

TRANSFERIBILIDADE DE MICROSSATÉLITES TRINUCLEOTÍDEOS DE REGIÕES CDS PARA *Coffea canephora*

Aline dos Santos Bergamin, Viviane Alexia Correia Silva, Stéffany de Freitas Badaró Rodrigues, Adésio Ferreira, Marcia Flores da Silva Ferreira

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, alinebergamin258@hotmail.com, vivianeac.correia@gmail.com, steffany.fbr@gmail.com, adesio.ferreira@ufes.br, mfloressf@gmail.com.

Resumo

Microsatélites de motivos trinucleotídeos são os mais frequentes em sequências codificadoras (CDS) em genomas de plantas. Estes SSR podem impactar no número de aminoácidos de uma proteína e, por consequência indicam a possibilidade de desenvolvimento de marcadores funcionais. Entretanto não se sabe sobre a taxa de transferibilidade e do tipo de polimorfismo destes marcadores. Neste estudo, 32 microsatélites descritos em regiões CDS para *Psidium guajava* foram testados quanto à transferibilidade para *C. canephora*, que representa cerca de 30% da produção mundial de café, visando desenvolvimento de novos marcadores moleculares para serem usados na certificação de mudas, como ferramenta molecular, pelo destaque de alto polimorfismo e aplicabilidade em fingerprinting. Houve 55% de transferibilidade, para indivíduos do clone Z13 e, destes, 12 mostraram polimorfismo em genótipos híbridos. Os resultados indicaram diversidade alélica moderada com número médio de alelos de 2.9 e PIC de 0.45, além da ausência de heterozigotos, mas com variação suficiente para distinguir genótipos. Os SSRs testados apresentam potencial para identificação genética, rastreabilidade e suporte à certificação de mudas em *C. canephora*.

Palavras-chave: Café Conilon. DNA *fingerprinting*. SSR.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias (Agricultura).

Introdução

A espécie *Coffea canephora* representa cerca de 30% da produção mundial de café, sendo o Espírito Santo o maior produtor nacional. Em escala comercial, as mudas de *C. canephora* são predominantemente obtidas por propagação vegetativa, especialmente via estaquia, assegurando a clonagem da constituição genética da planta matriz (Silva et al., 2023). De acordo com o Plano Estratégico de Desenvolvimento da Agricultura Capixaba (PEDEAG 4, 2023 - 2032), a baixa taxa de certificação e a insuficiência de fiscalização na produção de mudas representam obstáculos significativos para a cafeicultura estadual.

Com a crescente demanda por mudas de alta qualidade, torna-se essencial garantir a identificação genética precisa e confiável dos genótipos, portanto a identificação correta de clones é crucial não apenas para o melhoramento genético e registro de cultivares, mas também para assegurar a qualidade na produção e comercialização, fortalecendo toda a cadeia produtiva. Nesse contexto, ferramentas moleculares capazes de gerar dados genéticos robustos são essenciais para a identificação, conservação e caracterização do germoplasma de *C. canephora*.

Entre essas ferramentas, os marcadores microsatélites (SSR) são amplamente empregados em estudos de genética de populações, mapeamento de associação, fingerprinting de DNA, análise de diversidade e genômica funcional (Iqbal et al., 2021). O DNA fingerprinting utilizando SSR, é uma ferramenta eficaz para distinguir cultivares, variedades e linhagens a partir de perfis genéticos únicos (Gazendam, Mojapelo e Bairu, 2022). Os SSRs consistem em motivos repetidos em tandem de mono a decanucleotídeos e são valorizados por seu alto polimorfismo, codominância, multialelismo, ampla distribuição genômica e elevada reprodutibilidade, sendo recomendados para análises genéticas de plantas (Ahmad et al., 2018).

Sabe-se que microsatélites localizados em regiões codificadoras (CDS) apresentam maior transferibilidade entre espécies em comparação aos SSRs genômicos (Şuteu et al., 2024). Recentemente, Pires et al. (2024) descreveram SSRs trinucleotídicos em regiões codificadoras e expressas do genoma da goiabeira, com alto polimorfismo, que podem ser potencialmente aplicáveis ao café, destacando a importância de estudos sobre sua transferibilidade. Assim, o desenvolvimento

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

de novos microssatélites para *C. canephora* contribui para a construção de bancos de dados alélicos, permitindo a identificação segura de genótipos e apoio à comercialização de mudas.

Dessa forma, a caracterização e validação de SSRs transferíveis e polimórficos em *C. canephora* representa um avanço significativo para o desenvolvimento de bancos de dados genéticos e ferramentas confiáveis de identificação, aumentando a segurança na comercialização de mudas. O objetivo deste estudo foi testar a transferibilidade de SSRs trinucleotídicos em 13 genótipos de *C. canephora*, avaliando seu polimorfismo e potencial como ferramenta para identificação genética.

Metodologia

SSR em regiões codificadoras de *Psidium guajava* (Pires et al., 2024), tiveram a transferibilidade testada em duas amostras de DNA do clone Z13 de *Coffea canephora*. Foram utilizados 32 loci SSR para o teste de transferibilidade, e os marcadores que tiveram amplificação nessas amostras, foram selecionados para serem utilizados em um segundo conjunto de amostras.

Posteriormente o polimorfismo foi testado em 12 genótipos de *C. canephora* previamente caracterizados, por terem alta quantidade de loci em heterozigose. Devido a essa característica, esses materiais foram considerados apropriados para a etapa inicial de triagem dos marcadores microssatélites, considerando que aumentam a probabilidade de detecção de um maior número de polimorfismos. Esses materiais foram obtidos na Fazenda Experimental de Marilândia (FEM), pertencente ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper).

As amostras coletadas foram armazenadas no freezer a -80 °C por aproximadamente 24 horas, e em seguida liofilizadas por 72 horas e maceradas. Para extração de DNA foi utilizado o protocolo CTAB, com modificações (Zaidan et al., 2023), no qual utilizou-se 80 a 100 mg de tecido vegetal macerado. Em seguida, o DNA foi ressuspensão em 40 µL de TE com RNase (40 µg/mL) e deixado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotômetro, no Nanodrop™ 2000, e adotou-se o parâmetro de pureza com relação de absorbância de 260 a 280 nm (A260/A280), considerando a faixa ideal entre 1,8 até 2,0. A avaliação de integridade do DNA foi realizada através da eletroforese com gel de agarose a 0,8% corado com GelRed®, e as amostras extraídas foram diluídas para a concentração final de 20 ng µL⁻¹ de DNA e armazenadas em freezer a -20°C para serem utilizadas nas análises moleculares por SSRs.

As reações de PCR seguiram o protocolo da Sinapse Biotecnologia®, com volume final de 20 µL, contendo: 40 ng/µL de DNA, 1X PCR Buffer Mg2+ plus, 1 U de Taq DNA Polimerase (Sinapse Biotecnologia®), 0.2 µM 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, a 94 °C; 35 ciclos com 30 segundos, a 94 °C, 30 segundos, a 60 °C e um minuto, a 72 °C; extensão final de dez minutos, a 72 °C. Os produtos de PCR foram separados e visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), com uma corrente inicial de 80V por 30 minutos, seguida de 100V por 160 minutos.

A análise foi realizada no RStudio (Posit Team, 2025), utilizando os seguintes pacotes: readxl (Wickham; Bryam, 2025), tidyverse (Wickham et al., 2019), pegas (Paradis, 2010) e adegenet (Jombart, 2008). Foram estimados os seguintes 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).

Resultados

De 32 loci SSR obtidos avaliados (Pinto et al., 2024 e materiais disponíveis), 17 amplificaram nas amostras de DNA do clone Z13 (Tabela 1) representando aproximadamente 55% de transferibilidade. Os 17 loci SSR, foram então amplificados na população teste de 12 genótipos híbridos, e observou-se a amplificação de 12 loci dos 17, em toda a população testada.

Tabela 1. Transferibilidade de 17 loci SSR previamente descritos em regiões codificadoras de *Psidium guajava* para o clone Z13 de *Coffea canephora* e amplificação em híbridos. A tabela apresenta também o tamanho dos fragmentos amplificados (em pares de bases, pb) para cada marcador.

Loci SSR	Transferibilidade (Z13)	Amplificação (Híbridos)	Tamanho do fragmento (pb)
Pg16499	Sim	Sim	100

A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO**

Pg16451	Sim	Não	146
Pg20401	Sim	Sim	107
Pg21028	Sim	Não	107
Pg24968	Sim	Não	101
Pg31517	Sim	Sim	142
Pg33230	Sim	Não	126
Pg35383	Sim	Sim	121
Pg35926	Sim	Sim	158
Pg15660-2	Sim	Sim	137
Pg14098	Sim	Sim	145
Pg37450	Sim	Não	138
Pg13133	Sim	Sim	118
Pg31044	Sim	Sim	134
Pg26541	Sim	Sim	170
Pg59231	Sim	Sim	150
Pg31310	Sim	Sim	-

Fonte: os autores.

Os loci Pg13133 (*basic leucine-zipper - bZIP*) e Pg26541 (*AP2/ERF transcription factors*) apresentaram maior número de alelos e polimorfismo, dentre os 12 SSR transferidos. O número médio de alelos foi de 2,9 (Tabela 2). Além disso, todos os indivíduos amostrados foram homozigotos apresentando fixação completa de alelos, apesar da heterozigosidade esperada (0.48). O valor de PIC foi de 0.45 indicando informatividade moderada.

Foram encontrados alto nível de endogamia e estrutura genética restrita, onde a diversidade alélica existe, mas está distribuída entre indivíduos fixos para diferentes alelos, sem recombinação gerando heterozigotos.

Tabela 2. Descrição do número de alelos (Na), número de alelos efetivos (Ne), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), índice de conteúdo polimórfico (PIC) e coeficiente de endogamia (F) em *C. canephora*.

Loco	Nº de alelos	Ho	He	PIC	F
Pg13133	4	0	0.6806	0.6512	1
Pg14098	3	0	0.5	0.4745	1
Pg15660_2	2	0	0.4861	0.427	1
Pg16499	3	0	0.5694	0.537	1
Pg20401	3	0	0.625	0.5852	1
Pg26541	4	0	0.5139	0.4949	1
Pg31044	3	0	0.6446	0.6084	1
Pg31310	3	0	0.5417	0.5007	1
Pg31517	2	0	0.1528	0.1469	1
Pg35383	3	0	0.5785	0.5324	1
Pg35926	3	0	0.314	0.3029	1
Pg59231	2	0	0.1528	0.1469	1
Média	2.9166	0	0.4799	0.45066	1

Fonte: os autores.

Discussão

A transferibilidade de SSRs geralmente é estudada entre espécies do mesmo gênero ou, no máximo, dentro da mesma família botânica, visto que a proximidade filogenética aumenta as chances de sucesso na amplificação. Um exemplo recente foi descrito por Sirtoli *et al.* (2023), em que 19 primers SSR desenvolvidos para *Conyza canadensis* (família *Asteraceae*) apresentaram elevado índice de transferibilidade em *Digitaria insularis* (família *Poaceae*), com taxa de sucesso de 89.47%. Esse resultado reforça a possibilidade do uso de SSRs em grupos taxonômicos distantes, mas também evidencia a escassez de informações quando se trata de espécies pertencentes a famílias botânicas diferentes.

A análise de 12 loci microssatélites transferíveis para *Coffea canephora* revelou um nível moderado de polimorfismo, com média de 2.91 alelos por loco e conteúdo de informação polimórfica (PIC = 0.45). Esses parâmetros indicam que os SSRs testados apresentam capacidade satisfatória de distinguir entre genótipos, embora não representem alta diversidade quando comparados a outros estudos com SSRs genômicos (Iqbal *et al.*, 2021).

Apesar da heterozigosidade observada (H_o) ter sido nula em todos os locos analisados, resultando em coeficiente de fixação igual a 1, apresentando homozigosidade fixa nos indivíduos, mas diversidade entre os genótipos. Apesar de ser um material com alta variabilidade genotípica, observou-se a falta de heterozigotos, indicando a conservação de apenas um alelo por locus, o que pode refletir na expressão gênica da característica para o indivíduo. Dessa forma, reforçando que estes tipos de marcadores não são neutros e podem estar sob seleção. Em plantas, os trinucleotídeos são especialmente prevalentes em regiões codificadoras (CDS) em virtude da seleção negativa contra mutações de mudança de quadro e da seleção positiva para o alongamento de aminoácidos (Parvathy, Udayasuriyan, Bhadana, 2022).

Microssatélites já foram considerados marcadores neutros, entretanto, atualmente sabe-se que afetam a expressão gênica, desempenhando papéis em processos moleculares, celulares e metabólicos (Pires *et al.*, 2024). Em plantas, apesar dos estudos escassos a respeito dos SSRs trinucleotídeos em regiões codificadoras, evidências sugerem que eles influenciam a expressão gênica sob determinadas condições ambientais (Pires *et al.*, 2024). Um trabalho conduzido por Pires e colaboradores (2024) sugere que SSRs trinucleotídicos em regiões codificadoras da goiabeira podem influenciar o fenótipo por alterarem a sequência de aminoácidos, funcionando como marcadores funcionais, possibilitando associações entre variações genéticas e características fenotípicas.

Sendo assim, considerando que os SSRs avaliados são derivados de regiões codificadoras, seu potencial como marcadores funcionais não deve ser negligenciado. Tais marcadores podem futuramente ser explorados em estudos de associação genótipo-fenótipo, contribuindo não apenas para a identificação genética, mas também para programas de melhoramento com base em caracteres agrônômicos de interesse.

A validação de marcadores transferíveis, mesmo com nível moderado de polimorfismo, pode contribuir para a implementação de ferramentas confiáveis de rastreabilidade e certificação, aumentando a segurança da cadeia produtiva de *C. canephora*.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que os SSRs trinucleotídicos testados apresentam transferibilidade satisfatória, polimorfismo moderado e aplicabilidade para fingerprinting em *C. canephora*, sendo promissores como ferramenta de suporte à certificação de mudas e ao fortalecimento da cafeicultura capixaba.

Referências

Ahmad, A., Wang, J. D., Pan, Y. B., Sharif, R., & Gao, S. J. 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>

Ferrão, R. G.; Fonseca, A. F. A. DA.; Ferrão, M. A. G.; DE Muner, L. H. *Conilon Coffee: The coffea canephora produced in Brasil*. 3rd Updated and expanded. Vitória, ES: 2019, 974 p.

A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO**

Gazendam, I., Mojapelo, P., & Bairu, M. W. Potato cultivar identification in south Africa using a custom SNP panel. *Plants*, v. 11, n. 12, p. 1546, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11121546>

Iqbal, M. Z., Jamil, S., Shahzad, R., Bilal, K., Qaisar, R., Nisar, A., Bhatti, M. K. DNA fingerprinting of crops and its applications in the field of plant breeding. *Journal of Agricultural Research* (03681157), v. 59, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.58475/454vn066>

Jombart, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403-1405. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129

Paradis E (2010). "pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach." *Bioinformatics*, *26*, 419-420. doi:10.1093/bioinformatics/btp696 <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>>.

Parvathy, S. T., Udayasuriyan, V., & Bhadana, V. Codon usage bias. *Molecular biology reports*, v. 49, n. 1, p. 539-565, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06749-4>

Pires, G. P., Fioresi, V. S., Canal, D., Canal, D. C., Fernandes, M., Brustolini, O. J. B., da Silva Ferreira, M. F. 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>

Posit team (2025). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>.

Silva, J. A. D., Esposti, M. D. D., Senra, J. F. D. B., Comério, M., Conceição, A. O. D., Zacarias, A. J., ... & Raimundo, E. G. Morphophysiological responses of Conilon coffee matrix plants in a super-dense clonal garden. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 58, p. e03078, 2023. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2023.v58.03078>

Şuteu, D., Puşcaş, M., Băcilă, I., Balázs, Z. R., & Choler, P. Cross-species transferability of specific SSR markers from *Carex curvula* (Cyperaceae) to other *Carex* species. *Diversity*, v. 16, n. 2, p. 73, 2024. <https://doi.org/10.3390/d16020073>

Wickham H, Bryan J (2025). *_readxl: Read Excel Files_*. R package version 1.4.5, <<https://CRAN.R-project.org/package=readxl>>.

Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, Golemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen TL, Miller E, Bache SM, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H (2019). "Welcome to the tidyverse." *_Journal of Open Source Software_*, *4*(43), 1686. doi:10.21105/joss.01686 <<https://doi.org/10.21105/joss.01686>>

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) – projeto número 290/2024, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca (SEAG), à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e aos Laboratórios de Biometria e de Genética da UFES por todo o apoio.