

**INSTITUTO FEDERAL
DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**
Minas Gerais
Campus Bambuí

Daphne Amaral Fraga

**AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA E
DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Coleocephalocereus purpureus, UMA ESPÉCIE
AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais –
IFMG

Bambuí
Agosto / 2019

Daphne Amaral Fraga

**AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA E
DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Coleocephalocereus purpureus, UMA ESPÉCIE
AMEAÇADA DE EXTINÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais - IFMG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental.

Área de concentração: Ciências Ambientais
Linha de Pesquisa: Ecologia Aplicada
Orientador: prof. Dr. Gustavo Augusto Lacorte
Coorientador: prof. Dr. Marlon Câmara Machado

F827a Fraga, Daphne Amaral.

Avaliação da estrutura e diversidade genética de
Coleocephalocereus purpureus, uma espécie ameaçada de
extinção. / Daphne Amaral Fraga – Bambuí, 2019.

103 f.: il.; color.

Orientador: Gustavo Augusto Lacorte.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal de Educação,
Ciência e




FICHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de Mestrado, intitulada “*AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES REMANESCENTES DE COLEOCEPHALOCEREUS PURPUREUS E PROPOSIÇÃO DE PLANO DE MANEJO*”, de autoria da mestranda em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental **Daphne Amaral Fraga**, aprovada pela Banca Examinadora de Defesa, em 09/08/2019, com a média de pontuação de 84.

Título do Trabalho – houve alteração Sim () Não


Se sim, qual o título AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE COLEOCEPHALOCEREUS, UMA ESPÉCIE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO.


Betim (MG), 09 de agosto de 2019.


Prof. Dr. Gustavo Augusto Lacorte – Orientador - (IFMG/Bambuí)


Prof. Dra. Flávia de Faria Siqueira – (IFMG/Betim)


Prof. Dr. Marlon Câmara Machado – Pesquisador


Prof. Dra. Yasmine Antonini - (UFOP)


Prof.ª Dra. Simone Magela Moreira – (IFMG/Bambuí)
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental do IFMG – Campus Bambuí

Dedico esta pesquisa à minha filha, Laura, aos meus Pais, Nilsa e Lorival, e ao meu irmão, Wendell, pessoas que sempre fizeram de cada conquista trampolim para um salto maior!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos colocadas em minha vida e por ter me dado forças para superar os momentos difíceis e chegar até aqui.

À minha amada filha Laura, agradeço pela ajuda com a tradução de vários artigos; pelo incentivo nos momentos em que eu pensei desistir; e pela fundamental compreensão durante os momentos de minha ausência; enfim, pelo carinho, acolhida e amor incondicional. Te amo Filha!

Aos meus Pais, Nilsa e Lorival, as pessoas que são exemplo de coragem e determinação e me guiaram por toda a vida, agradeço as orações, o carinho, apoio, acolhida, paciência, amor, muuuuuuito amor, a valorização de cada conquista e por estarem sempre ao meu lado contribuindo para que eu fizesse o meu melhor.

Ao meu irmão, Wendell, pelo carinho, amor, proteção e incentivo, dando-me certeza de que eu não estava sozinha nesta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Augusto Lacorte, por ser um exemplo de profissional, pela amizade, paciência, ensinamentos, muitos desafios, puxões de orelha, conselhos (que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal) e a confiança em mim depositada. Muito obrigada!!! Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Marlon Machado, pelos ensinamentos, conselhos, dicas botânicas e pela fundamental parceria nas coletas no campo. Muito obrigada!

À Tia Ritinha (Rita Anizelli), minha grande amiga, agradeço os valiosos conselhos que incentivaram meu fortalecimento emocional; os puxões de orelha, a acolhida e conforto nos momentos difíceis ao longo desta jornada.

Ao amigo Gustavo (Muxiba), pela inteira disponibilidade, palavras de encorajamento e o total apoio. Ao amigo Marcos (Mano!) pela parceria, conselhos, apoio e incentivo nos momentos difíceis.

Ao Ricardo Santana e ao Cledson (Kel – o engenheiro ambiental mais biólogo que conheço, rss!), agradeço imensamente o incentivo, apoio e parceria durante as coletas no campo. À Nativa Meio Ambiente por ser o ponto de partida desta pesquisa e ter dado total apoio financeiro para as coletas.

Ao Instituto Federal de Minas Gerais – campus Bambuí – e ao Programa de pós Graduação em Sustentabilidade e tecnologia Ambiental (MPSTA), pela a oportunidade e estrutura disponibilizada para a conclusão desta pesquisa.

Ao Ronaldo, Secretário do MPSTA, pela dedicação e disponibilidade prestada aos alunos do Programa. A todos os Professores do MPSTA, pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, pelo apoio durante a etapa de genotipagem das amostras.

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram na realização desta pesquisa, todas, sem exceção, foram imprescindíveis e muito especiais.

BIOGRAFIA

Daphne Amaral Fraga filha de Nilsa Amaral Fraga e Lorival Guimarães Fraga, nascida em Betim –MG, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Presidente Antônio Carlos – Betim/MG, em 2009. Em 2012 concluiu especialização *lato sensu* em Ecologia Vegetal com Ênfase em Estudos da Flora pela UNA BH. Em 2019 tornou-se Mestre em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental pelo Instituto Federal de Minas Gerais – IFMG, *campus* Bambuí/MG.

RESUMO

Coleocephalocereus purpureus é uma cactácea criticamente ameaçada de extinção. A sua distribuição é restrita a um fragmento do bioma Caatinga em Minas Gerais, com ocorrência em afloramentos rochosos onde geralmente ocorre intensa exploração de granito ornamental. Seu habitat encontra-se gravemente comprometido em virtude de processos minerários. Sendo assim esta pesquisa teve como objetivo analisar a estrutura e diversidade genética de 04 agrupamentos de *C. purpureus* situados em locais distintos do município de Itinga (MG), e ainda, a elaboração do Plano de Manejo Genético para os exemplares presentes no agrupamento da RPPN Pasmado, assim como a elaboração de ações de manutenção para os outros 03 agrupamentos como forma de reter a diversidade genética remanescente nos agrupamentos a fim de garantir a sobrevivência da espécie. Deste modo, desenvolveu-se um marcador molecular para acessar a estrutura genética visando estimar a variabilidade genética dos agrupamentos amostrados. Para proceder à avaliação da diversidade gênica coletou-se 132 amostras de representantes dos 04 agrupamentos; extraiu-se o DNA; confeccionou-se *primers* para o desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites; validou-se os marcadores; procedeu-se à genotipagem; interpretou-se os dados; e identificou-se os indivíduos geneticamente mais valiosos. A partir dos marcadores moleculares obtidos foi possível estimar a heterozigosidade dos agrupamentos amostrados, certificando que os marcadores desenvolvidos foram adequados para serem utilizados em futuros estudos populacionais de diversidade e estrutura populacional de *C. purpureus*. Na sequência, verificou-se que as estimativas de diversidade genética apresentaram níveis moderados de variabilidade gênica, revelando-se que dos 04 agrupamentos amostrados há 01 agrupamento que formou uma população geneticamente distinta. A partir dos resultados obtidos elaborou-se o Plano de Manejo Genético para o agrupamento presente na RPPN Pasmado e também estratégias que favorecerão a conservação de *C. purpureus* nos outros 03 agrupamentos amostrados. Concluiu-se que: 1- quanto maior a heterozigosidade encontrada entre agrupamentos, maior será a variabilidade genética e, conseqüentemente, melhor será o equilíbrio da população e menor será o risco de extinção da espécie por fatores genéticos; 2- os marcadores desenvolvidos são extremamente úteis para estudos genéticos com a espécie em questão; 3- constatou-se a carência de estudos aprofundados sobre a conservação de *C. purpureus*; 4- para a implementação do Plano de Manejo Genético será necessária a elaboração de estudos complementares sobre a biologia reprodutiva de *C. purpureus*, bem como estudos sobre os respectivos polinizadores. Portanto, inferiu-se que esta pesquisa colabora efetivamente para com a conservação da espécie, uma vez que traz ao público uma importante ferramenta molecular de acesso à estrutura e diversidade genética, subsidiando-se o Plano de Manejo Genético, o qual tem importante potencial para reabilitar e reconstruir agrupamentos de *C. purpureus* em declínio.

Palavras-chaves: *Coleocephalocereus purpureus*, Cactaceae, diversidade genética, conservação.

ABSTRACT

Coleocephalocereus purpureus is a critically endangered cactus. Its distribution is restricted to a fragment of the Caatinga biome in Minas Gerais, occurring in rocky outcrops where intense exploitation of ornamental granite usually occurs. Its habitat is severely compromised due to mining processes. Thus, this research aimed to analyze the structure and genetic diversity of four populational groups of *C. purpureus* located in different locations of Itinga (MG) and the elaboration of the Genetic Management Plan for the specimens present in the RPPN Pasmado as well as the elaboration of conservation actions for the other three groups as a way to retain the remaining genetic diversity of the species. Thus, a molecular marker was developed to access the genetic structure to estimate the genetic variability of *C. purpureus* populations. To evaluate the genetic diversity, 132 samples were collected from representatives of the four groups, DNA was extracted and the microsatellite molecular markers were genotyped. Molecular data were interpreted and the most genetically valuable individuals were identified. From the obtained molecular markers it was possible to estimate the heterozygosity of the sampled groups, certifying that the developed markers were adequate to be used in future population studies of *C. purpureus* diversity and population structure. It was verified that the genetic diversity estimates presented moderate levels of gene variability and it was possible to define two distinct populations isolated by Jequitinhonha River. From the results obtained, the Genetic Management Plan was elaborated for the species. It was concluded that: (1) the higher the heterozygosity found between grouping, the greater the genetic variability and, consequently, the better the population balance and the lower the risk of extinction of the species by genetic factors; (2) the markers developed are extremely useful for genetic studies with the species in question; (3) there was a lack of in-depth conservation studies of *C. purpureus*; (4) for the implementation of the Genetic Management Plan it will be necessary to elaborate complementary studies on the reproductive biology of *C. purpureus*, as well as studies on the respective pollinators. Therefore, it was inferred that this research collaborates effectively with the conservation of the species, since it brings to the public an important molecular tool for access to genetic structure and diversity, subsidizing the Genetic Management Plan, which has important potential for rehabilitate and reconstruct declining *C. purpureus* grouping.

Keywords: *Coleocephalocereus purpureus*, Cactaceae, genetic diversity, conservation.

LISTA DE ABREVIACÕES

- AFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmento
- AMOVA – Analysis Of Molecular Variance
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
- HWE – Hardy-Weinberg Equilibrium
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
- IEF – Instituto Estadual de Florestas
- IFMG – Instituto Federal de Minas Gerais
- IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza
- MCMC - Chain Monte Carlo
- MG – Minas Gerais
- MMA – Ministério do Meio Ambiente
- MPSTA – Mestrado Profissional em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental
- NGS – Next-Generation Sequencing (Sequenciamento de Próxima Geração)
- OCBIL – Old Climatically-Buffered Infertile Landscapes
- PAN – Plano de Ação Nacional
- PCR – Polymerase Chain Reaction
- POP – População
- RAPD – DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
- RPPN – Reserva Particular do Patrimônio Natural
- SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.
- SMM – Stepwise Mutation Model
- SNUC – Sistema Nacional de Unidades de Conservação
- SP – São Paulo
- TPM – Two Phase Model
- UC – Unidade de Conservação
- USA – United States (Estados Unidos)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figure 1. Images of <i>Coleocephalocereus purpureus</i> . A, a typical individual of <i>C. purpureus</i> with several columnar stems. B, a typical cephalium near the stem's tip. C, pink melocactus-like flowers.	29
Figure 2. <i>C. purpureus</i> distribution. Natural color Google Earth image showing the location of the known occurrence areas of <i>C. purpureus</i> remnant individuals. Unprotected areas is represented by red dots and the protected and managed area by a yellow dot. Jequitinhonha and Itinga rivers are depicted in blue. Map of eastern Brazil showing the area studied within the red square (on the left).	30
Figure 3: Number of sequence reads containing potentially microsatellite loci (on the top of each bar is the exactly number of reads).	34

CAPÍTULO 2

Figure 1. Distribution of <i>C. purpureus</i> and collection localities. A. Map of Eastern Brazil showing the studied area inside the red square; B. Natural colour Google Earth image showing the location of the four known <i>C. purpureus</i> remnant grouping; C-F. Natural colour Google Earth image showing the collection sites (green dots) at each <i>C. purpureus</i> remnant grouping: C and D - quarrying impacted grouping (coded by Agrup Tipo and Agrup Nova Aurora, respectively), E – managed grouping harboured in a conservation unit (coded by Agrup RPPN), F – isolated grouping by Jequitinhonha River (coded by Agrup Tipo).	44
Figure 2. Population assignment plot implemented by GenAlex, which each sample is assigned to the population with the highest log likelihood (the population with the least negative log-likelihood value).	50
Figure 3. Genetic component grouping of the four <i>C. purpureus</i> grouping based on STRUCTURE analysis. A. Plotted the mean likelihood $\ln \Pr(X K)$ and ΔK value. B, C. Assignments proportion of each individual from all grouping when $K = 2$ and $K = 3$, respectively. Each individual is represented by a vertical bar and the colour represents the proportion of its genotype assigned to each group. Black lines separate different grouping.	51

CAPÍTULO 3

Figura 01: Imagem aérea da RPPN Pasmado. Fonte: Google Earth adaptado, 2019.	67
Figura 02: Entrada da RPPN Pasmado (conhecida localmente por RPPN Purpureus).	68
Figura 03: Vista do interior da RPPN Pasmado, com a presença de indivíduos	68

de <i>Coleocephalocereus purpureus</i> .	
Figura 04: Indivíduos de <i>C. purpureus</i> .	69
Figura 05: Detalhe do cladódio colunar com a presença de cefálio, flores e frutos.	69
Figura 06: Flores magentas, principal característica morfológica de <i>C. purpureus</i> .	69
Figura 07: Ponto de partida até a passagem sobre a ponte do Rio Pasmado.	70
Figura 08: Passagem pela ponte do Rio Pasmado até a estrada de acesso à Nova Aurora Mineração.	70
Figura 09: Chegada ao destino final.	71
Figura 10: Remoção dos cactos.	74
Figura 11: Transporte dos indivíduos de <i>C. purpureus</i> .	75
Figura 12: Rega dos indivíduos realocados.	76
Figura 13: Localização dos pontos de coletas.	78
Figura 14: Localização dos indivíduos de <i>Coleocephalocereus purpureus</i> na RPPN Pasmado.	80
Figura 15: Localização dos indivíduos de <i>Coleocephalocereus purpureus</i> presentes na localidade Tipo – Pop Tipo.	82
Figura 16: Localização dos indivíduos de <i>Coleocephalocereus purpureus</i> dentro da área da Mineração Nova Aurora – Pop Nova Aurora.	92
Figura 17: Localização dos indivíduos de <i>Coleocephalocereus purpureus</i> na margem da estrada de acesso à Mineração Nova Aurora – Agrup Pasmado.	94
Figura 18: Cactário do Jardim Botânico Plantarum.	96
Figura 19: Coleta de material vegetal dos indivíduos presentes na Agrup Nova Aurora.	98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Summary data for 10 microsatellite loci developed for <i>C. purpureus</i>	35
--	----

CAPÍTULO 2

Table 1. Summary data for 10 microsatellite loci for <i>C. purpureus</i> used in this study	45
Table 2. Genetic diversity parameters for <i>C. purpureus</i> groups	48
Table 3. Mean allele diversity and expected heterozygosity comparisons among <i>C. purpureus</i> and other cacti species previously accessed	48
Table 4. Pairwise grouping F_{ST} (below) and Nei genetic distance (above) for the <i>C. purpureus</i> groups	49
Table 5. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of the 10 loci analysed for all accessed <i>C. purpureus</i> groups	51
Table 6. Hardy-Weinberg Equilibrium deviation and Heterozygote deficit tests by microsatellite loci	52

CAPÍTULO 3

Quadro 1: Ficha técnica sobre a RPPN Pasmado	67
Quadro 2: Identificação e localização dos indivíduos geneticamente valiosos	79
Quadro 3: Identificação e localização dos indivíduos geneticamente valiosos para conservação <i>ex situ</i>	81
Quadro 4: Localização dos indivíduos amostrados na RPPN Pasmado	90
Quadro 5: Localização dos indivíduos amostrados na Localidade Tipo	93
Quadro 6: Localização dos indivíduos amostrados da Localidade Nova Aurora	95
Quadro 7: Localização dos indivíduos amostrados na Localidade Pasmado	97

SUMÁRIO

PREFÁCIO	166
1. INTRODUÇÃO	188
2. OBJETIVOS.....	211
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. REFERENCIAL TEÓRICO	222
CAPÍTULO 1	299
Development of microsatellite markers for the threatened species <i>Coleocephalocereus purpureus</i> (Cactaceae) using next-generation sequencing	299
Abstract.....	299
Introduction	30
Material and methods	322
Results and discussion.....	344
References	377
CAPÍTULO 2	40
Establishing population boundaries and conservation proposals for <i>Coleocephalocereus purpureus</i> , a critically endangered cactus species microendemic from Caatinga biome	4040
Abstract.....	40
Introduction	422
Methods	444
Results	488
Discussion.....	533
References	599
CAPÍTULO 3	633
Plano de Manejo Genético da espécie <i>Coleocephalocereus purpureus</i> presente em quatro localidades de Itinga (MG).....	633
1. Conservação de <i>Coleocephalocereus purpureus</i>	666
2. Ficha técnica da unidade de conservação	688
3. Caracterização do município de Itinga	739
4. Contextualização da RPPN Pasmado	744

5. Estratégias de manutenção da diversidade genética das colônias de <i>Coleocephalocereus purpureus</i>	788
6. Cronograma	855
7. Consideração final	866
8. Referências bibliográficas	877
Anexos	911
CONCLUSÃO.....	100
ANEXOS	1011

PREFÁCIO

Esta dissertação está organizada em quatro partes, consistindo em uma introdução geral acompanhada do referencial teórico e objetivos, mais dois capítulos que correspondem aos artigos científicos elaborados a partir dos resultados obtidos das análises de estrutura e diversidade genética de *C. purpureus*. E ainda, um capítulo que apresenta o Plano de Manejo Genético a fim de contribuir para com a conservação de *C. purpureus*.

A introdução abordou aspectos que não foram incluídos nos artigos, mas que são de suma importância para que os leitores que não estejam envolvidos com a espécie *Coleocephalocereus purpureus* tenham uma breve contextualização sobre o tema abordado neste trabalho, bem como a melhor compreensão da relevância dos objetivos propostos que também foram incluídos nessa seção.

O capítulo 1 inclui o artigo intitulado “Development of microsatellite markers for the threatened species *Coleocephalocereus purpureus* (Cactaceae) using next-generation sequencing”, já no prelo para publicação no periódico Molecular Biology Reports. Este artigo teve como objetivo apresentar os resultados do desenvolvimento e validação de marcadores moleculares microssatélites para a espécie ameaçada de extinção *C. purpureus*. Os marcadores foram obtidos a partir de sequências geradas por abordagens de sequenciamento *shotgun* de genoma inteiro. Um grupo de teste de 36 espécimes da população principal foi genotipado e todos os marcadores descritos apresentaram resultados satisfatórios para estudos genéticos populacionais, demonstrando status polimórfico para o grupo de teste de *C. purpureus* com amplificação limpa e reprodutível. Nenhuma evidência para erros de pontuação, alelos nulos ou desequilíbrio de ligação foi detectada. O número de alelos por loco variou de 3 a 6 e a heterozigosidade esperada variou de 0,78 a 0,99. Deste modo, constatou-se que os marcadores moleculares desenvolvidos são adequados para serem utilizados em futuros estudos populacionais de diversidade e estrutura populacional de *C. purpureus*.

O capítulo 2 incluiu o manuscrito intitulado “Establishing population boundaries and conservation proposals for *Coleocephalocereus purpureus*, a critically endangered cactus species microendemic from Caatinga biome”, submetido ao periódico Journal of Nature Conservation, documentando-se a avaliar a diversidade genética dos agrupamentos remanescentes de *C. purpureus* presentes em 04 localidades situadas em Itinga (MG), para proceder a uma base para proposição de ações efetivas para a

conservação genética da referida espécie. As estimativas da diversidade genética, apesar dos agrupamentos serem pequenos e fragmentadas, apresentaram níveis moderados de variabilidade genética. Todas as abordagens de diferenciação genética revelaram que há uma clara diferenciação de uma população isolada pelo Rio Jequitinhonha em relação à outra população dividida em 03 agrupamentos, o que constitui uma Unidade de Manejo independente. Como ações prioritárias para a retenção da diversidade genética dos agrupamentos de *C. purpureus*, propõe-se (i) que a população isolada seja considerada prioritária para os esforços de conservação e gerida como uma unidade independente; (ii) manter a integridade do habitat de todos os agrupamentos e realizar o monitoramento da diversidade genética; (iii) a qualidade de habitats dos polinizadores locais também deve ser preservada; e (iv) a conservação *ex situ* deve ser considerada no estabelecimento de representantes de *C. purpureus* em jardins botânicos, bem como a formação de banco de germoplasma.

O capítulo 3 apresenta o Plano de Manejo Genético dos agrupamentos das duas populações de *C. purpureus* presentes no município de Itinga (MG). Este documento estabeleceu eficientes estratégias para o manejo genético dos agrupamentos amostradas, contemplando medidas de controle dos fatores de risco de perda da espécie, bem como a definição das estratégias para conservação da variabilidade genética entre os agrupamentos amostrados; ações para viabilizar a polinização; formação de bancos de germoplasma; manutenção dos tamanhos dos agrupamentos a fim de evitar erosão genética; manutenção de habitat para polinizadores; e conservação *ex situ* de colônias de *C. purpureus* em jardim botânico.

Por fim, vale destacar que embora cada um dos artigos assim como o Plano de Manejo Genético, apresentam finalidades independentes, porém relacionadas, todos contribuem para a compreensão da história evolutiva da espécie *Coleocephalocereus purpureus* em Minas Gerais, espécie cactácea criticamente ameaçada de extinção que ainda é carente de estudos.

1. INTRODUÇÃO

A família Cactaceae apresenta mais de 1300 espécies, sendo a segunda maior em ordem de tamanho entre as plantas vasculares endêmicas das Américas, e ainda, é dividida em 3 subfamílias: Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae (TAYLOR & ZAPPI, 2004). Essa família é caracterizada por plantas xerófitas, suculentas e perenes (MACHADO, 2004), com caules segmentados em cladódios, os quais podem ser achatados ou colunares e costelados, geralmente com presença de folhas modificadas em espinhos (SOUZA & LORENZI, 2012, p. 533), excetuando-se a subfamília Pereskioideae, a qual atinge porte arbustivo e arbóreo, com presença de folhas alternas, largas, decíduas, pouco carnosas (TAYLOR & ZAPPI, 2004); Flores solitárias ou em inflorescência cimosa, bissexuadas ou raramente unissexuadas; Frutos em baga ou cápsula carnosa (SOUZA & LORENZI, 2012, p. 533).

Em virtude do grau de singularidade que as cactáceas possuem em relação ao endemismo, averiguou-se que é de suma importância a conservação de seus habitats, uma vez observado o declínio das populações associado à perda da qualidade dos mesmos (TAYLOR & ZAPPI, 2004). Neste contexto, infere-se que a ocorrência de espécies raras relaciona-se estreitamente com o grau de endemismo, tornando-se estas duas características importantes critérios para determinação de áreas potenciais para fins de conservação (KRUCKEBERG & RABNOWITZ, 1985). Existe uma concordância geral de que reservas e parques florestais deveriam ser estabelecidos e manejados de maneira a preservar a máxima variabilidade genética dentro das espécies. Entretanto, caso não tenha dados disponíveis sobre a estrutura genética das populações presentes nessas áreas, bem como dados sobre a distribuição da variabilidade gênica, torna-se difícil estabelecer estratégias eficazes para viabilizar uma adequada conservação das espécies, principalmente em casos de espécies ameaçadas de extinção. (Whitmore 1980 *apud* Moraes et al. 1999).

No ano de 2008 o Ministério do Meio Ambiente – MMA, publicou a Instrução Normativa MMA nº 06, de setembro de 2008, onde divulgou-se uma lista de espécie ameaçadas de extinção, contemplando 28 espécies de cactáceas (CAVALCANTI *et al.*, 2013), e ainda, estabeleceu-se o desenvolvimento de planos de ação visando à retirada das espécies da lista, bem como a concessão de apoio financeiro para a promoção de planos de manejo das Unidades de Conservação, assim como para planos de conservação *ex situ* (BRASIL, 2008). Deste modo, segundo Cavalcanti *et al.* (2013), “o MMA dedicou o primeiro Plano

de Ação Nacional para a Conservação das Cactáceas, o qual ficou conhecido como PAN Cactáceas”. Este Plano teve como objetivo o levantamento das cactáceas ameaçadas de extinção, assim como elaboração de estratégias voltadas para a conservação das populações.

Conforme o PAN Cactáceas, dos 382 táxons nativos distribuídos nos biomas brasileiros (ZAPPI *et al.*, 2011), destaca-se que algumas espécies são encontradas apenas em uma ou duas regiões (CAVALVANTI *et al.*, 2013), sendo um forte indicativo de espécies endêmicas e, conseqüentemente, espécies ameaçadas de extinção (ZAPPI *et al.*, 2011). Neste Plano de Conservação a espécie *Coleocephalocereus purpureus* (Buining & Brederoo) Ritter, espécie objeto desta pesquisa, é citada e classificada como espécie criticamente ameaçada de extinção.

A área de distribuição de *C. purpureus* ocorre em fragmentos da Caatinga localizada na região do Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais, com ocorrência sobre afloramentos gnáissicos e lajedos, ou seja, em *inselbergs*, à margem do Rio Jequitinhonha, no município de Itinga e, recentemente também encontrado nos municípios de Comercinho e Medina, presentes em meio à caatinga (TAYLOR & ZAPPI, 1991), onde também ocorre intensa exploração de granito ornamental (TAYLOR & ZAPPI, 2004).

Embora a atividade minerária apresente aspectos sociais positivos, tais como, geração de empregos, desenvolvimento regional, recolhimento de tributos e, conseqüentemente, fomento a economia direta e indireta da região (PACCOLA, 2005), a exploração mineral quando praticada desconsiderando os princípios da sustentabilidade, tem como consequência graves impactos ambientais responsáveis por negativas alterações biológicas, hídricas, geomorfológicas e atmosféricas, em virtude da remoção da vegetação, fragmentação e destruição de habitats, poluição dos recursos hídricos, sedimentação dos cursos d’água, poluição da atmosfera e processos erosivos (CURI, 2002).

Neste contexto, em razão do interesse na exploração de granito no município de Itinga (MG), por duas grandes mineradoras, justamente em áreas de afloramentos rochosos habitat do cacto *Coleocephalocereus purpureus* e, respectivamente áreas particulares, em agosto de 2010 o Instituto Estadual de Florestas (IEF) reconheceu através da Portaria IEF nº 149/2010, a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Pasmado, de propriedade da Nova Aurora Mármore e Granitos Ltda e Mineração Thomazini Ltda, localizada em Itinga (MINAS GERAIS, 2010), conhecida localmente como RPPN Purpureus.

De acordo com o Processo de criação da RPPN Pasmado, a Unidade de Conservação teve como objetivo garantir a sobrevivência dos agrupamentos de *C. purpureus* por meio da remoção, realocação e monitoramento dos indivíduos para uma área com condições ambientais semelhantes a área em que os indivíduos estavam naturalmente consolidadas, ou seja, a área da Unidade de Conservação.

A RPPN Pasmado está situada em zona rural do município de Itinga, possui área superficial total de 14,5 ha, com declividade elevada, no qual a porção basal apresenta um afloramento de granito onde também ocorre a presença natural de *Coleocephalocereus purpureus*. A vegetação no entorno é característica por mata seca e não possui vestígios de atividades pecuárias e antrópicas (MINAS GERAIS, 2010).

Diante do exposto, constatou-se a necessidade de proceder-se à avaliação da diversidade genética do agrupamento presente na RPPN, bem como a diversidade genética de outros 03 agrupamentos também localizadas em Itinga, e ainda, elaborar estratégias para a conservação de *C. purpureus*. Deste modo, produziu-se dois manuscritos para periódicos especializados e elaborou-se o Plano de Manejo Genético para a espécie em questão, o que tornou este estudo uma importante ferramenta para a manutenção das populações do cacto *Coleocephalocereus purpureus*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Delinear um Plano de Manejo Genético dos agrupamentos de *Coleocephalocereus purpureus* presente na RPPN Pasmado, bem como a elaboração de ações de manutenção para as outras três localidades amostradas, como forma de reter a diversidade genética remanescente nos agrupamentos a fim de garantir a sobrevivência da espécie.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Desenvolver uma ferramenta molecular eficiente para acessar a diversidade de alelos e genótipos dos indivíduos de *C. purpureus*;
- 2) Estimar a diversidade e a estrutura genética de 04 agrupamentos de *C. purpureus* a partir de amostras representativas de cada agrupamento;
- 3) Elaborar um Plano de Manejo Genético para *C. purpureus* baseado no resultado das análises de diversidade e estruturação genética dos agrupamentos amostrados;
- 4) Selecionar os indivíduos mais valiosos geneticamente para conservação *ex situ*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

A espécie *Coleocephalocereus purpureus* pertence à subfamília Cactoideae, vive em colônias, apresenta exemplares com caules colunares baixos, muito ramificados e cespitosos, com parênquima não mucilaginoso e flores magentas diurnas (ZAPPI *et al.*, 2011). A epiderme é verde escuro com presença de espinhos aciculares na coloração marrom avermelhado a vermelho, tendo-se maior concentração da base até a porção central da coluna; Em indivíduos adultos, no ápice do caule há presença de cefálio em um dos lados, com denso feltro branco, de onde nascem flores de coloração magenta, entendendo-se até a porção central da coluna, as quais se tornam frutos globosos também de coloração magenta (TAYLOR & ZAPPI, 2004).

Segundo Zappi *et al.* (2011), em virtude da associação do *C. purpureus* a um tipo de granito presente na região do vale do Jequitinhonha, o seu habitat está seriamente comprometido devido a intensos processos de exploração mineral na região (extração de granito ornamental), deixando em evidência que quaisquer distúrbios causados ao hábitat desta espécie pode leva-la à extinção. Ressalta-se que a perda de habitat é uma das principais ameaças à biodiversidade, visto que provoca o declínio das populações por meio da redução de seu tamanho, redução das taxas de reprodução e aumento da mortalidade (ESPÍRITO-SANTO, 2005).

Assim, entende-se que compreensão sobre os padrões de variação genética, entre e dentro de populações, é de suma importância para a elaboração de estratégias para conservação *in situ*, assim como para o desenvolvimento de ações eficazes conservação *ex situ* (HAMRICK & GODT, 1997).

Segundo Spoladore (2014), a conservação de espécies ameaçadas de extinção está intrinsecamente ligada ao conhecimento obtido por meio da avaliação da diversidade genética. A forma mais eficaz de se realizar esta avaliação é através do uso de marcadores moleculares, os quais são eficientes para o monitoramento da variabilidade genética, identificação de indivíduos e/ou famílias divergentes, bem como para a elaboração de mapas genéticos e identificação de locos relacionados aos caracteres quantitativos, ou seja, eles são capazes de acessar diretamente a diversidade de alelos e genótipos dos indivíduos (PIGATO & LOPES, 2001).

De acordo com Brown (1978), a estrutura genética das populações é definida de acordo com a distribuição da variedade genética entre e dentro os níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie, sendo em plantas, diretamente influenciada pelo fluxo gênico. Mas, fatores vinculados a reprodução das espécies e a sua evolução, podem interferir diretamente na organização dos padrões de fluxo gênico e, por conseguinte, na estrutura genética das populações (CAICEDO & SHAAL, 2004).

Para Rodrigues (2015), a diversidade genética é definida como a variação hereditária incumbida por parte das diferenciações fenotípicas dos indivíduos de uma população, garantindo à espécie um alto potencial de adaptação contra os efeitos ocasionados pelas adversidades ambientais, tais como mudanças climáticas, competição, predação, patologias e fatores abióticos.

Hamrick & Schnabel (1984), a estrutura genética das populações de plantas naturais é o resultado da seleção, fluxo gênico e deriva genética, sendo diretamente associada com o sistema de cruzamento da espécie, assim como com a ecologia de polinização e o mecanismo de dispersão de sementes, o que também é confirmado por Loveless & Hamrick (1984), em um estudo sobre determinantes ecológicos da estrutura genética na população de plantas, onde afirma-se que entre os fatores ecológicos o quesito reprodução indica uma elevada possibilidade de interferir na estruturação das populações.

De acordo com Figueredo *et al.* (2010), em uma pesquisa sobre estrutura e diversidade genética populacional de *Pilosocereus tillianus*, um cacto colunar nativo da Venezuela, a distribuição geográfica condicionada ao endemismo não provocam, necessariamente, a baixa diversidade genética, levando-se em conta a presença de polinizadores de longa distância (morcegos), assim como a dispersão de sementes, o que de acordo com os resultados apresentados pela pesquisa, proporcionou altos níveis de variabilidade genética.

Para Godoy (2016), os níveis de diversidade genética da espécie *Pilosocereus jauruensis*, uma cactácea colunar com distribuição restrita à vegetação xérica no entorno do Pantanal Mato-grossense, são relativamente altos mesmo com a distribuição geográfica fragmentada, assim como também é apontando nos resultados de sua pesquisa, altos índices de estruturação genética e diferenciação de populações. Entretanto, ainda segundo Godoy (2016), um dado alarmante é de que estes altos índices podem estar relacionados com possíveis incongruências taxonômicas, indicando a necessidade de uma revisão da

taxonomia de *P. jauruensis*, tendo em vista a ocorrência de táxons distintos dentro da mesma espécie.

Segundo Figueredo *et al.* (2010), muitos estudos de análise da genética espécies pertencentes da família Cactaceae, abordam cactos colunares para avaliação da diversidade gênica, principalmente espécies com distribuição restrita, indicando e atestando, surpreendentemente, que estes indivíduos apresentam elevados índices de variabilidade genética em nível de espécie e população.

Para proceder à análise da diversidade genética e determinar se há baixa ou elevada variabilidade genética é necessário estabelecer um marcador molecular para acessar a estrutura genética da espécie pesquisada (SPOLADORE, 2014).

Os marcadores moleculares são ferramentas rápidas e eficazes para estudos genômicos, uma vez que detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA sem influência ambiental (SOUZA, 2001). E assim, baseando-se neste polimorfismo, é possível realizar inferências entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos (MARTINS *et al.*, 2011).

De acordo com Silva 2012, os marcadores de DNA são classificados em marcadores dominantes, como, por exemplo, RAPD e AFLP, os quais permitem a obtenção de dados de vários loci do genoma; E os marcadores codominantes, tais como RFLP e Microsatélites, os quais apresentam alelos de um locus específico do genoma. Destacam-se que os marcadores microsatélites, permitem diferenciar indivíduos heterozigotos de homozigotos, e ainda, calcular a frequência de alelos.

As aplicações de marcadores moleculares têm sido cada vez mais comum desde o ano 2000, tendo-se maior aplicabilidade os marcadores de DNA microsatélites (SCHLÖTTERER, 2004), em virtude do elevado grau de polimorfismo encontrado (SPOLADORE, 2014).

Segundo Camacho (2016), “para estudos de diversidade genética são indicados marcadores que analisam um maior número de loci”, pois permitem uma cobertura mais abrangente do genoma, o que é também é confirmado por Spoladore (2014) ao afirmar que marcadores microsatélites são considerados marcadores altamente informativo para análises de genética de populações, pois tratam-se de sequências simples de um a seis nucleotídeos, dispostos sequencialmente. E ainda, são considerados marcadores neutros, pois não sofrem influência de pressões de seleção (CAMACHO, 2016).

A utilização de marcadores microssatélites permite compreender como é gerada e mantida a diversidade genética dentro e entre populações, e ainda, quantificar as distâncias de fluxo gênico através do pólen e semente (MORENO *et al.*, 2009). Estes marcadores também possibilitam verificar a existência de reprodução assexuada em populações naturais e como esta pode alterar as estimativas dos índices de diversidade genética e estrutural, tendo-se como objetivo melhorar as estratégias de conservação (ZUCCHI *et al.*, 2003)

Para Moraes *et al.* (2012), em nível populacional os marcadores microssatélites são mais comumente utilizados para estudos genéticos. E assim, por serem baseados em técnicas de PCR apresentam vantagens tais como, alto polimorfismo, natureza codominante e reprodutibilidade. Entretanto, uma desvantagem é a necessidade de desenvolver um novo conjunto de loci para cada espécie alvo, pois isolar os marcadores é dispendioso e demorado.

Por fim, Camacho (2016) afirma que os métodos de isolamento de microssatélites eram tarefas com elevado custo financeiro e demoradas, inconvenientes que muitas vezes reduziam o uso de marcadores microssatélites em estudos genéticos de populações naturais. Mas são as melhores ferramentas para realizar a avaliação da variabilidade genética dentro e entre populações. Aqui, utilizamos a abordagem de sequenciamento *shotgun* de genoma completo para desenvolver um conjunto de marcadores microssatélites para espécie endêmica *C. purpureus*, para aplicação em estudos genéticos populacionais, como forma de orientar o manejo genético de populações remanescentes de *C. purpureus*.

Referências consultadas:

BRASIL. Instrução Normativa MMA 06, setembro 2008. Reconhece as espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília DF, set. 2008.

BROWN, A. H. D. Isozymes, plant grouping genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**. (v. 52), n. 4, pág. 145 – 157, 1978.

CAICEDO, A. L.; SCHAAL, B. A. Grouping structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. **Molecular Ecology**. (v. 13), n. 7, p. 1871–1882, 2004.

CAMACHO, L. M. D. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética de populações de *Chrysoleaena obovata*.**

2016. 128 p. Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo 2016.

CAVALCANTI, A; TELES, M; MACHADO, M. **Cactos do Semiárido do Brasil: Guia ilustrado**. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2013.

CURI, A. Análise qualitativa da sustentabilidade ambiental da mineração: mito e realidade. In: VILLAS BÔAS, R. C.; BEINHOFF, C. **Indicadores de sostenibilidad para la indústria extractiva mineral**. Rio de Janeiro, CNPq/CYTED.

ESPÍRITO-SANTO, M. M. Perda de Habitat. In: **Panorama da Biodiversidade em Minas Gerais**. Belo Horizonte, MG. Instituto Estadual de Florestas, 2012, 247 p.

FIGUEREDO, C. J.; NASSAR, A. E.; GARCÍA-RIVAS, A. E. GONZÁLES-GARCIA, J. A. Grouping genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereaceae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. **Journal of Arid Environments**. (v. 74), n. 11, pág. 1392 – 1398, nov. 2010.

GODOY, M. O. **Diversidade e estrutura genética de *Pilosocereus jauruensis*: uma cactácea restrita aos enclaves de vegetação xérica no entorno do bioma Pantanal**. 2016. 83 p. Dissertação (Programa de Pós_Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J.W. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. **Conservation genetics: case histories from nature**. New York, Springer US, 1997, 512 p.

HAMRICK, J. L.; SCHNABEL, A. Understanding the genetic structure of plant grouping: Some old problems and a new approach. In: GREGORIUS, H. R. **Grouping genetics in forestry: lecture notes in biomathematics**. Berlin, Springer-Verlag, 1984, 212 p.

KRUCKEBERG, A. R; RABIONOWITZ, D; Biological aspects of endemism in higher plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**. (v. 16), n. 1, pág. 447 – 479, 1985.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinantes of genetic structure in plant grouping. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. Kansas, n. 15, pág. 65 – 95, 1984.

MACHADO, M. C. **O gênero *Discocactus* Pfeiff (Cactaceae) no estado da Bahia, Brasil: variabilidade morfológica, viabilidade genética, taxonomia e conservação**. 2004. 130 p. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2004.

MARTINS, A. B. G.; RODRIGUES M. G. F.; PAULA, D. R.; MENDES H. S. J.; ARANTES F. C. A.; SILVA C. L. S. P. Caracterização molecular e diversidade genética de diferentes variedades de abacate por marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**. (v. 33), n. 4, pág. 1178-1184, 2011.

MINAS GERAIS. Portaria IEF 149, de agosto de 2010. Reconhece como Reserva Particular do Patrimônio Natural – RPPN “Pasmado”, processo nº 8229491 de 15 de

junho de 2009, de propriedade da Mineração Thomazini Ltda e Nova Aurora Mármore e Granitos Ltda., localizada em Itinga, MG. **Instituto Estadual de Florestas**, Minas Gerais, ago. 2010.

MORAES P. L. R.; MONTEIRO R.; VENCOVSKY R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**. (v. 22), n. 2, pág. 237-248, 1999.

MORAES, E. M.; PEREZ, M. F.; TEO, M. F.; ZAPPI, D. C.; TAYLOR, N. P.; MACHADO M. C. Cross-species amplification of microsatellites reveals incongruence in the molecular variation and taxonomic limits of the *Pilosocereus aurisetus* group (Cactaceae). **Genetica**. (v.140), pág. 277-285, 2012.

MORENO, M. A.; TARAIZI, R.; FERRAZ, E. M.; GANDARA, F. B. Estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonocarpa* mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidiais. **Scientia Forestalis**. (v. 37), n. 84, pág. 513-523, 2009.

PACCOLA, N. C. **A mineração do granito e o conflito sócio-ambiental: estudo de caso em uma área entre os municípios de Itu e de Cabreúva (SP)**. 2005. 105 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Geociências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Scientia Florestalis**. N. 60, pág. 135 – 148, dez. 2001.

RODRIGUES, E. B. **Variabilidade genética populacional em variedades botânicas de *Harconia speciosa* Gomes (Apocynaceae): Estratégias para conservação no cerrado**. 2015. 135 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética de Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SILVA, M. B. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Revista Estudos de Biologia, Ambiente e Diversidade**. (v. 34), n. 83, pág. 157-163, 2012.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELLO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação, 2001. 1183 p.

SOUZA, V. C. S. LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo. 3ª ed. 2012. 767 p.

SPOLADORE, J. **Desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélites e caracterização da diversidade, estrutura genética e fluxo gênico em populações de *Swartzia glazioviana* (Taub.) Glaz., uma espécie ameaçada de extinção**. 2014. 99 p. Dissertação (Programa de Pós –Graduação em Botânica) – Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, 2014.

TAYLOR, N. P; ZAPPI, D. C. Cactaceae of Jequitinhonha river valley (Minas Gerais). **Acta Botânica Brasilica –SBB.** (v. 5) n. 1, pág. 63-69, 1991.

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

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; LAROCCA, J. A riqueza das cactáceas no Brasil. In: ICMBio. **Plano Nacional para conservação das Cactáceas.** Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBIO, 2011. 112 p.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetic and Molecular Biology.** (v. 26), n. 4, pág. 449-457, 2003.

CAPÍTULO 1

Manuscrito aceito para publicação no periódico Molecular Biology Reports

(DOI :10.1007/s11033-019-05213-8)

Development of microsatellite markers for the threatened species *Coleocephalocereus purpureus* (Cactaceae) using next-generation sequencing

Daphne Amaral Fraga¹, Anderson Figueiredo de Carvalho¹, Ricardo Souza Santana², Marlon Câmara Machado¹, Gustavo Augusto Lacorte¹.

1. Molecular Biology Lab, Department of Science and Languages, Federal Institute of Minas Gerais – Bambuí Campus, Bambuí, Minas Gerais State, Brazil;

2. Nativa Serviços Ambientais Ltda, Curvelo, Minas Gerais State, Brazil;

Corresponding author: Gustavo Augusto Lacorte; e-mail: gustavo.lacorte@ifmg.edu.br;

ORCID iD: 0000-0002-6866-348X; Phone number: +55 37 3431-5600.

Abstract

Ten microsatellite loci were developed and validated for the endangered cactus species *Coleocephalocereus purpureus*. The markers were obtained from sequences generated by whole genome shotgun sequencing approaches. A testing group of 36 specimens of the main population were genotyped and all described markers presented suitable outcomes to population genetic studies, showing polymorphic status for *C. purpureus* testing group with clean and reproducible amplification. No evidence for scoring errors, null alleles or linkage disequilibrium was detected. Number of alleles per locus ranged from 3 to 6 and expected heterozygosity ranged from 0.78 to 0.99. These new microsatellite loci are suitable to be used in future diversity and structure population studies of *C. purpureus*.

Keywords: Microsatellites; Population genetics; Cactus; Endangered species.

Author information

Daphne Amaral Fraga¹
e-mail: daphnefraga@hotmail.com

Anderson Figueiredo de Carvalho¹
e-mail: anderson_fbi45@outlook.com

Ricardo Souza Santana²
e-mail: souzasantana@hotmail.com
ORCID ID: 0000-0002-1107-3040

Marlon Câmara Machado¹
e-mail: marloncmachado@gmail.com

Corresponding author: Gustavo Augusto Lacorte¹
e-mail: gustavo.lacorte@ifmg.edu.br
ORCID iD: 0000-0002-6866-348X

Introduction

Coleocephalocereus purpureus (Buining & Brederoo) F. Ritter is a rare columnar cactus species, reaching up to 90 cm high, with grey wool and golden yellow to brown bristles, that forms a lateral cephalium up to 50 cm long near the stem's tip with pink melocactus-like flowers (Figure 1) [1]. As a typical columnar cactus, *C. purpureus* specimens provide nectar, pollen and fruits to a broad spectrum of bat, bird, and insect species, playing a crucial support ecological role of a fragile arid ecosystem [2].

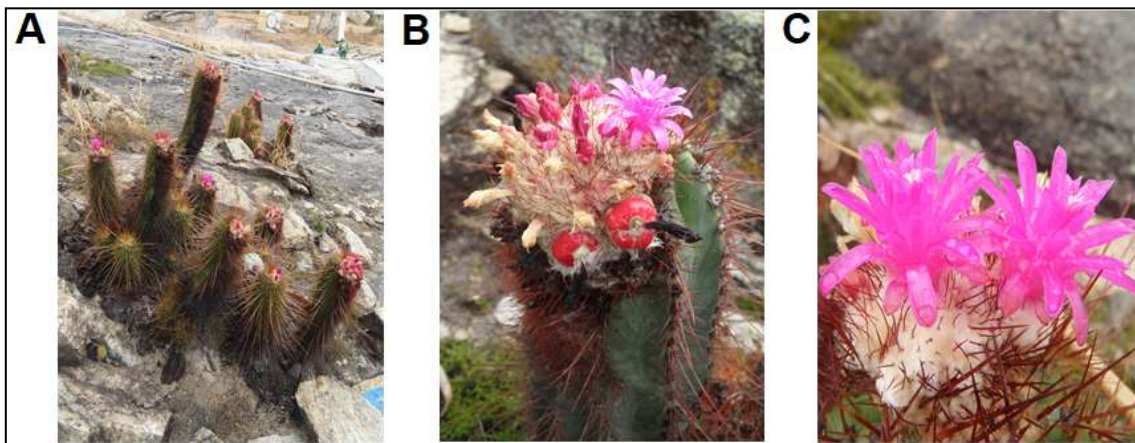


Figure 2. Images of *Coleocephalocereus purpureus*. A, a typical individual of *C. purpureus* with several columnar stems. B, a typical cephalium near the stem's tip. C, pink melocactus-like flowers.

The species was ranked by IUCN as “critically endangered” due its high endemism, whose occurrence of populations (or even of a single population, the population boundaries is unknown) is limited to only four small habitat patches restricted to inland cliffs and mountain peaks placed in a small area of Caatinga biome from Southeast Brazil (Figure 2), as well due the presence of quarrying activities of the rock where the species grows and other minor human impacts such as collection, deforestation, introduction of invasive species, fire and cattle trampling [3].



Figure 3. *C. purpureus* distribution. Natural color Google Earth image showing the location of the known occurrence areas of *C. purpureus* remnant individuals. Unprotected areas is represented by red dots and the protected and managed area by a yellow dot. Jequitinhonha and Itinga rivers are depicted in blue. Map of eastern Brazil showing the area studied within the red square (on the left).

Due to the high risk of extinction of the species imposed by quarrying activities in its home range, a conservation unit (named “RPPN Pasmado”) has recently been established to protect one of the main native populations of *C. purpureus* as well as to harbour rescued individuals from areas where quarrying activities has been authorized and all vegetation has been removed [4]. Since the translocation programs were implemented, the RPPN Pasmado Conservation Unit became the largest group of *C. purpureus* specimens constituted by native individuals as well translocated individuals from other populational groups that became extinct due to quarrying activity. In

addition, as the other three habitat patches harbouring *C. purpureus* individuals are located in unprotected areas of high value for quarrying activities, the RPPN Pasmado Conservation Unit has become the unique expectance of preservation of this species.

Strategies for genetic variability retention of the remaining populations is essential for the persistence of endangered species since low levels of genetic variation decrease population resilience and are associated to fitness decreasing by inbreeding depression [5]. Some genetic studies on cacti species using microsatellite molecular markers have provided insights into genetic diversity, demographic history, population structure and connectivity, which could offer critical guidance for conservation and management strategies [6-8].

The traditional methods for microsatellite isolation were expensive and time-consuming task, drawbacks that often reduced the use microsatellite markers in genetic studies of natural populations [9]. Recently, Next-generation sequencing (NGS), specifically whole genome shotgun sequencing approaches, has become a viable alternative for microsatellite markers isolation since NGS methods comprise faster and less costly approaches besides to generating thousands of markers per procedure [10]. Here, we use whole genome shotgun sequencing approach to develop a set of microsatellite markers for the endemic and endangered species *Coleocephalocereus purpureus* for application in population genetic studies, as a way to guide conservation and management strategies of *C. purpureus* species.

Material and methods

One *C. purpureus* specimen collected from the RPPN Pasmado was selected for whole genome shotgun sequencing. Total genomic DNA was extracted from a fresh stem slice using NucleoSpin® Plant II DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany)

and quantified using a Qubit 2.0 device (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Genomic libraries was constructed using Illumina TruSeq kit (Illumina Inc., San Diego, CA) and were run in a Illumina NextSeq Sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA) from BPI Sequencing Facility company (Botucatu, SP. Brazil). The microsatellite motifs were identified from sequences obtained by NGS with MSATCOMMANDER software [11], indicating to the program to search for di, tri, tetra and pentanucleotide microsatellites motifs. Sequencing reads including microsatellite motifs with following specifications were selected to primer design using PRIMER3 [12]: (1) perfect motif microsatellite ≥ 5 tandems repeats; (2) melting temperature around 54°C and with a maximum of 2°C difference between melting temperature for each paired primers; (3) PCR product between 100 and 300 pb length; (4) GC content > 40%; (5) no complementarity between the primers.

A testing group of 36 *C. purpureus* specimens from RPPN Pasmado Conservation Unit were selected and a small stem slice from each individual were collected to DNA extraction using NucleoSpin® Plant II DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Based on the five defined criteria for primer design, Forty-four primer pair were recovered from PRIMER3 results and subsequently manufactured with 6-FAM™ fluorophore labelling in order to perform PCR optimization and polymorphism tests. The amplification of testing group DNA was performed using a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf, Germany) and a 25 µL volume reaction containing 50 ng/µL of DNA, 5 µL of PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 0.4 µM of each primer; 0.2 mM dNTPs, 2 units of Taq DNA Polymerase and 6 µL of MiliQ H₂O. The amplification program included an initial denaturation at 95 °C for 4 min, 30 cycles at 95°C (45 s)/54°C (45 s)/72°C (45 s) and final extension at 72°C for 7 min. Amplification products were visualized in ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied

Biossystem®) using GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard v2.0 (Applied Biosystem®). The genotypes were obtained with Peak Scanner v1.0 software (Applied Biosystems®).

The genetic diversity was evaluated estimating the number of alleles per locus (N_A), number effective of alleles per locus (N_E), expected and observed heterozygosity (H_E and H_O , respectively) using the program ARLEQUIN V 3.5.1.2 [13]. In addition, deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium were tested also using ARLEQUIN V 3.5.1.2 [13]. Frequencies of null alleles were estimated using FREENA [14]. DNA sequences of microsatellite loci described here were deposited at GenBank Database with accession numbers MN200436 to MN200445.

Specimen collection for this study was authorized by Brazilian Environmental Agency (ICMBio) licence number 58257-1. The access to *C. purpureus* genetic material performed in this study was properly registered in official database of Brazilian genetic patrimony – SISGEN – with access number A8AFD21.

Results and discussion

This is the first time that microsatellite markers for *C. purpureus* were isolated and the NGS approach used in this study generated thousands of sequence reads containing microsatellite motifs (Figure 3). In total, it was generated 17,895,688 reads, of which 14769 sequences containing microsatellite motifs were identified. However, most of sequences containing microsatellite motifs were not suitable to be considered a potential microsatellite molecular marker because they did not present perfect (or even almost perfect) microsatellite motifs, or more than 5 tandems repeats, or sequence length > 100 bp. So, only about two thousands of sequence reads really could be considered potentially amplifiable microsatellite loci.

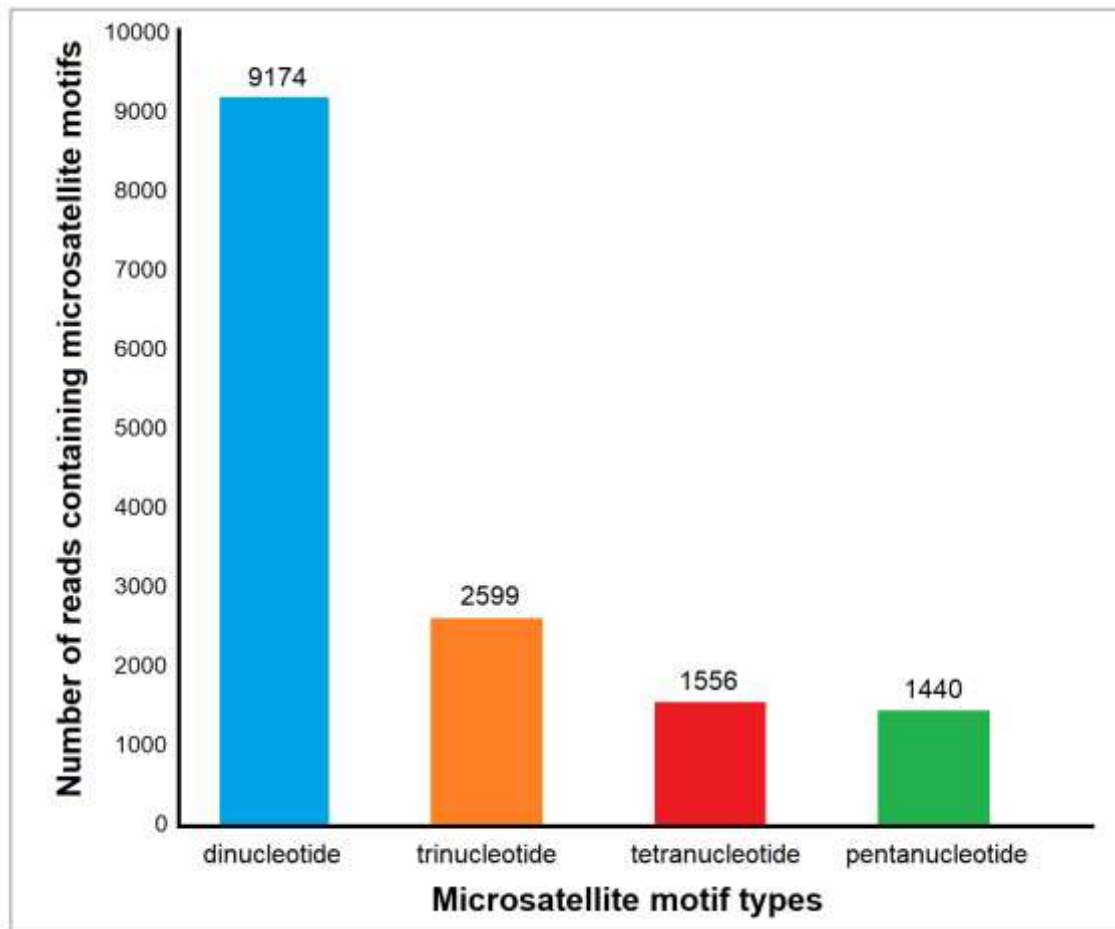


Figure 4. Number of sequence reads containing potentially microsatellite loci (on the top of each bar is the exactly number of reads).

Of all the almost 2,000 potential candidate loci, we selected only those that were accepted by the parameters implemented in the PRIMER3 primer design program, resulting in a list of 44 microsatellite loci. It is important to highlight that in this study we included melting temperature parameter in PRIMER3 software run just to simplify the process of PCR optimization. Thus, more microsatellite loci could have been characterized if the annealing temperature parameter were relaxed or not pre-established. Our results of recovering potentially amplifiable loci, using the whole genome shotgun technique, showed results similar to those performed with the same technique and purpose but for different plant species [15-18]. Our results support the robustness and applicability of NGS approaches for microsatellite loci characterization.

Of the forty-four microsatellite loci selected for the initial tests, ten of them presented suitable outcomes to population genetic studies, showing polymorphic status for *C. purpureus* testing group with clean and reproducible amplification (Table 1). The microsatellite loci presented different patterns of genetic diversity on testing group of 36 *C. purpureus* specimens designed for this study, which the number of alleles per locus ranged from 3 (Cpur-1) to 6 (Cpur-10), the observed heterozygosity (H_o) among loci ranged from 0.22 (Cpur-8) to 0.92 (Cpur-3) and expected heterozygosity (H_E) ranged from 0.78 (Cpur-8) to 0.99 (Cpur-3). Six loci presented HWE deviation attributed to deficit of heterozygotes, which is expected to small populations [19]. No evidence of scoring errors were detected in the genotyping by stuttering or due to large allele dropout as well no evidence of null alleles was verified. No significant linkage disequilibrium was detected.

Table 2. Summary data for 10 microsatellite loci developed for *C. purpureus*

Locus	Primer sequence (5' - 3')	Repeat motif	Size (bp)	N_A	N_E	H_o	H_E	HWE	FN
Cpur-1	F: CGAACAGCAGATCATCGACT	(CGCCG) ^{5*}	236-256	3	2,83	0.608	0.905	S	0
	R: ACCTGGGCGAACTGACGAT								0
Cpur-2	F: AACAGCAACTGCAACAATCG	(ATGT) ⁸	228-240	4	3,40	0.405	0.829	S	0
	R: CCCTTGTTCTTCTGTAAACCC								0
Cpur-3	F: GCACCACAAATCCTTCCAT	(AG) ¹³	206-214	5	4,85	0.921	0.994	NS	0
	R: TTCGTTCTAGTTCGCCACAG								0
Cpur-4	F: AAAGGAGATGTGCACTCACG	(AG) ¹⁴	157-167	4	3,17	0.730	0.952	NS	0
	R: ATTAGCCGTACCGTCAGAGT								0
Cpur-5	F: AACAGCCTAAAGAAGCCAG	(AG) ¹⁵	152-162	5	3,11	0.605	0.925	S	0
	R: ATTCTTGTCGCCTATGGTGC								0
Cpur-6	F: GTAACGGTTGGGAATGGGAA	(GAT) ¹²	230-236	3	2,98	0.833	0.972	NS	0
	R: AAGTCTCCCTCAGTTCCAA								0
Cpur-7	F: CAAACACAGCAACAGCACAA	(GA) ¹⁰	236-246	4	2,15	0.875	0.991	NS	0
	R: TTTGGACACTGTTGGACTCG								0
Cpur-8	F: CCCTTGAACCAACCTGTGTT	(TC) ¹⁸	230-240	6	4,51	0.229	0.785	S	0
	R: GGGTTCAGGTCTTTGGACAT								0
Cpur-9	F: GTGATGACCTCGCTTTTCGA	(TTA) ¹²	213-221	4	2,78	0.467	0.849	S	0
	R: TGGGTATTAAGGCTCACGA								0
Cpur-10	F: GTGCTGATGAGTGTTTGTACA	(ATGA) ⁹	245-257	4	2,97	0.676	0.895	S	0
	R: AATGAATGCACCGACCTCAC								0

N_A = number of alleles, N_E = number effective of alleles; H_O and H_E = observed and expected heterozygosity (respectively), HWE = deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium (S significant and NS not significant), FN = null allele frequency.*Maximum number of motif repeats.

These markers information could be useful for describing the genetic diversity and population structure of the remnant *C. purpureus* populations. They will also be used for understanding patterns of gene flow and potential connectivity among the populations. All this information is crucial for the design of management plans for this threatened species aiming the retention of the residual genetic diversity present in the remnant populations, maximizing the resilience and preventing the effects of inbreeding depression.

Acknowledgements

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS FIOCRUZ for use of its facilities and Nativa Serviços Ambientais Ltda for logistic support during collections of biological material.

References

1. Taylor NP, Zappi DC (2004). Cacti of eastern Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew, 2004.
2. Felger, R. S., & Moser, M. B. (1985). People of the Desert and Sea: Ethnobotany of the Seri Indians. xv+ 438 pp. Tucson: University of Arizona Press.
3. Taylor NP, Machado M, Braun P (2013) *Coleocephalocereus purpureus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T40913A2943088. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T40913A2943088.en>.
4. IEF-MG (2010) Portaria IEF n° 149, de 02 de agosto de 2010. <http://www.siam.mg.gov.br/sla/action/consultaPublicacoes.do>. Accessed 29 October 2019
5. Frankham R (2005). Genetics and extinction. Biological conservation 126:131-140. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>

6. Solórzano S, Dávila P (2015) Identification of conservation units of *Mammillaria crucigera* (Cactaceae): perspectives for the conservation of rare species. *Plant Ecology & Diversity* 8:559-569. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02422.x>
7. Maya-García R, Arizaga S, Cuevas-Reyes P, Peñaloza-Ramírez JM, Ramírez VR, Oyama K (2017) 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* 39:13-19. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.09.005>
8. Khan G, Ribeiro PM, Bonatelli IA, Perez MF, Franco FF, Moraes EM (2018) Weak population structure and no genetic erosion in *Pilosocereus aureispinus*: A microendemic and threatened cactus species from eastern Brazil. *PloS One* 13:e0195475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195475>
9. Vieira MLC, Santini L, Diniz AL, Munhoz, CDF (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and molecular biology* 39:312-328. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>
10. Zalapa JE, Cuevas H, Zhu H, Steffan S, Senalik D, Zeldin E, McCown B, Harbut R, Simon P (2012) Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *Am J Bot* 99:193–208. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100394>.
11. Faircloth BC (2008) MSATCOMMANDER: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Mol Ecol Resour* 8:92–94. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01884.x>
12. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* 40:e115-e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>.
13. Excoffier L, Lischer H (2010) Arlequin suite V.3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10(3):564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
14. Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24:621–631. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl191>.
15. Morillo, E., Buitron, J., Limongi, R., Vignes, H., & Argout, X. (2016). Characterization of microsatellites identified by next-generation sequencing in the Neotropical tree *Handroanthus billbergii* (Bignoniaceae). *Applications in plant sciences*, 4(5), 1500135. <https://doi.org/10.3732/apps.1500135>
16. Aranguren-Díaz, Y. C., Varani, A. M., Michael, T. P., & Miranda, V. F. (2018). Development of microsatellite markers for the carnivorous plant *Genlisea aurea*

- (Lentibulariaceae) using genomics data of NGS. *Molecular biology reports*, 45(1), 57-61. <https://doi.org/10.1007/s11033-017-4140-1>
17. Bastías, A., Correa, F., Rojas, P., Almada, R., Muñoz, C., & Sagredo, B. (2016). Identification and characterization of microsatellite loci in maqui (*Aristotelia chilensis* [Molina] Stunz) using next-generation sequencing (NGS). *PloS one*, 11(7), e0159825. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159825>
 18. Zhang, X., Zhou, Y., Li, Y. L., & Liu, J. X. (2019). Development of microsatellite markers for the seagrass *Zostera japonica* using next-generation sequencing. *Molecular biology reports*, 46(1), 1335-1341. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4491-2>
 19. Young A, Boyle T, Brown T. (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in ecology & evolution* 11:413-418. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10045-8](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10045-8).

CAPÍTULO 2

Manuscrito submetido ao periódico Journal of Nature Conservation

Establishing population boundaries and conservation proposals for *Coleocephalocereus purpureus*, a critically endangered cactus species microendemic from Caatinga biome

Daphne Amaral Fraga¹, Anderson Figueiredo de Carvalho¹, Cledson Jones Barbosa Ribeiro², Ricardo Souza Santana², Marlon Câmara Machado¹, Gustavo Augusto Lacorte¹.

1. Molecular Biology Lab, Department of Science and Languages, Federal Institute of Minas Gerais – Bambuí Campus, Bambuí, Minas Gerais State, Brazil;

2. Nativa Serviços Ambientais Ltda, Curvelo, Minas Gerais State, Brazil;

Corresponding author: Gustavo Augusto Lacorte; e-mail: gustavo.lacorte@ifmg.edu.br;

ORCID iD: 0000-0002-6866-348X; Phone number: +55 37 3431-5600.

Abstract

Coleocephalocereus purpureus is a rare columnar cactus species endemic to four small habitat patches of a south-eastern caatinga inselberg elements located in Eastern Brazil. *C. purpureus* was listed as Critically Endangered by IUCN by habitat loss due to quarrying activities. Here, we used ten microsatellite markers to estimate genetic diversity and structure of *C. purpureus* populational groups with the purpose of to make a diagnosis of remaining genetic diversity and to define population boundaries. Our estimates of genetic diversity indicated that *C. purpureus* displayed moderated levels of genetic diversity, even though the species populational groups are small and fragmented. All genetic structuring approaches revealed that there is a clear differentiation in two populations isolated by the Jequitinhonha River. One population is composed by a unique populational group placed in a disturbed non-protected area and other one composed by three groups, including the admixed and managed group

placed in a Conservation Unit. As priority actions for the retention of genetic diversity of *C. purpureus* populations, we propose (i) that the isolated population should be considered as a prior for conservation efforts and managed as an independent unit; (ii) maintaining the integrity of the habitat within the four small patches that constitute the range of the species; (iii) continuous monitoring of genetic diversity of the populational groups; (iii) quality of local pollinator habitats should also be preserved; and (iv) ex-situ conservation should be considered whit the establishment of *C. purpureus* representatives in botanical gardens as well with formation of a seed bank.

Keywords: Columnar cactus; Population boundaries; Plant conservation; Endangered species; Caatinga

Author information

Daphne Amaral Fraga¹
e-mail: daphnefraga@hotmail.com

Anderson Figueiredo de Carvalho¹
e-mail: anderson_fbi45@outlook.com

Cledson Jones Barbosa Ribeiro²
e-mail: kel@nativameioambiente.com.br

Ricardo Souza Santana²
e-mail: souzasantana@hotmail.com
ORCID ID: 0000-0002-1107-3040

Marlon Câmara Machado¹
e-mail: marloncmachado@gmail.com

Corresponding author: Gustavo Augusto Lacorte¹
e-mail: gustavo.lacorte@ifmg.edu.br
ORCID iD: 0000-0002-6866-348X

Introduction

Current global habitat fragmentation and drastic loss of natural ecosystems have been related with changes on components and functions of biotic communities as well on structure and dynamics of natural populations, causing vulnerability of local population and species extinction (Duraiappah 2005). This scenario is more evident for rare and endemic species, since these species often have a restricted geographic distribution range, low population densities and are frequently habitat specialists (Kruckeberg and Rabinowitz 1985). Moreover, when this scenario is combined with recent habitat loss caused by anthropogenic activities, the distribution of these species has become fragmented in small and isolated populational groups (Falk and Holsinger 1991).

In plants, small population size and fragmentation is correlated with low levels of genetic diversity so that theoretical and empirical studies have warned the importance of maintaining genetic diversity as crucial issue for conservation biology, since the declining of genetic diversity is a direct cause of population fitness reduction due inbreeding depression and genetic drift (Falk and Holsinger 1991; Sherman-Broyles et al. 1992; Ellstrand and Elam 1993). Furthermore, the reduction of genetic variation can limit adaptive capacities of populations and increase their risk of extinction (Murcia 1995; Jules and Rathcke 1999; Jacquemyn et al. 2002). Consequently, effective conservation efforts for rare and endemic species requires that their genetic variation across their ranges be evaluated and monitored in order to identify the major threats, to estimate short-term and long-term species viability and guide the strategies designing of species conservation (Frankham et al. 2010).

The Cactaceae family represents one of the most diversified Angiosperm clades with about 1800 species, predominantly distributed in arid and semiarid regions of the

Americas and the Caribbean (Goettsch et al. 2015). On the other hand, Cactaceae is also rich in rare and endemic species so that 31% of the total species is ranked as threatened of extinction due narrow distribution, small population sizes, habitat loss and illegal trade (IUCN 2019). A remarkable cacti endemism region in South America is Eastern Brazil, with about 40 genera and 227 species dispersed by Caatinga, Brazilian Atlantic Forest, and Cerrado biomes patches whose about 77% of the Cactaceae species are endemic (Taylor and Zappi 2004).

Coleocephalocereus purpureus (Buining & Brederoo) F. Ritter is a rare columnar cactus species, reaching up to 90 cm high, with grey wool and golden yellow to brown bristles, that forms a lateral cephalium up to 50 cm long near the stem's tip with pink melocactus-like flowers (Taylor and Zappi 2004). As *C. purpureus* is a typical columnar cactus, the specimens provide nectar, pollen and fruits to a broad spectrum of bat, bird, and insect species, playing a crucial support ecological role of a fragile arid ecosystem (Felger and Moser 1985). The species was ranked by IUCN as “critically endangered” due its high endemism, since the species distribution is limited to only four small habitat patches restricted to inland cliffs and mountain peaks placed in a small area of Caatinga biome from Southeast Brazil (Figure 1) as well due the presence of quarrying activities of the rock where the species grows and other minor human impacts such as collection, deforestation, introduction of invasive species, fire and cattle trampling (Taylor et al. 2013).

Due to the high risk of extinction of the species imposed by quarrying activities in its home range, a conservation unit (named “RPPN Pasmado”) has recently been established to protect one of the main native populations of *C. purpureus* as well as to harbour rescued individuals from areas where quarrying activities has been authorized and all vegetation has been removed (IEF-MG 2010). Thus, the known distribution of

the species consists of four populational groups covering an estimated occupancy area of less than 5km²: one of them corresponding to specimens placed in type-locality, isolated from the others by the Jequitinhonha River; a large group corresponding to the admixed and managed group placed in the conservation unit; and two groups with very small sizes, located near the conservation unit, in small gneissic inselbergs high impacted by quarrying industry.

As rare and endemic species consisting of small and fragmented populations are subject to random genetic drift which reduces genetic diversity and increase genetic differentiation (Ellstrand and Elam 1993), we expect to find low levels of genetic diversity and a high degree of differentiation among *C. purpureus* remnant populational groups. Furthermore, as the distance among *C. purpureus* groups is very short, it is possible that gene flow is occurring among the all or some groups so that the population boundaries in *C. purpureus* is unclear. In this context, we genotyped ten nuclear microsatellite markers to estimate the genetic diversity and genetic structure of *C. purpureus* remnant groups and use the findings to explore the following questions: (i) Are genetic diversity parameters significantly higher for the managed main group when compared with non-protected *C. purpureus* groups? (ii) How different are the parameters of genetic diversity among *C. purpureus* and other non-critically endangered cacti species? (iii) Is there enough genetic structuring to define more than one *C. purpureus* population? We consider that the answers for these questions will be crucial to design priority actions for the conservation of *C. purpureus* species.

Methods

Specimen sampling and DNA extraction

We sampled a total of 132 individuals distributed across the four known *C. purpureus* occurrence areas, covering the whole area of species distribution. The group of

specimens placed in type-locality was coded here as “Tipo group”. The group placed in RPPN Pasmado Conservation Unit, was coded as “RPPN group”. The other two groups place in areas near the conservation unit were coded as “Nova Aurora group” and “Pasmado group” (Figure 1). We collected a small slice (1cm x 1cm x 0.3 cm) of the columnar stem of each specimen in order to minimize the impact of collection on individual health. In order to minimize the probability of sampling clones (ramets), a distance of at least ten meters were maintained among sampled individuals and their geographical coordinates were registered using a GPS device. Collected samples were deposited in 2ml microtubes soaked in low TE Buffer in the field and frozen upon arrival in the laboratory. Total genomic DNA was extracted using commercial NucleoSpin® Plant II DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), quantified by measuring the absorbance of the sample at 260 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) and DNA integrity was verified through electrophoresis on 1% agarose gel.



Figure 1. Distribution of *C. purpureus* species. Natural colour Google Earth image showing the location of the four known *C. purpureus* remnant occurrence areas (depicted with yellow dots). On the left, map of Eastern Brazil showing the studied area inside the black square.

Microsatellite amplification

To access genetic diversity of *C. purpureus* groups, we used ten microsatellite loci previously developed and optimized for *C. purpureus* species (Fraga et al. 2019) (Table 1). The polymerase chain reactions were performed in simplex mode using forward primers labelled with FAM fluorophores. Amplification reactions were performed in 25 μ L final volume, containing 4 μ L of DNA (~ 40 ng), 5 μ L of PCR Buffer (10 mM Tris–HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 0.4 μ M of each primer, 0.2 mM dNTPs, 2 units of Taq DNA Polymerase and 6 μ L of MiliQ H₂O. The amplification program included an initial denaturation at 95 °C for 4 min, 30 cycles at 95°C (45 s)/54°C (45 s)/72°C (45 s) and final extension at 72°C for 7 min. Amplification products were visualized in ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystem®) using GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard v2.0 (Applied Biosystem®). The genotypes were obtained with Peak Scanner v1.0 software (Applied Biosystems®).

Table 1. Summary data for 10 microsatellite loci for *C. purpureus* used in this study

Locus	Primer sequence (5' - 3')	Repeat motif	Size (bp)
Cpur-1	F: CGAACAGCAGATCATCGACT R: ACCTGGGCGAACTGACGAT	(CGCCG) ^{5*}	256-236
Cpur-2	F: AACAGCAACTGCAACAATCG R: CCCTTGTTCTTCTGTTAAACCC	(ATGT) ⁸	228-240
Cpur-3	F: GCACCACCAAATCCTTCCAT R: TTCGTTCTAGTTCGCCACAG	(AG) ¹³	206-214
Cpur-4	F: AAAGGAGATGTGCACTCACG R: ATTAGCCGTACCGTCAGAGT	(AG) ¹⁴	157-167
Cpur-5	F: AACAGCCTAAAGAAGCCCAG R: ATTCTTGTCGCCTATGGTGC	(AG) ¹⁵	152-162
Cpur-6	F: GTAACGGTTGGGAATGGGAA R: AAGTCTCCCTCAGTTCCAA	(GAT) ¹²	230-236
Cpur-7	F: CAAACACAGCAACAGCACAA R: TTTGGACACTGTTGGACTCG	(GA) ¹⁰	236-246
Cpur-8	F: CCCTTGAACCAACCTGTGTT R: GGGTTCAGGTCTTTGGACAT	(TC) ¹⁸	230-240
Cpur-9	F: GTGATGACCTCGTCTTTCGA	(TTA) ¹²	213-221

Data analyses of microsatellite loci

Genetic diversity of accessed *C. purpureus* groups was estimated by the following parameters: number of alleles per locus (N_A), effective alleles (N_E), and private alleles, likewise observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, inbreeding coefficient (F_{IS}), calculated using the GenAlEx software 6.5 (Peakall and Smouse 2012). In order to compare the genetic diversity parameters found to *C. purpureus* sampling and genetic diversity parameters for microsatellite loci reported to other endemic Cactaceae species, performed Wilcoxon two sample tests by-sample values of number of alleles per locus (N_A) and expected (H_E) heterozygosity using data summarized by Khan et al. (2018). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), Heterozygote deficit and Linkage disequilibrium between loci was tested in ARLEQUIN 3.0 software (Excoffier et al. 2005). To test for evidences of recent population reduction, we used the heterozygosity-excess test implemented in BOTTLENECK 1.2.02 software (Piry et al. 1999).

Level of population differentiation was assessed by using the F_{ST} fixation index and Nei's Genetic Distance, implemented in GenAlEx software 6.5 (Peakall and Smouse 2012). The frequency-based assignment test of Paetkau was performed with GenAlEx software 6.5 (Peakall and Smouse 2012). In this test, for each sample, the expected genotype frequency at each locus is calculated, assuming random mating in the population in question, multiplied across loci and log transformed to give a log likelihood value. The log likelihood value is calculated for each population, using the allele frequencies of the respective population and a sample is assigned to the population with the highest log likelihood (i.e., the population with the least negative

log-likelihood value). A population assignment plot was generated to depict population clusters formed by the log-likelihood values.

We also used ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005) to compute molecular variance (AMOVA) components among and within populations. Bayesian analysis was implemented in STRUCTURE 2.3.4 (Evanno et al. 2005) was used by assigning individual microsatellite genotypes to K gene clusters. An admixture model was run with correlated allele frequencies allowing the individuals to be assigned to two or more genotype groups when they are admixed. Each run was carried for 1,000,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) cycles with a 50000 burn-in. The algorithm was run 10 times for each value of K. The most likely number of clusters was inferred from ΔK statistics (Evanno et al. 2005) as implemented in STRUCTURE HARVESTER 0.6.93 (Earl 2012), by the smallest value of K after which the Ln P(D) values reach a plateau.

To test for isolation by distance, we performed a Mantel test (Mantel 1967) using the software GenAlEx software 6.5 (Peakall and Smouse 2012). A matrix of pairwise G_{ST} genetic distance among the samples was generated and subsequently it was compared against a matrix of geographic distance. Significance tests were performed following 999 permutations ($P < 0.05$).

Results

We successfully amplified 10 microsatellite loci and, for all genetic diversity parameters analysed, average values varied among the accessed *C. purpureus* groups (Table 2). Excepted by the Observed Heterozygosity (H_O) parameter, the managed *C. purpureus* group (RPPN group) presented the highest values for all genetic diversity parameters analysed. The lowest values of genetic diversity was verified for *C. purpureus* group

isolated by Jequitinhonha River (Tipo group). The Tipo group also presented the highest value of inbreeding coefficient.

Table 2. Genetic diversity parameters for *C. purpureus* groups

Group	Status	N	N _A	N _E	H _O	H _E	F _{IS}
RPPN	Managed	60	4,7	2,821	0,498	0,624	0,187
Tipo	Disturbed/ Isolated	26	3,7	2,154	0,381	0,485	0,202
Nova Aurora	Disturbed	24	4,4	2,550	0,529	0,585	0,087
Pasmado	Disturbed	22	3,8	2,247	0,523	0,528	0,035
Total (mean)			4,150	2,443	0,483	0,555	0,128

Sampling size (N), Average number of alleles (N_A), Number of effective alleles (N_E), Observed heterozygosity (H_O), Expected heterozygosity (H_E), Inbreeding coefficient (F_{IS})

The comparison approach of the genetic diversity parameters estimated for other endemic but not critically endangered cacti species revealed that in most comparisons, the levels of genetic diversity found for *C. purpureus* were similar or higher than those found for other species, especially when compared to managed group of *C. purpureus* (Table 3).

Table 3. Mean allele diversity and expected heterozygosity comparisons among *C. purpureus* and other cacti species previously accessed

Species	IUCN status	N _A	<i>C. purpureus</i> vs. Cactus species	Cactus species vs. Managed <i>C. purpureus</i> group	H _E	Cactus species vs. <i>C. purpureus</i>	Cactus species vs. Managed <i>C. purpureus</i> group.	Reference
<i>Echinocactus grusonii</i>	Endangered	3,3	↑	↑	0,508	●	↑	Hardesty et al. 2008
<i>Mammillaria crucigera</i>	Endangered	8	↓	↓	0,765	↓	↑	Solórzano and Dávila 2015
<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Endangered	5,6	↓	↓	0,511	●	↑	Hugues et al. 2008
<i>Mammillaria supertexta</i>	Endangered	8,2	↓	↓	0,764	↓	↓	Solórzano et al. 2014
<i>Uebelmannia pectinifera</i>	Endangered	6,0	↓	↓	0,690	↓	↓	Moraes et al. 2014
<i>Astrophytum asterias</i>	Vulnerable	5,9	↓	↓	0,695	↓	↓	Terry et al. 2012
<i>Pilosocereus aureispinus</i>	Vulnerable	4,0	●	↑	0,463	↑	↑	Khan et al. 2018
<i>Pilosocereus parvus</i>	Vulnerable	3,8	●	↑	0,465	↑	↑	Moraes et al. 2012
<i>Pilosocereus aurisetus</i>	Least Concern	5,4	↓	●	0,551	●	↑	Bonatelli et al. 2014
<i>Pilosocereus machrisii</i>	Least Concern	4,4	●	●	0,478	●	↑	Bonatelli et al. 2014

<i>Pilosocereus jauruensis</i>	Least Concern	4,2	●	●	0,488	●	↑	Bonatelli et al. 2014
<i>Pilosocereus vilaboensis</i>	Least Concern	4,2	●	●	0,438	↑	↑	Bonatelli et al. 2014

The results of Wilcoxon's rank sum test comparing if genetic diversity parameters for both *C. purpureus* species and *C. purpureus* managed group is significantly ($P \leq 0.05$) larger (↑), smaller (↓) or not different (●) to the other accessed species.

We also observed that the differences in levels of genetic diversity between *C. purpureus* and other cacti species are not directly related to the degree of threat of the species, in which some non-endangered species had lower levels of genetic diversity than *C. purpureus*.

In general terms, all estimators of genetic differentiation among *C. purpureus* groups used in this study denote a clear divergence between Tipo group, which is isolated by the Jequitinhonha River, from the other groups. While the overall coefficient of genetic differentiation F_{ST} was 0.151, pairwise F_{ST} values between Tipo and other *C. purpureus* groups ranged from 0.227 to 0.279 (Table 4).

Table 4. Pairwise group F_{ST} (below) and Nei genetic distance (above) for the *C. purpureus* groups

Group	RPPN	Tipo	Nova Aurora	Pasmado
RPPN	***	0.678	0.136	0.146
Tipo	0.227	***	0.573	0.641
Nova Aurora	0.055	0.238	***	0.058
Pasmado	0.063	0.279	0.046	***

Similar results was verified to comparisons of Nei's genetic distance measures. Mantel test ($r^2 = 0.012$; $P = 0.13$) did not support any spatial correlation between the genetic and geographic distances among *C. purpureus* groups. The population assignment plot generated by population assignment approach implemented in GenAlex (Peakall and Smouse 2012), also depicted the Tipo group divergence from the other *C. purpureus* groups (Figure 2). Moreover, the genetic differentiation approaches also revealed that

high impacted groups Nova Aurora and Pasmado are genetically more similar to each other than compared to the managed RPPN group.

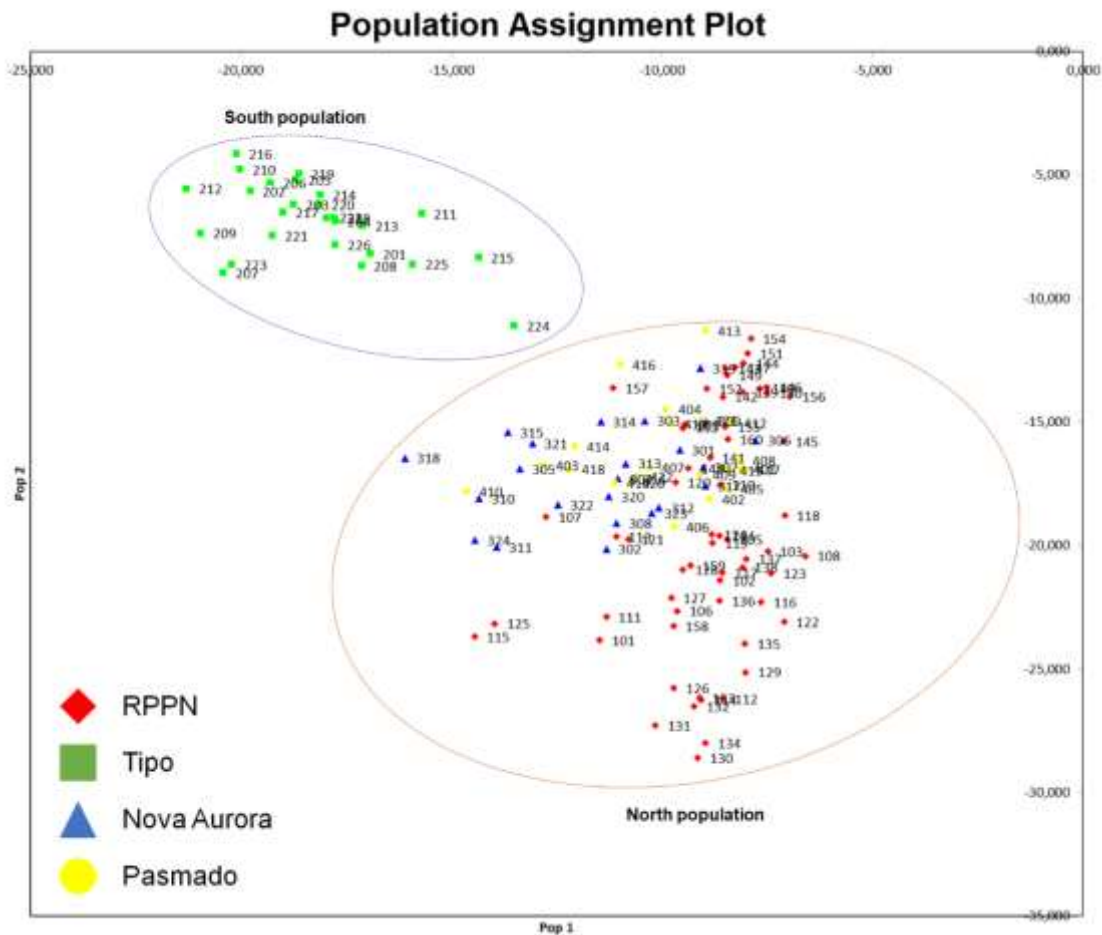


Figure 2. Population Assignment Plot implemented by GenAlex, which each sample is assigned to the group with the highest log likelihood (the group with the least negative log-likelihood value). The numbers close to each icon represent the code of each sampled specimen.

Using the ΔK method, we identified $K = 2$ as the best K value for our microsatellite data set, followed by $K = 3$ and we plotted both data sets to compare the results easily (Figure 3). Considering the two-group model as the most appropriate, there is one cluster composed by the genotypes present in Tipo group and another one composed by

the genotypes present in the individuals from the other three groups (Figure 3B). When we assume the three-group model to represent the genetic structure of *C. purpureus*, we again have a cluster formed by the genotypes present in Tipo group (green bars), a second cluster mostly present in the RPPN group (red bars), and a third cluster in which is best represented in Nova Aurora and Pasmado groups (blue bars) (Figure 3C).

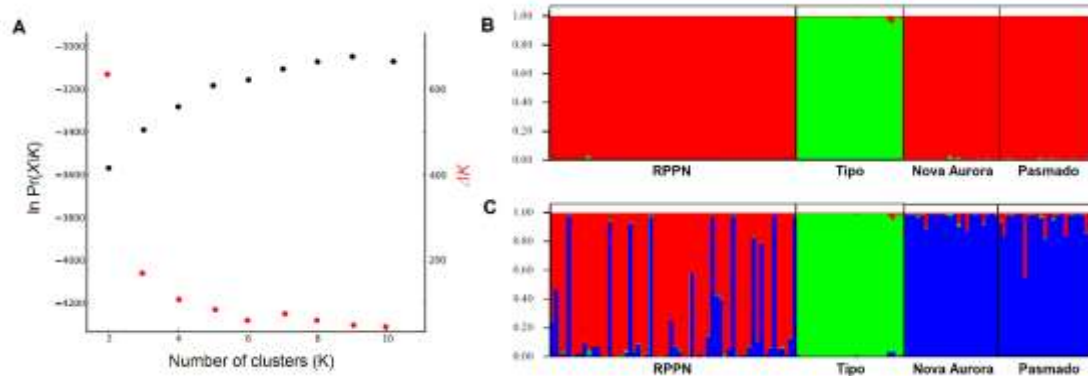


Figure 3. Genetic component clustering of the four *C. purpureus* groups based on STRUCTURE analysis. A. Plotted the mean likelihood $\ln \Pr(X|K)$ and ΔK value. B, C. Assignments proportion of each individual from all clusters when $K = 2$ and $K = 3$, respectively. Each individual is represented by a vertical bar and the colour represents the proportion of its genotype assigned to each group. Black lines separate different groups.

Although there was a clear divergence among *C. purpureus* groups, our AMOVA results indicated that most of the genetic variation was structured within groups rather than among groups, with about 80% of total variation explained by differences within groups and only about 15% of total variation explained by differences among groups (Table 5).

Table 5. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of the 10 loci analysed for all accessed *C. purpureus* groups

Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	109.032	0.54055	14.72 %
Among individuals within group	427.885	0.21120	5.75%
Within individuals	385.500	2.92045	79.53%
Total	922.417	3.67221	

Tests for population bottlenecks did not find any evidence of a recent bottleneck in any group of *C. purpureus* under either TPM or SMM model. No significant values of linkage disequilibrium were observed in any locus pair comparison ($P < 0.0001$). We verified Hardy-Weinberg deviations for the most of loci in all accessed *C. purpureus* groups, especially for the managed RPPN group that also presented heterozygote deficit for the most of microsatellite loci (Table 6).

Table 6. Hardy-Weinberg Equilibrium deviation and Heterozygote deficit tests by microsatellite loci

Group	CPUR-1	CPUR-2	CPUR-3	CPUR-4	CPUR-5	CPUR-6	CPUR-7	CPUR-8	CPUR-9	CPUR-10
<i>Test: HWE deviation</i>										
RPPN	***	***	***	***	***	**	***	***	***	ns
Tipo	**	**	ns	***	***	ns	*	***	*	ns
Nova Aurora	***	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	***	ns
Pasmado	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	*
<i>Test: Heterozygote deficit</i>										
RPPN	***	***	ns	ns	ns	*	**	***	***	ns
Tipo	ns	ns	ns	*	**	ns	ns	*	*	**
Nova Aurora	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	***	ns
Pasmado	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns=not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Discussion

Genetic diversity of *C. purpureus* species

Our estimates of genetic diversity revealed that *C. purpureus* groups presented moderated levels of genetic diversity, even though the species distribution is small and fragmented groups. The results contradicted our expectations of low genetic diversity for all *C. purpureus* groups due the small sizes that often are related to inbreeding and genetic drift effects on genetic diversity parameters. Similar results of absence of

relation between cacti populations disturbed by human activities and reduced levels of genetic diversity were reported by Paz-Guerrero et al. (2019) and Rodríguez-Oseguera et al. (2013).

Hopper (2009) proposed that in ancient climate-buffered infertile landscapes or OCBIL landscapes (in which *C. purpureus* habitats fit well), natural selection has historically favoured organisms of limited dispersibility, creating rare endemic group systems, maintained by high cross efficiency and highly mobile vector pollination, thus retaining genetic diversity. Moreover, no effect of historical events related of recent population retraction (bottleneck events) could be verified and based on the assumptions of OCBIL theory, it is plausible to consider that the recent habitat reduction of remnant *C. purpureus* groups has not yet been sufficient to cause extensive declining erosion of these groups, probably because these groups were naturally established in small portions of the habitat (gneiss inselbergs) and historically persisted in small groups that interchanged vegetative propagation of individuals and highly effective sexual reproduction processes conducted by local pollinators.

When we compared genetic diversity parameters accessed for *C. purpureus* groups with data compiled from the literature for other cacti species with similar distribution and different conservation status, *C. purpureus* estimates of genetic diversity were higher than those reported for other microendemic species from Eastern Brazil (Bonatelli et al. 2014; Moraes et al. 2014; Khan et al. 2018) but smaller than cacti species from Mexican dry lands (Hardesty et al. 2008; Hugues et al. 2008). These results suggest again that observed that levels of genetic diversity for endemic Cactaceae species may be more related to historical processes of establishment of each species as well as inherent characteristics of their biology (modes of reproduction, pollination and dispersion

strategies) than directly related to the degree of threat of the species established by general parameters defined by species protection agencies.

The genetic diversity parameters varied among the groups (H_E ranged from 0,485 to 0,625) and natural groups of *C. purpureus* did not showed significant deviations HWE as well as heterozygote deficits for the most of accessed microsatellite loci. However, the admixed and managed RPPN group showed the highest values of genetic diversity among the *C. purpureus* groups, but with the largest number of loci that deviated from equilibrium. These findings could be associated with the formation process of RPPN group in which colonies that lived in other adjacent habitat patches were translocated to RPPN Pasmado Conservation Unit that was already occupied by other colonies composing a new admixture group. If the two founding groups differed significantly in their allele frequencies, a Wahlund effect (Wahlund, 1928) can be the explanation for the deviations HWE by heterozygote deficits presented by RPPN group (Ottewell et al. 2016).

Population differentiation and genetic structure

All results from our estimates of population genetic differentiation describe the same scenario in which there is a clear differentiation in two populations isolated by the Jequitinhonha River. One population is composed by a unique populational group placed at south side of the river (South population) and other one composed by the three groups placed at north side, including the admixed and managed RPPN group (North population). The pairwise F_{ST} and Nei's Genetic Distance values for Tipó group were up to four times higher than for other groups (Table 4) and Population Assignment Plot showed a remarkable distinction of genotypic combinations presented by Tipó group compared to the other *C. purpureus* groups (Figure 2). Since the Mantel test did not reveal any evidence of isolation by distance (species range is less than 5 km), the most

likely explanation for this clear genetic divergence between Tipo group and the other *C. purpureus* groups is that the Jequitinhonha River plays a barrier to gene flow among groups placed at distinct sides of the river. At *C. purpureus* range, the Jequitinhonha River is more than 100 m wide and probably this prevents both pollinators (potentially moths and hummingbirds) and seed dispersers (small lizards).

STRUCTURE results of clustering also indicated the presence of significant structuring of genetic diversity in two main clusters ($k=2$) corresponding to representatives of North population (Tipo group) and South population (RPPN + Nova Aurora + Pasmado groups) (Figure 3B). Moreover, when we assume a more refined degree of sub-structuring ($k=3$), differences on genetic composition could be observed at the three groups of North population, which Nova Aurora and Pasmado groups have a more homogeneous pattern and RPPN group has an admixed pattern (Figure 3C).

Our findings of genetic differentiation of *C. purpureus* groups revealed that Tipo group can be considered as a isolated population and should be considered a distinct Management Unit (MU) based on criteria defined by Palsbøll et al. (2007). The identification of MUs is central to the short-term management and conservation of natural populations and is typically used to delineate entities for monitoring because its degree of connectivity is sufficiently low so that each one should be monitored and managed separately (Taylor and Dizon 1999). Moreover, further studies with appropriate genetic markers are needed to confirm if the isolation of the two populations is not recent so that it is possible that the two populations on both sides of the river are evolving independently, consisting of two Evolutionarily Significant Units - ESUs (Ryder 1986; Moritz 1994). The recognition of ESUs is as relevant as to establish MUs to management issues, since the success of species conservation is on maintain the full array of locally adapted variants in the MUs that composes each ESU

and prevent translocation of individuals between ESUs because differences in local adaptation or coadaptation can constrain the viability of the mixed populations (Moritz, 1999). In this context, we strongly recommend that phylogeographic studies be performed to confirm whether the isolation of South population is deep enough for it to constitute an independent ESU or relatively recent to consider it as a MU.

Implications for conservation and management

C. purpureus exhibits a moderated level of genetic diversity and a clear population differentiation between the groups separated by Jequitinhonha River (North and South populations). It is possible that populations in both sides can be locally adapted to environmental conditions, and promoting gene flow between the populations may lead to outbreeding depression, resulting in decreased fitness of subsequent generations (Lynch 1991). On the other hand, recent habitat destruction by local quarrying activities put all remnant groups at risk by making the population sizes smaller and more fragmented, increasing the effects of inbreeding and genetic drift (Frakham, 2005).

There are still substantial genetic diversity retained in the remnant populations, so we consider that the best option for conservation of *C. purpureus* is to ensure sustainable survival of all groups and to preserve their evolutionary potential. In order to accomplish this main goal, we proposed some actions that should be included in a general conservation plan for the species. The first critical measure should be attentively taken is to monitor the genetic diversity and conserve all remaining individuals of *C. purpureus* at their original sites. The in situ conservation plans for all extant groups should be executed to decrease the impact from human activities, ensure their viability in field, promote natural regeneration, and maintain the genetic diversity of populations.

However, to establish conservation efforts for all remnant groups is extremely expensive and could be not realistic. Therefore, we recommend the creation of a conservation unit to preserve the remnant specimens of South population. Here, we showed that South population has the lowest values of genetic diversity and also presents a degree of genetic differentiation from others that classify this population as a MU and conservation concerns should be taken independently for this population.

During field work, we observed bees and hummingbirds visiting the flowers of *C. purpureus*, being therefore their probable pollinating agents. These organisms are extremely sensitive to environmental disturbances (Hadley and Betts, 2009) and it is imperative that the quality of local pollinator habitats is also preserved and monitored in order to ensure the sexual reproduction of *C. purpureus* and the prevent inbreeding harms.

Nova Aurora and Pasmado patches are at strong risk of extinction due the imminent complete occupation of the areas by quarrying activities. In this study, we showed the RPPN group presents common elements of genetic diversity with Nova Aurora and Pasmado groups and the RPPN managed group can play a key role in the fate of the Nova Aurora and Pasmado groups in both optimistic or pessimistic scenarios. Under an optimistic scenario, in which Nova Aurora and Pasmado patches would become safe of habitats loss, individuals from RPPN group can be used recover (by translocation events) the population sizes of Nova Aurora and Pasmado groups. Under a pessimistic scenario, which the whole patches would be occupied by quarrying activities, Nova Aurora and Pasmado individuals may be translocated to the conservation unit where RPPN group is located, since exogamic depression effects are not expected given the genetic similarity among the three groups was verified.

Lastly, we recommend that ex-situ conservation should be implemented and two main strategies are proposed: (i) first, a group of individuals from each *C. purpureus* group should be selected so that they represent the genetic diversity of each group and sent to botanical gardens specialized in ex situ cacti species preservation; (ii) formation of a germplasm bank from the collection and suitable storage of viable seeds from as many colonies as possible of all *C. purpureus* groups.

References

- Bonatelli IA, Perez MF, Peterson AT, Taylor NP, Zappi DC, Machado MC, et al. (2014) Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/mec.12780>
- Duraiappah AK, Naeem S, Agardy T, Ash NJ, Cooper HD, Diaz S, et al. (2005) Ecosystems and human well-being: biodiversity synthesis; a report of the Millennium Ecosystem Assessment. World Resources Institute.
- Earl DA (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual review of Ecology and Systematics*. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.001245>
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>
- Falk DA, Holsinger KE, Holsinger KE (1991) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press on Demand.
- Felger RS, Moser MB (1985) People of the desert and sea. Ethnobotany of the Seri Indians. The University of Arizona.
- Fraga DA, Carvalho AF, Santana RS, Machado MC, Lacorte GA (2019) Development of microsatellite markers for the threatened species *Coleocephalocereus purpureus*

- (Cactaceae) using next-generation sequencing. BioRxiv. <https://doi.org/10.1101/838870>.
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation*. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>
- Frankham R (2010) Where are we in conservation genetics and where do we need to go? *Conservation Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-0010-2>
- Goettsch B, Hilton-Taylor C, Cruz-Piñón G, Duffy JP, Frances A, Hernández HM, et al. (2015) High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants*. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.142>
- Hadley AS, Betts MG (2009) Tropical deforestation alters hummingbird movement patterns. *Biology Letters*. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0691>
- Hardesty BD, Hughes SL, Rodriguez VM, Hawkins JA (2008) Characterization of microsatellite loci for the endangered cactus *Echinocactus grusonii*, and their cross-species utilization. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01913.x>
- Hopper SD (2009) OCBIL theory: towards an integrated understanding of the evolution, ecology and conservation of biodiversity on old, climatically buffered, infertile landscapes. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0068-0>
- Hughes SL, Rodriguez VM, Hardesty BD, Bárcenas Luna RT, Hernandez HM, Robson RM, Hawkins JA (2008) Characterization of microsatellite loci for the critically endangered cactus *Ariocarpus bravoanus*. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02157.x>
- IEF-MG (2010) Portaria IEF nº 149, de 02 de agosto de 2010. <http://www.siam.mg.gov.br/sla/action/consultaPublicacoes.do>. Accessed 29 October 2019
- IUCN (2019) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-2. <<https://www.iucnredlist.org>>
- Jacquemyn H, Brys R, Hermy M (2002) Patch occupancy, population size and reproductive success of a forest herb (*Primula elatior*) in a fragmented landscape. *Oecologia*. <https://doi.org/10.1007/s00442-001-0833-0>
- Jules ES, Rathcke BJ (1999) Mechanisms of reduced *Trillium* recruitment along edges of old-growth forest fragments. *Conservation Biology*. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1999.97435.x>
- Khan G, Ribeiro PM, Bonatelli IA, Perez MF, Franco FF, Moraes EM (2018) Weak population structure and no genetic erosion in *Pilosocereus aureispinus*: A microendemic and threatened cactus species from eastern Brazil. *PloS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195475>
- Kruckeberg AR, Rabinowitz D (1985) Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.002311>

- Lynch M (1991) The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution*. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1991.tb04333.x>
- Mantel N (1967) The detection of disease population and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 27: 209-220.
- Moraes EM, Cidade FW, Silva GAR, Machado MC (2014) Polymorphic microsatellite markers for the rare and endangered cactus *Uebelmannia pectinifera* (Cactaceae) and its congeneric species. *Genetics and Molecular Research*. <http://dx.doi.org/10.4238/2014.December.4.31>
- Moraes EM, Perez MF, Téó MF, Zappi DC, Taylor NP, Machado MC (2012) Cross-species amplification of microsatellites reveals incongruence in the molecular variation and taxonomic limits of the *Pilosocereus aurisetus* group (Cactaceae). *Genetica*. <https://doi.org/10.1007/s10709-012-9678-1>
- Moritz C (1994) Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90057-4)
- Moritz C (1999) Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas*. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1999.00217.x>
- Murcia C (1995) Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)88977-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)88977-6)
- Ottewell KM, Bickerton DC, Byrne M, Lowe AJ (2016) Bridging the gap: A genetic assessment framework for population-level threatened plant conservation prioritization and decision-making. *Diversity and Distributions*. <https://doi.org/10.1111/ddi.12387>
- Palsbøll PJ, Berube M, Allendorf FW (2007) Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.09.003>
- Paz-Guerrero F, Casas A, Alvarado-Sizzo H (2019) Habitat fragmentation and population genetics of *Stenocereus quevedonis* (Cactaceae) in Michoacán, México: bases for in situ conservation of silvicultural managed genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-00737-7>
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*. <https://doi.org/10.1093/jhered/90.4.502>
- Rodríguez-Oseguera AG, Casas A, Herrerías-Diego Y, Pérez-Negrón E (2013) Effect of habitat disturbance on pollination biology of the columnar cactus *Stenocereus quevedonis* at landscape-level in central Mexico. *Plant Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00657.x>

- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(86\)90059-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(86)90059-5)
- Sherman-Broyles SL, Gibson JP, Hamrick JL, Bucher MA, Gibson MJ (1992) Comparisons of allozyme diversity among rare and widespread *Rhus* species. *Systematic Botany*. <https://www.jstor.org/stable/2419726>
- Solórzano S, Cuevas-Alducin PD, García-Gómez V, Dávila P (2014) 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*. <https://doi.org/10.7550/rmb.39066>
- Solórzano S, Dávila P (2015) Identification of conservation units of *Mammillaria crucigera* (Cactaceae): perspectives for the conservation of rare species. *Plant Ecology & Diversity*. <https://doi.org/10.1080/17550874.2015.1044581>
- Taylor BL, Dizon AE (1999) First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00797.x>
- Taylor NP, Machado M, Braun P (2013) *Coleocephalocereus purpureus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T40913A2943088. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T40913A2943088.en>. Downloaded on 02 August 2019.
- Taylor NP, Zappi DC (2004) *The cacti of eastern Brazil*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Terry MK, Pepper AE, Strong AW, Tarin DM, Price DM, Manhart JR (2012) Genetic structure of a population of the endangered star cactus (*Astrophytum asterias*) in southern Texas. *The Southwestern Naturalist*. <https://doi.org/10.1894/0038-4909-57.2.182>
- Wahlund S (1928) Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1928.tb02483.x>

CAPÍTULO 3

Plano de Manejo Genético da espécie *Coleocephalocereus purpureus* presente em quatro localidades de Itinga (MG).

A Lei Federal nº 9.985, de 18 de julho de 2000, instituiu o Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC, documento que regulamentou as normas para criação, implantação e gestão das Unidades de Conservação. O SNUC determina que todas as Unidades de Conservação devem dispor de um Plano de Manejo que abrange a área da Unidade de Conservação, sua zona de amortecimento e os corredores ecológicos. Contudo, o trabalho aqui apresentado trata-se exclusivamente do Plano de Manejo Genético da espécie *Coleocephalocereus purpureus*, uma espécie de cactácea criticamente ameaçada de extinção, endêmica da região de Itinga (MG).

O presente estudo é o resultado de pesquisas de genética desenvolvidas pelo Programa de Mestrado Profissional em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental, na linha de Ecologia Aplicada, do Instituto Federal de Minas Gerais, *campus* Bambuí, em parceria com a Empresa Nativa Meio Ambiente, com sede em Curvelo (MG); e apoio do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, com sede em Belo Horizonte; e do Jardim Botânico Plantarum – Instituto Plantarum de Pesquisas da Flora, com sede em Nova Odessa (SP).

A família Cactaceae apresenta mais de 1300 espécies, sendo a segunda maior em ordem de tamanho entre as plantas vasculares endêmicas das Américas, e ainda, é dividida em 3 subfamílias: Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae (TAYLOR & ZAPPI, 2004). Essa família é caracterizada por plantas xerófitas, suculentas e perenes (MACHADO, 2004), com caules segmentados em cladódios, os quais podem ser achatados ou colunares e costelados, geralmente com presença de folhas modificadas em espinhos (SOUZA & LORENZI, 2012, p. 533), excetuando-se a subfamília Pereskioideae, a qual atinge porte arbustivo e arbóreo, com presença de folhas alternas, largas, decíduas, pouco carnosas (TAYLOR & ZAPPI, 2004); Flores solitárias ou em inflorescência cimosas, bissexuadas ou raramente unissexuadas; Frutos em baga ou cápsula carnosa (SOUZA & LORENZI, 2012, p. 533).

Em virtude do grau de singularidade que as cactáceas possuem em relação ao endemismo, averiguou-se que é de suma importância a conservação de seus habitats,

uma vez observado o declínio das populações associado à perda da qualidade dos mesmos (TAYLOR & ZAPPI, 2004). Neste contexto, infere-se que a ocorrência de espécies raras relaciona-se estreitamente com o grau de endemismo, tornando-se estas duas características importantes critérios para determinação de áreas potenciais para fins de conservação (KRUCKEBERG & RABNOWITZ, 1985). Existe uma concordância geral de que reservas e parques florestais deveriam ser estabelecidos e manejados de maneira a preservar a máxima variabilidade genética dentro das espécies. Entretanto, caso não tenham dados disponíveis sobre a estrutura genética das populações presentes nessas áreas, bem como dados sobre a distribuição da variabilidade gênica, torna-se difícil estabelecer estratégias eficazes para proporcionar uma adequada conservação das espécies, principalmente em casos de espécies ameaçadas de extinção. (WHITMORE 1980 *apud* MORAES *et al.* 1999).

Em 2008 o Ministério do Meio Ambiente – MMA, publicou a Instrução Normativa MMA nº 06, de setembro de 2008, divulgando a lista de espécie ameaçadas de extinção, contemplando 28 espécies de cactáceas (CAVALCANTI *et al.*, 2013), e ainda, estabeleceu-se o desenvolvimento de planos de ação visando à retirada das espécies da lista, bem como a concessão de apoio financeiro para a promoção de planos de manejo das Unidades de Conservação, assim como para planos de conservação *ex situ* (BRASIL, 2008). Deste modo, segundo Cavalcanti *et al.* (2013), “o MMA dedicou o primeiro Plano de Ação Nacional para a Conservação das Cactáceas, o qual ficou conhecido como PAN Cactáceas”. Este Plano teve como objetivo o levantamento das cactáceas ameaçadas de extinção, assim como elaboração de estratégias voltadas para a conservação das populações.

Conforme o PAN Cactáceas, dos 382 táxons nativos distribuídos nos biomas brasileiros (ZAPPI *et al.*, 2011), destaca-se que algumas espécies são encontradas apenas em uma ou duas regiões (CAVALVANTI *et al.*, 2013), sendo um forte indicativo de espécies endêmicas e, conseqüentemente, espécies ameaçadas de extinção (ZAPPI *et al.*, 2011). Neste Plano de Conservação a espécie *Coleocephalocereus purpureus* (Buining & Brederoo) Ritter, espécie objeto desta pesquisa, é citada e classificada como espécie criticamente ameaçada de extinção.

A área de distribuição de *C. purpureus* ocorre em fragmentos da Caatinga, presentes em Itinga, Comercinho e Medina, em Minas Gerais, sobre afloramentos gnáissicos e lajedos,

ou seja, em *inselbergs* (TAYLOR & ZAPPI, 1991), onde também ocorre intensa exploração de granito ornamental (TAYLOR & ZAPPI, 2004).

Embora a atividade minerária apresente aspectos sociais positivos, tais como, geração de empregos, desenvolvimento regional, recolhimento de tributos e, conseqüentemente, fomento a economia direta e indireta da região (PACCOLA, 2005), a exploração mineral quando praticada desconsiderando os princípios da sustentabilidade, tem como consequência graves impactos ambientais responsáveis por negativas alterações biológicas, hídricas, geomorfológicas e atmosféricas, em virtude da remoção da vegetação, fragmentação e destruição de habitats, poluição dos recursos hídricos, sedimentação dos cursos d'água, poluição da atmosfera e processos erosivos (CURI, 2002).

Neste contexto, em razão do interesse na exploração de granito no município de Itinga (MG), por duas grandes mineradoras, justamente em áreas de afloramentos rochosos habitat do cacto *Coleocephalocereus purpureus* e, respectivamente áreas particulares, em agosto de 2010 o Instituto Estadual de Florestas (IEF) reconheceu através da Portaria IEF nº 149/2010, a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) “Pasmado”, de propriedade da Mineração e Nova Aurora Mármore Granitos Ltda e Thomazini Ltda, localizada em Itinga (MINAS GERAIS, 2010), conhecida localmente como RPPN Purpureus.

De acordo com o Processo de criação da RPPN Pasmado em áreas onde prospectou-se o sucesso de exploração mineral, a RPPN teve como objetivo garantir a sobrevivência das populações de *C. purpureus* por meio da remoção, realocação e monitoramento das colônias para uma área com condições ambientais semelhantes a área em que as populações estavam naturalmente consolidadas, ou seja, a área da Unidade de Conservação.

Portanto, após apresentados os resultados da avaliação da diversidade genética dos agrupamentos amostradas de *C. purpureus* presentes na RPPN e em mais outras três localidades no município de Itinga (MG), durante a realização das pesquisas genéticas do Programa de Mestrado Profissional em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental, do IFMG, estabeleceu-se ações eficientes para a elaboração deste Plano de Manejo Genético, contemplando estratégias de controle dos fatores de risco de perda da espécie e ações para conservação da variabilidade genética para os agrupamentos amostrados, evitando assim o declínio da espécie.

1. Conservação de *Coleocephalocereus purpureus*

A espécie *Coleocephalocereus purpureus* pertence à subfamília Cactoideae, vive em colônias, apresenta exemplares com caules colunares baixos, muito ramificados e cespitosos, com parênquima não mucilaginoso, costelas sem linhas transversais acima das aréolas e flores coloridas diurnas (MACHADO – comunicação pessoal). A epiderme é verde escuro com presença de espinhos aciculares na coloração marrom avermelhado a vermelho, tendo-se maior concentração da base até a porção central da coluna; Em indivíduos adultos, no ápice do caule há presença de cefálio em um dos lados, com denso feltro branco, de onde nascem flores de coloração magenta, entendendo-se até a porção central da coluna, as quais se tornam frutos globosos de coloração magenta (TAYLOR & ZAPPI, 2004).

Segundo Zappi *et al.* (2011), em virtude da associação do *C. purpureus* a um tipo de granito, o seu habitat está seriamente comprometido devido a intensos processos de exploração mineral (extração de granito ornamental), deixando em evidência que quaisquer distúrbios causados ao hábitat desta espécie, pode leva-la à extinção. Ressalta-se que a perda de habitat é uma das principais ameaças à biodiversidade, visto que provoca o declínio das populações por meio da redução de seu tamanho, redução das taxas de reprodução e aumento da mortalidade (ESPÍRITO-SANTO, 2005).

Assim, entende-se que compreensão sobre os padrões de variação genética, entre e dentro de populações, é de suma importância para a elaboração de estratégias para conservação *in situ*, assim como para o desenvolvimento de ações eficazes conservação *ex situ* (HAMRICK & GODT, 1997). De acordo com Spoladore (2014), a conservação de espécies ameaçadas de extinção está intrinsecamente ligada ao conhecimento obtido por meio da avaliação da diversidade genética. A forma mais eficaz de se realizar esta avaliação é através do uso de marcadores moleculares, os quais são eficientes para o monitoramento da variabilidade genética, identificação de indivíduos e/ou famílias divergentes, bem como para a elaboração de mapas genéticos e identificação de locos relacionados aos caracteres quantitativos, ou seja, eles são capazes de acessar diretamente a diversidade de alelos e genótipos dos indivíduos (PIGATO & LOPES, 2001).

Segundo Brown (1978), a estrutura genética das populações é definida de acordo com a distribuição da variedade genética entre e dentro os níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie, sendo em plantas, diretamente influenciada pelo fluxo gênico. Mas, fatores vinculados à reprodução das espécies e à sua evolução, podem interferir diretamente na organização dos padrões de fluxo gênico e, por conseguinte, na estrutura genética das populações (CAICEDO & SHAAL, 2004).

Para Rodrigues (2015), a diversidade genética é definida como a variação hereditária incumbida por parte das diferenciações fenotípicas dos indivíduos de uma população, garantindo à espécie um alto potencial de adaptação contra os efeitos ocasionados pelas adversidades ambientais, tais como mudanças climáticas, competição, predação, patologias e fatores abióticos.

Para Hamrick & Schnabel (1984), a estrutura genética das populações de plantas naturais é o resultado da interação entre seleção, fluxo gênico e deriva genética, sendo diretamente associada com o sistema de cruzamento da espécie, assim como com a ecologia de polinização e o mecanismo de dispersão de sementes, o que também é confirmado por Loveless & Hamrick (1984), em um estudo sobre determinantes ecológicos da estrutura genética na população de plantas, onde afirma-se que entre os fatores ecológicos, o quesito reprodução indica uma elevada possibilidade de interferir na estruturação das populações.

2. Ficha técnica da unidade de conservação

Quadro 01: Ficha técnica sobre a RPPN Pasmado

Nome da UC: RPPN Pasmado	
Responsáveis: Mineração Thomazini Ltda. e Nova Aurora Mármore e Granitos Ltda.	
Endereço: Povoado Pasmado, Itinga/MG.	
Coordenadas em UTM: 210647.20 m E / 8175337.67 m S / 24 K	
Área superficial: 14,5 ha	Perímetro: 1738,05 m
Data de criação e número da Portaria: Agosto de 2010, Portaria IEF nº 149/2010.	
Marco importantes (limites): Rio Pasmado	
Atividades desenvolvidas: Fiscalização, monitoramento e pesquisa.	



Figura 01: Imagem aérea da RPPN Pasmado. Fonte: Google Earth adaptado, 2019.



Figura 02: Entrada da RPPN Pasmado (conhecida localmente por RPPN Purpureus). Fonte: Dados da pesquisa, 2018.



Figura 03: Vista do interior da RPPN Pasmado, com a presença de colônias de *Coleocephalocereus purpureus*. Fonte: Dados da pesquisa, 2018.



Figura 04: Colônia de *C. purpureus*. Fonte: Dados da pesquisa, 2018.



Figura 05: Detalhe do caule colunar com a presença de cefálio, flores e frutos.

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.



Figura 06: Flores magentas, principal característica morfológica de *C. purpureus*.

Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

Roteiro de acesso à RPPN Pasmado

A partir da Praça Hermelindo Gusmão, seguir por 600 m pela Rua Prefeito Nilo Barbuda até a estrada vicinal de acesso ao Povoado Pasmado; Em seguida, continuar margeando o Rio Jequitinhonha por 4,5 km até uma bifurcação, entrar à direita na Estrada Escrava Feliciano; Passar sobre a ponte do Rio Pasmado e seguir por 6,7 km e entrar à esquerda na estrada vicinal de acesso à Nova Aurora Mineração; Em seguida, continuar por 7,8 km até o destino final que está à direita, sendo a porteira de acesso à RPPN, tendo-se no local a placa de identificação da Unidade de Conservação; A partir deste momento, seguir em caminhada por 500 m até o interior da RPPN.

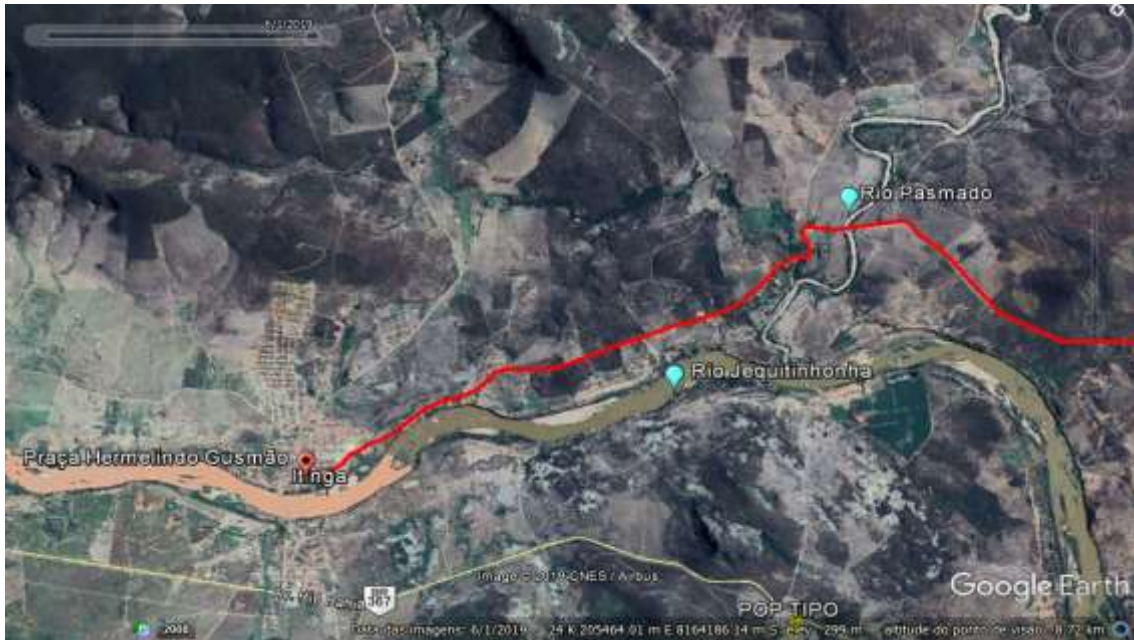


Figura 07: Ponto de partida até a passagem sobre a ponto do Rio Pasmado. Fonte: Google Earth adaptado, 2019.



Figura 08: Passagem pela ponte do Rio Pasmado até a estrada de acesso à Nova Aurora Mineração. Fonte: Google Earth adaptado, 2019.

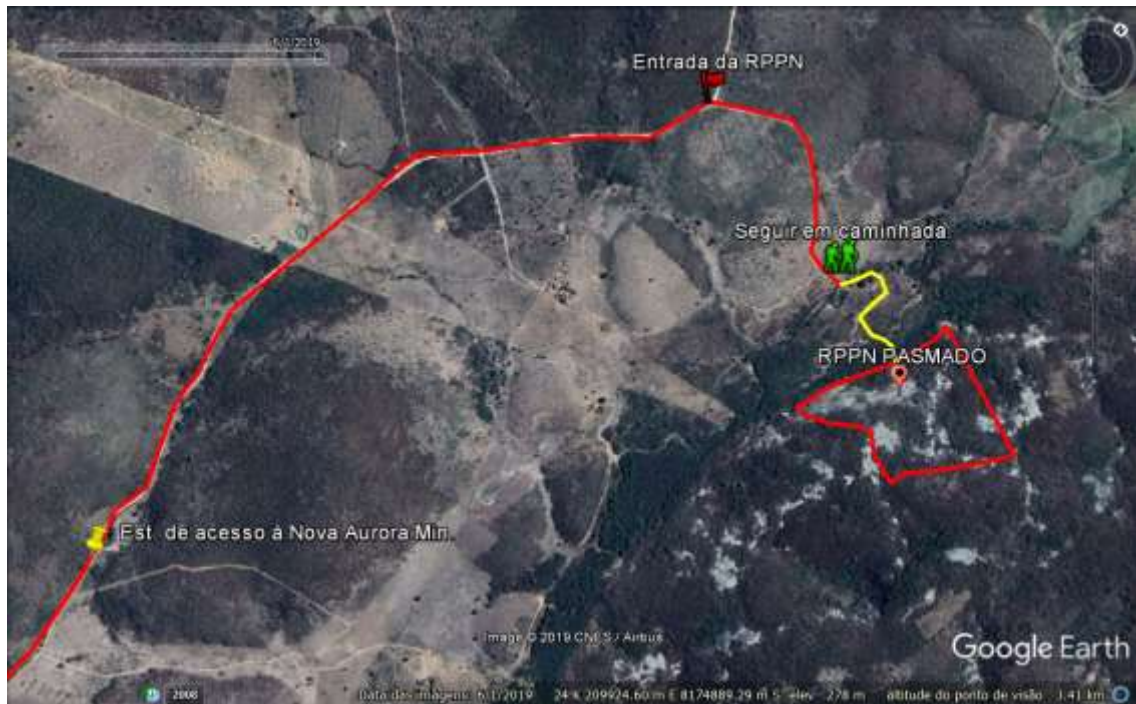


Figura 09: Chegada ao destino final. Linha amarela indica o trecho em que o acesso é por caminhada.
Fonte: Google Earth adaptado, 2019.

3. Caracterização do município de Itinga

A região Itinga é uma área de elevada importância biológica para a conservação, principalmente pela presença de espécies endêmicas da flora brasileira, ocorrência de ambientes únicos, além de uma alta riqueza de espécies vegetais.

Itinga está localizada no Vale do Jequitinhonha. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Município possui área superficial de 1.649,62 km², com estimativa de população, em 2018, de 14.956 habitantes. Ainda, conforme o IBGE, a economia da cidade é movimentada pela exploração de granito ornamental, extração de lítio e produção agropecuária.

De acordo com Batista (2016), a baixa geração de renda e emprego elevou as taxas de pobreza para o Município, o que tornou essencial e marcante a presença do Poder Público Federal por meio da implementação de políticas públicas de combate à pobreza e a fome, sendo especificamente os Programas Bolsa Família e Fome Zero, bem como também a promoção de programas de melhoramento de infraestrutura e captação de água de chuva. Deste modo, a Cidade ganhou destaque nacional, pois foi considerada o local de lançamento do programa Fome Zero (BATISTA, 2016).

Em relação ao clima de Itinga segundo Köppen, é tropical úmido (Aw) e seco com chuvas no verão (BSw) (AYOADE, 1998). As temperaturas variam de 19,3°C a 31,1° C, com índice pluviométrico anual de 841,2 mm.

Quanta à caracterização da vegetação, segundo Brandão (2000), Itinga está sob o domínio do bioma Caatinga, porém em campo observa-se a transição entre os biomas Cerrado e Caatinga. Cabe destacar que a Caatinga mineira ocupa área relativamente pequena no Estado, apresentando tipologia diversificada conforme condições edáficas, bem como sua posição no relevo. As fitofisionomias são representadas pela formação típica, suas variações e disjunções, com fisionomias que vão do arbóreo ao arbustivo (BRANDÃO, 2000). Nas áreas de vegetação xerófila do norte de Minas Gerais, sujeitas à ocorrência de secas prolongadas, a Caatinga ora é a formação dominante, ora mescla-se ao Cerrado, exibindo fases de transição de difícil caracterização, ou ocorre como manchas inclusas em outras formas de vegetação (BRANDÃO, 2000). De modo geral, em Minas Gerais a Caatinga transita para o Cerrado ao norte e a oeste, para a região dos campos rupestres ao centro e para a Floresta Atlântica ao leste (EPAMIG, 1990 *apud* BRANDÃO, 2000).

4. Contextualização da RPPN Pasmado

A dificuldade da comunidade científica em escolher locais para reservas é composta por debates sobre a relativa importância de regiões com alta biodiversidade e endemismo (KERR, 1997). Biólogos concordam que o sistema nacional e/ou internacional de reservas poderia ser o tema central para conservação da biodiversidade considerando o aumento veloz dos impactos ambientais provocados por atividades antrópicas (SOILÉ, 1991; KERR, 1997).

A ideia que regiões com endemismos poderiam ter prioridades em relação àquelas de alta biodiversidade é defendida por Myers (1990) e Bibby (1994). De acordo com Noss (1983), a mesma abordagem de Myers para a importância do endemismo para a seleção de áreas destinadas a preservação, é utilizada para endereçar as diferentes escalas de importância de conservação, desde a local até a regional, utilizando-se de métodos que assegurem a seleção criteriosa de porções suficientes de ambientes naturais, buscando-se representar diferentes ecossistemas e também manter ou incrementar os níveis de conectividade entre as diferentes áreas. Por esse motivo, no plano de criação da RPPN Pasmado sugeriu-se que após a criação da Unidade de Conservação em Itinga, fosse realizado pelo poder público local, ações de incentivo para a criação de outras RPPNs onde também há ocorrência natural de populações de *C. purpureus*, com objetivo de conservar a espécie ameaçada e manter a conectividade entre os fragmentos. Porém, em virtude de recursos financeiros escassos tanto do poder público quanto dos proprietários dos imóveis, as áreas de conservação não foram criadas.

Sendo assim, acreditando nessa linha de raciocínio conservacionista de Myres (1990), criou-se a RPPN Pasmado na localidade ora mencionada na ficha técnica, uma vez que já constatado a ocorrência natural de indivíduos de *C. purpureus* no local em questão e que, também seria o local ideal para inserir as novas indivíduos resgatados de outras localidades onde a extração do granito já havia sido autorizada e/ou de locais onde a espécie foi encontrada e de algum modo corria risco de ser destruída por pisoteio de gado e até mesmo extração ilegal.

A RPPN Pasmado está situada em zona rural do município de Itinga, possui área superficial total de 14,5 ha, com declividade elevada, no qual a porção basal apresenta um afloramento de granito onde também ocorre a presença natural de *Coleocephalocereus*

purpureus. A vegetação no entorno é característica por mata seca e não possui vestígios de atividades pecuárias e antrópicas.

Em razão da obtenção de licença ambiental para exploração de granito pelas Mineradoras Thomazini Ltda e Nova Aurora Mármore e Granitos Ltda em áreas de ocorrência de *C. purpureus*, em agosto de 2010 o Instituto Estadual de Florestas (IEF) reconheceu através da Portaria IEF nº 149/2010, a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Pasmado, de propriedade das duas Empresas. Exemplares de *C. purpureus* que estavam em área de exploração mineral das duas Empresas, foram resgatados e realocados para na RPPN, a fim de garantir a preservação das colônias existentes.

Os indivíduos de *C. purpureus* existentes na área de extração de granito foram extraídos com o sistema radicular íntegro, junto com todo o substrato existente no entorno, com o auxílio de pás grande s e pequenas. Tomou-se extremo cuidado para não danificar o sistema radicular dos indivíduos removidos e ao mesmo tempo retirar e relocar a maior quantidade de substrato.



Figura 10: Remoção dos cactos. Fonte: C&P Ambiental, 2008.

Em seguida, os indivíduos de *C. purpureus* juntamente com o substrato extraído das áreas de lavra da Nova Aurora Mármore e Granitos Ltda. e da Mineração

Thomazini Ltda., foram armazenadas em caixas de madeira com dimensão de 80 x 60 x 20 cm (Figura 10), para viabilizar o transporte até a RPPN. Constatou-se que os indivíduos são extremamente resistentes e que os espinhos de um indivíduo não interferiram ou danificavam a estrutura de outro indivíduo. Por isso, as indivíduos foram resgatados e dispostos em caixas de madeira sem uma separação entre os indivíduos. Realizou-se o transporte das caixas por meio de caminhonetes com a utilização de uma cobertura de sombrite sobre as caixas para evitar incidência solar direta e reduzir o estresse por perda d'água.



Figura 11: Transporte das colônias de *C. purpureus*. Fonte: C&P Ambiental, 2008.

Para a introdução dos novos indivíduos de *C. purpureus* na RPPN nos locais selecionados, realizou-se o plantio com o auxílio de pás. Durante todo o processo de manejo dos cactos a manipulação foi realizada com luvas grossas de couro.

Os indivíduos foram demarcados sequencialmente com o número de identificação da área de lavra que foram retirados (“T” para Mineração Thomazini Ltda. e “N” para Nova Aurora Mármore e Granitos Ltda.). Após o plantio dos indivíduos os mesmos foram levemente irrigadas com o auxílio de regadores (Figura 12).



Figura 12: Rega dos indivíduos realocados. Fonte: C&P Ambiental, 2008.

5. Estratégias de manutenção da diversidade genética das colônias de *Coleocephalocereus purpureus*

Segundo Sebbenn *et. al* (2001), “no manejo de populações naturais deve-se também considerar a constituição genotípica dos indivíduos, a qual é responsável pelas diferenças em produtividade, adaptação e reprodução entre indivíduos de uma espécie”. Apesar da importância da conservação da diversidade genética, principalmente para espécies ameaçadas de extinção, são raros os planos de manejo que levam o fator genético em consideração.

Conforme Moraes (2011), considerando que a perda da diversidade genética pode ser um ponto crítico para a extinção de espécies tanto no senso evolutivo como no ecológico, respectivamente a longo e curto prazo, infere-se que a aplicação de análises genéticas está embasada tanto na história evolutiva como dinâmica da variação genética dentro e entre populações, uma vez que são fatores primordiais para a conservação de espécies ameaçadas de extinção.

Sendo assim, conforme os resultados apontados pela avaliação da diversidade genética dos agrupamentos da espécie *C. purpureus*, por meio da execução das ações relacionadas a seguir, será possível evitar a drástica redução das populações, uma vez que elas contemplam medidas de controle dos fatores de risco de perda da espécie, bem como a definição das estratégias de conservação da variabilidade genética entre populações resgatadas e não resgatadas; ações para viabilizar a polinização; formação de bancos de sementes; manutenção dos tamanhos populacionais a fim de evitar erosão genética; manutenção de habitat para polinizadores; e conservação *ex situ* de colônias de *C. purpureus* em jardim botânico.

A. Criação de uma Unidade de Conservação para a População da Localidade Tipo

A conservação efetiva de uma espécie exige que sua variação genética ao longo do tempo seja mantida (SOLÓRZANO & DÁVILA, 2015), por esta razão e, levando-se em conta os resultados apontados nos estudos realizados sobre a diversidade genética de *C. purpureus* nas 04 localidades que serão relacionadas, constatou-se que a população da localidade Tipo forma um grupo geneticamente distinto das demais populações, isto é, segue por uma ramo da evolução diferente das outros, o que pode ter ocorrido em virtude da heterogeneidade da paisagem.

Sendo assim, recomenda-se que seja criada uma Unidade de Conservação para a localidade da População Tipo bem como a implementação de um plano de manejo específico para o local, a fim de minimizar o declínio da população da localidade Tipo, visto que a criação da UC permitirá que os indivíduos com a riqueza alélica diferenciada sejam conservados, considerando que são independentes e não estão conectados por fluxo gênico com os demais agrupamentos amostrados. Contudo, previamente será necessária a elaboração de estudos de viabilidade técnica e financeira, bem como o fundamental apoio do Poder Público local e estadual, visando à escolha do melhor local e definição de estratégias para implementação da UC.

B. Resgate de indivíduos geneticamente valiosos

Para identificar os indivíduos geneticamente mais valiosos tanto no agrupamento presente na RPPN Pasmado, como nos agrupamentos não manejados situados em áreas adjacentes, durante os meses de julho de 2017 e janeiro de 2018, efetuou-se a coleta de amostras de material vegetal de 132 indivíduos distribuídos em 04 localidades (Figuras 13): 60 amostras na RPPN Pasmado (Agrup RPPN); e 26 amostras localizadas na localidade onde a espécie foi descrita pela primeira vez, ou seja, localidade Tipo (Agrup Tipo); 24 amostras dentro da área da Mineração Nova Aurora (Agrup Nova Aurora); 22 amostras de uma população situada à margem da estrada de acesso à Mineração Nova Aurora, a qual foi identificada como Agrupamento Pasmado (Agrup Pasmado).

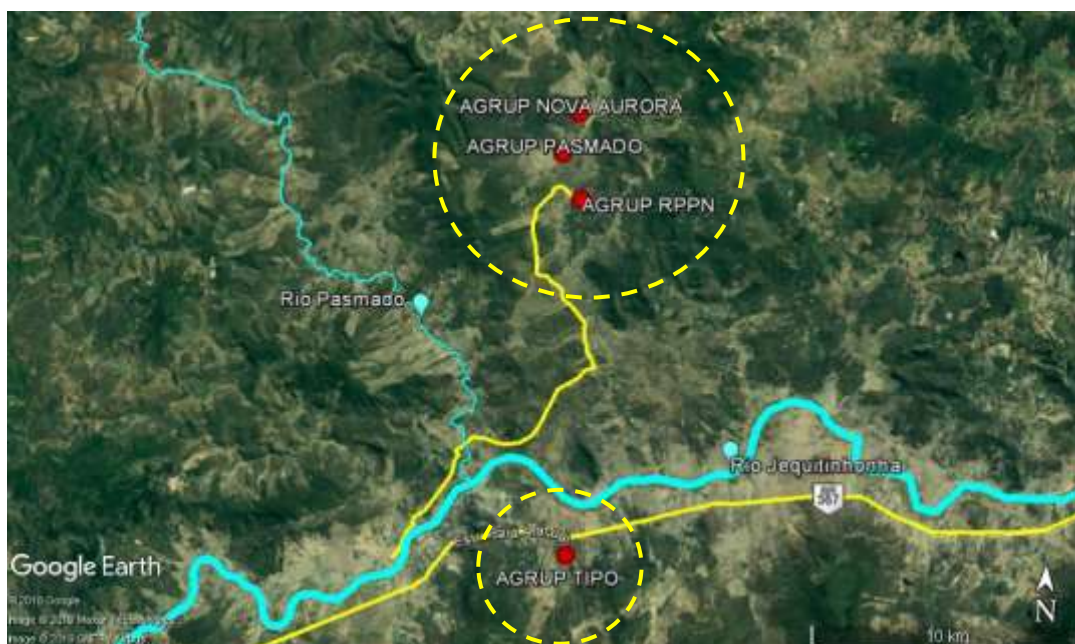


Figura 13: Localização dos pontos de coletas. Fonte: Google Earth 2019, adaptado.

Sendo assim, excetuando-se os indivíduos do Agrup Tipo, os quais são distintos geneticamente, as indivíduos mais valiosos dos Agrupamentos Pasmado e Nova Aurora relacionados a seguir, deverão ser resgatados e realocados na RPPN, visando enriquecer a diversidade genética do Agrup RPNN e, conseqüentemente, garantir a sobrevivência da espécie *C. purpureus* que se encontra criticamente ameaçada de extinção.

Quadro 02: identificação e localização dos indivíduos geneticamente valiosos.

IDENTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS GENETICAMENTE VALIOSAS			
Localidade	Id. Ponto	Coordenadas UTM	
		X	Y
Agrup Nova Aurora	N03	210409.34	8178571.93
	N05	210420.44	8178585.61
	N06	210420.35	8178592.35
	N08	210492.15	8178593.31
	N14	210473.60	8178628.44
	N20	210459.67	8178668.86
Agrup Pasmado	P03	210022.73	8177221.20
	P04	210032.30	8177211.29
	P12	209966.73	8177098.59
	P14	209970.70	8177068.17
	P15	209972.98	8177049.77

Em relação ao Agrup Nova Aurora, salienta-se que devido ao impacto da atividade minerária sobre os indivíduos de *C. purpureus*, todos deveriam ser resgatados para a RPPN, independente da riqueza da variabilidade genética presente, pois todas estão em condições não favoráveis à sua sobrevivência. Para que isto ocorra, será necessário proceder à estudos sobre a capacidade suporte da RPPN. Caso não seja possível levá-los para o referido local, deverá ser providenciada outra localidade que seja segura para realocação desses indivíduos.



Figura 14: Coleta de material vegetal dos indivíduos presentes no Agrup Nova Aurora. Aos fundos detalhe da atividade minerária. Fonte: Dados da pesquisa, 2018.

C. Monitoramento da diversidade genética do agrupamento presente na RPPN

A cada dez anos deverá ser avaliada a diversidade genética dos indivíduos de *C. purpureus* presentes na RPPN, a fim de garantir a sobrevivência da espécie no local, uma vez que ter uma significativa quantidade de indivíduos em um só espaço não garante a variabilidade genética dos mesmos. Sugere-se que os mesmos marcadores utilizados neste trabalho sejam utilizados como forma de comparar a situação da diversidade genética atual com os dados gerados nas próximas avaliações.

D. Preparação de indivíduos para conservação ex situ em jardim botânico

Os 05 indivíduos mais valiosos geneticamente de cada agrupamento amostrado, isto é, um total de 20 indivíduos, terão parte de seus cladódios removidos (uma touceira com no mínimo 03 cladódios) para formarem novos exemplares que serão depositadas no Jardim Botânico

Plantarum, em Novada Odessa (SP) e para o Jardim Botânico da Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte (MG) , visando à conservação *ex situ* e formação de banco de germoplasma.

Quadro 03: identificação e localização dos indivíduos geneticamente valiosos para conservação *ex situ*.

IDENTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS GENETICAMENTE VALIOSAS PARA CONSERVAÇÃO <i>EX SITU</i>			
Localidade	Id. Ponto	Coordenadas UTM	
		X	Y
Agrup RPPN	R001	210785.95	8175517.13
	R015	210739.18	8175419.05
	R018	210706.76	8175367.01
	R022	210659.65	8175358.07
	R030	210616.63	8175314.97
Agrup Tipo	T009	208775.33	8162792.06
	T011	208739.75	8162765.47
	T012	208761.69	8162761.69
	T015	208732.09	8162807.99
	T024	208693.73	8162801.35
Pop Nova Aurora	N001	210422.28	8178556.72
	N010	213964.56	8178643.00
	N018	210458.68	8178653.46
	N019	210453.55	8178662.01
	N024	210478.90	8178719.87
Agrup Pasmado	P001	210029.43	8177235.01
	P002	210018.59	8177231.12
	P010	209975.78	8177151.52
	P013	209954.46	8177083.01
	P016	209929.52	8177014.68

Os cladódios deverão ser removidos de seu habitat com auxílio de pás, de modo a preservar o sistema radicular íntegro. Também importante que o substrato seja levado junto a fim de contribuir para que o novo solo tenha condições semelhantes ao do habitat natural, o que aumentará o conforto pós-plantio para os espécimes. Em seguida, assim como na operação de realocação dos cactos, onde o sucesso foi garantido, os indivíduos serão identificados, numerados sequencialmente e colocadas, juntamente com seu substrato, em caixas de madeiras com dimensões de 80 x 60 x 20 cm para serem transportados em caminhonete coberta por sombrite, até os Jardins Botânicos ora mencionados.

A operação de transporte deverá ocorrer em 02 dias devido à distância entre Itinga (MG) e Nova Odessa (SP), ou seja, uma distância de 1.230 km. Sendo assim, deverão ser percorridos 615 km/dia, com parada no Jardim Botânico da Fundação Zoo-Botânica

de Belo Horizonte para depositar parte dos indivíduos. Salienta-se que a cada 2 horas os indivíduos deverão ser borrifados com água, excetuando-se o período noturno. Ao chegar nos Jardins Botânicos, os indivíduos que formarão os 20 novos agrupamentos ficarão em casa de vegetação para aclimação por 30 dias. Na sequência, as os agrupamentos serão depositadas no cactário, um ambiente com condições semelhantes ao habitados por cactáceas da caatinga mineira e do sertão do país, e assim devidamente monitorados e conservados.

Assim que entrar o período de floração, as flores serão artificialmente polinizadas através do uso de pincéis finos, a fim de garantir a frutificação e a produção de sementes com alta diversidade genética para a formação do banco de germoplasma da espécie *Coleocephalocereus purpureus* junto ao banco de germoplasma dos Jardins Botânicos.



Figura 15: Cactário do Jardim Botânico Plantarum. Fonte: Jornal Eletrônico Campinas com criança, 2019.

E. Manutenção dos tamanhos dos agrupamentos para evitar efeitos de erosão genética

Segundo Souza & Martins (2004), a erosão genética é a perda da variabilidade genética incluindo-se a perda de genes e perda individual de combinações de genes. A erosão genética dentro de uma espécie ocasiona a redução dos tamanhos das populações, ou seja, algumas características podem ser perdidas em função da perda da variabilidade genética (BRANDT *et al.*, 2008). Para que isso não ocorra, será necessário sanar os fatores que colocam os indivíduos da RPPN em risco de erosão genética, isto é,

monitorar anualmente o tamanho do agrupamento para que não haja perda de indivíduos, e até mesmo enriquece-lo por meio da coleta e dispersão de sementes, mas também mantendo-se o monitoramento genético a cada dez anos.

F. Manutenção do habitat para polinizadores

A polinização é um importante serviço ecossistêmico, tratando-se de uma ferramenta essencial para a conservação da biodiversidade, pois traz a fertilização das flores, dispersão de sementes e o valor estético da natureza (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2012). Segundo Nogueira-Couto (1998), a polinização é fundamental para a preservação da vida vegetal, assim como para manutenção da variabilidade genética. De acordo com Maué *et al* (2012), em fitofisionomias com restrições ambientais mais severas, como, por exemplo, a caatinga e a mata seca, existem sistemas de polinização diferenciados e interdependência entre plantas e vetores bióticos.

Em relação à polinização de *Coleocephalocereus purpureus*, faz-se necessário intensificar estudos sobre sua polinização e dispersão de sementes (ZAPPI, 2008). Entretanto, levando-se em consideração a espécie irmã *Coleocephalocereus aureus*, a qual se diferencia de *C. purpureus* em virtude da coloração branca esverdeada de suas flores e seus espinhos dourados, sua polinização envolve a presença de formigas (ZAPPI, 2008), e quanto à *C. purpureus*, observou-se em campo durante o mês de janeiro de 2018, uma grande quantidade de flores junto ao cefálio dos indivíduos e a presença de colibris em atividade de polinização destas flores, porém carece estudos conclusivos sobre a polinização de *C. purpureus*, mas isto não é um empecilho para a definição de estratégias que favoreçam este serviço ecossistêmico na RPPN Pasmado.

Sendo assim, recomenda-se o enriquecimento do entorno da área da RPPN com espécies vegetais de ocorrência natural da região, que sejam atrativas para formigas, colibris e esfingídeos e outros representantes da fauna, tais como lagartos e besouros, os quais podem ser dispersores de sementes. Também recomenda-se a criação de habitats artificiais a fim de propiciar locais de abrigo e nidificação destes espécimes, pois são importantes atores diretos e indiretos para a polinização e dispersão de sementes das colônias de *C. purpureus*. No entanto, para proceder de forma eficiente quanto à manutenção do habitat dos polinizadores da espécie em questão, sugere-se que também sejam realizados estudos adicionais sobre a biologia reprodutiva de *C. purpureus*, assim como estudos sobre a identificação de polinizadores, ciclo de vida, hábitos, e ainda, possíveis atrativos alimentícios.

6. Cronograma

ATIVIDADES	CURTO PRAZO		MÉDIO PRAZO			LONGO PRAZO					
	1º semestre	2º semestre	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano	5º ano	6º ano	7º ano	8º ano	10º ano
Resgate de indivíduos geneticamente valiosos	X	X									
Monitoramento da diversidade genética da população	X	X									
Manutenção dos tamanhos populacionais para evitar efeitos de erosão genética				X			X			X	
Manutenção de habitat para polinizadores	X	X		X		X		X		X	
Preparação das colônias para conservação <i>ex situ</i> em Jardim Botânico	X										
Monitoramento e conservação das colônias mantidas <i>ex situ</i>		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Criação de UC para a Localidade Tipo			X	X	X						
Avaliação da efetividade do planejamento			X		X		X		X		X

7. Consideração final

A conclusão deste Plano de Manejo Genético depende da inteiração dos setores público e privado para garantir seu sucesso. Com a implementação deste estudo espera-se garantir a variabilidade genética dos indivíduos de *Coleocephalocereus purpureus* presentes nos agrupamentos da RPPN, Tipo, Nova Aurora e Pasmado. No entanto, ressalta-se que a execução deste Plano está diretamente atrelada em termos temporais e financeiros das Empresas Mineração Nova Aura Ltda. e Thomazi Ltda, e ainda, que carece de estudos de viabilidade para implantação de uma nova área de reserva para o agrupamento localidade Tipo, caracterizado como uma população distinta; estudos sobre a capacidade suporte da RPPN Pasmado; e estudos conclusivos sobre a polinização da espécie *C. purpureus*. Em suma, há necessidade de ampliar o conhecimento científico sobre *C. purpureus*.

8. Referências bibliográficas

AYOADE, J.O. **Introdução a climatologia para os trópicos**. Bertrand Brasil, Rio de Janeiro, 5ª ed., 1998, 332 pp.

BATISTA, E. H. A. **Entre trânsitos permanentes e permanências transitórias: Estudo sobre a reprodução social de famílias rurais pobres em Itinga, Minas Gerais, Brasil**. 2016. 373p. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geografia. Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade estadual Paulista. Presidente Prudente, 2016.

BRASIL. Instrução Normativa MMA 06, setembro 2008. Reconhece as espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília DF, set. 2008.

BRASIL. Lei Federal 9.985, de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. Brasília, jul. 2000.

BRANDT, F. M.; MARRSCHELAK, R.; VIBRANS, A. C. Melhoramento (genético) florestal. Disponível em < <http://home.furb.br/rubensm/> >. Acesso em 28 de jul. 2019.

BROWN, A. H. D. Isozymes, plant grouping genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**. (v. 52), n. 4, p. 145 – 157, 1978.

BIBBY, C. A global view of priorities for bird conservation. **Íbis** n. 137, p. 247 – 248, 1994

CAICEDO, A. L.; SCHAAL, B. A. Grouping structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. **Molecular Ecology**. (v. 13), n. 7, p. 1871–1882, 2004.

CAVALCANTI, A; TELES, M; MACHADO, M. **Cactos do Semiárido do Brasil: Guia ilustrado**. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2013.

CURI, A. 2002. Análise qualitativa da sustentabilidade ambiental da mineração: mito e realidade. In: VILLAS BÔAS, R. C.; BEINHOFF, C. **Indicadores de sostenibilidad para la indústria extractiva mineral**. Rio de Janeiro, CNPq/CYTED.

C&P AMBIENTAL. Salvamento, reintrodução e estudo de conservação de *Coleocephalocereus purupureus* (Buining & Brederoo) F. Ritter, Itinga, Minas Gerais Brasil. Curvelo, 2008, 28 p.

BRANDÃO, M. 2000. Caatinga. In: MENDONÇA, M.P.; LINS, L.V. **Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção da Flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas/Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte.

ESPÍRITO-SANTO, M. M. Perda de Habitat. In: **Panorama da Biodiversidade em Minas Gerais**. Belo Horizonte, MG. Instituto Estadual de Florestas, 2012, 247 p.

IBGE. **População e extensão territorial de Itinga, Minas Gerais**. Disponível em < <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/itinga/panorama> >. Acesso em julho de 2019.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. A.; SARAIVA, A. M. Polinizadores e Polinização – Um tema global. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. A.; SARAIVA, A. M. Polinizadores no Brasil – Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, pág. 25-45, 2012.

CAMPINAS COM CRIANÇA. Imagem do cactário do Jardim Botânico Planatrum. Disponível em < <http://www.campinascomcriancasoficial.com.br/site/jardim-botanico/pertinho-de-campinas> >. Acesso em julho de 2019.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J.W. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. **Conservation genetics: case histories from nature**. New York, Springer US, 1997, 512 p.

HAMRICK, J. L.; SCHNABEL, A. Understanding the genetic structure of plant grouping: Some old problems and a new approach. In: GREGORIUS, H. R. **Grouping geneteics in forestry: lecture notes in biomathematics**. Berlin, Spring-Verlag, 1984, 212 p.

KEER, J. T. Species Richness, Endemism, and the Choice of areas for Conservation. **Conservation Biology**. (v. 11), n. 5 , pág. 1094- 1100, 1997.

KRUCKEBERG, A. R; RABIONOWITZ, D; Biological aspects of endemismo in higher plants. **Anual Review of Ecology and Systematics**. (v. 16), n. 1, pág. 447 – 479, 1985.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinantes of genetic structure in plant grouping. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. Kansas, n. 15, pági. 65 – 95, 1984.

MACHADO, M. C. **Sistemática, filogenia, filogeografia e modelagem de distribuição de espécies da flora de inselbergs no leste do Brasil, com ênfase em *Coleocephalocereus* Backeb. (Cactaceae)**. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por daphnefraga@hotmail.com em 08 fev. 2017.

MACHADO, M. C. **O gênero *Discocactus* Pfeiff (Cactaceae) no estado da Bahia, Brasil: variabilidade morfológica, viariabilidade genética, taxonomia e conservação**. 2004. 130 p. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, 2004.

MAUÉS, M. M.; VERASSIN, I. G.; FREITAS, L.; MACHADO, I. C. S.; OLIVEIRA, P. E. A. M. A importância dos polinizadores nos biomas brasileiros: Conhecimento Atual e perspectivas futuras para conservação. In: In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. A.; SARAIVA, A. M. Polinizadores no Brasil – Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, pág. 49-66, 2012.

MINAS GERAIS. Portaria IEF 149, de agosto de 2010. Reconhece como Reserva Particular do Patrimônio Natural – RPPN “Pasmado”, processo nº 8229491 de 15 de junho de 2009, de propriedade da Mineração Thomazini Ltda e Nova Aurora Mármore e Granitos Ltda., localizada em Itinga, MG. Instituto Estadual de Florestas, Minas Gerais, ago. 2010.

MORAES P. L. R.; MONTEIRO R.; VENCovsky R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica.** (v. 22), n. 2, pág. 237-248, 1999.

MORAES E. M. Genética aplicada à conservação. **Plano de Ação Nacional para Conservação das Cactáceas.** ICMBio. Brasília, pp 43-45, 2011.

MYERS, N. The Biodiversity challenge: expanded hot-spots analysis. **Tme Environmentalist.** n. 10, p. 243- 256, 1990.

NOGUEIRA-COUTO, R.H. As abelhas na manutenção da biodiversidade e geração de rendas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12, 1998, Salvador-BA. Anais... Salvador: 1998, p. 101.

PACCOLA, N. C. **A mineração do granito e o conflito sócio-ambiental: estudo de caso em uma área entre os municípios de Itu e de Cabreúva (SP).** 2005. 105 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Geociências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Scientia Florestalis.** N. 60, pág. 135 – 148, dez. 2001.

RODRIGUES, E. B. **Variabilidade genética populacional em variedades botânicas de *Harconia speciosa* Gomes (Apocynaceae): Estratégias para conservação no cerrado.** 2015. 135 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética de Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SABBENN, A.M. Et. al Estrutura genética em populações para o manejo florestal e a conservação genética. **Rev. Instituto Florestal.** (v.13), n. 2, pág. 99-113, 2001.

SPOLADORE, J. **Desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélites e caracterização da diversidade, estrutura genética e fluxo gênico em populações de *Swartzia glazioviana* (Taub.) Glaz., uma espécie ameaçada de extinção.** 2014. 99 p. Dissertação (Programa de Pós –Graduação em Botânica) – Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, 2014.

SOULE´, M. E.; SANJAYAN, M. A. Conservation targets: do they help? **Science.** (v. 279), pág. 2060–2061, 1998.

SOUZA, V. C. S. LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III.** Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo. 3ª ed. 2012. 767 pp.

SOUZA, G, A.; MARTINS, E. R. Análise de risco de erosão genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Educação Médica.** (v. 6), n. 3, pág. 42-47, 2004.

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

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

TAYLOR, N. P; ZAPPI, D. C. Cactaceae of Jequitinhonha river valley (Minas Gerais). **Acta Botânica Brasilica –SBB.** (v. 5) n. 1, pág. 63-69, 1991.

ZAPPI, D. Fitofisionomia da Caatinga associada à Cadeia do Espinhaço. *Revista Megadiversidade.* (v. 4), n. 1-2, pág. 139-144, 2008.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; LAROCCA, J. A riqueza das cactáceas no Brasil. In: ICMBio. **Plano Nacional para conservação das Cactáceas.** Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBIO, 2011. 112 p.

Anexos

Quadro 04: Localização das colônias amostradas na RPPN Pasmado.

AGRUP RPPN	COORDENADA UTM		ELEV.
	X	Y	
R1	210785.95	8175517.13	285
R2	210807.22	8175524.29	290
R3	210788.87	8175538.33	286
R4	210849.49	8175551.65	295
R5	210825.07	8175611.24	288
R6	210857.37	8175513.88	300
R7	210864.56	8175503.24	302
R8	210899.85	8175485.44	312
R9	210812.05	8175483.26	298
R10	210802.69	8175471.51	301
R11	210784.76	8175462.08	294
R12	210763.44	8175466.78	288
R13	210755.53	8175458.47	288
R14	210762.70	8175434.10	291
R15	210739.18	8175419.05	293
R16	210740.15	8175403.01	292
R17	210714.38	8175388.49	285
R18	210706.76	8175367.01	295
R19	210691.23	8175353.51	290
R20	210670.47	8175347.92	290
R21	210659.76	8175366.05	282
R22	210659.65	8175358.07	284
R23	210653.96	8175352.24	283
R24	210629.89	8175354.46	280
R25	210650.50	8175370.90	280
R26	210691.23	8175353.51	290
R27	210617.61	8175353.41	276
R28	210613.89	8175328.55	278
R29	210614.25	8175333.21	278
R30	210616.63	8175314.97	281
R31	210608.96	8175313.87	281
R32	210610.50	8175302.70	282
R33	210610.32	8175283.98	285
R34	210595.38	8175282.23	277
R35	210603.55	8175295.08	275
R36	210601.06	8175297.37	274
R37	210596.53	8175324.55	270
R38	210604.02	8175323.10	273
R39	210609.89	8175323.96	277

R40	210619.67	8175335.27	277
R41	210622.31	8175337.86	277
R42	210629.64	8175333.41	272
R43	210629.48	8175329.09	274
R44	210636.39	8175323.65	279
R45	210640.98	8175323.93	275
R46	210643.88	8175330.84	278
R47	210647.09	8175330.99	281
R48	210651.35	8175331.49	279
R49	210655.21	8175330.44	280
R50	210654.81	8175336.74	283
R51	210673.96	8175366.90	281
R52	210667.07	8175354.52	281
R53	210666.96	8175354.74	281
R54	210667.79	8175356.52	283
R55	210667.89	8175357.18	282
R56	210671.40	8175358.56	281
R57	210673.77	8175349.07	283
R58	210674.06	8175366.79	281
R59	210676.49	8175369.15	281
R60	210681.00	8175375.30	280

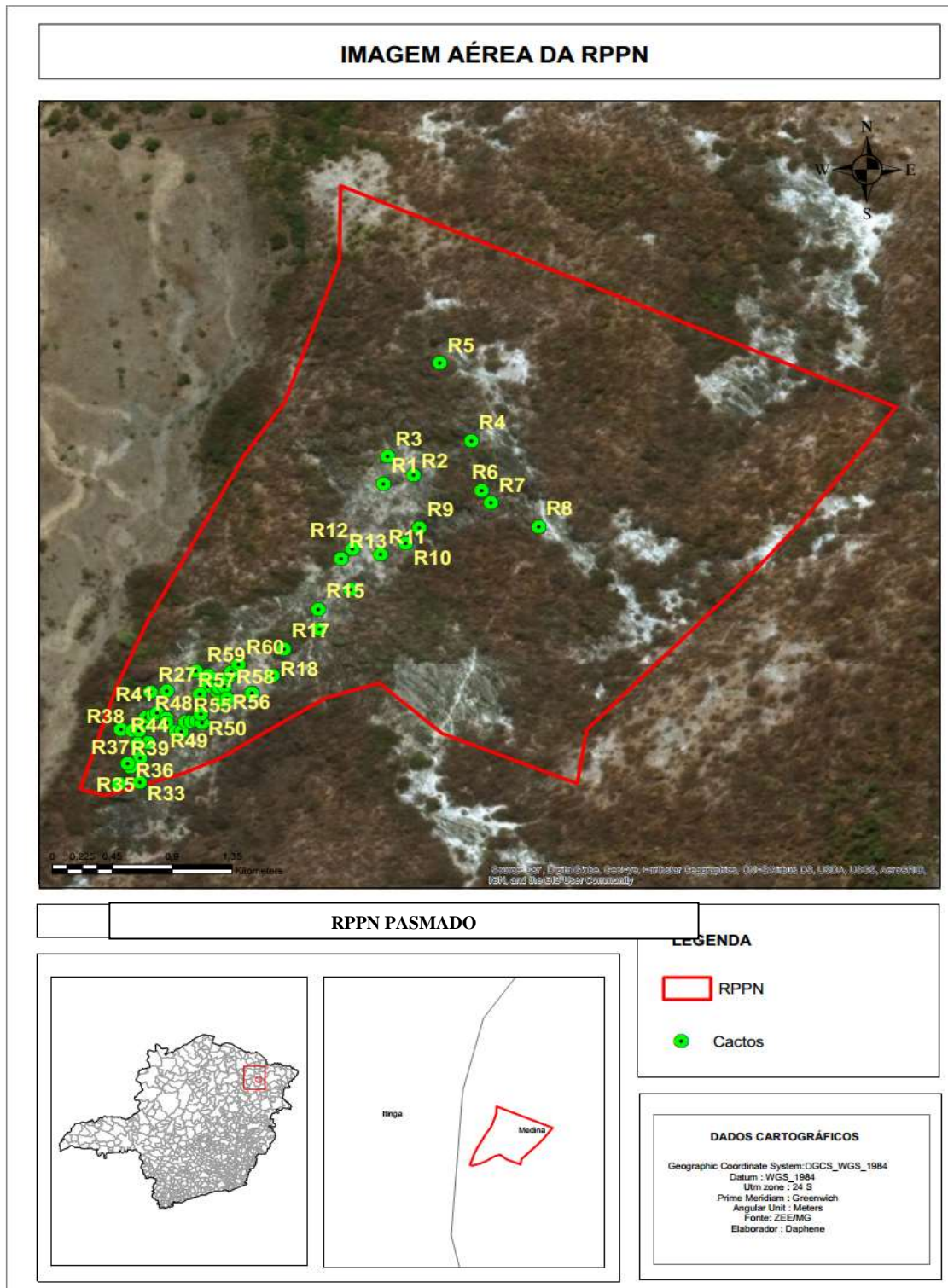


Figura 14: Localização das colônias de *Coleocephalocereus purpureus* na RPPN Pasmado. Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Quadro 05: Localização das colônias amostradas na Agrup Tipo.

AGRUP TIPO ID PONTO	COORDENADA UTM		ELEV.
	X	Y	
T01	208706.46	8162849.74	295
T02	208688.76	8162832.55	292
T03	208749.56	8162829.84	308
T04	208779.59	8162812.41	314
T05	208762.13	8162776.96	327
T06	208737.20	8162733.76	335
T07	208796.18	8162778.53	328
T08	208795.00	8162769.00	324
T09	208775.33	8162792.06	320
T10	208723.83	8162784.29	314
T11	208739.75	8162765.47	319
T12	208761.69	8162761.69	326
T13	208749.10	8162759.15	325
T14	208721.67	8162776.88	314
T15	208732.09	8162807.99	311
T16	208702.71	8162777.79	310
T17	208711.43	8162797.20	309
T18	208707.69	8162820.26	305
T19	208679.22	8162818.77	302
T20	208681.11	8162800.05	303
T21	208718.28	8162752.55	318
T22	208707.91	8162768.16	311
T23	208682.47	8162781.10	307
T24	208693.73	8162801.35	305
T25	208701.21	8162806.57	307
T26	208661.85	8162791.15	301

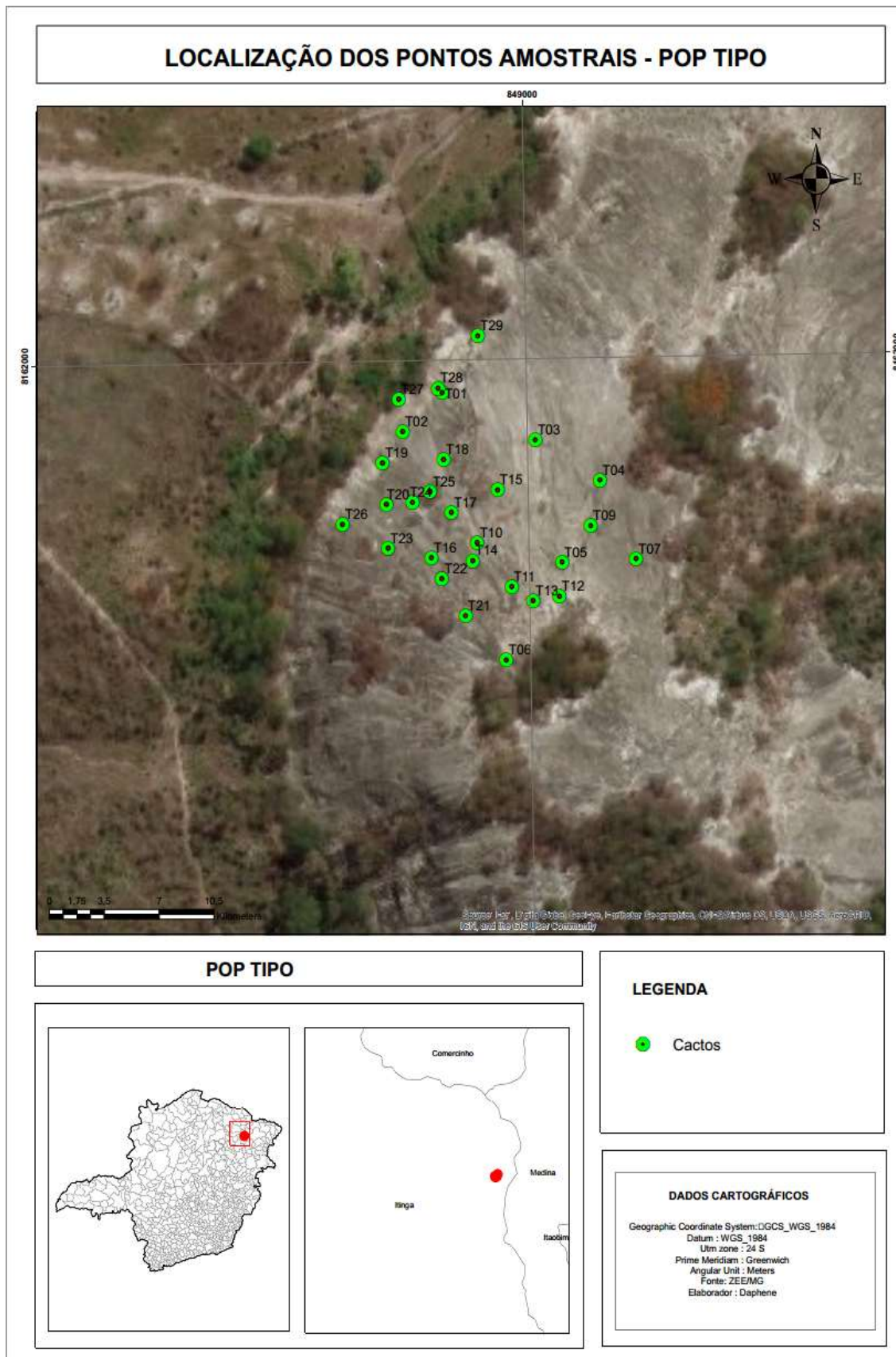


Figura 15: Localização das colônias de *Coleocephalocereus purpureus* presentes na localidade Tipo – Pop Tipo. Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Quadro 06: Localização das colônias amostradas na Agrup Nova Aurora.

AGRUP NOVA AURORA	COORDENADAS UTM		ELEV.
	PONTO	X	
N01	210422.28	8178556.72	287
N02	210437.03	8178563.65	287
N03	210409.34	8178571.93	305
N04	210421.94	8178582.25	305
N05	210420.44	8178585.61	306
N06	210420.35	8178592.35	307
N07	210417.01	8178595.69	308
N08	210401.56	8178598.86	310
N09	210492.15	8178593.31	301
N10	213964.56	8178643.00	302
N11	210493.80	8178582.90	300
N12	210494.97	8178628.73	304
N13	210485.23	8178621.83	304
N14	210473.60	8178628.44	305
N15	210467.00	8178633.30	307
N16	210473.32	8178646.89	308
N17	210468.53	8178652.09	310
N18	210458.68	8178653.46	310
N19	210453.55	8178662.01	312
N20	210459.67	8178668.86	312
N21	210475.68	8178714.63	312
N22	210458.05	8178700.83	312
N23	210478.95	8178716.49	313
N24	210478.90	8178719.87	313

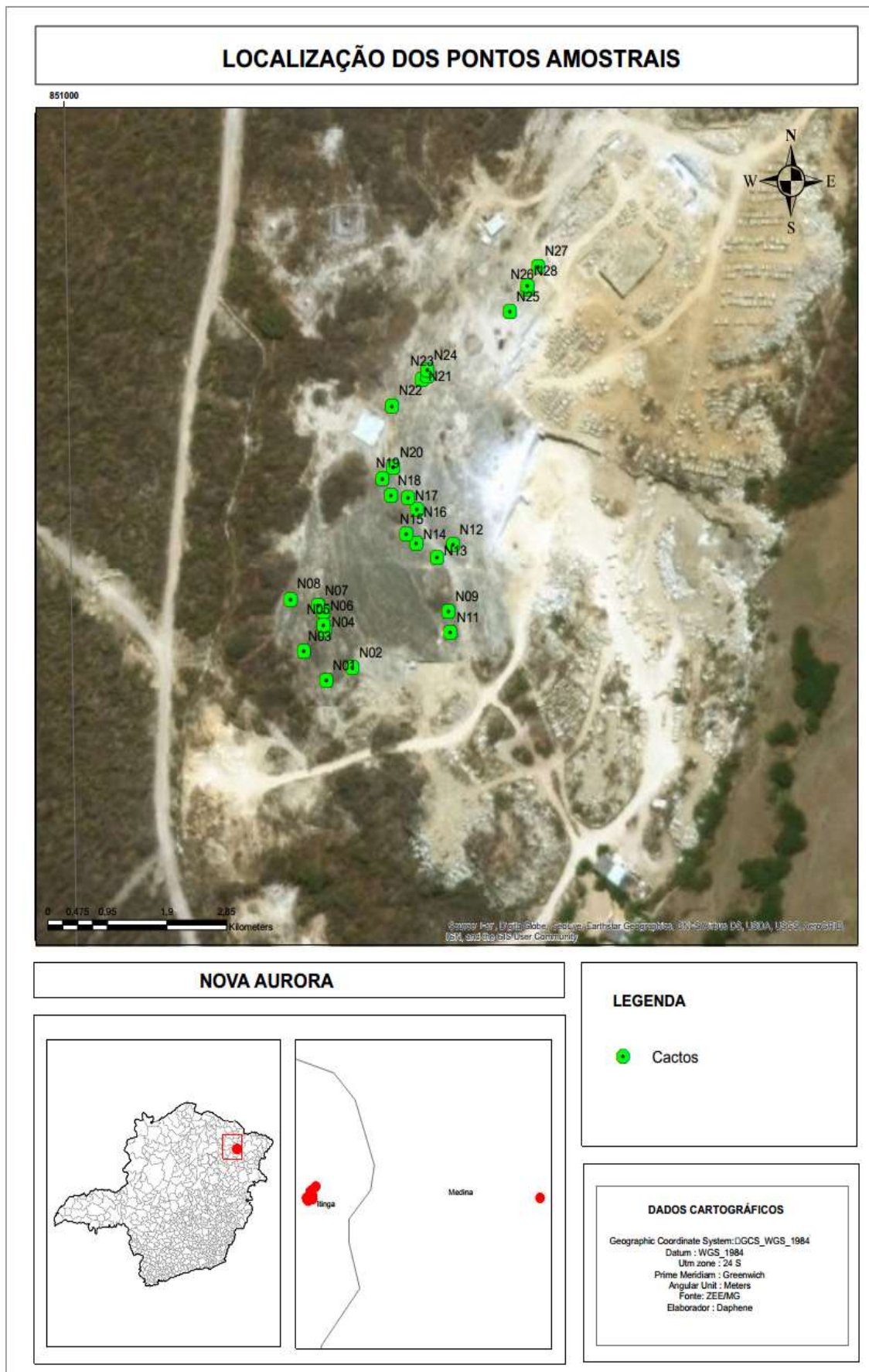


Figura 16: Localização das colônias de *Coleocephalocereus purpureus* dentro da área da Mineração Nova Aurora – Pop Nova Aurora.. Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Quadro 07: Localização das colônias amostradas na Agrup Pasmado.

AGRUP PASMADO	COORDENADAS UTM		
PONTO	X	Y	ELEV.
P01	210029.43	8177235.01	297
P02	210018.59	8177231.12	297
P03	210022.73	8177221.20	296
P04	210032.30	8177211.29	295
P05	210032.38	8177190.07	294
P06	210017.21	8177194.83	294
P07	210013.38	8177187.30	294
P08	210031.78	8177152.51	292
P09	209993.98	8177153.73	292
P10	209975.78	8177151.52	291
P11	209992.41	8177119.34	290
P12	209966.73	8177098.59	288
P13	209954.46	8177083.01	287
P14	209970.70	8177068.17	287
P15	209972.98	8177049.77	286
P16	209929.52	8177014.68	284
P17	209910.98	8177004.99	284
P18	209877.21	8177003.97	285
P19	209880.36	8177043.20	284
P20	209907.97	8177053.51	285
P21	209862.07	8177118.67	288
P22	209912.75	8177121.86	288

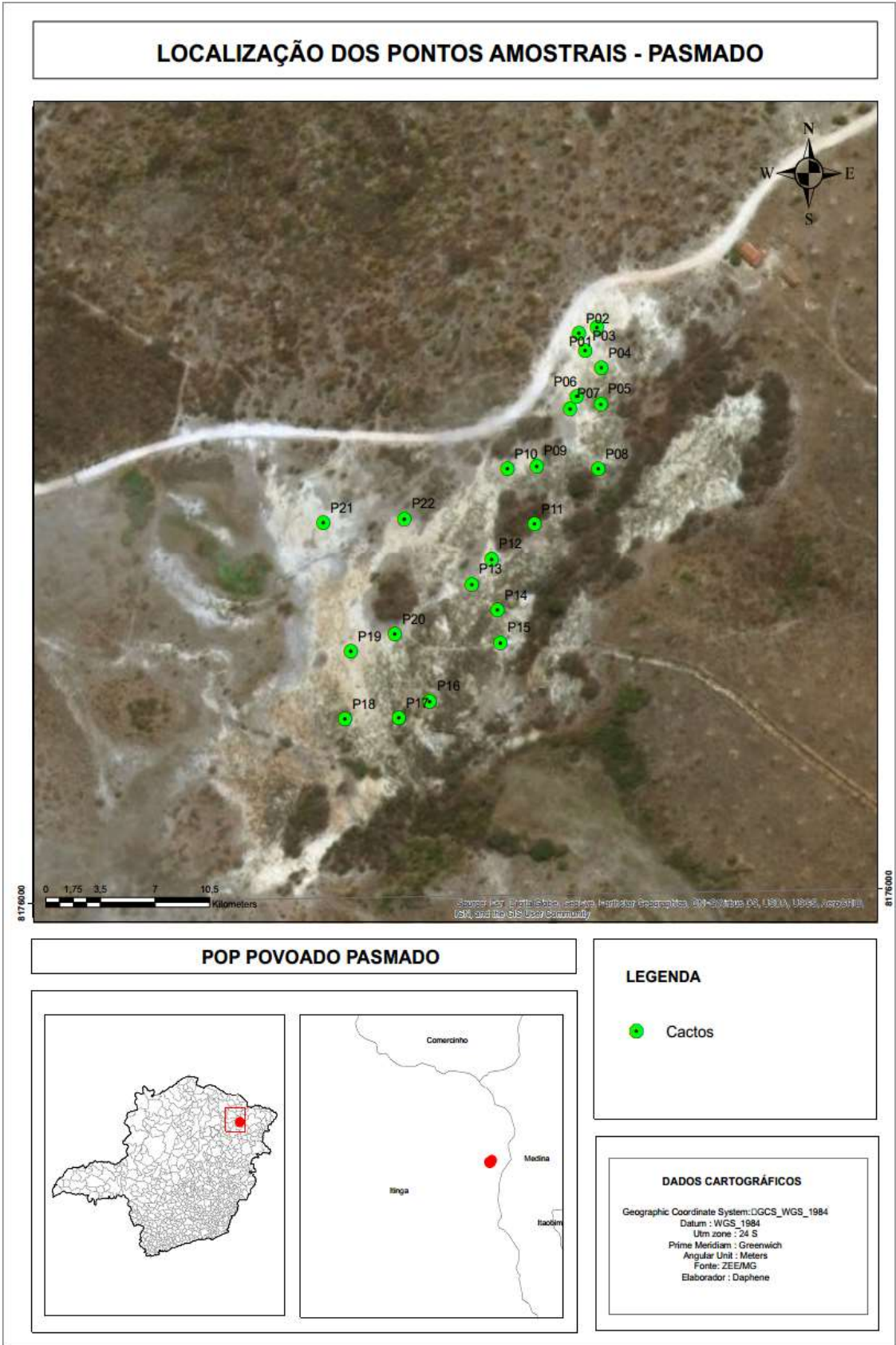


Figura 17: Localização das colônias de *Coleocephalocereus purpureus* na margem da estrada de acesso à Mineração Nova Aurora – Agrup Pasmado.. Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, considerando os aspectos estritamente ambientais, e ainda, a carência de estudos aprofundados sobre a conservação e a avaliação da diversidade genética da espécie *Coleocephalocereus purpureus*, conclui-se que esta pesquisa colabora efetivamente para com a conservação deste cacto criticamente ameaçado de extinção, pois traz a público uma importante ferramenta molecular de acesso à estrutura e diversidade genética da referida espécie, subsidiando-se o Plano de Manejo Genético, o qual viabilizará a reabilitação e reconstrução de populações em declínio e/ou com habitat degradado.

Destaca-se que a Localidade Tipo deve ser manejada em unidade independente levando-se em conta que ela apresenta de um grupo geneticamente distinto uma das demais populações amostradas, sendo um forte indício de evolução genética em um ramo diferenciado, o que pode provocar implicações em programas de reprodução e reintrodução dos espécimes desta população caso as colônias sejam inseridas em outras populações. Em relação às populações da RPPN, Nova Aurora e Pasmado, elas possuem semelhanças genéticas, o que facilitará a reprodução e reintrodução da referida espécie.

Portanto, infere-se que a avaliação da variabilidade genética de espécies ameaçadas de extinção é uma ferramenta eficaz para a conservação da biodiversidade, uma vez que quanto maior a heterozigosidade encontrada entre colônias, maior será a variabilidade genética e, conseqüentemente, melhor será o equilíbrio da população e menor será o risco de extinção da espécie por fatores genéticos.



Development of microsatellite markers for the threatened species *Coleocephalocereus purpureus* (Cactaceae) using next-generation sequencing

Daphne Amaral Fraga¹ · Anderson Figueiredo de Carvalho¹ · Ricardo Souza Santana² · Marlon Câmara Machado¹ · Gustavo Augusto Lacorte¹

Received: 19 July 2019 / Accepted: 28 November 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Ten microsatellite loci were developed and validated for the endangered cactus species *Coleocephalocereus purpureus*. The markers were obtained from sequences generated by whole genome shotgun sequencing approaches. A testing group of 36 specimens of the main population were genotyped and all described markers presented suitable outcomes to population genetic studies, showing polymorphic status for *C. purpureus* testing group with clean and reproducible amplification. No evidence for scoring errors, null alleles or linkage disequilibrium was detected. Number of alleles per locus ranged from 3 to 6 and expected heterozygosity ranged from 0.78 to 0.99. These new microsatellite loci are suitable to be used in future diversity and structure population studies of *C. purpureus*.

Keywords Microsatellites · Population genetics · Cactus · Endangered species

Introduction

Coleocephalocereus purpureus (Buining and Broderoo) F. Ritter is a rare columnar cactus species, reaching up to 90 cm high, with grey wool and golden yellow to brown bristles, that forms a lateral cephalium up to 50 cm long near the stem's tip with pink melocactus-like flowers (Fig. 1) [1]. As a typical columnar cactus, *C. purpureus* specimens provide

nectar, pollen and fruits to a broad spectrum of bat, bird, and insect species, playing a crucial support ecological role of a fragile arid ecosystem [2].

The species was ranked by IUCN as "critically endangered" due its high endemism, whose occurrence of populations (or even of a single population, the population boundaries is unknown) is limited to only four small habitat patches restricted to inland cliffs and mountain peaks placed in a small area of Caatinga biome from Southeast Brazil (Fig. 2), as well due the presence of quarrying activities of the rock where the species grows and other minor human impacts such as collection, deforestation, introduction of invasive species, fire and cattle trampling [3].

Due to the high risk of extinction of the species imposed by quarrying activities in its home range, a conservation unit (named "RPPN Pasmado") has recently been established to protect one of the main native populations of *C. purpureus* as well as to harbour rescued individuals from areas where quarrying activities has been authorized and all vegetation has been removed [4]. Since the translocation programs were implemented, the RPPN Pasmado Conservation Unit became the largest group of *C. purpureus* specimens constituted by native individuals as well translocated individuals from other populational groups that became extinct due to quarrying activity. In addition, as the other three habitat

Gustavo Augusto Lacorte
gustavo.lacorte@ufmg.edu.br

Daphne Amaral Fraga
daphnefraga@hotmail.com

Anderson Figueiredo de Carvalho
anderson_fbi45@outlook.com

Ricardo Souza Santana
souzasantana@hotmail.com

Marlon Câmara Machado
marloncmachado@gmail.com

¹ Molecular Biology Lab, Department of Science and Languages, Federal Institute of Minas Gerais, Bambuí Campus, Bambuí, Minas Gerais State, Brazil

² Nativa Serviços Ambientais Ltda, Curvelo, Minas Gerais State, Brazil

Comprovante de submissão do manuscrito ao periódico Journal of Nature Conservation utilizando o conteúdo do capítulo 2

Manuscript Details

Manuscript number	JNC_2019_386
Title	Establishing population boundaries and conservation proposals for <i>Coleocephalocereus purpureus</i> , a critically endangered cactus species microendemic from Caatinga biome
Short title	Establishing population boundaries for <i>C. purpureus</i>
Article type	Research Paper

Abstract

Coleocephalocereus purpureus (Buining & Brederoo) F. Ritter is a rare columnar cactus species endemic to small habitat patches of a south-eastern caatinga (inselberg) elements located in Eastern Brazil. *C. purpureus* was listed as Critically Endangered by IUCN by habitat loss due to encroaching quarrying activities. Here, we used ten microsatellite markers to estimate genetic diversity and differentiation of *C. purpureus* populations with the purpose of make a diagnosis of remaining genetic diversity and establish a basis for the proposition of effective actions to genetic conservation of the species. Our estimates of genetic diversity indicated that *C. purpureus* presented moderated levels of genetic diversity, even though the species the populations are small and fragmented. All genetic differentiation approaches revealed that there is a clear differentiation of an isolated population by the Jequitinhonha River from the other three populations, constituting an independent Management Unit – MU. As priority actions for the retention of genetic diversity of *C. purpureus* populations, we propose (i) that the isolated population should be considered as a prior for conservation efforts and managed as an independent unit; (ii) maintaining the integrity of the habitat within the small range of the species with continuous monitoring of genetic diversity; (iii) quality of local pollinator habitats should also be preserved; and (iv) ex-situ conservation should be considered with the establishment of *C. purpureus* representatives in botanical gardens as well with formation of a seed bank.

Keywords	Genetic structure; Endangered species; Molecular tools; Cactaceae; Microsatellite markers
Taxonomy	Conservation Biology, Wildlife Management
Manuscript region of origin	South America
Corresponding Author	Gustavo Augusto Lacorte
Corresponding Author's Institution	Federal Institute of Minas Gerais
Order of Authors	Daphne Amaral Fraga, Anderson Figueiredo de Carvalho, Cledson Jones Barbosa Ribeiro, Ricardo Souza Santana, Marlon Câmara Machado, Gustavo Augusto Lacorte

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter_submission.docx [Cover Letter]

Establishing population boundaries for *C. purpureus*.docx [Manuscript File]


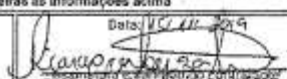
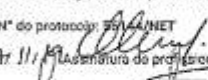
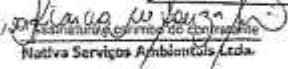
Figure 1_new.tif [Figure]

figure 2_new.tif [Figure]

figure 3_new.tif [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Cópia da Anotação de Responsabilidade Técnica – ART, emitida pelo Conselho Regional de Biologia – 4ª Região, tornando válido o Plano de Manejo Genético da espécie *C. purpureus* (produto técnico da dissertação – capítulo 3) a ser executado pela empresa Nativa Serviços Ambientais Ltda.

Serviço Público Federal CONSELHO FEDERAL/CONSELHO REGIONAL DE BIOLOGIA - 4ª REGIÃO	
Situação: TRABALHO EM ANDAMENTO	Data: 27/11/2019 10:23:08 AM
ANOTAÇÃO DE RESPONSABILIDADE TÉCNICA - ART	
Nº: 2019/10005	
CONTRATADO	
Nome: DAPHNE AMARAL FRAGA	Registro CRBio: 076804/04-D
CPF: 01542730660	Telefone: 96223855
E-mail: daphnefraga@hotmail.com	
Endereço: R MARCELO RIBDIRO ALVES N.º 111	
Cidade: SETIM	Bairro: CJ OLIMPIA BUENO-FR
CEP: 32671-768	UF: MG
CONTRATANTE	
Nome: NATIVA SERVIÇOS AMBIENTAIS LTDA	
Registro profissional:	CPF/CGC/CNPJ: 09.466.493/0001-24
Endereço: AVENIDA DA INTEGRAÇÃO S.º 43	
Cidade: CURVELO	Bairro: CENTRO
CEP: 35740-000	UF: MG
Site:	
DADOS DA ATIVIDADE PROFISSIONAL	
Natureza: Prestação de Serviços - Proposição de estudos, projetos de pesquisa e/ou serviços	
Identificação: Plano de Manejo Genético da espécie <i>Coleocephalocereus purpureus</i>	
Município do trabalho: ISIPA	UF: MG
Município de sede: CURVELO	UF: MG
Forma de participação: Equipe	Perfil do equipe: Biólogos e Eng. Ambientais
Área de conhecimento: Botânica	Campo de atuação: Meio ambiente
Descrição sumária da atividade: PLANO DE MANEJO GENÉTICO DA ESPÉCIE <i>COLEOCEPHALOCEREUS PURPUREUS</i> , UMA ESPÉCIE DE CACTO AMEAÇADA DE EXTINÇÃO	
Valor: R\$ 1000,00	Total de horas: 220
Início: 21/10/2019	Término: 11/11/2019
ASSINATURAS	
Declaro serem verdadeiras as informações acima	
Data: 11/11/2019  Assinatura do profissional	Data: 11/11/2019  Assinatura do contratante
Para verificar a autenticidade desta ART acesse o CRBio-04 Online em: www.crbio.org.br e depois o serviço Conferência de ART	
Solicitação de baixa por distrato Data: / / Assinatura do profissional Data: / / Assinatura e carimbo do contratante	Solicitação de baixa por conclusão Declaramos a conclusão do trabalho anotado na presente ART, razão pela qual solicitamos a devolução de BARRA junto aos arquivos dessa CRBio. Nº do protocolo: 5784/MET Data: 27/11/2019  Assinatura do profissional Data: 27/11/2019  Assinatura e carimbo do contratante Nativa Serviços Ambientais Ltda.

Imprimir ART

Divulgação do projeto no website da empresa Nativa Meio Ambiente Ltda., destacando a parceria entre o IFMG Campus Bambuí e as empresas envolvidas no manejo de *C. purpureus*. (<http://www.nativameioambiente.com.br/projetos/avaliacao-da-diversidade-e-estrutura-genetica-da-populacao-translocada-de-coleocephalocereus-purpureus-rppn-pasmado/> - Acesso em 10/09/2019)



The image is a screenshot of a website for 'nativa meio ambiente'. The header includes the company logo, contact information '(11) 3722-3295', and navigation links: Home, Quem somos, O que fazemos, Clientes, **Case**, Contatos, and Idioma: ↕. The main heading reads 'Avaliação da diversidade e estrutura genética da população translocada de Coleocephalocereus purpureus – RPPN Pasmado'. Below this, the text describes the project: 'Projeto: Avaliação da diversidade e estrutura genética da população translocada de Coleocephalocereus purpureus para a RPPN Pasmado, Itinga/MG.' It identifies the project leader as Ricardo de Souza Santana, Biólogo MSc. The text explains that this research is a partnership between IFMG/Campus Bambuí, Empresa Nativa Meio Ambiente, and Empresa NOVA AURORA MÁRMORES E GRANITOS, aimed at developing a molecular tool to assess the diversity and genetic structure of the cactus population. It notes that *Coleocephalocereus purpureus* is a rare and endemic species from Minas Gerais, occurring in rocky outcrops in the Itinga region. Classified as Critically Endangered (CR) in the 2007 Biodiversity List, the project aims to develop a molecular marker to establish conservation strategies for the translocated population. A photograph of a cactus with pink flowers is shown on the right side of the page.