TRANSFERIBILIDADE DE SSR DE *Psidium guajava* PARA *Paubrasilia echinata*

Mayla Bessa Scotá, Aline dos Santos Bergamin, Thalya Campelo Victor, Gustavo Mariano Fernandes, Viviane Alexia Correia Silva, Marcia Flores da Silva Ferreira, Elias Terra Werner

Universidade Federal do Espírito Santo, ES / Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, mayla_scotta@hotmail.com, alinebergamin258@hotmail.com, thalyavitor26@gmail.com, gustavo123mariano@hotmail.com, vivianeac.correia@gmail.com, mfloressf@gmail.com, elias.werner@ufes.br

Resumo
Paubrasilia echinata é uma espécie arbórea ameaçada, para a qual a micropropagação *in vitro* constitui uma estratégia promissora de conservação e multiplicação. Entretanto, a ocorrência de alterações genéticas durante a regeneração torna necessária a utilização de marcadores moleculares para o monitoramento da estabilidade genética. Neste estudo, avaliou-se a transferibilidade de 10 loci SSR derivados de regiões codificadoras de *Psidium guajava* para *P. echinata*. Foram analisadas 42 amostras de DNA provenientes de plantas germinadas, brotos regenerados *in vitro* e plantas aclimatizadas. Quatro loci apresentaram amplificação, dos quais três foram monomórficos e um, Pg24968, apresentou polimorfismo, com três alelos, He = 0,561 e PIC = 0,498. A heterozigosidade observada foi nula em todos os loci. Os resultados demonstram potencial de transferibilidade de SSRs para a espécie *P. echinata*, e o uso promissor em estudos de diversidade e estabilidade genética em plantas de micropropagadas *in vitro*.
Palavras-chave: Coding DNA Sequence . diversidade genética . *in vitro* . micropropagação . Simple Sequence Repeats.

Área do Conhecimento: Ciências biológicas. Genética.

Introdução

Paubrasilia echinata (Lam.) E. Gagnon, H.C. Lima & G.P. Lewis (Fabaceae), conhecida como pau-brasil (CNNFlora 2026) é uma arbórea nativa do Brasil, endêmica da Mata Atlântica e reconhecida por sua relevância histórica e ecológica (SOS Mata Atlântica e INPE, 2024). Em virtude da intensa exploração do bioma Mata Atlântica ao longo de décadas, da perda significativa de habitat, a espécie está classificada como “em perigo de extinção” pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da International Union for Conservation of Nature (IUCN) desde 1998, e pela Lista Vermelha de Ameaça da Flora Brasileira do Ministério do Meio Ambiente (MMA) atualizada em 2022.

Estratégias biotecnológicas de cultura de tecidos vegetais, como a micropropagação *in vitro*, constitui uma importante ferramenta para a conservação e multiplicação de espécies florestais ameaçadas, permitindo a produção em larga escala de mudas e subsidiando programas de conservação *ex situ* e restauração ambiental (Shueler et al., 2026). Contudo, alterações genéticas podem ocorrer durante as etapas de regeneração *in vitro*, tornando necessária a utilização de ferramentas moleculares capazes de monitorar a estabilidade genética das plantas obtidas por micropropagação (dos Santos Bergamin et al. 2025).

Entre os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) destacam-se por apresentarem elevada reprodutibilidade, codominância, multialelismo, ampla distribuição no genoma e alta reprodutibilidade, sendo amplamente empregados em estudos de diversidade genética, estrutura populacional, caracterização de germoplasma, DNA *fingerprinting* e avaliação da estabilidade genética de plantas propagadas *in vitro* (Ahmad et al., 2018; Bergamin et al. 2025).

Os microssatélites derivados de regiões codificadoras (*Coding* DNA *Sequence* – CDS) apresentam maior potencial de transferência entre espécies devido à elevada conservação dessas regiões ao longo da evolução, constituindo uma alternativa eficiente para espécies com recursos genômicos ainda limitados (Pires *et al.,* 2024; Gregio *et al.,* 2026). Nesse contexto, Pires et al. (2024) desenvolveram marcadores SSR trinucleotídicos em regiões codificadoras e expressas do genoma de *Psidium*

guajava, com elevado potencial de amplificação e polimorfismo, conforme observado por Bergamin et al. 2025 em testes de transferibilidade para a espécie *Coffea canephora*.

Considerando que o desenvolvimento de novos marcadores SSR é um processo oneroso e demorado e, da inexistência de estudos com marcadores SSR em plantas germinadas e micropropagadas *in vitro* de *P. echinata*, estudos de transferibilidade utilizando SSR já descritos, tornam-se fundamentais para identificar marcadores em potencial, passíveis de aplicação na avaliação da estabilidade genética de plantas regeneradas *in vitro*, contribuindo para o estabelecimento de protocolos mais seguros de propagação e conservação da espécie.

Metodologia

Foram utilizados 10 loci SSR desenvolvidos a partir de regiões codificadoras do genoma de *P. guajava* (Pires et al., 2024), e testados em 42 amostras de DNA de plantas germinadas (14 amostras), brotos regenerados *in vitro* (14 amostras) e plantas aclimatizadas (14 amostras) de *P. echinata*

Para a extração do DNA genômico as plântulas *in vitro* e amostras foliares das plantas aclimatizadas foram coletadas e maceradas com nitrogênio líquido, e utilizou-se o protocolo CTAB, com modificações (Zaidan et al., 2023), no qual utilizou-se de 80 a 100 mg de tecido vegetal macerado.

A quantificação e a qualidade do DNA foram avaliadas determinando a razão de absorção de 260 a 280 nm (A260/A280) com um espectrofotômetro (NanoDropTM-2000 - Thermo Scientific, EUA), considerando a faixa ideal entre 1,8 até 2,0. A integridade do DNA foi feita em eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com GelRed®. Por fim, as amostras de DNA foram diluídas, concentração final de 20 ng μL^{-1} de DNA, e armazenas em freezer (-20ºC) até o momento das análises moleculares por SSRs.

As reações de PCR seguiram o protocolo da Promega Biotecnologia do Brasil®, com volume final de 20 µL, contendo: 20 ng μL^{-1} de DNA, 1X PCR Buffer, 4 mM de Mg^{2+}, 2,5 U de GoTaq DNA Polimerase, 0.5 mM dos iniciadores forward/reverse e 0.2 mM de dNTP. Para as amplificações utilizou-se o termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (ThermoScientific®) sob as seguintes condições: 1 ciclo de três minutos (min) (95 °C); 35 ciclos com 20 segundos (seg) (95 °C), 30 seg (61 °C) e 1 min (72 °C); extensão final de 10 min (72 °C). Os produtos de PCR foram separados e visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose com uma corrente de 80V por 40 min, e posteriormente em gel de poliacrilamida (10%), com uma corrente inicial de 80V por 30 min, seguida de 100V por 160 min.

Para análise estatística foram estimados os parâmetros para cada SSR: frequência alélica, número total de alelos (N), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e coeficiente de endogamia (F), utilizando o GenAlEx v. 6.503 *Software* (Peakall; Smouse, 2012). Já o PIC foi calculado no software R (R Core Team).

Resultados

Dos 10 loci de SSR (Tabela 1) testados, 4 amplificaram nas 42 amostras de DNA de *P. echinata*, os outros 6 loci apresentaram amplificações inespecíficas, sendo necessário outros testes de análise PCR.

Tabela 1- Transferibilidade de 10 loci SSR previamente descritos em regiões codificadoras de *P. guajava* para plantas micropropagadas *in vitro* e aclimatizadas de *P. echinata*, assim como, tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) dos marcadores.

Loci SSR	Tamanho do Fragmento (pb)	Transferibilidade
Pg14098	145	Sim
Pg16499	100	Sim
Pg21028	107	Não
Pg24968	101	Sim
Pg31044	134	Não
Pg31517	142	Sim
Pg33733	122	Não
Pg35926	158	Não
Pg37148	107	Não
Pg37450	138	Não

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Entre os quatro loci SSR analisados, Pg24968 apresentou o maior número de alelos e foi o único locus polimórfico, com três alelos, enquanto os loci Pg14098, Pg16499 e Pg31517 foram monomórficos, apresentando apenas um alelo cada (Tabela 2). O número médio de alelos foi de 1,5. Todos os indivíduos avaliados apresentaram-se homozigotos, resultando em heterozigosidade observada (Ho) igual a zero em todos os loci. Apesar disso, o locus Pg24968 apresentou heterozigosidade esperada de 0,561 e PIC de 0,498, indicando informatividade moderada. Considerando o conjunto dos loci, os valores médios de He e PIC foram 0,140 e 0,125, respectivamente. A ausência de heterozigotos no locus polimórfico resultou em F = 1,0, indicando fixação dos alelos nesse locus.

Tabela 2- Descrição do número de alelos (Na), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), índice de conteúdo polimórfico (PIC) e coeficiente de endogamia (F) em *P. echinata*.

Loco	Nº de alelos	Ho	He	PIC	F
Pg14098	1	0	0	0	NA
Pg16499	1	0	0	0	NA
Pg24968	3	0	0,561	0,498	1
Pg31517	1	0	0	0	NA
Média	1,5	0	0,140	0,1245	1

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Discussão

A transferibilidade de marcadores SSR constitui uma estratégia relevante para a obtenção de ferramentas moleculares em espécies com recursos genômicos limitados, especialmente quando o desenvolvimento de marcadores específicos ainda é restrito (Pires *et al.,* 2024; Gregio *et al.,* 2026).

Embora a proximidade filogenética favoreça a conservação das regiões flanqueadoras e o sucesso de amplificação, a transferência pode ocorrer entre espécies taxonomicamente distantes. Sirtoli et al. (2023) demonstraram essa possibilidade ao relatarem elevada transferibilidade de SSRs entre *Conyza canadensis* (Asteraceae) e *Digitaria insularis* (Poaceae). De forma semelhante, Bergamin et al. (2025) observaram a transferência de marcadores desenvolvidos para *P. guajava* em *Coffea canephora*, enquanto Dos Santos Bergamin et al. (2025) demonstraram transferibilidade de marcadores de espécies de *Piper* para *Peperomia stroemfeltii*. Esses estudos reforçam que a utilização de SSRs previamente desenvolvidos pode ser explorada mesmo em espécies pertencentes a diferentes gêneros e famílias botânicas.

No presente estudo, a amplificação de quatro dos dez loci avaliados correspondeu a uma taxa de transferibilidade de 40% para *P. echinata*. Considerando que os marcadores foram originalmente desenvolvidos para *P. guajava*, pertencente à família Myrtaceae, enquanto *P. echinata* pertence à família Fabaceae, essa transferência evidencia a possibilidade de utilização de SSRs entre grupos taxonomicamente distantes. A ocorrência de amplificação específica em parte dos loci indica a conservação suficiente das regiões necessárias ao anelamento dos primers, mesmo diante da distância evolutiva entre as espécies. Os seis loci que apresentaram amplificações inespecíficas não devem, entretanto, ser considerados definitivamente inadequados para *P. echinata*, uma vez que ajustes nas condições de PCR, especialmente na temperatura de anelamento e nas concentrações dos componentes da reação, podem contribuir para a obtenção de amplificações específicas (Rani et al. 2023; Pires et al. 2024).

Entre os loci transferíveis, a predominância de marcadores monomórficos demonstra que a amplificação bem-sucedida não necessariamente resulta em polimorfismo detectável na amostra avaliada. Os loci Pg14098, Pg16499 e Pg31517 foram monomórficos, refletindo, provavelmente uma característica intrínseca da transferibilidade entre gêneros ou da base genética estreita das sementes usadas, e não um efeito do cultivo in vitro em si. Embora esses marcadores apresentem capacidade limitada de discriminação genética na população estudada, sua transferência confirma a conservação das regiões-alvo e não exclui a possibilidade de apresentarem polimorfismo em amostras mais amplas ou geneticamente mais diversas.

O locus Pg24968 apresentou comportamento distinto, com três alelos e conteúdo de informação polimórfica moderado. Apesar do rigor experimental, pode-se observar neste loci, a ausência completa de heterozigotos que combinada à variação nas frequências alélicas entre os estágios de propagação,

leva a um padrão mais consistente com a possibilidade de amplificação de alelos nulos ou loci parálogos, que é um fenômeno recorrente em estudos de transferibilidade interespecífica. Apesar disso, o locus Pg24968 se destacou entre os loci avaliados como o marcador com maior potencial de discriminação genética para *P. echinata*.

Os marcadores avaliados foram originalmente desenvolvidos a partir de regiões codificadoras do genoma de *P. guajava*, característica que pode favorecer sua conservação entre espécies. Pires et al. (2024) destacam o potencial de SSRs trinucleotídicos localizados em regiões codificadoras, os quais, além da possibilidade de transferência, podem apresentar funções associadas à expressão gênica. Gregio et al. (2026) também reforçam o potencial desses marcadores como alternativa para espécies com menor disponibilidade de recursos genômicos. Dessa forma, a utilização de SSRs derivados de regiões codificadoras pode representar uma estratégia particularmente interessante para ampliar a disponibilidade de marcadores em *P. echinata* sem a necessidade imediata de desenvolvimento de um conjunto específico para a espécie (Benelli et al. 2023).

A ausência de heterozigotos observados no conjunto de loci avaliados e a elevada estimativa de F no locus polimórfico devem ser interpretadas com cautela, especialmente considerando o número reduzido de loci informativos. Esses resultados indicam que a amostra analisada apresentou homozigose nos marcadores avaliados, mas não permitem inferir, isoladamente, elevados níveis de endogamia ou padrões gerais de estrutura genética da espécie. Da mesma forma, os valores observados não devem ser utilizados para caracterizar a diversidade genética de *P. echinata* de maneira ampla, uma vez que o objetivo principal foi avaliar a transferibilidade dos marcadores.

A identificação de loci transferíveis, sobretudo de um marcador polimórfico e moderadamente informativo, constitui uma etapa inicial importante para a obtenção de ferramentas moleculares aplicáveis à espécie. Embora os quatro loci transferíveis apresentem diferentes níveis de informatividade, a ampliação do número de primers e a otimização das condições de PCR poderão aumentar o número de marcadores polimórficos disponíveis. Esse conjunto poderá futuramente ser empregado na comparação dos perfis genéticos de plantas matrizes e regenerantes obtidos por micropropagação, contribuindo para o monitoramento da estabilidade genética e para a validação de protocolos de propagação *in vitro* de *P. echinata*.

Conclusão

Os resultados demonstram a transferibilidade de 4 marcadores SSRs de *P. guajava* para *P. echinata*, destacando-se o locus Pg24968 como o mais informativo entre os marcadores avaliados. Os loci transferíveis identificados poderão ser posteriormente ampliados e validados em maior número de indivíduos, visando à obtenção de marcadores eficientes para avaliação da estabilidade genética de plantas micropropagadas de *P. echinata*.

Referências

AHMAD, A. et al. Development and use of simple sequence repeats (SSRs) markers for sugarcane breeding and genetic studies. **Agronomy**, v. 8, n. 11, p. 260, 2018. https://doi.org/10.3390/agronomy8110260

BENELLI, Carla et al. *In vitro* conservation through slow growth storage technique of fruit species: an overview of the last 10 years. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3188, 2022. https://doi.org/10.3390/plants11233188

BERGAMIN, A. S. et al. **Transferibilidade de microssatélites trinucleotídeos de regiões CDS para *Coffea canephora***. In: Encontro latino-americano de iniciação científica, 29.; Encontro latino-americano de pós-graduação, 25.; Encontro de iniciação à docência, 15., 2025, São José dos Campos. Anais [...] São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), 2025. Disponível em: https://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2025/anais/arquivos/0702_1047_01.pdf. Acesso em: 27 jul. 2026.

DOS SANTOS BERGAMIN, A et al. *In vitro* propagation and genetic analysis of *Peperomia stroemfeltii*: insights for large-scale cultivation of an endemic Atlantic forest species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 162, n. 2, p. 36, 2025. https://doi.org/10.1007/s11240-025-03136-w

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica: período 2022–2023. São Paulo: **Fundação SOS Mata Atlântica,** 2024. Disponível em: Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica – Período 2022–2023. Acesso em: 27 jul. 2026.

GREGIO, E. L et al. Diversidade genética como ferramenta para conservação de espécies da fauna brasileira. **Revista de Geopolítica**, v. 17, n. 1, p. e1433-e1433, 2026. https://doi.org/10.56238/revgeov17n1-168

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species: ***Paubrasilia echinata*. Gland, Switzerland: International Union for Conservation of Nature,** 1998. Disponível em: https://www.iucnredlist.org/species/33974/9818224. Acesso em: 27 jul. 2026.

PIRES, G. P. et al. Effects of trimer repeats on *Psidium guajava* L. gene expression and prospection of functional microsatellite markers. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 9811, 2024. https://doi.org/10.1038/s41598-024-60417-8

RANI, Reena et al. Genetic diversity and population structure analysis in cultivated soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) using SSR and EST-SSR markers. **PLoS One**, v. 18, n. 5, p. e0286099, 2023. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286099

ROSA, P. et al. *Paubrasilia echinata* (Lam.) Gagnon, H.C.Lima & G.P.Lewis (Fabaceae) na Lista Vermelha da Flora Brasileira. Rio de Janeiro: **Centro Nacional de Conservação da Flora, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2024. Disponível em: https://cncflora.jbrj.gov.br/ficha/602728. Acesso em: 27 jul. 2026.

SCHUELER, J. O. et al. Light spectrum and explant type drive hormonal and proteomic reprogramming in micropropagation of the endangered *Paubrasilia echinata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** v. 164, n. 2, p. 49, 2026. https://doi.org/10.1007/s11240-026-03347-9

SIRTOLI, G. F. et al. T**ransferibilidade de marcadores SSR de buva (*Conyza canadensis*) para capim-amargoso (*Digitaria insularis*).** In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 27., 2023, São José dos Campos. Anais [...]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2023.

ZAIDAN, Iasmine Ramos et al. Germplasm characterization of half-sib families from seminal matricies of *Coffea canephora*. Agronomy Journal, v. 115, n. 1, p. 108-122, 2023. https://doi.org/10.1002/agj2.21224

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), por meio da concessão de bolsa (040/2023) e do financiamento (T.O. nº 860/2023).