

DETECÇÃO DE SNPs E DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS PARA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE *CITRUS SINENSIS* POR qPCR-HRM

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

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/n, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, claravelinoah@gmail.com, dealmeidarlf@gmail.com, matheus.l.machado@edu.ufes.br, taciane.silva@edu.ufes.br, karolbbritto@hotmail.com, greiciane.paneto@ufes.br

Resumo

A identificação de cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis*) é essencial para certificação e rastreabilidade, mas a elevada semelhança morfológica entre elas representa um desafio. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar reações de qPCR-HRM para a identificação genética de cultivares de *C. sinensis*. Foram coletadas e caracterizadas amostras de quatro genótipos: Natal Embrapa, Natal Folha Murcha, Natal EEL/IAC e Navelina Embrapa. O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB modificado. A partir do sequenciamento de laranjas doces, SNPs foram selecionados e três pares de *primers* foram desenhados e validados *in silico*. As análises de qPCR-HRM foram conduzidas no equipamento LightCycler® 96 System. Os resultados demonstram que a metodologia baseada em qPCR-HRM é uma estratégia robusta para a genotipagem e diferenciação entre cultivares de *C. sinensis*, contribuindo para sistemas de certificação e para a segurança da cadeia produtiva de citros.

Palavras-chave: Citricultura. Polimorfismos genéticos. SNP. qPCR. HRM.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas. Biologia Molecular.

Introdução

O gênero *Citrus* (*Rutaceae*) tem origem no Sudeste Asiático (SWINGLE; REECE, 1967) e compreende espécies como limões (*C. limon*), pomelos (*C. maxima*), tangerinas (*C. reticulata*) e a laranja doce (*C. sinensis*) (ITIS, 2025). A maioria se reproduz assexuadamente a partir do tecido nucelar do óvulo da planta-mãe (apomixia esporófitica), resultando em mudas geralmente com a mesma composição genética à planta-mãe (SOOST; ROOSE, 1996). Uma das principais dificuldades na diferenciação entre cultivares de *Citrus* é sua semelhança morfológica e genética, devido à mutações somáticas espontâneas em um ramo específico (*bud* ou *limbs sports*) ou que surgem por apomixia (HODGSON, 1967). Assim, há variações genéticas devido a hibridação natural, dando origem a vários fenótipos, sugerindo uma espécie com muitas cultivares (MOORE, 2001).

Dentre as cultivares, destaca-se a laranja doce (*Citrus x sinensis* L. Osbeck), um híbrido interespecífico resultante do cruzamento entre tangerina (*C. reticulata*) e pomelo (*C. maxima*) (XU *et al.*, 2013). Um dos parâmetros fundamentais na análise de mudas cítricas é a identidade genética (IBPGR, 1988), que assegura o padrão e a qualidade do material propagativo (EMBRAPA, 2023). Com produção mundial de cerca de 77,6 milhões de toneladas em 2023, o Brasil destaca-se como maior produtor e exportador de suco de laranja, reforçando a relevância da espécie na cadeia produtiva (FAO, 2023). Devido sua importância econômica, aproximadamente 3 milhões de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) foram identificados em variedades de laranja doce, demonstrando o alto nível de polimorfismo entre as cultivares (FENG *et al.*, 2021).

Neste contexto, observa-se o potencial dos SNPs, no qual podem ser identificados através da metodologia DarT-seq (KILIAN *et al.*, 2012). Diante desse cenário, o objetivo deste trabalho é desenvolver e padronizar reações de HRM para a identificação genética de cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis*) — Natal Embrapa, Natal Folha Murcha, Natal EEL/IAC e Navelina Embrapa — cultivadas no sul do Espírito Santo, com o objetivo de estabelecer uma técnica rápida, precisa e de baixo custo para a certificação molecular de mudas cítricas.

Metodologia

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Foram utilizadas plantas indexadas, certificadas e registradas, a partir do banco de germoplasma de citros do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), através da coleção localizada em Venda Nova do Imigrante – ES. Foram coletadas folhas jovens de 4 genótipos, com três plantas por acesso: Natal Embrapa, Natal Folha Murcha, Natal EEL/IAC e Navelina Embrapa. O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB com modificações (ARSENEAU; STEEVES; LAFLAMME, 2017).

O genoma de referência de *C. sinensis* (var. *Valencia Orange*, NCBI GCA_963573335.1) foi utilizado para mapear os SNPs e criar banco local com makeblastdb (NCBI BLAST+). Através de scripts *in houses*, as sequências foram comparadas com a análise DArT-seq geradas em um estudo prévio a este e alinhadas ao genoma de referência (NCBI GCF_022201045.2) pelo algoritmo megablast. Os primers foram desenhados no PRIMER3WEB v.4.0.0 (<https://primer3.ut.ee>), avaliados no PERLPRIMER, PRIMER-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e uMELT QUARTZ (<https://dna-utah.org/umelt/quartz>).

A validação dos *primers* foi realizada por PCR, utilizando 2 µL de DNA (20 ng/µL) em 35 ciclos: desnaturação a 94 °C, anelamento a 55 °C (SNP 1 e SNP 2) ou 51 °C (SNP 3); e extensão a 72 °C. A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com GelRed®, em tampão TBE 1x, a 80 V, durante 30 minutos, visualizados sob luz UV, utilizando o software Image Lab® (<https://www.bio-rad.com/en-us/product/image-lab-software>). As amostras validadas foram submetidas à qPCR-HRM, em reações de 5 µL com SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, EUA): 2,5 µL de buffer EvaGreen®, 0,15 µL de primer *forward* (300 µM), 0,15 µL de primer *reverse* (300 µM), 1 µL de DNA genômico (5 ng/µL) e água ultrapura q.s.p. As reações foram conduzidas no LightCycler® 96 System e analisadas no LightCycler® 96 Software v1.1 (ROCHE, 2021), com pré-incubação a 98 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos: 98 °C/15 s, 55 °C ou 51 °C/30 s, 68 °C/30 s. A etapa de HRM foi realizada com 95 °C/1 min, 40 °C/1 min e aumento gradual de 65 °C a 97 °C, com coleta contínua de fluorescência.

Resultados

O DNA genômico das 12 extrações foi quantificado em 1 µL de amostra no espectrofotômetro NanoDrop™ (Tabela 1).

Tabela 1 – Quantificação do DNA extraído das amostras selecionadas no Nanodrop.

Amostra	Quantidade ng/µL	260/280	260/230
1. Natal Embrapa	775,9	1,9	2,2
2. Natal Embrapa	430,5	1,9	2,1
3. Natal Embrapa	465,2	1,8	1,9
1. Natal Folha Murcha	495,1	1,9	2,1
2. Natal Folha Murcha	357,3	1,8	2,1
3. Natal Folha Murcha	300,3	1,8	2,1
1. Natal EEL/IAC	379,1	1,8	2,1

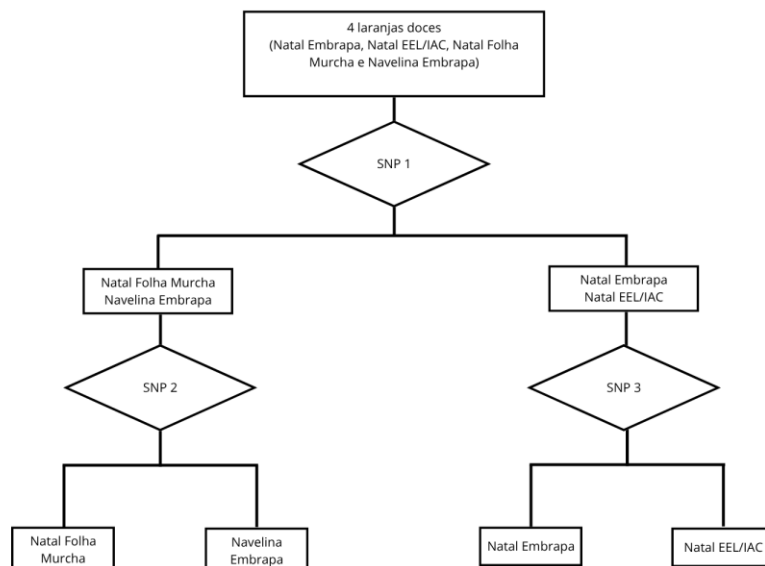
A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Amostra	Quantidade ng/ μ L	260/280	260/230
2. Natal EEL/IAC	403,6	1,8	2,1
3. Natal EEL/IAC	323,1	1,8	2,1
1. Navelina Embrapa	293,9	1,9	2,2
2. Navelina Embrapa	381,8	1,9	2,1
3. Navelina Embrapa	421,0	1,8	2,1

Fonte: A autora (2025).

A escolha dos três SNPs para análise HRM baseou-se na diferenciação inequívoca da cultivar de interesse em relação às demais. O SNP 1 distinguiu dois grupos: Natal Folha Murcha e Navelina Embrapa (heterozigoto) e Natal EEL/IAC e Natal Embrapa (homozigotos); o SNP 2 separou Natal Folha Murcha (homozigoto) de Navelina Embrapa (homozigoto); e o SNP 3 diferenciou Natal EEL/IAC (homozigoto) de Natal Embrapa® (Figura 1). Os *primers* desenhados variaram de 100-200 pb e simulações *in silico* no uMELT QUARTZ confirmaram picos de melting com diferença mínima de 0,5 °C (Figura 2). As bandas observadas apresentaram tamanhos compatíveis com os previstos pelos *primers*, conforme o marcador de 50 pb (Figura 3).

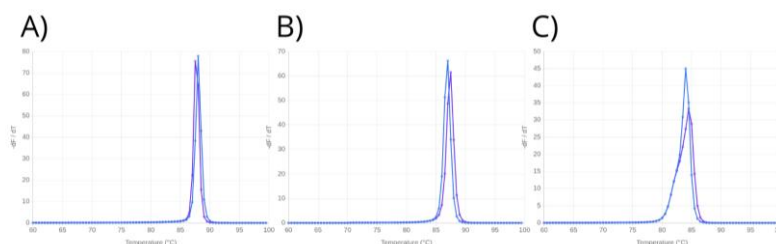
Figura 1 - Árvore de decisão construída a partir de três regiões SNP polimórficas selecionadas.



Fonte: A autora (2025).

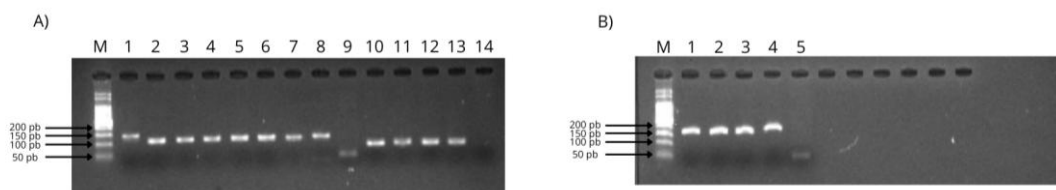
Figura 2 - Curvas de *melting* geradas no uMELT. (A) *Primer* SNP 1. (B) *Primer* SNP 2. (C) *Primer* SNP 3.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO



Fonte: A autora (2025).

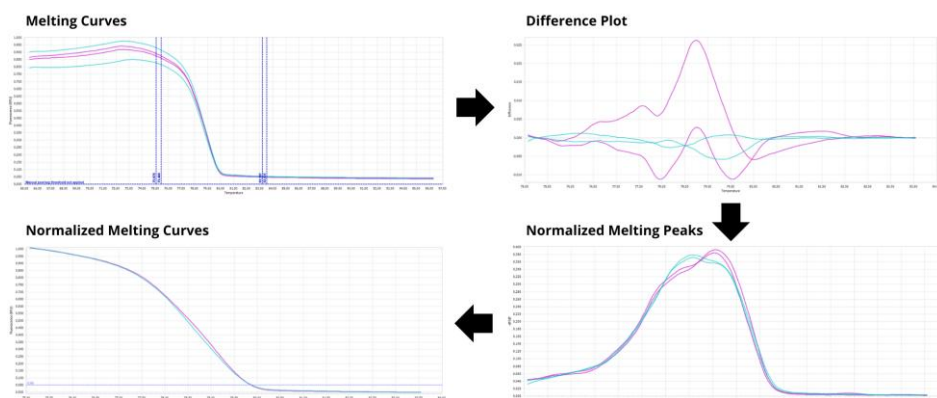
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos de PCR com os três pares de *primers* desenvolvidos. (A) *Primers* SNP 1: Natal Embrapa, Natal EEL/IAC, Natal Folha Murcha e Navelina Embrapa (linhas 1–8); *primers* SNP 2: Natal Folha Murcha e Navelina Embrapa (linhas 10–13). (B) *Primer* SNP 3: Natal Embrapa e Natal EEL/IAC (linhas 1–4). As linhas 5, 9 e 14 correspondem aos controles negativos. M: marcador de 50 pb. Amostras exibem suas repetições biológicas.



Fonte: A autora (2025).

As curvas de *melting* do marcador SNP 1 revelaram perfis bem definidos, com separação clara entre os grupos, sendo a amplificação realizada com temperatura de anelamento de 55 °C. As amostras Natal Folha Murcha e Navelina Embrapa apresentaram o alelo heterozigoto, enquanto as amostras Natal Embrapa e Natal EEL/IAC foram identificadas como homozigotas. O *primer* SNP 2 obteve sucesso na discriminação alélica de homozigotos, utilizando temperatura de anelamento de 55 °C. Essa reação permitiu distinguir a amostra Natal Folha Murcha da amostra Navelina Embrapa, ambas portadoras do alelo homozigoto. O *primer* SNP 3 foi desenvolvido para separar a amostra Natal EEL/IAC (homozigoto) da amostra Natal Embrapa (homozigoto), com temperatura de anelamento de 51 °C (Figura 4). As curvas de *melting* obtidas para as repetições biológicas de cada amostra e para cada par de *primer* apresentaram perfis coincidentes.

Figura 4 - Análise de HRM do marcador SNP 3 realizada no LightCycler® 96 v1.1 (Roche). Curvas rosa: Natal EEL/IAC (homozigoto); curvas azuis: Natal Embrapa.



Fonte: A autora (2025).

Discussão

As concentrações de DNA obtidas variaram entre 293,924 ng/μL e 775,938 ng/μL, com razões 260/280 e 260/230 dentro da faixa considerada aceitável para DNA de alta qualidade. Resultados semelhantes foram observados por Arseneau, Steeves e Laflamme (2017), que utilizaram o método CTAB modificado e obtiveram razões 260/280 próximas de 2,0, indicando pureza adequada para aplicações genômicas. O tamanho do primer é um fator determinante na sensibilidade da análise de HRM, sendo recomendável que não ultrapasse 300 pares de bases. Amplicons maiores tendem a reduzir a diferença na curva de melting provocada por pequenas variações na sequência, dificultando a detecção de polimorfismos (DRUML; CICHNA-MARKL, 2017). Fragmentos longos podem apresentar múltiplos domínios de dissociação, gerando perfis mais complexos e de interpretação difícil.

Além disso, o perfil de dissociação de um produto de PCR depende de seu conteúdo de GC, comprimento, sequência e complementaridade de fita (heterozigosidade), a análise de HRM é altamente aplicável para a Vossen *et al.* (2009), detecção de variantes de sequência (REED; KENT; WITTEWER, 2007). Segundo as curvas de amostras heterozigotas exibem um padrão distinto, resultado da formação simultânea de homoduplexos, com maior estabilidade e dissociação em temperaturas mais altas, e heteroduplexos, que possuem pareamentos imperfeitos e, por isso, fundem em temperaturas mais baixas. Este estudo apresenta limitações, como no número de genótipos avaliados, além do painel contemplar apenas três SNPs, o que limita a extrapolação para uma gama maior de cultivares e condições experimentais. Este estudo encontra-se em andamento, sendo os resultados aqui apresentados de caráter preliminar, dado que análises adicionais ainda serão desenvolvidas para ampliar a validação dos marcadores.

Conclusão

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a abordagem baseada em qPCR-HRM é uma ferramenta robusta, reprodutível e acessível para identificação genética de cultivares de laranja doce, podendo ser implementada como metodologia complementar ou alternativa às técnicas tradicionais de genotipagem, especialmente em programas de melhoramento e certificação vegetal.

Referências

- 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, 2017.
- DRUML, B.; CICHNA-MARKL, M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA—its role and potential in food analysis. **Food Chemistry**, v. 230, p. 217–226, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>
- EMBRAPA. Sistema de produção de mudas de citros. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2023. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1155982>. Acesso em: 10 jul. 2025.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT – Crops and livestock products: Oranges, Production Quantity, 2023. Roma: FAO, 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 09 jul. 2025.
- FENG, G. *et al.* Genomic and transcriptomic analyses of Citrus sinensis varieties provide insights into Valencia orange fruit mastication trait formation. **Horticulture Research**, v. 8, p. 218, 2021. DOI: 10.1038/s41438-021-00653-5.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION of the United Nations; INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES – FAO/IBPGR. FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm. Roma: FAO/IBPGR, 1988.
- HODGSON, R. W. Horticultural varieties of Citrus. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The Citrus Industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p.

431–591.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM (ITIS). [S. l.: s. n.], 2025. Disponível em: <https://www.itis.gov>. Acesso em: 7 jul. 2025.

KILIAN, A. *et al.* Diversity Arrays Technology: A Generic Genome Profiling Technology on Open Platforms. **Methods in Molecular Biology**, v. 888, p. 67-89, 2012. DOI: 10.1007/978-1-61779-870-2_5.

MOORE, G. A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 9, p. 536-540, set. 2001. DOI: 10.1016/s0168-9525(01)02442-8.

REED, G. H., KENT, J. O., WITTEWER, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, 2007, 8(6), 597–608.

ROCHE. LightCycler® 96 System Software v1.1: Operator Manual. Roche Diagnostics, 2021. Disponível em: <https://diagnostics.roche.com>. Acesso em: 19 jul. 2025.

SOOST, R. K.; ROOSE, M. L. Citrus. In: JANICK, Jules; MOORE, James N. (eds.). **Fruit breeding, volume I: tree and tropical fruits**. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 257-333.

SWINGLE, W.T., REECE, P.C. The botany of Citrus and its wild relatives. **The citrus industry**. 1. History, world distribution, botany and varieties. éd., Berkeley, Etats-Unis, University of California Press, pp. 190–430, 1967.

VOSSEN, R. H. A. M. *et al.* High-resolution melting analysis (HRMA) – More than just sequence variant screening. **Human Mutation**, 2009, 30(6), 860–866.

XU, Q. *et al.* The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature Genetics**, v. 45, n. 1, p. 59-66, jan. 2013.