SELEÇÃO DE *PRIMERS* ISSR PARA ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau (Bignoniaceae)

Mikael de Paula Brandão, Gabrieli de Lourdes Sales, Laís Lara Jesus Barros Freitas, Luziane Alves Brandão, Lucas Amaral de Melo, Adelson Lemes da Silva Júnior, Lucimara Cruz de Souza

Universidade Federal de Lavras, Trevo Rotatório Professor Edmir Sá Santos, s/n
Caixa Postal 3037 - 37203-202 – Lavras – MG, Brasil, mikael.brandao1@estudante.ufla.br, gabrieli.sales@estudante.ufla.br, lais.freitas1@estudante.ufla.br, luziane.alves@ufla.br, lucas.amaral@ufla.br, adelson.lemes@ufla.br, lucimaracruz@ufla.br

Resumo
A utilização de marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) constitui uma ferramenta eficiente para estudos de diversidade genética em espécies nativas pouco caracterizadas geneticamente. Neste contexto, este trabalho objetivou selecionar *primers* ISSR com potencial para estudos de diversidade genética em *Zeyheria tuberculosa*, conhecido como Ipê felpudo. Foram coletadas amostras foliares de três indivíduos selecionados aleatoriamente em um teste de progênies estabelecido em área experimental na Universidade Federal de Lavras. O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB com modificações e avaliado quanto à concentração, pureza e integridade. Foram testados 22 *primers* por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cujos produtos foram separados em gel de agarose 2% e registrados por fotodocumentação em luz UV. A partir dos perfis de bandas, foram determinados o número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de polimorfismo. Ao final, 17 *primers* apresentaram amplificação satisfatória, com média de 49,33% de polimorfismo, sendo selecionados para estudos posteriores de diversidade genética em *Z. tuberculosa*.

Palavras-chave: Ipê felpudo. Marcadores moleculares. Variabilidade genética. Árvores nativas. Melhoramento florestal.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Genética

Introdução

A ampliação do uso de espécies arbóreas nativas em plantios comerciais representa uma estratégia importante para atender à crescente demanda por madeira e produtos florestais não madeireiros, conciliando produção florestal, conservação da biodiversidade e desenvolvimento sustentável. Nesse contexto, *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau. (Bignoniaceae), conhecida popularmente como ipê-felpudo, destaca-se pelo elevado potencial silvicultural e valor econômico, embora esteja classificada como espécie ameaçada de extinção em decorrência da intensa exploração de suas populações naturais (Brasil, 2021).

Sua distribuição concentra-se principalmente na região Sudeste do Brasil, com registros também no Nordeste e Centro-Oeste. Apresenta diversas características favoráveis à domesticação, como rápido crescimento, elevada plasticidade fenotípica, crescimento monopodial, alta capacidade de rebrota e propagação por sementes, além de madeira amplamente utilizada na construção civil, obras internas, cabos de ferramentas e implementos agrícolas (Carvalho, 2005; Lohmann, 2015; Magistrali *et al*., 2022; Mendonça *et al*., 2018).

Apesar de seu potencial, a utilização de *Zeyheria tuberculosa* na silvicultura brasileira ainda é limitada pela escassez de informações técnico-científicas relacionadas ao seu manejo, produtividade, adaptação a diferentes condições ambientais e caracterização genética. Os estudos genéticos disponíveis são ainda incipientes e concentram-se em espécies relacionadas, como *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae), para a qual foram utilizados marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Bertoni, 2007). Nesse contexto, estudos voltados à caracterização da diversidade e da estrutura genética de *Z. tuberculosa* são fundamentais para subsidiar estratégias de conservação, domesticação e melhoramento florestal, contribuindo para o uso sustentável da espécie e para sua inserção em sistemas de produção florestal e de mudas (Assunção *et al*., 2024).

Nessa conjuntura, os marcadores moleculares de DNA constituem ferramentas eficientes para estudos genéticos, uma vez que possibilitam a caracterização da variabilidade genética intra e interespecífica, bem como o monitoramento de populações naturais e cultivadas, independentemente das variações ambientais. Entre as diferentes classes de marcadores disponíveis, os marcadores Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) têm sido amplamente empregados na avaliação da diversidade genética de espécies florestais nativas (Brandão *et al*., 2015; Silva Júnior *et al*., 2017; Teixeira *et al*., 2020). Esses marcadores são baseados na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e permitem a amplificação de regiões genômicas flanqueadas por microssatélites, dispensando o conhecimento prévio das sequências de DNA, sendo especialmente úteis para espécies pouco estudadas como *Z. tuberculosa*, que ainda não dispõe de marcadores moleculares específicos.

Para a obtenção de resultados confiáveis e consistentes a partir de estudos genéticos de diversidade, requer-se uma seleção eficiente de *primers* antes das análises amostrais de determinada população, visando a garantia da utilização de iniciadores com um bom perfil de amplificação, elevada reprodutibilidade e informativos (Costa *et al*., 2015). Diante disso, o objetivo deste estudo foi selecionar *primers* ISSR para análises moleculares posteriores de diversidade genética em indivíduos de *Z. tuberculosa*.

Metodologia

Foram selecionados 3 indivíduos aleatórios de *Zeyheria tuberculosa* em um teste de progênies estabelecido em área experimental da Universidade Federal de Lavras (21º13’45’’S e 44º59’02’’W), Lavras, MG. As amostras de tecidos foliares jovens e sadios foram coletadas e armazenadas em freezer a -20 °C e, posteriormente, submetidas à liofilização em liofilizador (Liotop L101) por 48 horas. Após a liofilização, o material vegetal foi macerado em equipamento TissueLyser (QIAGEN TissueLyser LT) para a homogeneização e a liberação mecânica do material genético.

Para extração de DNA genômico das amostras foliares, utilizou-se o método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1990), com modificações propostas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC). O tampão de extração foi constituído de 2% CTAB, 100 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA pH 8,0, 1% de PVP e 0,2% β-mercaptoetanol. Foram realizadas três etapas de desproteinização com solução de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA) 24:1. A etapa de *overnight* do protocolo original foi substituída pela adição de 1 volume de álcool isopropílico gelado e 1/3 do volume de acetato de amônio (7,5 M), seguida de três lavagens com etanol 70% e secagem do *pellet* à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspendido em 54 µL de H_20 ultrapura com RNAse (40 µg/mL) e armazenado em freezer a -20 °C. A quantificação e a avaliação da pureza do DNA foram realizadas por meio de espectrofotometria em aparelho NanoDrop Lite Plus (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), com base nas leituras de absorbância (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) e a integridade foi constatada por eletroforese em gel de agarose a 0.8% corado com brometo de etídio (0.25 µg mL^{-1}).

Foram testados 22 *primers* ISSR em ensaios de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) individuais. Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 µL contendo: tampão 1X (10 mM Tris-HCl (pH 8.5) e 50 mM de KCl), $MgCl_2$ (2.5 mM), dNTP (1 mM), *primer* (0.2 mM), 1 unidade de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA genômico.

A programação do termociclador consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos constituídos por 3 etapas: 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 52 ºC e 90 segundos a 72 °C, e extensão final de 72 °C por 7 minutos. Os produtos finais de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0.25 µg mL^{-1}) e a uma voltagem de 100 volts, por 1 hora e 30 minutos. Os perfis de bandas eletroforéticas foram registrados em sistema de fotodocumentação digital (L-PIX, Loccus Biotecnologia) para as análises subsequentes.

A partir dos perfis de amplificação, foram elaboradas matrizes binárias, com base na análise visual minuciosa dos padrões de bandas observados nos géis, na qual o valor “1” representa a presença e “0” representa a ausência. A partir dessa matriz, foi realizada uma análise descritiva dos dados obtendo-se o número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) e a porcentagem de bandas polimórficas (PBP). Por meio desta, foi possível identificar quais *primers* apresentaram melhor perfil de amplificação**.**

Resultados

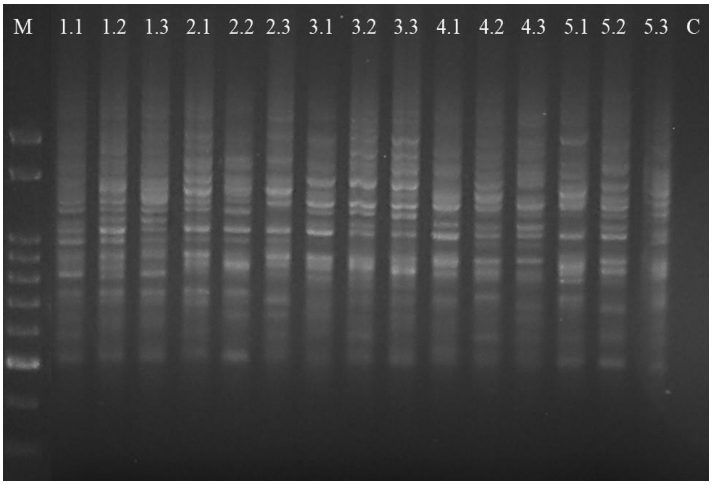
A partir da fotodocumentação dos géis foi observada boa definição visual e um expressivo número de loci em 17 dos 22 iniciadores testados, sendo selecionados por possuírem um melhor perfil de amplificação (Tabela 1, Figura 1).

Tabela 1 - Análise descritiva dos 17 *primers* selecionados, sequência de nucleotídeos, total de bandas amplificadas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) e porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por primer ISSR.

Primer	Sequências (5'-3')	NBT	NBP	PBP
JOHN	(AG)7-YC	9	5	55,55%
UBC 807	(AG)8-T	15	4	26,66%
UBC 808	(AG)8-C	17	5	29,41%
UBC 809	(AG)8-G	10	4	40%
UBC 810	(GA)8-T	18	8	44,44%
UBC 811	(GA)8-C	15	10	66,66%
UBC 812	(GA)8-A	12	8	66,66%
UBC 822	(TC)8-A	8	4	50%
UBC 827	(AC)8-G	18	13	72,22%
UBC 834	(GA)8-YT	17	12	70,58%
UBC 835	(AG)8-YC	12	3	25%
UBC 836	(AG)8-YA	19	9	47,36%
UBC 841	(GA)8-YC	10	6	60%
UBC 842	(GA)8-YG	11	6	54,54%
UBC 855	(AC)8-YT	14	6	42,85%
UBC 868	(GAA)6	10	5	50%
UBC 880	(GGAGA)3	10	3	30%
TOTAL		225	111	49,33%

Fonte: Do autor, 2026.

Figura 1 - Perfil de amplificação em gel de agarose do *primer* ISSR UBC 827 em 15 indivíduos de *Z. tuberculosa*. C = No template Control, M = Marcador Ladder: 100 pb.



Fonte: Do autor, 2026.

Os 17 *primers* selecionados proporcionaram uma porcentagem média de polimorfismo de 49,33%, correspondendo a 111 bandas polimórficas de um total de 225 bandas amplificadas. O número total de fragmentos amplificados por *primer* variou de 8 a 19, com uma média de 13,23 bandas por iniciador.

Entre os iniciadores avaliados, o *primer* UBC 835 apresentou o menor nível de polimorfismo (25%), obtendo-se 12 bandas, das quais 3 foram polimórficas. Por outro lado, o *primer* UBC 827 destacou-se por apresentar a maior porcentagem de polimorfismo (72,22%) com 13 bandas polimórficas entre as 18 bandas amplificadas.

Em relação ao número total de fragmentos amplificados, o *primer* UBC 836 apresentou o maior desempenho, gerando 19 bandas, das quais 9 foram polimórficas, correspondendo a 47,36% de polimorfismo.

Discussão

A seleção de *primers* para estudos de diversidade genética tem se tornado uma prática cada vez mais frequente, uma vez que permite avaliar previamente a eficiência e a aplicabilidade dos iniciadores, contribuindo para a redução dos custos e do tempo necessários à realização das análises laboratoriais.

Os resultados obtidos indicam o potencial dos *primers* selecionados para sua utilização em estudos genético-populacionais de ipê-felpudo). A taxa de polimorfismo obtida com os 17 *primers* foi de 49,33%, valor que se encontra dentro da amplitude observada em estudos de diversidade genética com marcadores dominantes do tipo ISSR em espécies arbóreas (Liu *et al*., 2015; Pimenta *et al*., 2022).

Ressalta-se, que o polimorfismo observado na etapa de seleção dos *primers* é referente aos três indivíduos analisados, não sendo representativo da variabilidade genética da população como um todo. Dessa forma, o aumento do número de indivíduos amostrados poderá revelar níveis mais elevados de polimorfismo.

Conclusão

Os 17 *primers* ISSR selecionados podem ser indicados, na condição aqui proposta, para quantificação de diversidade genética em indivíduos de *Z. tuberculosa*.

Referências

ASSUNÇÃO, R. R.; SILVA JÚNIOR, A. L.; ALMEIDA, R. S.; CARVALHO, D.; MELO, L. A. Genetic characterization of *Zeyheria tuberculosa* progenies and evaluation for formation of a seed orchard. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 46, n. 1, e66986, 2024.

BERTONI, B. W.; ASTOLFI FILHO, S.; MARTINS, E. R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Genetic variability in natural populations of *Zeyheria montana* Mart. from Brazilian Cerrado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 409-415, 2007.

BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. A.; NAZARENO, A. G.; CARVALHO, D. Genetic diversity of neotropical tree *Myrcia splendens* (Myrtaceae) in a fragment-corridor system in the Atlantic rainforest. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 216, p. 35-41, 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Portaria MMA nº 561, de 15 de dezembro de 2021**. Institui a Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2021.

CARVALHO, P. E. R. **Ipê-felpudo**. Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 9 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 112).

COSTA, D. F.; VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

LIU, M. M.; XING, Y. M.; GUO, S. X. Diversity analysis of *Polyporus umbellatus* in China using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 38, n. 10, p. 1512-1517, 2015.

LOHMANN, L. G. **Bignoniaceae In Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB112305. Acesso em: 10 jul. 2026.

MAGISTRALI, P. R.; CACAU, F. V. P.; NASCIMENTO, J. F.; MAGISTRALI, I. C**.** Tamanho de recipientes e luminosidade na produção de mudas *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae)**. Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2022.

MENDONÇA, A. R.; SILVA, J. C.; AOZAI, T. S.; SILVA, E. R.; SANTOS, J. S.; BINOTI, D. H. B.; SILVA, G. F. Estimação da altura total de árvores de ipê felpudo utilizando modelos de regressão e redes neurais artificiais. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 36, n. 1, p. 128-139, 2018.

PIMENTA, J. M. A.; FELIX, F. C.; ARAÚJO, J. S. O.; FAJARDO, C. G.; PACHECO, M. V. Selection of ISSR molecular primers for studies of genetic diversity in *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 35, n. 1, p. 231-238, 2022.

SILVA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, L. C.; PEREIRA, A. G.; CALDEIRA, M. V. W.; MIRANDA, F. D. Genetic diversity of *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex. Ducke) Barneby, in a forest area in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 2017.

TEIXEIRA, G. C.; KONZEN, E. R.; FARIA, J. C. T.; GONÇALVES, D. S.; CARVALHO, D.; BRONDANI, G. E. Genetic diversity analysis of two *Eucalyptus* species using ISSR markers. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 270-278, 2020.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES, CNPq, FAPEMIG, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas (PPGGM-UFLA), Grupo de Pesquisa em Genética Molecular de Plantas (GMOL-UFLA) e Grupo de Pesquisa em Silvicultura e Melhoramento Florestal (SILMEF-UFLA).