

USO DA TÉCNICA DE *HIGH RESOLUTION MELTING* PARA A IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE PORTA-ENXERTOS DE LARANJA DOCE

Autores: Matheus Lopes Furtado Machado, Raphaella Luisa de Almeida, Karolinni Bianchi Britto, Taciane Cezar Boechat Silva, Clara Avelino Alves Henrique, Greiciane Gaburro Paneto.

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N, Guararema - 295000-000 - Alegre-ES, Brasil, matheus.l.machado@edu.ufes.br, raphaella.almeida@edu.ufes.br, karolbbritto@hotmail.com, taciane.silva@edu.ufes.br, clara.henrique@edu.ufes.br, greiciane.paneto@ufes.br.

Resumo

Este estudo teve por objetivo diferenciar, por técnicas moleculares, as principais espécies de porta-enxerto utilizadas no cultivo de laranja doce, tendo em vista a enorme dificuldade na identificação taxonômica de tais espécies. As amostras dos principais porta-enxertos foram coletadas no banco de germoplasma do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper) e devidamente sequenciadas por *DArT-Seq*. Utilizou-se de ferramentas de bioinformática para análise de dados, com a finalidade de encontrar polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP*) entre as espécies selecionadas. A partir disso, *primers* específicos foram desenhados e testados em *softwares* para controle de qualidade. Os *primers*, então, foram validados em bancada, amplificando as amostras na região de interesse. Após a amplificação, a técnica de *High Resolution Melting* (*HRM*) foi empregada. Com as análises das diferentes curvas de *melting* geradas, foi possível identificar e separar as variedades de porta-enxertos selecionadas neste estudo utilizando os *SNPs* e respectivos *primers* propostos de forma clara e reproduzível.

Palavras-chave: identificação. laranja. porta-enxerto. *SNP*. mudas.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas – Biologia Molecular

Introdução

O Brasil detém cerca de 34% da produção mundial de laranja e aproximadamente 71% da produção de suco de laranja global. Cerca de 75% do comércio internacional de suco da fruta provém do Brasil, gerando em toda sua cadeia citrícola em torno de 200 mil empregos, diretos ou indiretos, número equivalente a 10 vezes os empregos gerados pela cana-de-açúcar por hectare (Citrusbr, 2019). Em uma perspectiva estadual, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Espírito Santo, no ano de 2023, colheu cerca de 24 mil toneladas de laranjas, gerando uma estimativa de 47 milhões de reais de valor de produção (IBGE, 2023).

O sucesso dessa cultura, no entanto, está intimamente relacionado à escolha correta dos porta-enxertos – plantas utilizadas como portadoras de copas de outras espécie, a partir da técnica de enxertia – pois esses são os responsáveis diretos por conferir adaptações edafoclimáticas, tolerância a doenças e pragas dos citros, aumentando a produtividade e qualidade dos frutos (Gconci, 2023; Andrade, 2024; Soares *et al.*, 2015).

Exames biomoleculares se fazem necessários para a certificação dos porta-enxertos, visto que, quando desenvolvidos, os porta-enxertos não apresentam folhas, nem outros órgãos se não uma parcela inicial do caule e raiz. Tal característica torna inviável a classificação taxonômica por meio da anatomia vegetal foliar, uma vez que, o conjunto de caracteres mais úteis e preferido por taxonomistas para diferenciar espécies vegetais está relacionado às folhas, podendo citar: as características de tricoma, epiderme, cutícula e hipoderme (Pridgeon, 1982).

Para superar esse desafio de certificação, ferramentas moleculares utilizando polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP*) se fazem úteis. O *SNP* é, atualmente, o marcador molecular mais usado por pesquisadores para diferentes finalidades, sendo a principal escolha para a identificação de espécies (Wang *et al.*, 2023). Isso é devido a sua abundância genômica e facilidade de detecção. Além disso,

são as variações moleculares mais abundantes dentro de uma mesma espécie (Mammadov et al., 2012).

Outrossim, instrumentos de análises moleculares como o *High Resolution Melting* (HRM) acoplados à reação em cadeia da polimerase (PCR), se mostram eficientes para diferenciar espécies baseado em mudanças de uma única base nitrogenada (Erali et al., 2010; Pakbin et al., 2022). Essa técnica possui diversas vantagens, como custo baixo, rapidez, simplicidade de processo e menor probabilidade de erros, uma vez que ocorre em um único microtubo sem a necessidade de troca de recipiente. Somado a isso, o HRM é frequentemente indicado para o desenvolvimento, projeções e testes de identificação de espécies (Grazina et al., 2021). Acrescenta-se que, para a realização desse procedimento é indispensável um bom desenho de *primer* a partir de regiões que possuam SNPs previamente conhecidas, como também a previsão *in silico* de perfis de fusão (Pakbin et al., 2022).

Portanto, análises moleculares se fazem necessárias para a coerente diferenciação de porta-enxerto, evitando problemas de compatibilidade com a copa. Por meio do método *DART-seq*, SNPs são descobertos com alta precisão, e em conjunto à técnica de HRM, podem possibilitar a identificação de diferentes espécies de porta-enxerto de forma eficiente.

Metodologia

Foram utilizadas plantas indexadas, registradas e certificadas de cada clone, a partir do banco de germoplasma de citros do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), oriundas da coleção localizada em Venda Nova do Imigrante – ES, 29375-000, -20.3829745, -41.1994141. Foram coletadas folhas jovens e frescas, em 3 repetições. As espécies escolhidas para análise foram: *Citrus sunki* × *Poncirus trifoliata* 'Riverside', *Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata* 'Swingle', *Citrus limonia* Osbeck 'Limão Cravo Santa Cruz', *Citrus volkameriana* Pasq. 'volkameriana', *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki* (Hayata) Tanaka 'Sunki'. O pesquisador do Incaper, Dr. José Aires Ventura, selecionou previamente as amostras devido à sua importância regional e disponibilidade no banco de germoplasma.

Para a extração do DNA, foi coletado o material genômico do caule, utilizando-se o método de extração CTAB com modificações proposto por Arseneau et al. (2017).

Com base nas sequências contendo SNPs geradas pela tecnologia *DART-seq*, foram desenvolvidos e implementados *scripts* em *Python* com o objetivo de otimizar a seleção e análise desses marcadores moleculares. Para isso, foram utilizadas bibliotecas especializadas como *Pandas*, *numpy*, *io*, e *Bio*, que permitiram realizar filtragens específicas e organizar as informações necessárias para identificar e diferenciar cada genótipo dos porta-enxertos propostos. A seleção criteriosa dos SNPs foi direcionada para garantir que os marcadores escolhidos apresentassem alta especificidade e potencial de discriminação entre os genótipos analisados.

Após a etapa de seleção dos SNPs relevantes, as sequências contendo esses marcadores foram submetidas a um alinhamento com o genoma de referência de *Citrus sinensis* (NCBI Gene, 2025), utilizando o algoritmo *megablast*. Os primers foram desenhados utilizando o programa *Primer3Plus* (Untergasser et al., 2007). Além disso, a qualidade dos mesmos foi verificada utilizando o programa *Perlprimer* (Marshall, 2004). Realizou-se simulações *in silico* de curva de fusão entre os fragmentos de genomas que eram dotados de SNP específico, e os que não o possuíam. Para isso, utilizou-se o *software uMelt Quartz* (Dwight et al., 2011).

Por fim, os *primers* desenhados foram testados no laboratório para amplificação por PCR e análise por HRM. O preparo do mix para PCR/HRM foi realizado de seguinte forma: 0,3μM/μL de *primer forward* e 0,3μM/μL do *reverse* (10 μM), 2,5/μL do *buffer EvaGreen®* e água ultrapura q.s.p. Após o preparo do mix adicionou-se 5ng de DNA da amostra desejada, totalizando 5 μL por reação. Todas as reações preparadas foram realizadas em termociclador *LightCycler®* e os resultados foram gerados em *software* próprio do equipamento para posterior análise.

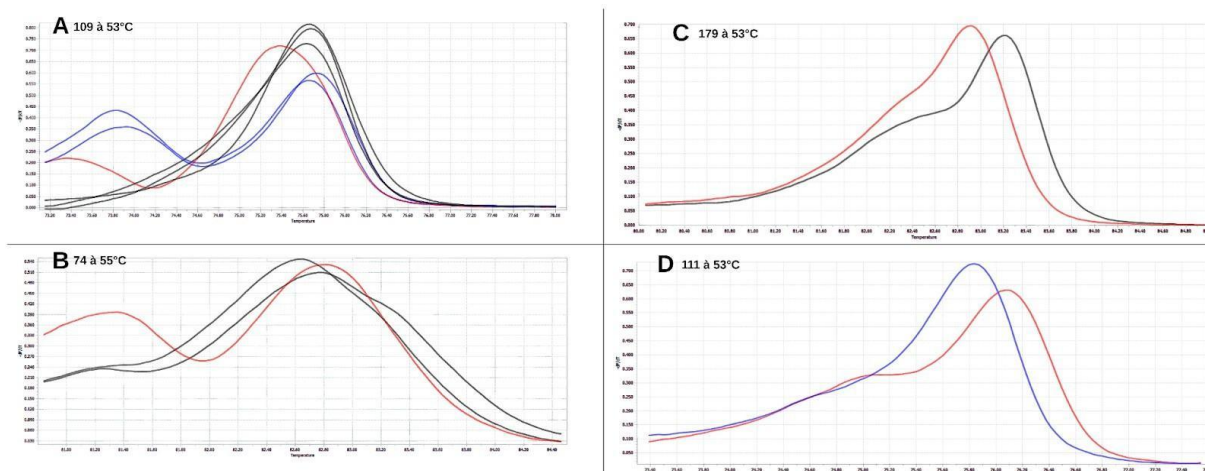
Resultados

Seis regiões genômicas contendo variações polimórficas foram selecionadas para a construção de primers para serem usados na PCR em tempo real seguida de HRM, a fim de possibilitar a identificação das cultivares propostas. Os *primers* específicos das seis regiões foram testados *in silico*, por meio dos *softwares PerlPrimer*, para averiguar presença de anelamentos indevidos, e *uMelt*, para assegurar a diferença de temperatura entre os *amplicons*. Após isso, no laboratório esses

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

primers isolaram as espécies selecionadas por meio da técnica HRM (Figura 1). As temperaturas usadas foram selecionadas por meio das recomendações do *Primer3Plus*, somado às recomendações dos fabricantes após a síntese dos mesmos. Na figura abaixo serão apresentados os resultados obtidos após o teste em bancada dos quatro *primers* selecionados (Figura 1).

Figura 1 - Resultados das curvas de melting, normalizado.



Fonte: software LightCycler® 96 v1.1 (Roche).

Em A, tem-se a divisão inicial de grupos e isolamento da primeira amostra. A curva em vermelho representa o perfil de fusão da amostra *P. trifoliata* que possui mudança de nucleotídeo para timina em vez de guanina, como as outras variedades. Em azul as amostras *C. limonia* e *Volkameriana* agrupados em um grupo. E um terceiro grupo em preto é formado, composto pelas amostras: *Swingle*, *Riverside* e *Sunki*.

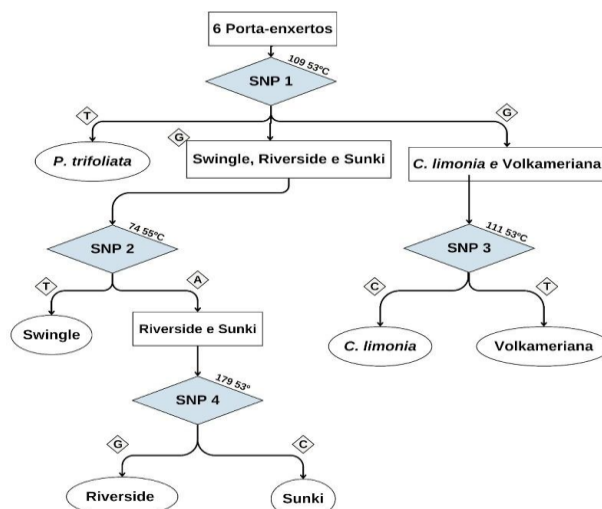
No gráfico B, evidencia-se em vermelho o isolamento da variedade *Swingle*, com timina (T) sendo o SNP. Por outro lado, em preto, o agrupamento das amostras *Riverside* e *Sunki*, ambas com adenina (A).

Em C, representa em vermelho a amostra de *Riverside*, com guanina, e em preto a variedade *Sunki*, que possui citosina.

Por último, em D, as amostras *C. limonia* em azul (C) e *Volkameriana* em azul, (T) se separam de forma conclusiva.

Para demonstrar a separação das variedades selecionadas por meios dos SNPs propostos, de forma visual, foi elaborada uma árvore de decisão esquemática (Figura 2).

Figura 2 – árvore de decisão.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Discussão

A região do *SNP* 1, amplificada pelo *primer* 109 (nome conferido ao *primer* devido o tamanho do fragmento – em pares de base – que o mesmo amplifica) à 53°C, foi desenhado a priori para separar a amostra de *P. trifoliata* que possui timina (T) enquanto na mesma posição o restante das amostras possuem guanina (G). Entretanto, como se visualiza na Figura 1, as outras amostras, que não *P. trifoliata*, ao contrário do esperado, se dividiram em dois outros grupos. Podemos presumir que isso se deve aos *SNPs* ocultos na região de amplificação. Esses *SNPs*, somente podem ser encontrados por meio do sequenciamento do amplicon (Liu *et al.*, 2020). . No entanto, os resultados foram úteis e confiáveis, pois se repetiram nas demais replicatas.

Outrossim, a sequência da árvore de decisão (Figura 2) condiz com todos os resultados obtidos por meio de técnica de *High Resolution Melting* (Figura 1).

Ademais, estudos similares, mas com espécies diferentes, corroboram com os resultados obtidos neste trabalho. Três variedades de uvas foram testadas e separadas entre si a partir de reações de *HRM* (GOMES *et al.*, 2018). Da mesma forma, populações de milho puderam ser discriminadas pela mesma técnica (Shang *et al.*, 2021).

Conclusão

Ao término deste estudo, foi possível concluir que as seis amostras selecionadas foram identificadas e separadas a partir dos 4 *SNPs* escolhidos, utilizando-se de *primers* específicos e da técnica de reação de *HRM*. Portanto, a técnica de *HRM* foi bastante sensível a pequenas alterações de bases, mesmo as que não conseguimos definir, visto que o isolamento de todos os porta-enxertos foi realizado com êxito, a partir de pequenas mudanças de nucleotídeo. O uso de tal técnica tem o potencial de favorecer o mercado de citros brasileiro, uma vez que prejuízos que são causados pela utilização equivocada de porta-enxertos podem ser previamente solucionados. Essa metodologia é simples, rápida e econômica de identificação biomolecular, sendo um significativo avanço tecnológico na área. Além disso, não há empecilhos para que o potencial desse procedimento não seja explorado em outras espécies, o que tem poder de contribuir, significativamente, com uma agricultura ainda mais forte, sustentável e tecnológica.

Referências

- ACANDRADE, L. L. de. **Caracterização da resposta de laranjeira-doce sobre porta-enxertos potencialmente resistentes à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus***. 2024. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2024. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstreams/2ccd57bb-b910-4459-8cc9-eb114e69e64f/download>. Acesso em: 10 ago. 2025.
- ARSENEAU, J. R.; STEEVES, R.; LAFLAMME, M. Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 4, p. 686-693, jul. 2017. DOI: 10.1111/1755-0998.12616. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27768249/>. Acesso em: 12 ago. 2025.
- CITRUSBR. A cadeia do suco de laranja brasileiro. São Paulo: **CitrusBR**, 2019. Disponível em: <https://citrusbr.com/biblioteca/publicacoes-citrusbr/>. Acesso em: 10 ago. 2025.
- DWIGHT, Z.; PALAIS, R.; WITTEWER, C. T. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. **Bioinformatics**, v. 27, n. 7, p. 1019-1020, abr. 2011. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr065. Disponível em: <https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/umb.php>. Acesso em: 12 ago. 2025.
- ERALI, M.; WITTEWER, C. T. High resolution melting analysis for gene scanning. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 250-261, abr. 2010. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20085814/>. Acesso em: 11 ago. 2025.

GCONCI. Avaliação e controle de riscos ambientais e ocupacionais. **Revista Gconci**, ano XXX, n. 144, 2023. Disponível em: <https://www.gconci.com.br/Conteudo/Pdf/Revistas/144.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2025.

GOMES, S.; CASTRO, C.; BARRIAS, S.; PEREIRA, L.; JORGE, P.; FERNANDES, J., R.; LOPES, P. Alternative SNP detection platforms, HRM and biosensors, for varietal identification in *Vitis vinifera* L. using F3H and LDOX genes. **Scientific Reports**, v. 8, p. 5850, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-24158-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24158-9>. Acesso em: 13 ago. 2025.

GRAZINA, L.; COSTA, J.; AMARAL, J. S.; MAFRA, I. High-resolution melting analysis as a tool for plant species authentication. In: GRAZINA, L.; COSTA, J.; AMARAL, J. S.; MAFRA, I. (ed.). Crop Breeding. Cham: **Springer**, 2021. p. 55-73. DOI: 10.1007/978-1-0716-1201-9_5. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/347298491_High-Resolution_Melting_Analysis_as_a_Tool_for_Plant_Species_Authentication. Acesso em: 11 ago. 2025.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agropecuária: laranja**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/laranja/es>. Acesso em: 10 ago. 2025.

LIU, Z.; MA, Y.; WU, L.; et al. Genetic diversity and population structure of a worldwide collection of cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *sativa* L.) germplasm as revealed by high-throughput SNP markers. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 387, 2020. DOI: 10.1186/s12864-020-07240-3. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-020-07240-3>. Acesso em: 23 set. 2025.

MAMMADOV, J.; AGGARWAL, R.; BUYYARAPU, R.; KUMPATLA, S. SNP markers and their impact on plant breeding. **International Journal of Plant Genomics**, 2012, Art. ID 728398, 11 p. DOI: 10.1155/2012/728398. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536327/>. Acesso em: 14 ago. 2025.

MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, v. 20, n. 15, p. 2471-2472, ago. 2004. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth254. Disponível em: <https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/umb.php>. Acesso em: 12 ago. 2025.

NCBI GENE. **Citrus sinensis genome assembly DVS_A1.0. GCF_022201045.2**. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/gene/GCF_022201045.2/. Acesso em: 12 ago. 2025.

PAKBIN, B.; AKHONDAZADEH BASTI, A.; KHANJARI, A. et al. Development of high-resolution melting (HRM) assay to differentiate the species of *Shigella* isolates from stool and food samples. **Scientific Reports**, v. 12, p. 473, 2022. DOI: 10.1038/s41598-021-04484-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-04484-1>. Acesso em: 11 ago. 2025.

PRIDGEON, A. M. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 69, p. 921-938, 1982. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2442889>. Acesso em: 10 ago. 2025.

SHANG, Z.; ZHU, Y.; GUO, X.; ZHAO, M. Identificação de marcadores polimórficos por ensaio de fusão de alta resolução (HRM) para genotipagem de SNP de alto rendimento em milho. **Phyton-International Journal of Experimental botany**, 2021. DOI: 10.32604/phyton.2021.015048. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/org/science/article/pii/S0031945721000162>. Acesso em: 13 ago.

SOARES, L. A. dos A.; BRITO, M. E. B.; FERNANDES, P. D.; LIMA, G. S. de; SOARES FILHO, W.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

dos S.; OLIVEIRA, E. S. de. Crescimento de combinações copa–porta–enxerto de citros sob estresse hídrico em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 3, p. 211-217, mar. 2015. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v19n3p211-217. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbeaa/a/Y7bTF8yz7Kh7dcXmKV8357y/>. Acesso em: 11 ago. 2025.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl_2, p. W71-W74, jul. 2007. DOI: 10.1093/nar/gkm306. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/35/suppl_2/W71/2922185. Acesso em: 12 ago. 2025.

WANG, L.; XUN, H.; AKTAR, S.; ZHANG, R.; WU, L.; NI, D.; WEI, K.; WANG, L. Development of SNP markers for original analysis and germplasm identification in *Camellia sinensis*. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 162, 2023. DOI: 10.3390/plants12010162. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/1/162>. Acesso em: 14 ago. 2025.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (Fapes) – Termo de outorga 744/2024.