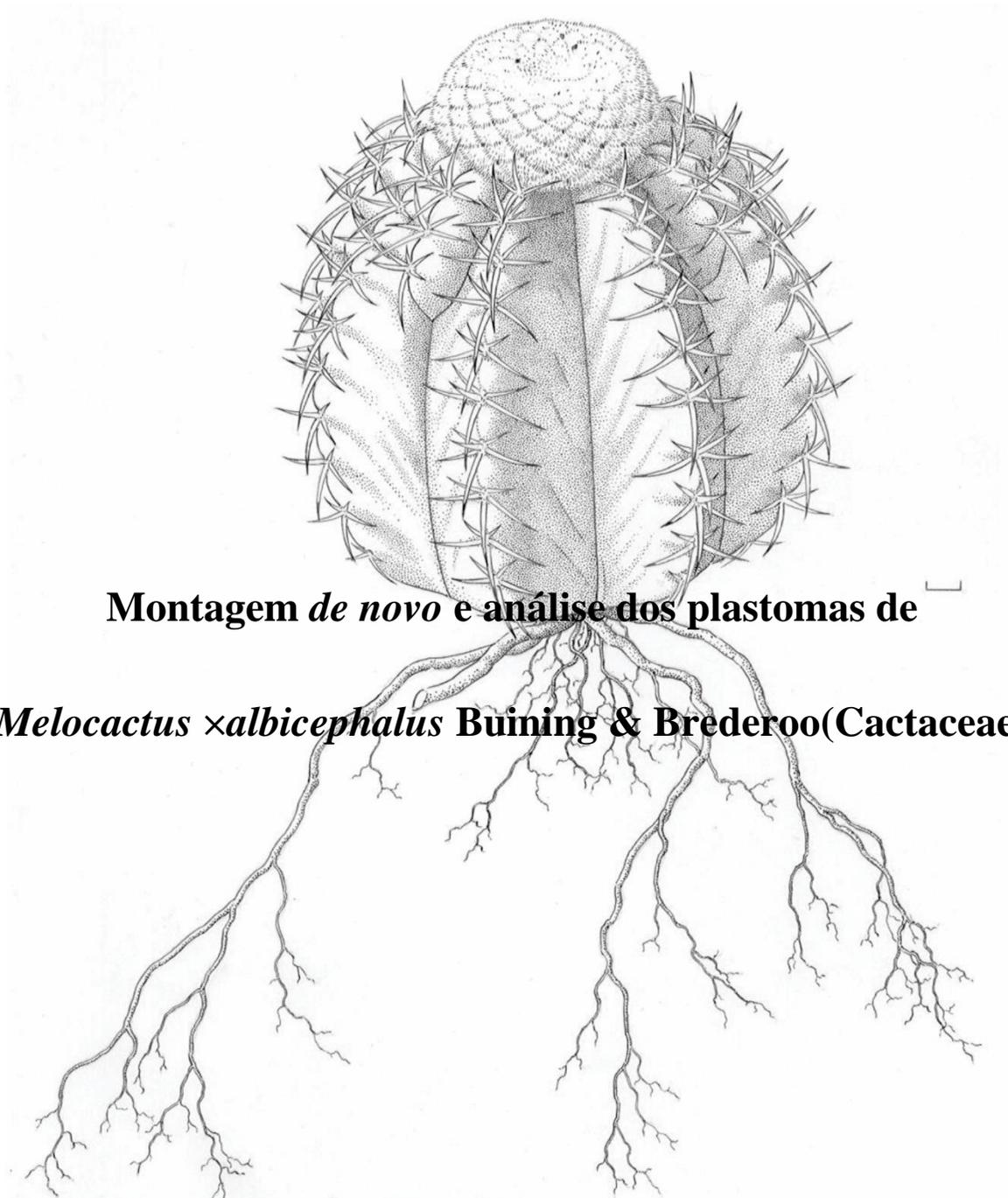


HUGO VITA SOUSA



Montagem *de novo* e análise dos plastomas de

***Melocactus ×albicephalus* Buining & Brederoo (Cactaceae)**

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**Montagem *de novo* e análise dos plastomas de
Melocactus ×albicephalus Buining & Brederoo (Cactaceae)**

Hugo Vita Sousa

Monografia apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, como exigência para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a. Gabriela Torres da Silva

Coorientadora: Dr^a. Alessandra Selbach Schnadelbach

Salvador, BA

2023

Banca Examinadora

Data da defesa: 16 de dezembro de 2023

Dr^a. Mariela Analía Sader
Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Frederic Mendes Hughes
Universidade Estadual de Santa Cruz

Dr^a. Alessandra Selbach Schnadelbach
Universidade Federal da Bahia
Co-orientadora

Dr^a. Gabriela Torres da Silva
Universidade Federal de Viçosa
Orientadora e presidente da banca

Agradecimentos

A Universidade Federal da Bahia, ao Instituto de Biologia e ao Laboratório de Genética e Evolução Vegetal (LAGEV) por fornecerem a infraestrutura necessária durante minha graduação e iniciação científica, e ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) por fornecer as plantas utilizadas para a realização do presente estudo.

Ao Centro Tecnológico Agropecuária do Estado da Bahia (CETAB) por fornecer a infraestrutura para realização da quantificação das amostras de DNA total e ao Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ Bahia) por fornecer a infraestrutura para a liofilização das amostras.

A Dr^a. Gabriela Torres da Silva por se minha mãe científica, me auxiliando e me levando na direção correta durante toda a minha iniciação científica, me apresentou aos *Melocactus* e que financiou a minha pesquisa.

A Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach que me recebeu em seu laboratório como seu estagiário, sempre estando de prontidão para me auxiliar com o que eu precisasse e por ter me apresentado à minha orientadora de TCC, Dr^a. Gabriela Torres da Silva.

Aos meus pais Ila Vita e Mauro dos Santos Sousa que sempre me apoiaram em todas as decisões que eu tomei para minha vida, e que me criaram para ser a pessoa que sou hoje e que espero poder continuar a dar muito orgulho a eles.

Ao meu Irmão Rodrigo Vita Sousa que sempre esteve do meu lado me apoiando e sempre acreditando em mim.

Aos meus amigos, meus irmão de vida, Felipe Moreno, Victor Fadigas, João Vitor Teles, Douglas Felipe Chagas, João Victor Brandão, Gabriel Alvarez e Cristovão Jacques que, não importa o que aconteça, eu sei que nunca vão sair do meu lado.

Aos amigos que eu fiz na faculdade, Amanda, Ariane e Gabriel, que fizeram essa caminhada da graduação junto a mim e sempre me incentivaram.

Aos meus companheiros de laboratório do LCTV, que sempre estavam de prontidão para me ajudar com o que eu precisasse.

E, por fim, a Deus por todas as coisas maravilhosas que ele proporcionou na minha vida e todas as coisas que Ele ainda há de proporcionar.

Resumo

Melocactus ×albicephalus Buining & Brederoo (Cactaceae) é considerado um híbrido natural que ocorre simpatricamente com *M. glaucescens* e *M. ernestii*. Devido à ocorrência simpátrica e a morfologia de *M. ×albicephalus*, que parece ser intermediária entre *M. glaucescens* e *M. ernestii*, estas são as espécies parentais presumidas. Mais além, estudos recentes indicam que há baixa introgressão em híbridos do gênero *Melocactus*, o que permite que as populações híbridas acumulem mutações que as distanciem geneticamente dos parentais. Estudos do genoma do cloroplasto (cpDNA, plastoma) podem ser informativos para inferir sobre o *status* de populações híbridas, colaborando para o manejo de taxa que podem estar em risco de extinção. O presente trabalho teve como objetivo realizar a montagem *de novo* e análise dos plastomas de *Melocactus ×albicephalus*, visando a identificação das espécies parentais e suas relações filogenéticas. O DNA total de um indivíduo de *M. ×albicephalus* foi extraído, liofilizado e submetido ao Sequenciamento de Nova Geração (*New Generation Sequencing* – NGS) em plataforma HiSeq 4000 BGISEq500. A montagem *de novo* do cpDNA permitiu a obtenção de dois plastomas de *M. ×albicephalus*, indicando a ocorrência de heteroplasmia de cloroplasto em suas células, denominados de cpDNA1 e cpDNA2. O cpDNA1 é 96,4% semelhante ao plastoma de *Discocactus bahiensis*, o único plastoma de *Discocactus* disponível para comparação. Já o cpDNA2 é 99,3% semelhante ao plastoma de *M. glaucescens*. Comparando cpDNA1 e cpDNA2 de *M. ×albicephalus* com o plastoma de *M. ernestii*, percebe-se diferenças maiores em todas as regiões do que as comparações com *D. bahiensis* e *M. glaucescens*. Outrossim, *M. ×albicephalus* ocorre simpatricamente não somente com *M. glaucescens* e *M. ernestii*, mas também com *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus*. Desta forma, a zona de hibridação do Parque Estadual de Morro do Chapéu, conhecida popularmente como “Lages”, pode abrigar eventos de hibridação não somente entre *M. glaucescens* e *M. ernestii*, mas também entre *M. glaucescens* e *D. zehntneri* subsp. *boomianus*. Sendo assim, podemos inferir que o indivíduo *M. ×albicephalus* analisado é um híbrido intergenérico, indicando fraco isolamento pré-zigótico de *M. ×albicephalus*, sendo necessários mais estudos para inferir sobre o *status* das suas populações híbridas.

Palavras-chave: cabeça-de-frade, híbrido natural, genoma do cloroplasto.

Abstract

Melocactus × *albicephalus* Buining & Brederoo (Cactaceae) is considered a natural hybrid that occurs sympatrically with *M. glaucescens* and *M. ernestii*. Due to the sympatric occurrence and morphology of *M. ×albicephalus*, which appears to be intermediate between *M. glaucescens* and *M. ernestii*, these are the presumed parental species. Furthermore, recent studies indicate that there is low introgression in hybrids of the genus *Melocactus*, which allows hybrid populations to accumulate mutations that genetically distance them from their parents. Studies of the chloroplast genome (cpDNA, plastome) can be informative to infer the status of hybrid populations, contributing to the management of taxa that may be at risk of extinction. The present work aimed to perform the *de novo* assembly and analysis of *Melocactus* × *albicephalus* plastomes, aiming to identify the parental species and their phylogenetic relationships. Total DNA from an individual of *M. ×albicephalus* was extracted, lyophilized and subjected to New Generation Sequencing (NGS) on a HiSeq 4000 BGISEq500 platform. The *de novo* assembly of cpDNA allowed the obtaining of two *M. ×albicephalus* plastomes, indicating the occurrence of chloroplast heteroplasmy in its cells, named cpDNA1 and cpDNA2. cpDNA1 is 96.4% similar to the *Discocactus bahiensis* plastome, the only *Discocactus* plastome available for comparison. cpDNA2 is 99.3% similar to the *M. glaucescens* plastome. Comparing cpDNA1 and cpDNA2 of *M. ×albicephalus* with the plastome of *M. ernestii*, greater differences can be seen in all regions than the comparisons with *D. bahiensis* and *M. glaucescens*. Furthermore, *M. ×albicephalus* occurs sympatrically not only with *M. glaucescens* and *M. ernestii*, but also with *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus*. In this way, the hybridization zone of the Morro do Chapéu State Park, popularly known as “Lages”, can host hybridization events not only between *M. glaucescens* and *M. ernestii*, but also between *M. glaucescens* and *D. zehntneri* subsp. *boomianus*. Therefore, we can infer that the *M. ×albicephalus* individual analyzed is an intergeneric hybrid, indicating weak pre-zygotic isolation of *M. ×albicephalus*, requiring further studies to infer the status of its hybrid populations.

Keywords: cabeça-de-frade, natural hybrid, chloroplast genome.

Índice

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução | 8 |
| 2. Objetivos | 12 |
| 2.1 Objetivo Geral | 12 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 12 |
| 3. Materiais e Métodos | 13 |
| 3.1 Material vegetal | 13 |
| 3.2 Extração de DNA total | 13 |
| 3.3 Sequenciamento dos plastomas | 14 |
| 3.4 Montagens <i>de novo</i> , anotações e ilustrações dos plastomas | 14 |
| 3.5 Análises filogenéticas | 14 |
| 4. Resultados | 16 |
| 4.1 Extração de DNA total | 16 |
| 4.2 Montagens <i>de novo</i> , anotações e ilustrações dos plastomas | 16 |
| 4.3 Análises filogenéticas | 17 |
| 5. Discussão | 18 |
| 5.1 O híbrido <i>Melocactus ×albicephalus</i> Buining & Brederoo | 18 |
| 5.2. Os plastomas de <i>Melocactus ×albicephalus</i> | 19 |
| 5.3 Tamanho e composição dos plastomas de <i>M. ×albicephalus</i> | 20 |
| 5.4 O cpDNA1 de <i>M. ×albicephalus</i> : | 21 |
| 5.5 O cpDNA2 de <i>M. ×albicephalus</i> : | 21 |
| 5.6 O papel de <i>Melocactus ernestii</i> : | 22 |
| 6 Conclusões | 23 |
| 7 Referências | 24 |
| 8 Anexos | 30 |

1. Introdução

1.1 O que é um plastoma:

Os plastomas (cpDNA) são os genomas dos cloroplastos, o qual é uma organela presente em células vegetais. Estes se originaram a partir do evento de endossimbiose, que teria ocorrido há cerca de 1,5 bilhões de anos, onde uma célula eucariótica teria engolfado uma cianobactéria de vida livre capaz de realizar fotossíntese (MARTIN & KOWALLIK, 1999; OCHOA de ALDA *et al.*, 2014). Sendo assim, a função principal dessa organela é realizar a fotossíntese. Porém, os plastídios são as organelas que realizam a maior parte das funções celulares, o que inclui a síntese de aminoácidos, lipídios e pigmentos vitais para a vida das plantas (NEUHAS & EMES, 2010).

Com o passar do tempo, os plastomas foram se modificando por meio da transferência de muitos genes para o genoma nuclear das plantas. Desta forma, eles diminuiram bastante o seu tamanho, a tal ponto que, atualmente, seu tamanho equivale de 5 a 10% ao tamanho do seu ancestral, que possuía de 2.000 a 3.000 genes em sua composição (MARTIN *et al.*, 2002).

O modo de herança dos plastomas é, na maioria das vezes, uniparental (BOGDANOVA & KOSTERIN, 2006; RUF *et al.*, 2007), sendo normalmente advindo da planta mãe, pois os cloroplastos paternos normalmente são degradados antes de ocorrer a fertilização (BORGONOVA & SILVA-FILHO, 2010). Porém, um terço das angiospermas estudadas transmitem seus plastomas de maneira biparental (MOGENSEN, 1996), onde 20% das angiospermas possuem plastídios em seu pólen maduro, sendo essa uma característica denominada de potencial de herança plastidial biparental (PBPI) (CORRIVEAU e COLEMAN, 1988; ZHANG *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2010). Até o momento, não foram encontrados na bibliografia estudos dessa natureza envolvendo representantes da família Cactaceae.

Os plastomas das Streptofitas (plantas terrestres e algas mais próximas) variam em tamanho de 120 a 160 kb. Estes plastomas são divididos em 4 regiões, sendo essas: a Grande Região de Cópia Única (*Large Single Copy – LSC*), a Pequena Região de Cópia Única (*Small Single Copy – SSC*), as quais são separadas por duas sequências de Regiões de Repetição Invertidas (*Inverted Repeats – IRs*) (WICKE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2018).

Cada plastoma apresenta entre 120 a 130 genes, o que significa que há, em média, um gene a cada 1kb, configurando-se como uma densidade genômica muito maior do que a apresentada pelos genomas nucleares (RUHLMAN & JANSEN, 2014). Desses genes, 80 a 90 são genes codificadores de proteínas (PCGs), os quais podem ser classificados em 5 categorias: (i) aqueles envolvidos nos processos da fotossíntese; (ii) aqueles que não estão envolvidos nos processos da fotossíntese; (iii) aqueles que estão

envolvidos nos processos de transcrição e tradução; (iv) aqueles que codificam proteínas estruturais; e (v) aqueles que participam de modificações pós-transcricionais. As angiospermas apresentam cerca de 30 genes de tRNA, porém, no geral, o número pode variar de 20 até 40 (WICKE *et al.*, 2011).

1.2 Família Cactaceae Lindl.:

Cactaceae Lindl. (ordem Caryophyllales, subordem Cactineae), é uma família de plantas suculentas perenes que possui mais de 1.450 espécies, sendo estas divididas em 127 gêneros (BARTHLOTT & HUNT, 1993; HUNT *et al.*, 2006). Ocorrem predominantemente em regiões quentes e secas das Américas, apresentando como única exceção o cacto epífita *Rhipsalis baccifera* (Mill.) Stearn, o qual também ocorre na África e no sudeste asiático, tendo sido reportado em Madagascar, em ilhas do Oceano Índico e no Sri Lanka (ANDERSON, 2001; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2014).

Os cactos apresentam duas características bem marcantes em sua morfologia, sendo estas um caule suculento e a presença de aréolas, estruturas semelhantes a anéis as quais se localizam em volta dos espinhos. Seu hábito pode variar de uma grande árvore a pequenos geófitos, podendo esses serem arbustos, trepadeiras e formas epífitas (BARTHLOTT & HUNT, 1993). Outra característica marcante dessa família é a folhas serem modificadas em espinhos, os quais podem variar em número, tamanho, forma e cor de acordo com a idade (TAYLOR, 1991; ANDERSON, 2001; PEHAREC *et al.*, 2010). Os espinhos servem também de proteção contra a herbívora, além de refletir a luz e reduzir a circulação de ar, o auxiliando na redução do processo de evapotranspiração (ANDERSON, 2001; MALDA *et al.*, 1999). Na maioria das vezes, essas plantas possuem raízes superficiais, as quais uma parte realiza a função de reserva de água e a outra parte, realiza a função de captar a água que escorre do próprio cladódio do cacto (ANDERSON, 2001).

A família Cactaceae inclui diversas espécies de importância ornamental que, por serem bonitas e rústicas, são usadas para ornamentação em áreas públicas, principalmente em regiões áridas, onde a água é um recurso escasso (PÉREZ-MOLPHE-BALCH *et al.*, 2015). Além disso, as folhas, cladódios e frutos de algumas espécies de cactos são utilizados na gastronomia (CORADIN *et al.*, 2011; SANTIAGO & CORADIN, 2018 *apud* ALMEIDA, 2021). Mais além, são utilizados como ração animal no Nordeste do Brasil, em casos de escassez de alimentos (NETO *et al.*, 2015).

Dos 127 gêneros desta família, 35 ocorrem no Brasil, com 14 desses possuindo espécies endêmicas. Das 227 espécies ocorrentes no Brasil, 176 são endêmicas, com a ocorrência de maior diversidade nos estados da Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (ZAPPI *et al.*, 2011). Sendo assim, o Brasil é considerado uma área prioritária para a conservação de espécies pertencentes a essa família (ORTEGA-BAES & GODÍNEZ-ÁLVARES, 2006; ZAPPI *et al.*, 2011).

1.3 Gêneros *Melocactus* (L.) Link & Otto e *Discocactus* Pfeiff:

O gênero *Melocactus* (L.) Link & Otto, é composto por 50 taxa (ANDERSON, 2001). Possui uma ampla distribuição nas Américas, indo do sudeste ao nordeste do Brasil e a região amazônica, seguindo para o oeste dos Andes e da América Central, norte do Caribe e México (TAYLOR, 2000). Já o gênero *Discocactus* Pfeiff é composto por 14 espécies, com sua distribuição restrita à América do Sul (HUNT *et al.*, 2006; TAYLOR & ZAPPI, 2018). São grupos irmãos da família Cactoideae, pertencentes ao clado BCT, o qual abriga três subfamílias: Browningieae, Cereeae e Trichocereae (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2017). Ambos possuem um corpo globular e uma estrutura reprodutiva singular denominada cefálio. O cefálio de *Discocactus* possui espinhos e *Melocactus*, na maioria das vezes, possui cerdas (TAYLOR & ZAPPI, 2004; HUNT *et al.*, 2006; SANTOS 2013). *Melocactus* e *Discocactus* diferem também no horário de floração, sendo a floração de *Melocactus* diurna enquanto a floração de *Discocactus* é noturna (COLAÇO *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2009).

Melocactus ernestii Vaupel (Figura 1.A) pode ser encontrado no norte do estado de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Alagoas e Pernambuco, ocorrendo em áreas de afloramento rochoso em regiões de Caatinga, sendo uma espécie unicamente saxícola (TAYLOR, 1991; HUGHES *et al.*, 2011).

Melocactus glaucescens Buining & Brederoo (Figura 1.B), por sua vez, é uma espécie endêmica do município de Morro do Chapéu (Bahia), podendo ser encontrada em seis localidades ao redor desse município. Essa espécie está listada como ameaçada desde o ano de 1992 no apêndice da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies Silvestres (CITES). Está listada como ameaçada de extinção também pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil (CFNFloral, 2023), devido ao fato dessa ser uma espécie rara e de grande interesse de colecionadores (TAYLOR & ZAPPI, 2004).

Ambas as espécies, *M. glaucescens* e *M. ernestii*, ocorrem em simpatria no Parque Estadual de Morro do Chapéu, o que parece permitir a ocorrência de um táxon híbrido natural denominado *Melocactus ×albicephalus* Buining & Brederoo. *Melocactus ×albicephalus* já foi descrito como uma espécie distinta, porém na atualidade seu *status* de híbrido natural tem sido amplamente aceito, pois apresenta características morfológicas intermediárias dos dois parentais putativos, sendo essas cefálio branco ou amarelo creme, com cerdas vermelhas restritas a periferia do cefálio, epiderme glauca, corpo vegetal menor e espinhos maiores que os de *M. ernestii* e maiores e mais grossos do que os de *M. glaucescens* (TAYLOR & ZAPPI, 2004; LAMBERT *et al.*, 2006).

Outra cactácea encontrada no Parque Estadual de Morro do Chapéu é *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus* (Buining & Brederoo) N. P. Taylor & Zappi (Figura 1.C), uma espécie rara, com distribuição

restrita a solos rasos em áreas de afloramentos rochosos do semi-árido baiano (OLIVEIRA, 2009). No entanto, até o momento, não foi encontrado na literatura nenhuma indicação de ocorrência de híbridos naturais entre espécies do gênero *Melocactus* e *Discocactus*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo realizar a montagem *de novo* e análise dos plastomas de *Melocactus xalbicephalus* Buining & Brederoo (Cactaceae), visando a identificação dos parentais e suas relações filogenéticas.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter sequências do plastoma de *M. xalbicephalus* mediante o sequenciamento de nova geração;
- Realizar a montagem *de novo* e analisar quali e quantitativamente os plastomas de *M. xalbicephalus*;
- Reconstruir as hipóteses de relações filogenéticas baseadas nos plastomas completos a fim de identificar os parentais de *M. xalbicephalus*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Material vegetal

Melocactus ×albicephalus é um dos cinco acessos do gênero *Melocactus* presentes no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). As sementes desse acesso foram coletadas na cidade de Morro do Chapéu (Bahia) em março de 2007, em uma população localizada dentro do Parque Estadual de Morro do Chapéu, conhecida popularmente como “Lages” (11°29'38.4" S; 41° 20'22.5" W).

Essas sementes foram armazenadas em microtubos, mantidas em temperatura ambiente e, em julho de 2007, germinadas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com ¼ da concentração salina, 15 g L⁻¹ de sacarose e 6,5 g L⁻¹ de ágar, segundo Resende *et al.* (2021). Desde então, essas plantas têm sido mantidas *in vitro*, em subcultivos periódicos, em meio de cultura MS com ½ da concentração salina, 15 g L⁻¹ de sacarose e 6,5 g L⁻¹ de ágar (TORRES-SILVA *et al.*, 2021).

3.2 Extração de DNA total

Amostras de caule e raiz foram coletadas de 8 indivíduos de *M. ×albicephalus* oriundos do BAG-LCTV-UFBA para a realização da extração de DNA total. As amostras foram submetidas a extração de DNA utilizando o método CTAB adaptado para microtubos (DOYLE & DOYLE, 1997).

Para tal, os espinhos foram removidos dos fragmentos de tecido do caule e as raízes foram lavadas em água corrente para remover o excesso de meio de cultura. Em seguida, os tecidos foram depositados em almofariz com 2 mL de tampão CTAB para maceração. Após a maceração, o conteúdo foi dividido em dois microtubos de 2 mL, obtendo duas repetições. Foi adicionado, em capela, 10µL de β-mercaptoetanol em cada microtubo. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex e mantido a 65° C por 30 minutos, em banho-maria. Em seguida, os microtubos foram resfriados em gelo, sendo então adicionados 1.000 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os microtubos foram levados para agitação por 30 min.

Decorrido o tempo de agitação, as fases foram separadas por centrifugação a 13.000 rpm por 10 min. Em seguida, a primeira fase foi recuperada em novo microtubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 800 µL de isopropanol. O material foi mantido em *overnight* a -20°C. Após, o material foi submetido a centrifugação a 13.000 rpm por 10 min para a formação do *pellet*. O *pellet* foi lavado três vezes em álcool 70%, centrifugado a 13.000 rpm por 5 min, seco em capela de fluxo laminar e eluído em 100 µL de água DEPC. A qualidade do DNA foi analisada em gel de agarose 1% e espectrofotômetro L-Quant (modelo SLIPQ 026).

3.3 Sequenciamento dos plastomas

Uma amostra de DNA de um indivíduo de *M. ×albicephalus*, que apresentou a concentração e parâmetros de qualidade exigidos para o Sequenciamento de Nova Geração (*Next-Generation Sequencing*-NGS), foi submetida a liofilização (FIOCRUZ Bahia). A amostra liofilizada foi enviada para a empresa BGI, onde foi realizado o NGS em plataforma HiSeq 4000 BGISEq500 (Illumina Inc.).

3.4 Montagens *de novo*, anotações e ilustrações dos plastomas

Três gigabases de leituras *paired ends* de 150 pares de base (pb) foram geradas na plataforma HiSeq 4000 BGISEq500. A montagem *de novo* dos plastomas de *M. ×albicephalus* foi realizada usando o Get Organelle (JIN *et al.*, 2020) no pipeline do Repeat Explorer (<http://repeatexplorer.org/>). A anotação foi realizada no Geneious Prime (KEARSE *et al.*, 2012) tendo como referências o plastoma de *M. ernestii* (OK03711.1). Ajustes manuais foram realizados nos códons de começo e parada utilizando o Geneious Prime. Os pseudogenes foram identificados com base nas Regiões de Codificação (*Coding Regions* – CDS) incompletas através do Geneious Prime. O Geneious Prime também foi utilizado para analisar a usagem dos códons e o conteúdo GC. Por fim, o OGDRAW (GREINER *et al.*, 2019), disponível gratuitamente *on-line* na plataforma do CHLOROBX (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/>), foi utilizado para ilustração dos plastomas.

3.5 Análises filogenéticas

Os dois plastomas montados foram comparados com outros plastomas de Caryophyllales. Mudanças estruturais foram detectadas com a ferramenta MAUVE (*Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence with Rearrangements*) (DARLING *et al.*, 2004) e o número, tipo e extensão de regiões repetidas com a ferramenta Find Repeats implementada no Geneious Prime. Para visualizar os rearranjos estruturais que ocorreram nos plastomas de *M. ×albicephalus*, utilizamos a ferramenta MAUVE no Geneious Prime, a qual exibe a ordem e a orientação dos segmentos e facilita análises comparativas dos genomas completos.

Para inferir sobre a posição filogenética dos plastomas de *M. ×albicephalus* dentro de Caryophyllales, utilizamos plastomas filogeneticamente distantes (*Portulaca oleracea*) e de membros representantes das subfamílias de Cactaceae, todos apresentando plastomas rearranjados: *M. ernestii* (OK03711.1), *M. glaucescens* (OK29849.9), *Discocactus bahienses* (OK037110), *Rhipsales baccifera* (NC053545.1), *Mammillaria zephyranthoides* (MN517611) e *Opuntia quimilo* (MN114084). Os genomas completos foram alinhados usando o software MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Posteriormente, a análise de Inferência Bayesiana (BI) foi realizada utilizando o modelo *General Time*

Reversible + Gamma + Invariant sites (GTR + G + I) (ABADI *et al.*, 2019) usando Mr Bayes (<https://nbisweden.github.io/MrBayes/index.html>) no Geneious Prime (KEARSE *et al.*, 2012). Foi realizada uma corrida de 10×10^6 gerações, amostrando a cada 1.000 gerações. Os 25% iniciais das árvores amostradas foram descartados como *burn-in*. Para a visualização da topologia da árvore, foi utilizado o programa Geneious Prime.

4. Resultados

4.1 Extração de DNA total

As amostras de *Melocactus×albicephalus* submetidas à extração de DNA total apresentaram resultados satisfatórios de concentração e qualidade para o Sequenciamento de Nova Geração (*New Generation Sequencing* – NSG). Após a realização da eletroforese o gel de agarose, foram observadas três bandas de DNA em cada poço, referentes aos genomas nuclear, DNA mitocondrial e DNA do cloroplasto (Figura 2).

A análise da qualidade foi realizada utilizando a medida A260/280 (Tabela 1). Sendo assim, a amostra de número 1 (um) foi selecionada para ser sequenciada, pois essa possuiu a maior pureza pela relação A260/280 e uma concentração de DNA total satisfatória dentre as amostras de *M.×albicephalus* para o NGS.

4.2 Montagens *de novo*, anotações e ilustrações dos plastomas

Por meio da ferramenta de montagem *de novo*, foram encontrados dois plastomas na amostra de *M.×albicephalus* enviada para o NGS, os quais foram nomeados como cpDNA1 (Figura 3) e cpDNA2 (Figura 4). Ambos os plastomas apresentam a estrutura quadripartida típica, o mesmo tamanho total de 130.364 pares de bases (pb) e 36,5% de conteúdo GC (Tabela 2). As regiões LSC, SSC, IRa e IRb representam 39,49%, 14,66%, 22,92% e 22,92% do plastoma de cpDNA1 e 39,49%, 14,62%, 22,92% e 22,95% do plastoma de cpDNA2, respectivamente (Tabela 2).

O cpDNA1 possui 138 genes, sendo desses 91 codificadores de proteína, 40 tRNA e 7 rRNA. Já o cpDNA2 possui 142 genes, sendo desses 94 codificadores de proteína, 41 tRNA e 7 rRNA (Tabela 2). Foram encontrados 11 pseudogenes no total (*ndhB*, *ndhD*, *ndhJ*, *rps12*, *rps16*, *rps18*, *rps19*, *rpl18*, *ycf1*-fragmento, *ycf3* e *ycf3*-fragmento), sendo o *rpl18* exclusivo de cpDNA1 e o *ndhB*, o *rps12*, o *rps16* e o *rps18* exclusivos do cpDNA2.

A comparação entre os plastomas cpDNA1 e cpDNA2 de *M.×albicephalus* com o plastoma de *M. glaucescens* revelaram algumas diferenças. Em cpDNA1, observa-se a perda dos genes *pbfl*, *clpP1*, *rps18*, *petE*, *pafI*, *pafII* e *rrn23*. Os genes *rpl16*, *petB*, *petD*, *trnG*, *rpoC1*, *cemA*, *accD*, *rps16*, *ycf3*-fragmento, *ycf*-fragmento, *ycf2* e *ndhB* não se apresentam como pseudogenes em cpDNA1 e *rps19*, *ndhJ* e *ndhD* se apresentam como pseudogenes em cpDNA1, além da presença dos genes *clpP* e *ycf68*.

Em cpDNA2, há a perda dos genes *pbfl*, *clpP1*, *pafI*, *pafII*. Os genes *rpl16*, *petB*, *petD*, *trnG*, *atpF*, *rpoC1*, *accD* não se apresentam como pseudogenes em cpDNA2, os genes *rps19* e *ndhJ* se apresentam como

pseudogenes e há a presença dos genes *clpP* e *ycf68* no cpDNA2.

Já quando comparados à *M. ernestii* e *D. bahiensis*, houve a perda dos genes *rpl2*, *rps6*, *rps18* e *psaC* no cpDNA1. Os genes *rps12*, *trnH*, *rpl33*, *rpl16*, *rpl12*, *rps16*, *ndhC*, *accD*, *ndhB* e *ndhF* não se apresentam como pseudogenes e *rpl18* se apresenta como um pseudogene, além da adição dos genes *rps8* e *rpl18* em cpDNA1. Em cpDNA2, não há perda de genes, os genes *rpl16*, *rpl20*, *rpl33*, *rps12* e *psbH* não se apresentam como pseudogenes, o gene *rps19* se apresenta como pseudogene e a presença dos genes *rps8* e *trnF*.

4.3 Análises filogenéticas

O cpDNA 1 apresentou 96,4% de semelhança com o plastoma de *D. bahiensis*, não apresentando rearranjos estruturais (Figura 5). Já o cpDNA2 apresentou 99,3% de semelhança com o plastoma de *M. glaucescens*, também não apresentando rearranjos estruturais (Figura 6). A árvore filogenética gerada por Inferência Bayesiana permite inferir o agrupamento do cpDNA1 com *D. bahiensis*, enquanto o cpDNA2 se encontra mais próximo de *M. glaucescens*, e relativamente distante de *M. ernestii* (Figura 7).

5. Discussão

5.1 O híbrido *Melocactus ×albicephalus* Buining & Brederoo

Melocactus albicephalus foi descrito pela primeira vez por Buining (1973). Posteriormente, Taylor (1980) confirmou a sua ocorrência em Morro do Chapéu (Bahia), a 900m, em fendas de rochas planas. Taylor (1991) já considera a ocorrência da zona de hibridação de *Melocactus glaucescens* com *Melocactus ernestii*, os quais ocorrem simpatricamente, levando *Melocactus ×albicephalus* ao status de híbrido natural.

Melocactus ×albicephalus possui cefálio branco a amarelo creme, com cerdas vermelhas restritas a periferia do cefálio, epiderme glauca, corpo vegetativo um pouco menor e espinhos menores que os de *M. ernestii*, maiores e também mais groços que os de *M. glaucescens* (LAMBERT *et al.*, 2006). Portanto, devido à ocorrência simpátrica e a morfologia de *M. ×albicephalus* parecer ser intermediária entre *M. glaucescens* e *M. ernestii*, essas foram as espécies parentais presumidas (MACHADO, 2009). Além de caracteres morfológicos, os cromossomos dessas taxa também foram estudados, no entanto revelando-se pouco informativos, pois *M. glaucescens*, *M. ernestii* e *M. ×albicephalus* apresentam $2n = 44$ cromossomos (ASSIS *et al.*, 2003).

Em estudo posterior, Taylor & Zappi (2004) reportaram a ocorrência do que chamaram de “multidão de híbridos” (*hybrid swarms*) para *Melocactus*, que são populações híbridas nas quais o retrocruzamento dos híbridos com as espécies parentais resultou em híbridos exibindo todas as combinações possíveis de características morfológicas das espécies parentais. Em seguida, Lambert *et al.* (2006) relataram a ocorrência de duas formas prováveis para *M. ×albicephalus*, uma dessas formas se caracteriza por possuir indivíduos que visivelmente compartilham características das duas espécies parentais, e a outra quase assemelha a *M. glaucescens*, relatando a ocorrência de introgressão com *M. glaucescens*. Sendo assim, tem sido notada heterogeneidade de características morfológicas entre os indivíduos *M. ×albicephalus* que ocorrem na população natural da região das “Lages”, no Parque Estadual de Morro do Chapéu.

Os resultados do presente estudo sugerem a ocorrência de heteroplasmia de cloroplasto em células de *M. ×albicephalus*, as quais apresentam dois tipos de plastomas, sendo um 96,4% semelhante a *D. bahiensis* (Figura 5), o único plastoma de *Discocactus* disponível para comparação, e o outro 99,3% semelhante a *M. glaucescens* (Figura 6). Outrossim, *M. ×albicephalus* ocorre simpatricamente não somente com *M. glaucescens* e *M. ernestii*, mas também com *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus* Buining & Brederoo (OLIVEIRA, 2009).

Portanto, os resultados do presente estudo indicam um evento de hibridação entre *M. ×albicephalus* e *D. zehntneri* subsp. *boomianus*. Estudos de biologia reprodutiva de *M. glaucescens* e *D. zehntneri* subsp.

boomianus sugerem, dentre outros animais, a ação de coleópteros como vetores de polinização (COLAÇO *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2009).

Segundo Colaço *et al.* (2006), a antese das flores de *M. glaucescens* dura de 14 às 18:30h. Já Oliveira (2009) afirma que a antese das flores de *D. zehntneri* subsp. *boomianus* é noturna, não havendo registro na literatura consultada do horário de início da abertura da sua flor. No estudo de Colaço *et al.* (2006) também foi reportado o comportamento dos coleópteros estudados, sendo observada a presença do animal dentro da flor, mesmo antes da antese. Contudo, não existem mais informações na bibliografia consultada sobre a biologia reprodutiva de *D. zehntneri* subsp. *boomianus* para saber se o pólen encontra-se disponível antes da abertura da sua flor. Também não existem estudos dessa natureza envolvendo *M. ×albicephalus*.

Apesar das informações escassas sobre a biologia reprodutiva, o fato de haver registros de similaridade da gilda de polinizadores entre espécies de *Melocactus* e *Discocactus* que ocorrem na região das “Lages” em Morro do Chapé e a possibilidade de haver uma mínima sobreposição da antese dessas espécies, é possível que haja a polinização de flores de *M. ×albicephalus* por pólen de *D. zehntneri* subsp. *boomianus*.

Os resultados do presente estudo corroboram com o estudo anterior de Khan *et al.* (2020) sobre eventos de hibridação em *Melocactus*, no qual foi observado o fraco isolamento pré-zigótico, com espécies experimentando poucas barreiras intrínsecas ao fluxo gênico e a ocorrência frequente de hibridação natural. Contudo, os resultados do presente estudo permitem inferir que a zona de hibridação do Parque Estadual de Morro do Chapé pode abrigar eventos de hibridação não somente entre *M. glaucescens* e *M. ernestii*, mas também entre *M. ×albicephalus* e *D. zehntneri* subsp. *boomianus*, sendo esse o primeiro indicativo de ocorrência de hibridação entre *Melocactus* e *Discocactus*.

5.2. Os plastomas de *Melocactus ×albicephalus*

O sequenciamento de nova geração (NGS) do DNA total de *M. ×albicephalus* permitiu a montagem *de novo* de dois plastomas, o que indica a ocorrência de herança biparental dos cloroplastos durante a reprodução sexuada que originou o indivíduo de *M. ×albicephalus* estudado. Angiospermas apresentam geralmente herança uniparental de cloroplastos (BOGDANOVA & KOSTERIN, 2006; RUF *et al.*, 2007), sendo os cloroplastos normalmente advindos da planta mãe, pois os cloroplastos dos gametas paternos normalmente são degradados antes de ocorrer a fertilização (BORGONOVA e SILVA-FILHO, 2010).

Por outro lado, a transmissão biparental de cloroplasto ocorre em aproximadamente um terço das angiospermas (MOGENSEN, 1996), sendo que 20% das angiospermas conhecidas possuem plastídios em seu pólen maduro, o que indica a possibilidade de ocorrência da transmissão biparental (CORRIVEAU & COLEMAN, 1988; ZHANG *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2010).

Outrossim, espécies vegetais podem apresentar mais de um modo de herança dos cloroplastos quando há diferentes tipos de cruzamento para formação de híbridos. Em *Passiflora*, foi observado que há uma prevalência de herança materna quando os cruzamentos acontecem entre variedades de uma mesma espécie. Contudo, há uma prevalência de herança paterna quando os cruzamentos são interespecíficos. Além disso, foi observado que 4,7% dos híbridos oriundos de cruzamentos interespecíficos apresentaram herança biparental (HANSEN *et al.*, 2007). Sendo assim pode ser que o cruzamento entre *Melocactus* x *Melocactus* favoreça a herança uniparental e que *Melocactus* x *Discocactus* favoreça a herança biparental.

Deste modo, novos estudos de biologia reprodutiva nas populações naturais de *M. glaucescens*, *M. ernestii*, *M. ×albicephalus* e *D. zehntneri* subsp. *boomianus* são necessários para analisar a viabilidade do cruzamento entre *Melocactus* e *Discocactus* e os tipos de herança de cloroplastos que podem ocorrer dos cruzamentos entre todas as espécies envolvidas.

5.3 Tamanho e composição dos plastomas de *M. ×albicephalus*

Ambos os plastomas obtidos da amostra analisada de *M. ×albicephalus* possuem o mesmo tamanho (130.364pb), sendo este tamanho semelhante ao observado para outras angiospermas, que varia entre 120 e 160 pb (WICKE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2018). Os plastomas apresentam a estrutura quadripartida típica dos plastomas de Streptofitas, com uma região LSC, uma região SSC e duas regiões de IRs. O cpDNA1 possui 138 genes em sua composição e o cpDNA2 possui 142 genes (Tabela 2), ambos apresentando número maior de genes do que a maioria dos plastomas, que é de 120 a 130 genes (RUHLMAN & JANSEN, 2014).

Quanto a quantidade de genes codificadores de proteínas, cpDNA1 possui 91 e cpDNA2 possui 94 (Tabela 2), valor superior à média encontrada comumente nos plastomas, que é de 80 a 90 genes (WICKE *et al.*, 2011). Para a quantidade de genes codificadores de tRNA, cpDNA1 possui 40 e cpDNA2 possui 41 genes, estando na média apresentada comumente nos plastomas que é de 30 a 40 genes (WICKE *et al.*, 2011).

Combinados, cpDNA1 e cpDNA2 apresentam 11 pseudogenes (*ndhB*, *ndhD*, *ndhJ*, *rps12*, *rps16*, *rps18*, *rps19*, *rpl18*, *ycf1*-fragmento, *ycf3* e *ycf3*-fragmento), desses *ndhB* é pseudogene apenas em cpDNA1 (Tabela 2). A ocorrência de pseudogenes é uma característica comum dos plastomas devido ao fato de, desde o advento da endossimbiose há 1,5 bilhões de anos, terem ocorrido inúmeras trocas de informação genética entre plastídio e núcleo, o que acarretou em ganhos e perdas de genes totais e parciais (HERRMANN, 1997; HERRMANN & WESTHOFF, 2001). Possivelmente os genes supracitados estão atualmente localizados no núcleo, com seus produtos gênicos sendo encaminhados para o cloroplasto, já que estes são genes

importantes para os plastídios realizarem suas funções (Tabela 3) (MARTIN *et al.*, 2002; TIKHONOV, 2013).

5.4 O cpDNA1 de *M. ×albicephalus*:

Um dos plastomas de *M. ×albicephalus*, o cpDNA1, possui 96,4% de semelhança com *D. bahiensis*. É possível perceber grande semelhança entre esses dois plastomas, com ambos apresentando a mesma sequência de genes em todas as regiões e ausência de rearranjos estruturais (Figura 5).

Comparando a região LSC de cpDNA1 e *D. bahiensis*, os genes *rpl2*, *rpl33* e *clpP* não foram considerados como pseudogenes ou fragmentos pela anotação, os genes *rps18* e *rps19* são pseudogenes, o gene *atpF* não possui uma segunda cópia e há adição do gene *psbL*, o qual está presente em cpDNA2 e em *M. glaucescens*. A presença do gene *psbL* em cpDNA1 pode ser devido à transferência horizontal entre o cpDNA2 e o cpDNA1 (HERRMANN, 1997; HERRMANN & WESTHOFF, 2001; GREINNER, 2011).

Comparando a região SSC de cpDNA1 e *D. bahiensis*, o gene *ndhF* não foi considerado como pseudogene pela anotação, o gene *rrn23* possui mais duas cópias fragmentadas e o gene *rrn16* possui mais uma cópia em cpDNA1.

Comparando as IRs de cpDNA1 e *D. bahiensis*, o gene *trnS-GGA* está presente em cpDNA1 e ausente em *D. bahiensis*. Todavia, *trnS-GGA* está presente em cpDNA2 e em *M. glaucescens*. A transferência horizontal entre cpDNA2 e cpDNA1 possivelmente permitiu a presença deste gene em cpDNA1 (HERRMANN, 1997; HERRMANN & WESTHOFF, 2001; GREINNER, 2011).

5.5 O cpDNA2 de *M. ×albicephalus*:

O segundo plastoma de *M. ×albicephalus*, o cpDNA2, apresentou 99,3% de semelhança com *M. glaucescens*. É possível perceber grande semelhança entre esses dois plastomas, com ambos apresentando a mesma sequência de genes em todas as regiões e ausência de rearranjos estruturais (Figura 6).

Comparando a região LSC de cpDNA2 e *M. glaucescens*, os genes *rps18* e *rps19* são pseudogenes em cpDNA2, sendo essa a única diferença nessa região.

Comparando a região SSC de cpDNA2 e *M. glaucescens*, o gene *rps12* é um pseudogene, os genes *rrn16* e *rrn23* possuem mais de uma cópias, além da adição de dois genes *ndhF* e *ycf68*, ambos os quais estão presentes em cpDNA1, mais uma vez sugerindo a ocorrência de uma transferência horizontal entre os cpDNA1 e cpDNA2 (HERRMANN, 1997; HERRMANN & WESTHOFF, 2001; GREINNER, 2011).

Comparando a região das IRs de cpDNA2 e *M. glaucescens*, o gene *ndhJ* é um pseudogene em cpDNA2, sendo essa a única diferença nessa região.

5.6 O papel de *Melocactus ernestii*

Comparando cpDNA1 e cpDNA2 de *M. ×albicephalus* com *M. ernestii*, percebe-se diferenças maiores em todas as regiões do que quando comparado com *D. bahiensis* e *M. glaucescens*, o que justifica sua posição de grupo irmão de *M. glaucescens* e cpDNA2 na árvore de Inferência Bayesiana (Figura 7).

A presença de plastomas de *M. ×albicephalus* mais próximos filogeneticamente de *M. glaucescens* e *Discocactus* (Figura 7) não exclui a participação de *M. ernestii* como um dos parentais da população híbrida de *M. ×albicephalus* que ocorre na região das “Lages”, visto que dados de RAD-Seq single-nucleotide polymorphism (SNP), que permite a analisar a contribuição do genoma nuclear, indicaram *M. ernestii* como um dos parentais dessa população híbrida (KHAN *et al.*, 2020).

Devido a grande semelhança entre os plastomas analisados, novos estudos incluindo sequências de plastomas de *D. zehntneri* subsp. *boomianus* e outras espécies de *Melocactus* que ocorrem no Parque Estadual de Morro do Chapéu são necessários para compreender melhor as posição filogenética dos dois plastomas encontrados no indivíduo *M. ×albicephalus* analisado, visto que o plastoma analisado era de *D. bahiensis* pois o plastoma de *D. zehntneri* subsp. *boomianus* ainda não foi sequenciado.

Mais além, estudos analisando os plastomas de indivíduos adultos de *M. ×albicephalus* que ocorrem na população das “Lages” e em outras regiões do Parque Estadual de Morro do Chapéu são necessários para identificar se híbridos de *Melocactus* e *Discocactus* são viáveis nas populações naturais, ou a se a germinação e a viabilidade do indivíduo *M. ×albicephalus* analisado só foi possível devido às condições artificiais proporcionadas pela germinação *in vitro*, a qual fornece todas as condições ideais para que as plantas germinem e se desenvolvam, já que a amostra foi coletadas de um indivíduos de *M. ×albicephalus* germinado *in vitro* (TORRES-SILVA *et al.*, 2021).

6. Conclusões

Com base nos dados desse estudo, podemos inferir que o indivíduo *M. ×albicephalus* analisado é um híbrido intergenérico. O presente estudo indica fraco isolamento pré-zigótico de *M. ×albicephalus*, sendo necessários mais estudos para inferir sobre o *status* de espécie das suas populações híbridas.

7. Referências

- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control*, v. 19, n. 6, p. 716-723, 1974.
- ANDERSON, E. F. **The cactus family**. Timber Press, Portland, Oregon, 768p. 2001.
- ALMEIDA, E. M.; SADER, M. A.; RODRIGUEZ, P. E.; LOEUILLE, B.; FELIX, L. P.; PEDROSA-HARAND, A. Assembling the puzzle: complete chloroplast genome sequences of *Discocactus bahiensis* Britton & Rose and *Melocactus ernestii* Vaupel (Cactaceae) and their evolutionary significance. **Brazilian Journal of Botany**, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 877-888, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s40415-021-00772-2>.
- ASSIS, J. G. A.; OLIVEIRA, A. L. P. C.; RESENDE, S. V.; SENRA, J. F. V.; MACHADO, M. Chromosome numbers in Brazilian *Melocactus* (Cactaceae). **Bradleya**, [S.L.], v. 21, n. 21, p. 1-6, 2003. <http://dx.doi.org/10.25223/brad.n21.2003.a2>.
- BARTHLOTT, W.; HUNT, D. R. Cactaceae. **Flowering Plants Dicotyledons**, [S.L.], p. 161-197, 1993. Springer Berlin Heidelberg. 1993 http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-02899-5_17.
- BOGDANOVA, V. S.; KOSTERIN, O. E. A case of anomalous chloroplast inheritance in crosses of garden pea involving an accession of wild subspecies. **Doklady Biological Sciences**, [S.L.], v. 406, n. 1- 6, p. 44-46, 2006. <http://dx.doi.org/10.1134/s0012496606010121>.
- BORGONOVE, C. M.; SILVA-FILHO, M. C. Perda de genes e evolução do genoma organelar. *In: Seminários em genética e melhoramento de plantas*, Piracicaba. LGN 5799. Piracicaba: Esalq, 2010. v. 1, p. 1-2. 2010 Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/departamentos/lgn/pub/seminar/CMBorgonai-200702-Resumo.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2023.
- CNCFlora- Centro Nacional de Conservação da Flora. 2023. Acessado em 22 de dezembro de 2023: <http://cncflora.jbrj.gov.br/porta1/ptbr/profile/Melocactus%20glaucescens>
- COLAÇO, M. A. S.; FONSECA, R. B. S.; LAMBERT, S. M.; COSTA, C. B. N.; MACHADO, C. G.; BORBA, E. L. Biologia reprodutiva de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo e *Melocactus paucispinus* G. Heimen & R. J. Paul (Cactaceae), na Chapada Diamantina, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 29 (2): 239-249. 2006.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 478-493, 2011.

CORRIVEAU, J. L.; COLEMAN, A.W. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. **American Journal of Botany**, 29 [S.L.], v. 75, n. 10, p. 1443-1458, 1988. <http://dx.doi.org/10.1002/j.15372197.1988.tb11219.x>.

CRUZ, A. B. S.; REIS, D. O.; FABRICANTE, J. R. Categorization of extinction risk of *Discocactus* species. **Acta Brasiliensis**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 14, 2022. <http://dx.doi.org/10.22571/2526-4338569>.

DARLING, A. C.; MAU, B.; BLATTNER, F. R.; PERNA, N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. **Genome Research**, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 1394-1403, 2004. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.2289704>.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochemical Bulletin of Botanical Society of America**, v.19, p.11-15, 1987.

FONSECA, R. B. S.; FUNCH, L. S.; BORBA, E. L. Reproductive phenology of *Melocactus* (Cactaceae) species from Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 237-244, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-84042008000200006>.

GREINER, S.; LEHWARK, P.; BOCK, R. Organellar Genome DRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 59-64, 2019. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz238>.

HANSEN, A. K.; ESCOBAR, L. K.; GILBERT, L. E.; JANSEN, R. K. Paternal, maternal, and biparental inheritance of the chloroplast genome in *Passiflora* (Passifloraceae): implications for phylogenetic studies. **American Journal of Botany**, v.94, n.1, p. 42-46, 2007. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.94.1.42>.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, T.; HERNANDEZ, H. M.; DE-NOVA, J. A.; PUENTE, R.; EGUIARTE, L. E.; MAGALLON, S. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). **American Journal of Botany**, [S.L.], v. 98, n. 1, p. 44-61, 23 dez. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1000129>.

HERRMANN, R. G. Eukaryotism, towards a new interpretation. Eukaryotism and symbiosis, [S.L.], p. 73-118, 1997. **Springer Berlin Heidelberg**. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-60885-8_7.

HERRMANN, R. G.; WESTHOFF, P. Thylakoid biogenesis and dynamics: the result of a complex phylogenetic puzzle. *Regulation of Photosynthesis*, [S.L.], p. 1-28, 2001. **Kluwer Academic Publishers**. http://dx.doi.org/10.1007/0-306-48148-0_1.

HUGHES, F. M. **Ecologia reprodutiva e morfometria de *Melocactus ernestii* Vaupel no município de Nova Itarana - BA**. Dissertação (Mestrado). Curso de Recursos Genéticos Vegetais, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

HUGHES, F. M.; ROT, M. C.; ROMÃO, R. L.; CASTRO, M. S. Dinâmica espaço-temporal de *Melocactus ernestii* subsp. *ernestii* (Cactaceae) no Nordeste do Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.34, n.3, p.389-402, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042011000300012>.

HUNT, D.; TAYLOR, N. P.; CHARLES, C. **The New Cactus Lexicon: description and illustrations of the Cactus Family**. DH Books. 2006. Milborne Port, UK.

JIN, D-M.; WICKE, S.; LU, G.; YANG, J-B.; JIN, J-J.; YI, T-S. The loss of the inverted repeat in the putranjivoid clade of Malpighiales. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 942, 2020. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.00942>.

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 xalbicephalus* (*Melocactus ernestii* x *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 93-108, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1442-1984.2006.00155.x>.

LOWE, T. M.; CHAN, P. P. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 54-57, 2016. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw413>.

KHAN, G.; FRANCO, F. F.; SILVA, G. A. R.; BOMBONATO, J. R.; MACHADO, M.; ALONSO, D. P.; RIBOLLA, P. E.M.; ALBACH, D. C.; MORAES, E. M. Maintaining genetic integrity with high promiscuity: frequent hybridization with low introgression in multiple hybrid zones of *Melocactus* (Cactaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S.L.], v. 142, p. 106642, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106642>.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

MACHADO, M. C. The genus *Melocactus* in eastern Brazil: part I – an introduction to *Melocactus*. **British Cactus & Succulent Journal**, v.27, p.1-16, 2009.

MALDA, B. G.; BACKHAUS, R. A.; MARTIN, C. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.58, p.1-9, 1999.

MARTIN, W.; KOWALLIK, K. Annotated english translation of mereschkowsky's 1905 paper 'Über natur und ursprung der chromatophoren im pflanzenreiche'. **European Journal Of Phycology**, [S.L.], v. 34, n.3, p. 287-295, 1999. <http://dx.doi.org/10.1080/09670269910001736342>

MARTIN, W.; RUJAN, T.; RICHLI, E.; HANSEN, A.; CORNELSEN, S.; LINS, T.; LEISTER, D.; STOEBE, B.; HASEGAWA, M.; PENNY, D. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 99, n. 19, p. 12246-12251, 2002. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.182432999>.

MOGENSEN, H. L. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. **American Journal of Botany**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 383-404, 1996. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb12718.x>.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant.**,v.15, p.473-497, 1962.

NETO, J. A. S.; CASTRO FILHO, E. S.; ARAÚJO, H. R. Potencial das cactáceas como alternativa alimentar para ruminantes no semiárido. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 12, n. 6, p. 4426-4434, 2015.

NEUHAUS, H. E.; EMES, M. J. Nonphotosynthetic metabolism in plastids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 111-140, 2000. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.111>.

OCHOA de ALDA JAG, E. R; DIAGO M. L, HOUMARD J. The plastid ancestor originated one of the major cyanobacterial lineages. **Nature Commum**, v. 5, p. 4837. <https://doi.org/10.1038/ncomm s5937>.

OLIVEIRA, J. P. L. **Ecologia de *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus* (Cactaceae) em afloramento rochoso do semi-árido baiano** (Brasil). 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia e Biomonitoramento, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

ORTEGA-BAES, P.; GODÍNEZ-ÁLVAREZ, H. Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. **Biodiversity and Conservation**, v.15,p.817-827, 2006.

PEHAREC, P.; POSILOVÍČ, H.; BALEN, B.; KRSNIK-RASOL, M. Spine micromorphology of normal and hyperhydric *Mammillaria gracilis* Pfeiff. (Cactaceae) shoots. **Journal of Microscopy**, v. 239, n. 1, p. 78-86, 2010.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; SANTOS-DÍAZ, M. S.; RAMÍREZ-MALAGÓN, R.; OCHOA-ALEJO, N. Tissue culture of ornamental cacti. **Scientia Agricola**, [S.L.], v. 72, n. 6, p. 540-561, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0012>.

REFLORA – Herbário Virtual. 2023. Acessado em 22 de dezembro de 2023: <https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do>

RUHLMAN T., JANSEN R. K. The plastid genomes of flowering plants. In: **Maliga P (ed) Chloroplast biotechnology: methods and protocols, methods in molecular biology**, vol 1132, Springer, New York, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-995-6_1

RUF, S.; KARCHER, D.; BOCK, R. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v.104, n. 17, p. 6998-7002, 2007. [.http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0700008104](http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0700008104).

SANTOS, M. R. **Filogenia molecular, taxonomia, biogeografia e conservação de *Discocactus* Pfeiff. (Cactaceae)**. 2013. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Aplicadas, Botânica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013. Cap. 1.

TAYLOR, N. P. The genus *Melocactus* (Cactaceae) in Central and South America. **Bradleya**, v. 9, p. 1-8, 1991.

TAYLOR, N. P. 2000. **Taxonomy and phytogeography of the Cactaceae of Eastern Brazil**. Thesis for the award of ‘Doctor of Philosophy’. Royal Botanic Gardens, Kew, 2000, 414p.

TAYLOR, N. P.; ZAPPI, D. C. Cacti of Eastern Brazil. Richmond, Surrey, UK: Royal Botanic Gardens, Kew. *Tellima grandiflora* (Saxifragaceae). **American Journal of Botany**, [S.L.], v. 78, n. 10, p. 1379-1390, 2004. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1537-2197.1991.tb12604.x>.

TORRES-SILVA, G.; SCHNADELBACH, A. S.; BEZERRA, H. B.; LIMA-BRITO, A.; RESENDE, S. V. *In vitro* conservation and genetic diversity of threatened species of *Melocactus* (Cactaceae). **Biodiversity and Conservation**, v. 30, p. 1067-1080, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02132-8>.

TIKHONOV, A. N. pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. **Photosynthesis Research**, [S.L.], v. 116, n. 2-3, p. 511-534, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-013-9845-y>.

WICKE, S.; SCHNEEWEISS, G. M.; DEPAMPHILIS, C. W.; MÜLLER, K. F.; QUANDT, D. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. **Plant Molecular Biology**, [S.L.], v. 76, n. 3-5, p. 273-297, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-011-9762-4>.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N. P.; SILVA, S. R.; MACHADO, M. C.; MORAES, E. M.; CALVENTE, A.; CRUZ, B.; CORREIA, D.; LAROCCA, J.; ASSIS, J. G.; AONA, L.; MENEZES, M. O. T.; MELADO, M.; MARCHI, M. N.; BELLINTANI, M.; COELHO, P.; NAHOUM, P.; RESENDE, S. **Plano de Ação Nacional para a Conservação da Cactaceae**. In: SILVA, S. R.; ZAPPI, D.; TAYLOR, N. P.; MACHADO, M. C. (Orgs.). Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Série Espécies Ameaçadas, n. 24, 112p. 2011.

ZHANG, Q.; LIU, Y.; SODMERGEN. Examination of the cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 angiosperm species. **Plant and Cell Physiology**, [S.L.], v. 44, n. 9, p. 941-951, 2003. <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcg121>.

ZHANG, Q; SODMERGEN. Why does biparental plastid inheritance revive in angiosperms? **Journal of Plant Research**, [S.L.], v. 123, n. 2, p. 201-206, 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10265-009-0291-z>.

8. Anexos

Tabela 1. Concentração do DNA total ([] ng/μL) e relação de pureza (A260/A280) de amostras de fragmentos do caule ou da raiz de *Melocactus xalbicephalus*.

| Amostra | Material vegetal | []ng/μL | 260/280 |
|----------------|-------------------------|-----------------|----------------|
| 1 | Caule | 108,53 | 2,09 |
| 2 | Caule | 317,35 | 1,79 |
| 3 | Caule | 568,30 | 1,50 |
| 4 | Caule | 438,13 | 1,50 |
| 5 | Caule | 339,77 | 1,50 |
| 6 | Raiz | 103,60 | 0,7 |
| 7 | Raiz | 55,9 | 1,2 |
| 8 | Raiz | 264,90 | 1,2 |

Tabela 2. Composição dos plastomas de *Melocactus xalbicephalus*.

| | Tamanho(%) | GC(%) | Genes | Genes codificadores de proteína | tRNA | rRNA |
|--------------|------------|-------|-------|---------------------------------------|------|------|
| cpDNA1 | | 36,5 | | | | |
| cpDNA1 total | 100 | | 138 | 91 | 40 | 7 |
| LSC | 39,49 | | 55 | 45 | 10 | 0 |
| SSC | 14,66 | | 23 | 12 | 4 | 7 |
| IRa | 22,92 | | 30 | 17 | 13 | 0 |
| IRb | 22,92 | | 30 | 17 | 13 | 0 |
| cpDNA2 | | 36,5 | | | | |
| cpDNA2 total | 100 | | 142 | 94 | 41 | 7 |
| LSC | 39,49 | | 59 | 49 | 10 | 0 |
| SSC | 14,62 | | 23 | 11 | 5 | 7 |
| IRa | 22,92 | | 30 | 17 | 13 | 0 |
| IRb | 22,95 | | 30 | 17 | 13 | 0 |

Tabela 3. Genes dos plastomas de *Melocactus xalbicephalus*.

| Grupos de genes | Genes |
|--|---|
| Fotossistema I | <i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i> |
| Fotossistema II | <i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbL, psbK, psbN, psbT, psbZ</i> |
| Complexo citocromo b6/f | <i>petA, petB, petD, petG, petL, petN</i> |
| ATP sintase | <i>atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI</i> |
| NADH-desidrogenase | <i>ndhB(1), ndhB*(2), ndhC, ndhD*, ndhF, ndhH, ndhJ*</i> |
| Subunidade grande da RubisCO | <i>rbcL</i> |
| RNA polimerase | <i>rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2</i> |
| Proteínas ribossomais (SSU) | <i>rps2, rps3, rps4, rps7, rps8(2), rps11, rps12(1), rps12*(2), rps14, rps15, rps16(1), rps16*(2), rps18*(2), rps19*</i> |
| Proteínas ribossomais (LSU) | <i>rpl2(2), rpl12(1), rpl14, rpl16, rpl18*(1), rpl20, rpl22, rpl32, rpl33, rpl36</i> |
| RNAs transportadores | <i>trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-GAA, trnG-GCC, trnG-UCC, trnH-GUG, trnI-CAU, trnI-GAU, trnK-UUU, trnL-CAA, trnL-UAA, trnL-UAG, trnM-CAU, trnN-GUU, trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG, trnR-UCU, trnS-GGA, trnS-GCU, trnS-UGA, trnT-GGU, trnT-UGU, trnW-CCA, trnY-GUA</i> |
| Codificadores de proteínas hipotéticas | <i>ycf1(2), ycf1-fragmento, ycf2, ycf3-fragmento, ycf3*, ycf4, ycf68</i> |
| Proteínas diversas | <i>ccsA, cemA, clpP, infA, matK, accD</i> |
| Ribossomais | <i>rrn4,5, rrn5, rrn16, rrn 23, rrn23-fragmento</i> |

*Pseudogenes; (1) = presente somente no cpDNA1 de *Melocactus xalbicephalus*; (2) = presente somente no cpDNA2 de *Melocactus xalbicephalus*

Figura 1. Três espécies de Cactaceae que ocorrem na região das “Lages”, Parque Estadual de Morro do Chapéu (Bahia – Brasil) e seus respectivos mapas de distribuição de espécies segundo o REFLORA (2023). **A:** *Melocactus ernestii*; **B:** *Melocactus glaucescens*; e **C:** *Discocactus zenthneri* subsp. *boomianus*.

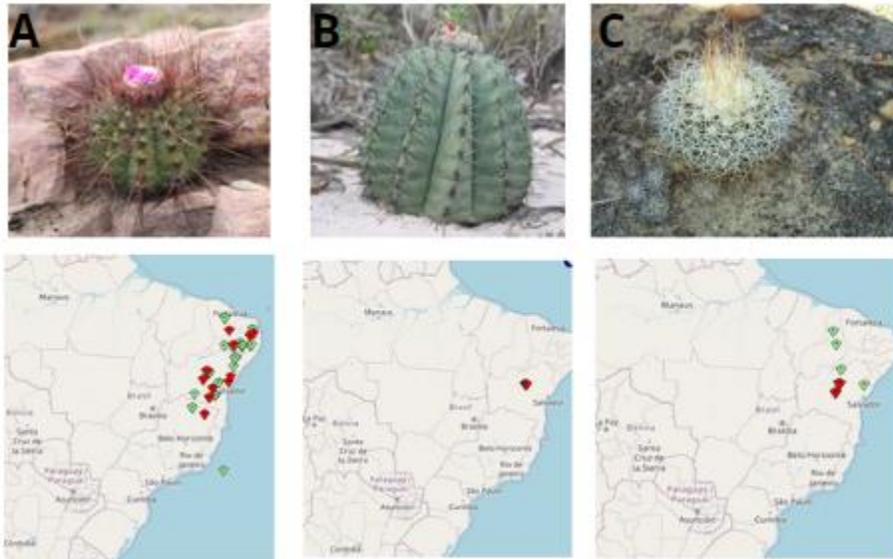


Figura 2. Gel de eletroforese a 1% de amostras de DNA total de *Melocactus ×albicephalus*.
As amostras de 1 a 5 foram provenientes do caule e amostras 6 a 8 da raiz.

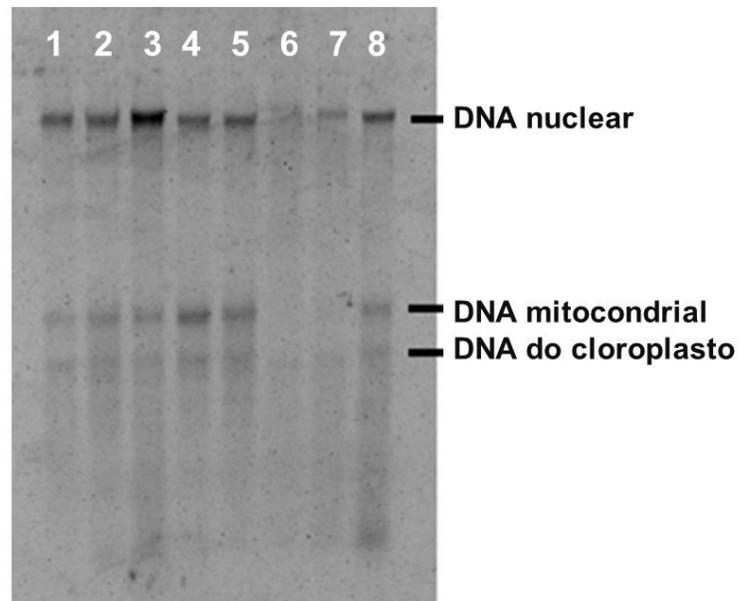


Figura 3. Plastoma ilustrado do cpDNA1 de *Melocactus ×albicephalus*.

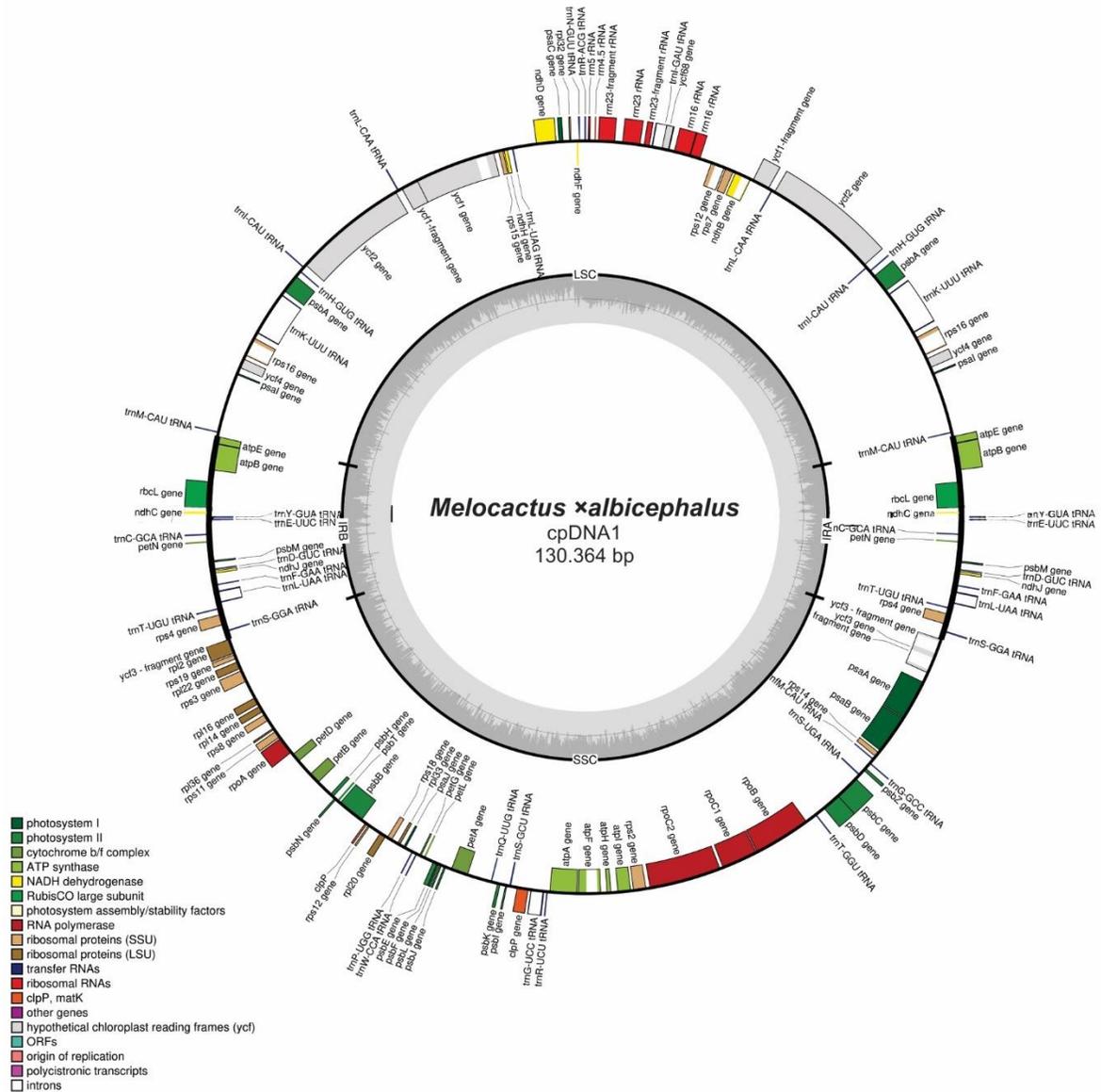


Figura 4. Plastoma ilustrado do cpDNA2 de *Melocactus xalbicephalus*.

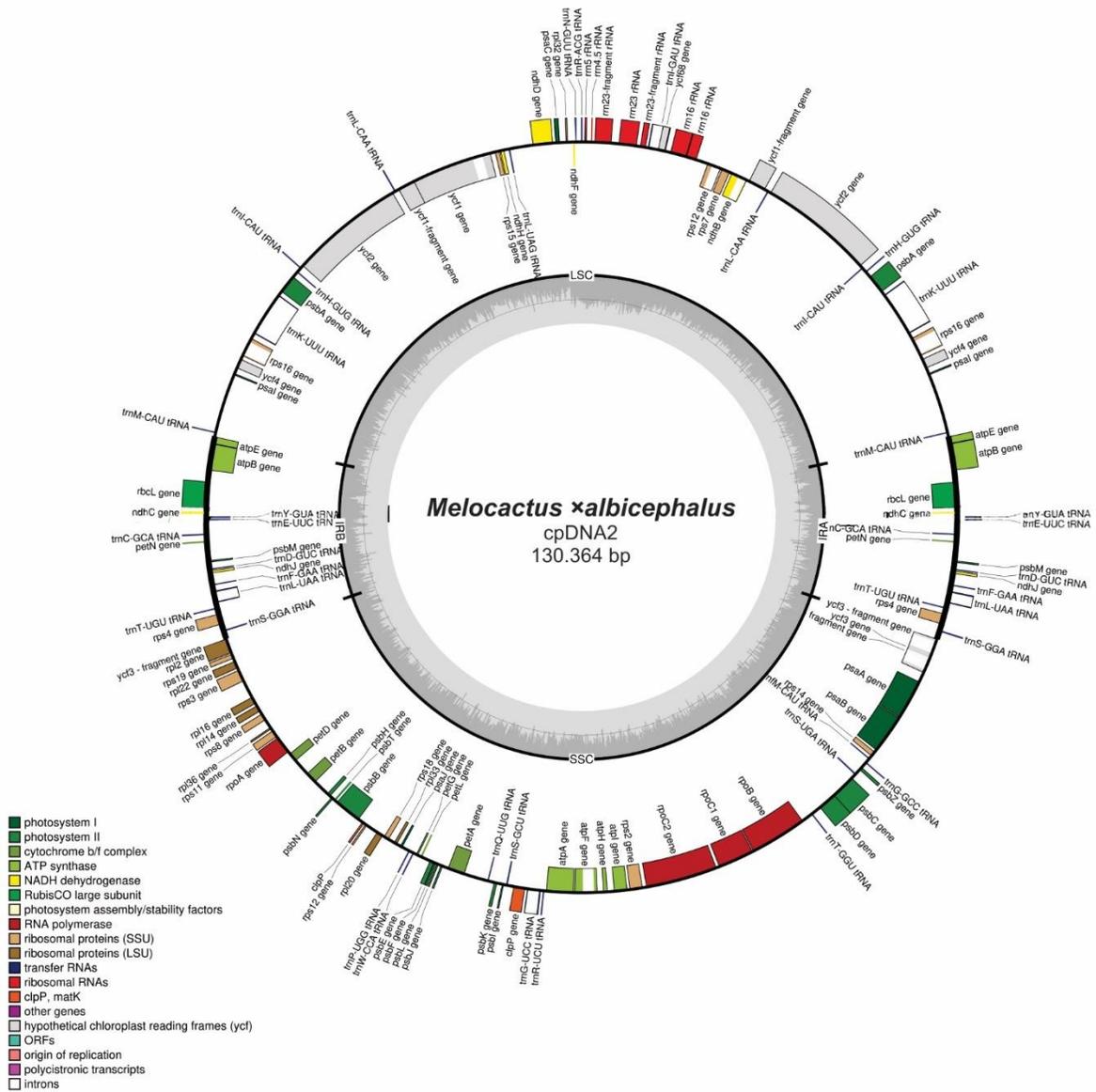


Figura5. Alinhamento comparativo entre os plastomas de cpDNA1 de *Melocactus* \times *albicephalus* e *Discocactus bahiensis*.

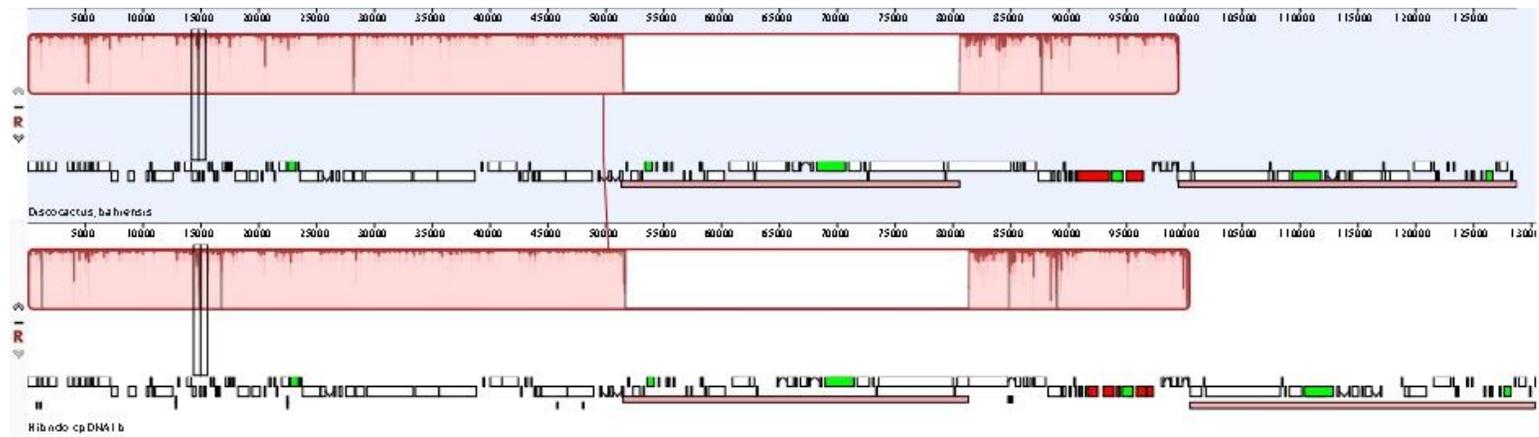


Figura6. Alinhamento comparativo entre os plastomas de cpDNA2 de *Melocactus ×albicephalus* e *Melocactus glaucescens*



Figura7. Árvore filogenética por Inferência Bayesiana dos plastomas de *Melocactus* \times *albicephalus*, contendo seis membros da família Cactaceae e o grupo externo *Portulaca oleraceae*.

