result of habitat fragmentation. **Plant diversity**. 39, n. 1, p. 13-19, 2017.
- MEIRMANS, P. G.; LIU, S.; VAN TIENDEREN, P. H. The analysis of polyploid genetic data. **Journal of Heredity**, 109, n. 3, p. 283-296, 2018.
- MILLS, L. S.; ALLENDORF, F. W. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. **Conservation biology**, 10, n. 6, p. 1509-1518, 1996.
- NASSAR, J. M.; HAMRICK, J.; FLEMING, T. H. Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). **Heredity**, 87, n. 1, p. 69, 2001.
- NASSAR, J. M.; HAMRICK, J.; FLEMING, T. H. J. A. J. o. B. Population genetic structure of Venezuelan chiropterophilous columnar cacti (Cactaceae). 90, n. 11, p. 1628-1637, 2003.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89, n. 3, p. 583-590, 1978.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia university press, 1987. 0231063210.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and researchdan update. **Bioinformatics** 28, 2537e2539. 2012.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. Biologia da conservação. *In: Biologia da conservação*, 2006.

- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **euphytica**, 128, n. 1, p. 9-17, 2002.
- RIZZINI, C. T. **Melocactus no Brasil**. IBDF, Jardim Botânico, 1982.
- ROMÃO, R. L.; HUGHES, F. M.; VIEIRA, A. M. C.; FONTES, E. C. Autoecologia de Cabeça-de-frade (*Melocactus ernestii* Vaupel) em duas áreas de afloramentos na Bahia. **Revista Brasileira de Biociências**, 5, n. 1, p. 738-740, 2007.
- SOLÓRZANO, S.; ARIAS, S.; DÁVILA, P. Genetics and conservation of plant species of extremely narrow geographic range. **Diversity**, 8, n. 4, p. 31, 2016.
- SOLÓRZANO, S.; CUEVAS-ALDUCIN, P. D.; GARCÍA-GÓMEZ, V.; DÁVILA, P. Genetic diversity and conservation of *Mammillaria huitzilopochtli* and *M. supertexta*, two threatened species endemic of the semiarid region of central Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, 85, n. 2, p. 565-575, 2014.
- SOLÓRZANO, S.; DÁVILA, P. Identification of conservation units of *Mammillaria crucigera* (Cactaceae): perspectives for the conservation of rare species. **Plant Ecology Diversity**, 8, n. 4, p. 559-569, 2015.
- SOULÉ, M. E. What is conservation biology? **BioScience**, 35, n. 11, p. 727-734, 1985.
- STIFT, M.; KOLÁŘ, F.; MEIRMANS, P. G. STRUCTURE is more robust than other clustering methods in simulated mixed-ploidy populations. **Heredity**, 123, n. 4, p. 429-441, 2019.
- TAYLOR, N. P. The genus *Melocactus* (Cactaceae) in Central and South America. **Bradleya**, 1991, n. 9, p. 1-81, 1991.
- TAYLOR, N. P. PLANTS IN PERIL, 17 MELOCACTUS CONOIDEUS. **Curtis's Botanical Magazine**, 9, n. 3, p. 138-141, 1992.
- VIEIRA, A. C.; CARDOSO, T. d. S.; SILVA, T. S. S.; SILVA, C. B. M. C. *et al.* SELEÇÃO DE PRIMERS INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT EM *Melocactus conoideus* BUIN. & BRED. (CACTACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DO SUDOESTEDA BAHIA, BRASIL. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, V.16, p. 1365-1374, 2019.
- WANG, J. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. **Conservation Biology**, 18, n. 2, p. 332-343, 2004.
- WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. INVITED REVIEW: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular ecology**, 15, n. 6, p. 1419-1439, 2006.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, 19, n. 3, p. 395-420, 1965.
- YEH, F. C.; YANG, R.-C.; BOYLE, T.; YE, Z. *et al.* POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. **Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada**, v. 10, p. 295-301, 1997.

ZAPPI, D. C.; TAYLOR, N. **Cactaceae in Flora do Brasil 2020 em construção.** 2020.
Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB70>.

PERSPECTIVAS

Em função do surgimento de um vírus em território chinês que originou uma zoonose pandêmica já considerada como um marco histórico na humanidade, uma nova situação social foi imposta. O vírus SARS-CoV-2 e a doença causada por ele, a Covid-19, implicaram a todo o mundo a necessidade de políticas de isolamento social devido a letalidade e a sua capacidade contagiosa. Diante disso, uma transformação radical das relações sociais se fez necessária, inviabilizando o convívio em espaços sociais como medida preventiva ao risco de transmissão da doença.

Nesse contexto, o trabalho relativo à caracterização de padrões associados ao sistema de cruzamento genético de *Melocactus conoideus* por meio de abordagens estatísticas a partir do perfil de amplificação genética de 10 famílias, previsto originalmente no projeto de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e que se encontrava em andamento, foi diretamente impactado por conta das restrições às atividades de pesquisa laboratoriais e em campo. Até a pandemia, foi construído o banco de DNA genômico dos indivíduos progenitores, extraído do pericarpo dos frutos, que foram despulpados e as sementes utilizadas no cultivo das progênies. As amostras estão armazenadas em banco de DNA genômico no Laboratório de Genética Molecular Aplicada- LGMA. Foram obtidas para cada planta mãe, cerca de dez mudas que foram mantidas recebendo fluxo de radiação solar até o desenvolvimento do cladódio. A extração de DNA genômico das progênies foi realizada a partir do tecido caulinar, através do protocolo CTAB (*Cetyl Trimetil Amônio Bromide*) no LGMA, onde se encontram armazenadas.

A perspectiva é a realização de amplificação genética utilizando 10 *primers Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) pré-selecionados por Vieira *et al.* (2019) para os ensaios de taxa de cruzamento genético através da genotipagem molecular entre os indivíduos progenitores e as progênies. Estes dados avaliados a partir do *software Multilocus Mating System Program* MLTR 3.2 (RITLAND, 2002), para aplicação dos modelos de máxima verossimilhança para estimativas de sistemas de acasalamento, como a taxa de cruzamento dentro e entre populações, coeficiente de endogamia e correlação de paternidade.

Além disso, a obtenção de dados acerca da ecologia reprodutiva de *M. conoideus*, através de uma avaliação do sistema reprodutivo e da caracterização da biologia floral, relacionada a viabilidade polínica, receptividade de estigma e o fornecimento de recursos e

atrativos a visitantes florais, tais como odor e néctar, foram igualmente impactados pela pandemia, não sendo possível a obtenção dos mesmos como esperado originalmente na proposição deste trabalho. Entretanto, estamos certos de que os dados aqui apresentados são quali-quantitativamente suficientes para a obtenção do título de mestre em Ciências Ambientais e em breve, os dados não obtidos até o momento estarão disponíveis para somar às informações aqui apresentadas e contribuirão sobremaneira para a preservação de uma das espécies símbolos do sudoeste baiano, *Melocactus conoideus*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos através desse estudo representam os esforços em genética da conservação em *M. conoideus*. Através do Capítulo I, foi realizado o estudo preliminar de seleção de iniciadores ISSR para a caracterização da diversidade e estrutura genética da espécie (Capítulo II). Este trabalho, por sua vez, contribuiu significativamente para a compreensão da dinâmica populacional da espécie em ambiente natural, além de fornecer dados que implicam diretamente em estratégias para o manejo genético da espécie, tendo em vista a diferenciação genética dos genótipos oriundos das regiões amostradas nesse estudo, fora de uma zona protetiva. Assim sendo, os resultados desse estudo cumprem com os objetivos da biologia e da genética da conservação, e merecem ser considerados para fins de manejo genético da espécie, além de indicar o caminho para estudos adicionais a serem realizados no período pós pandemia.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y. *et al.* Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular ecology**, 17, n. 24, p. 5177-5188, 2008.
- ANDERSON, E. F. **The cactus family**. Timber Press (OR), 2001. 0881924989.
- ASSIS, J. G.; OLIVEIRA, A. L.; RESENDE, S. V.; SENRA, J. F. *et al.* Chromosome numbers in Brazilian Melocactus (Cactaceae). **Bradleya**, 2003, n. 21, p. 1-7, 2003.
- BENEDICTIS, N. M. S. M. **Política ambiental e desenvolvimento urbano na serra do periperi em Vitória da conquista-BA**. 2007. - PPGCS - Mestrado em Ciências Sociais, Universidade Federal do Rio Grande do Norte Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/13535>.
- BOMBONATO, J. R.; BONATELLI, I. A. S.; SILVA, G. A. R.; MORAES, E. M. *et al.* Cross-genera SSR transferability in cacti revealed by a case study using Cereus (Cereaceae, Cactaceae). **Genetics and molecular biology**, n. AHEAD, 2019.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, 32, n. 3, p. 314, 1980.
- BRAVO FILHO, E. S.; SANTANA, M. C.; SANTOS, P. A. A.; RIBEIRO, A. d. S. Levantamento etnobotânico da família Cactaceae no estado de Sergipe. **Revista Fitos Eletrônica**, 12, n. 1, p. 41-53, 2018.
- BRITO-KATEIVAS, K. S. Ants interacting with fruits of Melocactus conoideus Buining & Brederoo (Cactaceae) in southwestern Bahia, Brazil. **Biotemas**, 25, n. 3, p. 153-159, 2012.
- BUSTAMANTE, E.; BÚRQUEZ, A.; SCHEINVAR, E.; EGUIARTE, L. E. Population genetic structure of a widespread bat-pollinated columnar cactus. **PloS one**, 11, n. 3, p. e0152329, 2016.
- CARSON, H. L. J. B. C. S. The genetics of the founder effect. **BIOL. CONSERV. SER**, p. 189-200, 1983.
- CASTRO-FELIX, P.; ROSAS-ESPINOZA, V. C.; DÍAZ-CÁRDENAS, B.; PÉREZ-VALENCIA, L. I. *et al.* Genetic diversity within a declining natural population of Ferocactus histrix (DC) L. **Plant species biology**, 29, n. 3, p. E21-E30, 2014.

CASTRO, J. P.; MORAES, A. P.; CHASE, M. W.; SANTOS, A. M. S. *et al.* Karyotype characterization and evolution of chromosome number in Cactaceae with special emphasis on subfamily Cactoideae. **Acta Botanica Brasilica**, 34, 2019.

CAVALCANTE, A. D. M. B.; GOMES, V. G. N.; DE VASCONCELOS, G. C. L.; MEIADO, M. V. J. C. *et al.* Ex situ conservation of Cactaceae in the Brazilian semiarid: Cactarium Guimarães Duque. **Cactus and Succulent Journal**, 89, n. 1, p. 24-27, 2017.

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.

CHESNOKOV, Y. V.; ARTEMYEVA, A. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. **Сельскохозяйственная биология**, n. 5 (eng), 2015.

CITES. **Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora**. 2020. Disponível em: <https://www.cites.org/eng/disc/what.php>. Acesso em: 05/08/2020.

CIVATTI, L.; MARCHI, M.; BELLINTANI, M. Cryopreservation of cacti seeds of three ornamental species endemic to the state of Bahia, Brazil. **Seed Science and Technology**, 43, n. 2, p. 284-290, 2015.

CNCFLORA. **Melocactus conoideus in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2**. Centro Nacional de Conservação da Flora., 2020. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Melocactus%20conoideus>. Acesso em: 06/08.

COLAÇO, M. A.; FONSECA, R. B.; LAMBERT, S. M.; COSTA, C. *et al.* Biologia reprodutiva de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo e *M. paucispinus* G. Heimen & R. Paul (Cactaceae), na Chapada Diamantina, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 29, n. 2, p. 239-249, 2006.

CORREIA, D.; DO NASCIMENTO, E.; GOMES FILHO, A.; LIMA, M. *et al.* **Melocactus**. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1088141/melocactus>.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: estatística experimental e matrizes**. UFV, 2006. 8572692452.

CSSG. **The Cactus and Succulent Plants Specialist Group- Red Listing of cacti and succulents**. 2020. Disponível em: <https://www.iucn.org/ssc-groups/plants-fungi/cactus-and-succulent-plants-specialist-group/red-listing-cacti-and-succulents>. Acesso em: 06/08.

DE SILVA, H.; HALL, A.; RIKKERINK, E.; MCNEILAGE, M. *et al.* Estimation of allele frequencies in polyploids under certain patterns of inheritance. **Heredity**, 95, n. 4, p. 327-334, 2005.

DEL CARMEN MANDUJANO, M.; CARRILLO-ANGELES, I.; MARTÍNEZ-PERALTA, C.; GOLUBOV, J. Reproductive biology of Cactaceae. *In: Desert plants*: Springer, 2010. p. 197-230.

DOMINGUES, S. D.; MACHADO, M. d. F. P. d. S.; MANGOLIN, C. A.; NEVES, A. F. d. SELEÇÃO DE PRIMERS PARA ANÁLISE DE INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS (ISSR) EM *Cereus* sp. (CACTACEAE). **Revista Biotecnologia & Ciência**, v.6, p. 46-54, 2017.

DOS SANTOS, L. F.; DE OLIVEIRA, E. J.; DOS SANTOS SILVA, A.; DE CARVALHO, F. M. *et al.* ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, 49, n. 7-8, p. 540-554, 2011.

DOYLE, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12, p. 13-15, 1990.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation genetics resources**, 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FIGUEREDO, C.; NASSAR, J.; GARCÍA-RIVAS, A.; GONZÁLEZ-CARCACÍA, J. Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereeae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. **Journal of Arid Environments**, 74, n. 11, p. 1392-1398, 2010.

FLATHER, C. H.; SIEG, C. H. **Species rarity: definition, causes and classification**. Conservation of rare or little-known species: Biological, social, and economic considerations, 2007. 40-66 p.

FONSECA, R. B. S.; FUNCH, L. S.; BORBA, E. L. Reproductive phenology of *Melocactus* (Cactaceae) species from Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, 31, n. 2, p. 237-244, 2008.

FRAGA, D. A.; DE CARVALHO, A. F.; RIBEIRO, C. J. B.; SANTANA, R. S. *et al.* Establishing population boundaries and conservation proposals for *Coleocephalocereus purpureus*, a critically endangered cactus species microendemic from Caatinga biome. p. 125823, 2020.

FRANKEL, O.; SOULÉ, M. E. **Conservation and evolution.** CUP Archive, 1981. 052129889X.

FRANKEL, O. H., 1970, **Variation-the essence of life.** 158-169.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biologies**, 326, p. 22-29, 2003.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological conservation**, 126, n. 2, p. 131-140, 2005.

FRANKHAM, R.; BRADSHAW, C. J.; BROOK, B. W. J. B. C. Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. **Biological Conservation**, 170, p. 56-63, 2014.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. **Introduction to conservation genetics.** Cambridge university press, 2002. 0521639859.

FRANKHAM, R. J. B. c. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological conservation**, 143, n. 9, p. 1919-1927, 2010.

FRANKHAM, R. J. C. G. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? **Conservation Genetics**, 11, n. 2, p. 661-663, 2010.

GARNER, B. A.; HAND, B. K.; AMISH, S. J.; BERNATCHEZ, L. *et al.* Genomics in conservation: case studies and bridging the gap between data and application. **Trends in Ecology & Evolution**, 31, n. 2, p. 81-83, 2016.

GIBSON, A. C.; NOBEL, P. S. **The cactus primer.** Harvard University Press, 1986. 067408991X.

GILPIN, M. E.; SOULÉ, M. E. Minimum viable populations: processes of species extinction. **Conservation biology: the science of scarcity and diversity.**, p. 19-34, 1986.

GIOVANONI, S. d. S. Caracterização genética de populações de *Rhipsalis dissimilis* K. Schum.(Cactaceae) no Estado do Paraná. 2014.

GODEFROID, S.; RIVIÈRE, S.; WALDREN, S.; BORETOS, N. *et al.* To what extent are threatened European plant species conserved in seed banks? **Biological conservation**, 144, n. 5, p. 1494-1498, 2011.

GODINHO, L.; SCALDAFERRI, M.; SANTOS, E.; CERQUEIRA-SILVA, C. Conhecimento popular e educação ambiental como alternativas para preservação do *Melocactus conoideus* Buin. e Bred. na Serra do Periperi, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. **Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas**, 7, n. 3, 2010.

GOETTSCHE, B.; HILTON-TAYLOR, C.; CRUZ-PIÑÓN, G.; DUFFY, J. P. *et al.* High proportion of cactus species threatened with extinction. **Nature plants**, 1, n. 10, p. 15142, 2015.

GOMES, V.; QUIRINO, Z.; MACHADO, I. Pollination and seed dispersal of *Melocactus ernestii* Vaupel subsp. *ernestii* (Cactaceae) by lizards: an example of double mutualism. **Plant Biology**, 16, n. 2, p. 315-322, 2014.

GUERRERO, P. C.; MAJURE, L. C.; CORNEJO-ROMERO, A.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, T. J. J. o. H. Phylogenetic relationships and evolutionary trends in the Cactus family. **Journal of Heredity**, 110, n. 1, p. 4-21, 2019.

GUPTA, M.; CHYI, Y.-S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. J. T. *et al.* Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and applied genetics**, 89, n. 7-8, p. 998-1006, 1994.

GUTIÉRREZ-FLORES, C.; COTA-SÁNCHEZ, J. H.; LEÓN-DE LA LUZ, J. L.; GARCÍA-DE LEÓN, F. J. Disparity in floral traits and breeding systems in the iconic columnar cactus *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). **Flora**, 235, p. 18-28, 2017.

HAMRICK, J. Genetic diversity in columnar cacti. **Ecology Conservation Biology**, 2002.

HEDRICK, P. W. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, 53, n. 2, p. 313-318, 1999.

HENRY, R. J. **Molecular markers in plants**. Wiley Online Library, 2013. 0470959517.

HUGHES, F. M. **Biosistemática, filogeografia, estrutura microespacial e dinâmica populacional do complexo *Melocactus oreas* (Cactaceae) no Brasil**. 2014. -, PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

HUNT, D. R.; TAYLOR, N. P.; CHARLES, G. **New cactus lexicon**. dh books, 2006. 0953813444.

IUCN. Guidelines for application of IUCN red list criteria at regional and national levels: version 4.0. : IUCN Gland, Switzerland and Cambridge, UK 2012.

IUCN, S. S. C. IUCN Red List categories and criteria: version 3.1. **Prepared by the IUCN Species Survival Commission**, 2001.

JESUS, I. S. D. d.; CONCEIÇÃO, L. P.; SCHNADELBACH, A. S.; ASSIS, J. G. d. A. *et al.* Genetic evidence of multiple reproductive strategies in a microendemic and threatened cactus (Cactaceae: *Discocactus* Pfeiff) in Bahia, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, 33, n. 3, p. 437-445, 2019.

KAREIVA, P.; MARVIER, M. What Is Conservation Science? **BioScience**, 62, n. 11, p. 962-969, 2012.

KHAN, G.; FRANCO, F. F.; SILVA, G. A.; BOMBONATO, J. R. *et al.* Maintaining genetic integrity with high promiscuity: Frequent hybridization with low introgression in multiple hybrid zones of *Melocactus* (Cactaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, 142, p. 106642, 2020.

LAMBERT, S. M.; BORBA, E. L.; MACHADO, M. C. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus* × *albicephalus* (*Melocactus ernestii* × *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, 21, n. 2, p. 93-108, 2006.

LAMBERT, S. M.; BORBA, E. L.; MACHADO, M. C.; ANDRADE, S. C. D. S. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. **Annals of Botany**, 97, n. 3, p. 389-403, 2006.

LAUSCHE, B. J. **Weaving a web of environmental law**. Schmidt, 2008. 3503110453.

LAUTERBACH, D.; BURKART, M.; GEMEINHOLZER, B. J. B. J. o. t. L. S. Rapid genetic differentiation between ex situ and their in situ source populations: an example of the endangered *Silene otites* (Caryophyllaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 168, n. 1, p. 64-75, 2012.

LEAL, F. C.; LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. Polinização por beija-flores em uma área de caatinga no Município de Floresta, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Bot.**, p. 379-389, 2006.

LEVIN, D. A.; KERSTER, H. W. Gene flow in seed plants. *In*: **Evolutionary biology**: Springer, 1974. p. 139-220.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual review of ecology and systematics**, 15, n. 1, p. 65-95, 1984.

LUZ-FREIRE, H. P.; TRINDADE, D. P. F. d.; SÁ-NETO, R. J. d.; CORRÊA, M. M. Survival dynamics of *Melocactus conoideus* Buining & Brederoo (Cactaceae), a threatened species endemic to northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, 28, n. 2, p. 293-297, 2014.

MACE, G. M.; LANDE, R. J. C. b. Assessing extinction threats: toward a reevaluation of IUCN threatened species categories. **Conservation biology**, 5, n. 2, p. 148-157, 1991.

MACHADO, M. The genus *Melocactus* in eastern Brazil: part I-an introduction to *Melocactus*. **CactusWorld**, 27, n. 1, p. 5-20, 2009.

MALUF, R. P.-.; CARDOSO, C. M. P.; JR, J. G. A.; ABREU, S. A. *et al.* VISITANTES FLORAIS E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MELOCACTUS CONOIDEUS BRUIN. & BED. (CACTACEAE), ESPECIE ENDÊMICA DA SERRA DO PERIPERI, VITORIA DA CONQUISTA, BA. . Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia, São Lourenço - MG 2009.

MAYA-GARCÍA, R.; ARIZAGA, S.; CUEVAS-REYES, P.; PEÑALOZA-RAMÍREZ, J. M. *et al.* Landscape genetics reveals inbreeding and genetic bottlenecks in the extremely rare short-globose cacti *Mammillaria pectinifera* (Cactaceae) as a result of habitat fragmentation. **Plant diversity**, 39, n. 1, p. 13-19, 2017.

MCGOUGH, N. H.; GROVES, M.; SMITH, M.; SAJEVA, M. *et al.* CITES and Succulents a user's guide. : Royal Botanic Gardens, Kew 2000.

MEFFE, G. K.; VIEDERMAN, S. J. W. S. B. Combining science and policy in conservation biology. **Wildlife Society Bulletin (1973-2006)**, 23, n. 3, p. 327-332, 1995.

MEIRMANS, P. G.; LIU, S.; VAN TIENDEREN, P. H. The analysis of polyploid genetic data. **Journal of Heredity**, 109, n. 3, p. 283-296, 2018.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G.; FREEDMAN, E.; VILGALYS, R. J. J. o. C. M. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, 31, n. 9, p. 2274-2280, 1993.

MILLIGAN, B.; LEEBENS-MACK, J.; STRAND, A. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. **Molecular Ecology**, 3, n. 4, p. 423-435, 1994.

MILLS, L. S.; ALLENDORF, F. W. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. **Conservation biology**, 10, n. 6, p. 1509-1518, 1996.

MONTEIRO, E. R.; MANGOLIN, C. A.; DAS NEVES, A. F.; ORASMO, G. R. *et al.* Genetic diversity and structure of populations in *Pilosocereus gounellei* (FAC Weber ex K. Schum.) (Cactaceae) in the Caatinga biome as revealed by heterologous microsatellite primers. **Biochemical Systematics and Ecology**, 58, p. 7-12, 2015.

MORAIS, P. M. T. A. **Ritmo circadiano do florescimento de *Melocactus zehntneri*: quem seriam os potenciais visitantes e polinizadores.** 2018. - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/26323>.

NADEEM, M. A.; NAWAZ, M. A.; SHAHID, M. Q.; DOĞAN, Y. *et al.* DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 32, n. 2, p. 261-285, 2018.

NASSAR, J.; RAMÍREZ, N. Reproductive biology of the melon cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). **Plant Systematics and Evolution**, 248, n. 1-4, p. 31-44, 2004.

NASSAR, J. M.; HAMRICK, J.; FLEMING, T. H. Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). **Heredity**, 87, n. 1, p. 69, 2001.

NASSAR, J. M.; HAMRICK, J.; FLEMING, T. H. J. A. J. o. B. Population genetic structure of Venezuelan chiropterophilous columnar cacti (Cactaceae). **Journal of Arid Environments**, 90, n. 11, p. 1628-1637, 2003.

NEEL, M. C.; CUMMINGS, M. P. J. C. B. Effectiveness of conservation targets in capturing genetic diversity. **Conservation Biology**, 17, n. 1, p. 219-229, 2003.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics.** Columbia university press, 1987. 0231063210.

NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. **ASM Sci J**, 9, n. 1, p. 30-39, 2015.

ODENBAUGH, J. Aug 23, 2019. **The Stanford Encyclopedia of Philosophy** 2019.

OLDFIELD, S. **Cactus and succulent plants: status survey and conservation action plan.** International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), 1997. 2831703905.

OLIVEIRA, H.; BRITO, K.; MORAIS, C.; MELO, J. *et al.*, 2007, **Padrão de distribuição espacial de *Melocactus conoideus* (Cactaceae) no Parque Municipal Serra do Periperi, Vitória da Conquista, Bahia.**

OLIVEIRA, M. d. J.; SOUZA, A. d. L.; ANDRADE, G. N. d.; BARROS, J. S. PARQUE MUNICIPAL SERRA DO PERIPERI: UM BREVE ESTUDO ACERCA DO (DES)CUMPRIMENTO DA LEGISLAÇÃO AMBIENTAL APLICÁVEL. **Anais- IX Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental, XV Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia Ambiental e III Fórum Latino Americano de Engenharia e Sustentabilidade**, 4, p. 152-162, 2017.

OUBORG, N.; VERGEER, P.; MIX, C. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. **Journal of Ecology**, 94, n. 6, p. 1233-1248, 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and researchdan update. **Bioinformatics** 28, 2537e2539. 2012.

PMVC. **Prefeitura Municipal de Vitória da Conquista.** 2013. Disponível em: <https://www.pmvc.ba.gov.br/prefeitura-reproduz-especie-endemica-em-herbario-municipal/>. Acesso em: 11/08.

PMVC. **Prefeitura Municipal de Vitória da Conquista.** 2016. Disponível em: <https://www.pmvc.ba.gov.br/herbario-municipal-produz-mais-de-3-mil-mudas-em-quatromeses/>.

PMVC. **Prefeitura Municipal de Vitória da Conquista.** 2017. Disponível em: <https://www.pmvc.ba.gov.br/herbario-municipal-auxilia-no-reflorestamento-da-serra-do-periperi/>.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. Biologia da conservação. *In*: **Biologia da conservação**, 2006.

PRIMMER, C. From conservation genetics to conservation genomics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1162, n. 1, p. 357-368, 2009.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

RABINOWITZ, D. Seven forms of rarity. **Biological aspects of rare plant conservation**, 1981.

REALINI, M. F.; GONZÁLEZ, G. E.; FONT, F.; PICCA, P. I. *et al.* Phylogenetic relationships in *Opuntia* (Cactaceae, Opuntioideae) from southern South America. **Plant systematics and evolution**, 301, n. 4, p. 1123-1134, 2015.

REBOUÇAS, A. C. M. N.; SANTOS, D. L. Influência do Fotoperíodo e Qualidade de Luz na Germinação de Sementes de *Melocactus conoideus* (Cactaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, 5, n. S2, p. 900-902, 2007.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **euphytica**, 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems**. Garland Science, 1997. (Provides a comprehensive overview of plant breeding systems and their consequences. 0412574500.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**, 88, n. 4, p. 221, 2002.

RIZZINI, C. T. **Melocactus no Brasil**. IBDF, Jardim Botânico, 1982.

ROMÃO, R. L.; HUGHES, F. M.; VIEIRA, A. M. C.; FONTES, E. C. Autoecologia de Cabeça-de-frade (*Melocactus ernestii* Vaupel) em duas áreas de afloramentos na Bahia. **Revista Brasileira de Biociências**, 5, n. 1, p. 738-740, 2007.

ROSSETTO, M.; RYMER, P. D. Applications of molecular markers in plant conservation. *In: Molecular markers in plants*. Brisbane, Qld.: Wiley & Sons, 2013. p. 81-98.

SANTOS, D. L.; CERQUEIRA SILVA, C. B. Fenologia reprodutiva de *Melocactus conoideus* Buin e Bred: Espécie Endêmica do Município de Vitória da Conquista, Bahia–Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, 5, n. S2, p. 1095-1097, 2007.

SARKAR, S. **Biodiversity and environmental philosophy: An introduction**. Cambridge University Press, 2005. 0521851327.

SHAFER, A. B.; WOLF, J. B.; ALVES, P. C.; BERGSTRÖM, L. *et al.* Genomics and the challenging translation into conservation practice. **Trends in ecology & evolution**, 30, n. 2, p. 78-87, 2015.

SILVA, G. A. R.; ANTONELLI, A.; LENDEL, A.; MORAES, E. d. M. *et al.* The impact of early Quaternary climate change on the diversification and population dynamics of a South American cactus species. **Journal of Biogeography**, 45, n. 1, p. 76-88, 2018.

SILVA, S. R.; ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; MACHADO, M. Plano de ação nacional para a conservação das cactáceas. **Série Espécies Ameaçadas**, n. 24, 2011.

SMITH, G.; IHLENFELDT, H. D.; THIEDE, J.; EGGLI, U. *et al.* The International Organization for Succulent Plant Study (IOS): its role and potential services to the international scientific community. **Taxon**, 48, n. 4, p. 715-720, 1999.

SOLÓRZANO, S.; ARIAS, S.; DÁVILA, P. Genetics and conservation of plant species of extremely narrow geographic range. **Diversity**, 8, n. 4, p. 31, 2016.

SOLÓRZANO, S.; CUEVAS-ALDUCIN, P. D.; GARCÍA-GÓMEZ, V.; DÁVILA, P. Genetic diversity and conservation of *Mammillaria huitzilopochtli* and *M. supertexta*, two threatened species endemic of the semiarid region of central Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, 85, n. 2, p. 565-575, 2014.

SOLÓRZANO, S.; DÁVILA, P. Identification of conservation units of *Mammillaria crucigera* (Cactaceae): perspectives for the conservation of rare species. **Plant Ecology & Diversity**, 8, n. 4, p. 559-569, 2015.

SOULÉ, M. E. What is conservation biology? **BioScience**, 35, n. 11, p. 727-734, 1985.

STIFT, M.; KOLÁŘ, F.; MEIRMANS, P. G. STRUCTURE is more robust than other clustering methods in simulated mixed-ploidy populations. **Heredity**, 123, n. 4, p. 429-441, 2019.

TAO, J.; QIAO, G.; WEN, X.-P.; GAO, G.-L. *et al.* Characterization of genetic relationship of dragon fruit accessions (*Hylocereus* spp.) by morphological traits and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, 170, p. 82-88, 2014.

TAYLOR, N. P. The genus *Melocactus* (Cactaceae) in Central and South America. **Bradleya**, 1991, n. 9, p. 1-81, 1991.

TAYLOR, N. P. PLANTS IN PERIL, 17 MELOCACTUS CONOIDEUS. **Curtis's Botanical Magazine**, 9, n. 3, p. 138-141, 1992.

TAYLOR, N. P. **Taxonomy and phylogeography of the Cactaceae of eastern Brazil**. 2000. -, The Open University.

TAYLOR, N. P.; ZAPPI, D. C. **Cacti of eastern Brazil**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2004. 1842460560.

THEPLANTLIST. **The Plant List, a working list of all plant species 2020**. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Cactaceae/>.

TORRES-SILVA, G.; RESENDE, S.; LIMA-BRITO, A.; BEZERRA, H. *et al.* In vitro shoot production, morphological alterations and genetic instability of *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), an endangered species endemic to eastern Brazil. **South African journal of botany**, 115, p. 100-107, 2018.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. **Editora SBG Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP**, 181, 2017.

VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; SAMAH, S.; LUNA-PAEZ, A.; EVOLUTION. Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). **Plant Systematics and evolution**, 301, n. 2, p. 737-747, 2015.

VAN DYKE, F. The Legal Foundations of Conservation Biology. **Conservation Biology: Foundations, Concepts, Applications**, p. 57-82, 2008.

VIEIRA, A. C.; CARDOSO, T. d. S.; SILVA, T. S. S.; SILVA, C. B. M. 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, p. 1365-1374, 2019.

VIEIRA, C. G. **Levantamento das espécies visitantes e potenciais polinizadoras de *Melocactus conoideus* (Cactaceae) em Vitória da Conquista, Ba.** . 2005. 50 f. f. Monografia - (curso de Ciências biológicas) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

WANG, J. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. **Conservation Biology**, 18, n. 2, p. 332-343, 2004.

WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. INVITED REVIEW: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular ecology**, 15, n. 6, p. 1419-1439, 2006.

WHITLOCK, R.; HIPPERSON, H.; THOMPSON, D.; BUTLIN, R. *et al.* Consequences of in-situ strategies for the conservation of plant genetic diversity. **Biological Conservation**, 203, p. 134-142, 2016.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, 19, n. 3, p. 395-420, 1965.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: Vol. 4: variability within and among natural populations**. University of Chicago Press, 1978.

YEH, F. C.; YANG, R.-C.; BOYLE, T.; YE, Z. *et al.* POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. **Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada**, 10, p. 295-301, 1997.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in ecology evolution** 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

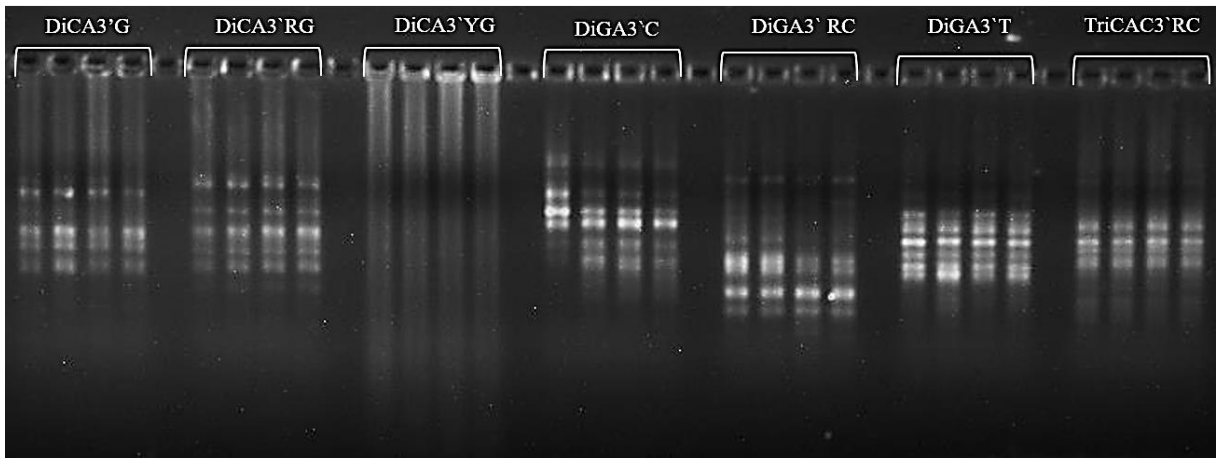
ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C. *et al.* Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZAPPI, D. C.; TAYLOR, N. **Cactaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB70>.

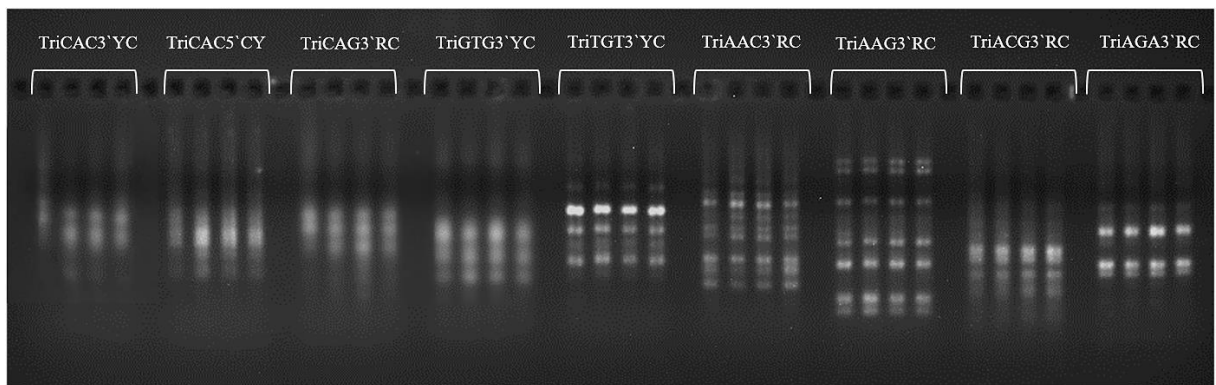
ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

APÊNDICES

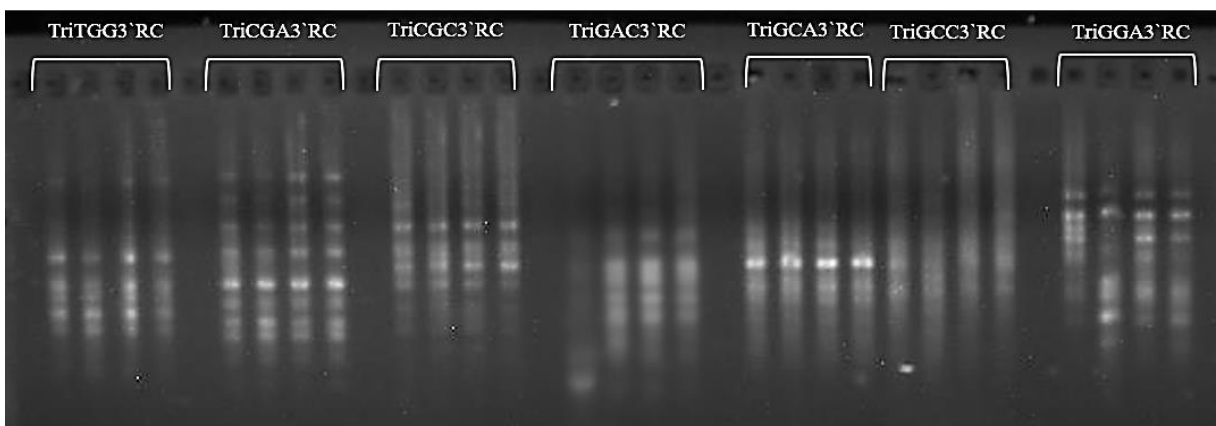
APÊNDICE A- SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR EM *Melocactus conoideus*



Anexo 1. Perfil de amplificação genômica para os iniciadores DiCA3`G, DiCA3`RG, DiCA3`YG, DiGA3`C, DiGA3`RC, DiGA3`T, TriCAC3`RC.

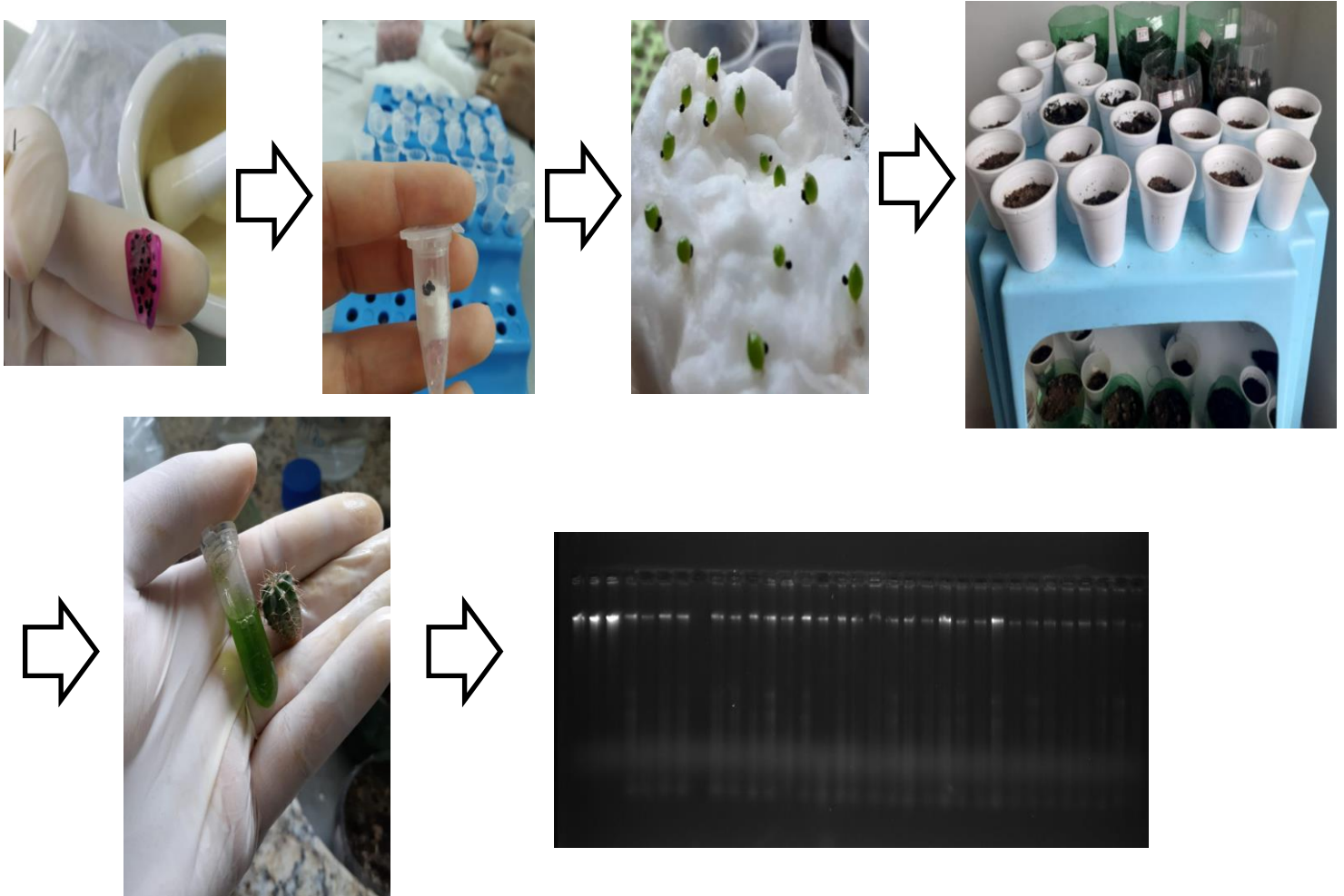


Anexo 2. Perfil de amplificação genômica para os iniciadores TriCAC3`YC, TriCAC5`CY, TriCAG3`RC, TriGTG3`YC, TriTGT3`YC, TriAAC3`RC, TriAAG3`RC, TriACG3`RC, TriAGA3`RC.



Anexo 3. Perfil de amplificação genômica para os iniciadores TriTGG3`RC, TriCGA3`RC, TriCGC3`RC, TriGAC3`RC, TriGCA3`RC, TriGCC3`RC, TriGGA3`RC

**APÊNDICE B- CULTIVO DE PROGÊNIES E EXTRAÇÃO DE DNA
(ATIVIDADES ANTES / DURANTE A PANDEMIA POR COVID-19)**



Anexo 4. Procedimentos de montagem de banco de DNA genômico de progênies de *M. conoideus*: Coleta e germinação das sementes, manutenção das progênies e extração de DNA genômico.