

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

FRANCISCO ORLANDO NETO HAUKE DINIZ

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE MOLECULAR DE SELEÇÕES DE LIMEIRA
ÁCIDA ‘TAHITI’**

Ilha Solteira - SP

2024



FRANCISCO ORLANDO NETO HAUK DINIZ

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE MOLECULAR DE SELEÇÕES DE LIMEIRA
ÁCIDA ‘TAHITI’**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Câmpus de Ilha Solteira-SP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Sistemas de Produção).

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues

Ilha Solteira - SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

D585a Diniz, Francisco Orlando Neto Hauk.
Análise da variabilidade molecular de seleções de limeira ácida 'Tahiti' /
Francisco Orlando Neto Hauk Diniz. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2024
43 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2024.

Orientador: Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues
Inclui bibliografia

1. Citrus Latifolia Tan. 2. Citricultura. 3. Mutação espontânea. 4. Metilação
do DNA. 5. Epigenética. 6. Análise molecular.

IMPACTO POTENCIAL DA PESQUISA

A pesquisa sobre a variabilidade molecular em seleções de limeira ácida ‘Tahiti’ contribui de forma significativa para o campo da agronomia e citricultura, com impacto direto na sustentabilidade e na produtividade agrícola. Este estudo se concentra na caracterização molecular de variantes espontâneas da limeira ácida ‘Tahiti’ usando quantificação de metilação de DNA e análise de marcadores microssatélites, ferramentas fundamentais para a compreensão das diferenças fenotípicas e resistência a estresses abióticos e bióticos. Identificar e selecionar plantas com potencial agrônomo a partir dessas mutações somáticas contribui não apenas para a diversidade genética dos citros, mas também para a resiliência a fatores ambientais adversos, um fator crucial em um cenário de mudanças climáticas e crescente demanda global por alimentos sustentáveis.

A aplicação dos resultados dessa pesquisa transcende a análise acadêmica e impacta práticas agrônômicas de melhoramento genético ao possibilitar a seleção de plantas com características desejáveis, como resistência a doenças, maior rendimento e frutos com qualidades superiores. Isso tem o potencial de fortalecer a citricultura brasileira, uma vez que a cultura da limeira ácida ‘Tahiti’ é uma das que se destacam no país, gerando emprego e renda nas regiões produtoras.

Além disso, a abordagem epigenética adotada, ao avaliar a metilação do DNA e sua relação com características fenotípicas, abre novas possibilidades para o desenvolvimento de cultivares aprimoradas por meio de técnicas de seleção epigenética. Esse enfoque promove uma alternativa sustentável e inovadora ao melhoramento tradicional, alinhando-se às demandas atuais de práticas agrícolas mais sustentáveis e menos dependentes de insumos externos. Portanto, essa pesquisa representa uma contribuição valiosa para o fortalecimento da citricultura nacional, aprimorando a capacidade do setor agrícola de enfrentar desafios futuros e promover a segurança alimentar e ambiental.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The research on molecular variability in 'Tahiti' acid lime selections significantly contributes to the fields of agronomy and citrus cultivation, with a direct impact on sustainability and agricultural productivity. This study focuses on the molecular characterization of spontaneous variants in 'Tahiti' acid lime, using DNA methylation quantification and microsatellite marker analysis—key tools for understanding phenotypic differences and resistance to abiotic and biotic stresses. Identifying and selecting plants with agronomic potential based on these somatic mutations not only enhances the genetic diversity of citrus but also boosts resilience to adverse environmental factors, which is crucial in a context of climate change and growing global demand for sustainable food.

The application of these research findings goes beyond academic analysis and directly influences agronomic practices in genetic improvement by enabling the selection of plants with desirable traits, such as disease resistance, higher yields, and superior fruit quality. This has the potential to strengthen Brazilian citrus farming, as 'Tahiti' acid lime is one of the country's most prominent crops, generating employment and income, especially in key production regions.

Furthermore, the epigenetic approach adopted in this study, which assesses DNA methylation and its relationship with phenotypic traits, opens new possibilities for developing improved cultivars through epigenetic selection techniques. This approach promotes a sustainable and innovative alternative to traditional breeding, aligning with the current demand for more sustainable agricultural practices that rely less on external inputs. Therefore, this research represents a valuable contribution to strengthening national citrus farming, enhancing the agricultural sector's ability to face future challenges and promoting both food and environmental security.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE DA VARIABILIDADE MOLECULAR DE SELEÇÕES DE LIMEIRA
ÁCIDA 'TAHITI'

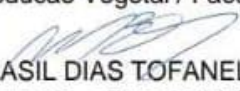
AUTOR: FRANCISCO ORLANDO NETO HAUK DINIZ

ORIENTADORA: MARIA GABRIELA FONTANETTI RODRIGUES

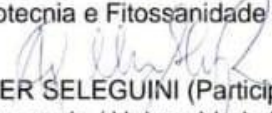
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, área:
Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA GABRIELA FONTANETTI RODRIGUES (Participação Virtual)
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - UNESP



Prof. Dr. MAURO BRASIL DIAS TOFANELLI (Participação Virtual)
Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade / Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof. Dr. ALEXSANDER SELEGUINI (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia / Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Ilha Solteira, 29 de novembro de 2024

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação foi um desafio gratificante, e muitas pessoas e instituições contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Agradeço a Deus, pela força, sabedoria e saúde que me permitiram seguir firme nesta caminhada. Agradeço também à minha família pelo apoio e suporte essenciais ao longo deste percurso.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues, minha profunda gratidão por toda a orientação, paciência e dedicação ao longo de todo o processo. Sua expertise e apoio constante foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, e seus ensinamentos permanecerão comigo para além desta etapa.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo suporte financeiro, essencial para a realização desta pesquisa (Código de Financiamento 001).

À Fazenda Costa Mello, pela disponibilização das plantas de lima ácida 'Tahiti' e pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa, que foi crucial para a concretização dos resultados aqui apresentados.

Por fim, agradeço a mim por nunca ter desistido, pela perseverança, esforço e dedicação ao longo desta jornada. Os desafios foram muitos, mas a vontade de aprender e de crescer academicamente sempre falaram mais alto, e é com orgulho que concluo esta etapa.

RESUMO

A lima ácida 'Tahiti' está entre as principais frutíferas produzidas pelo Brasil, se destacando pela grande importância econômica. Porém, sua natureza triploide e a vulnerabilidade a doenças trazem desafios para melhoramento genético da cultura. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo a caracterização molecular de seleções de plantas de limeira ácida 'Tahiti', por meio da quantificação da metilação do DNA e da diferenciação genética por marcadores microsatélites, a fim de subsidiar trabalhos de conservação e melhoramento genético da cultura. Para tanto foram utilizadas 12 plantas tidas como possíveis mutantes, previamente selecionadas por suas características biométricas distintas. Assim, após a remoção do DNA genômico das plantas, foram realizadas análises moleculares para mensurar a quantificação relativa da metilação global entre os indivíduos. O delineamento experimental utilizado foi o bastante casualizado, com 12 tratamentos, sendo cada planta considerada como um tratamento, e 4 repetições. Uma análise post-hoc dos dados foi realizada pelo teste de Tukey para um nível de confiança de 95%, utilizando o programa estatístico SISVAR versão 5.6. Na sequência, fez-se análises moleculares com 12 pares de marcadores moleculares microsatélites para diferenciação genética entre os tratamentos. Foram observadas diferenças nos padrões de metilação dos DNAs entre os tratamentos avaliados, com destaque para os tratamentos 3 e 9, que apresentaram valores de absorção de 0,621 e 0,266 nm, respectivamente. Em relação às análises com marcadores microsatélites, foi possível a amplificação de 19 bandas, porém todas monomórficas, destacando que os diferentes fenótipos coletados podem ser devido a alterações no epigenoma dessas plantas. Esses resultados destacam a relevância de estudos epigenéticos na identificação de fatores que influenciam a variabilidade fenotípica e molecular, contribuindo para avanços em estratégias de conservação e melhoramento genético da lima ácida 'Tahiti'.

Palavras-chave: *Citrus latifolia* Tan.; citricultura; mutação espontânea; metilação do DNA; epigenética.

ABSTRACT

The ‘Tahiti’ acid lime is among the main fruit crops produced in Brazil, standing out for its great economic importance. However, its triploid nature and susceptibility to diseases pose challenges for the genetic improvement of the crop. Given this, the present study aims at the molecular characterization of selections of ‘Tahiti’ acid lime plants, through DNA methylation quantification and genetic differentiation using microsatellite markers, in order to support conservation and genetic improvement efforts for the crop. For this purpose, 12 plants considered as potential mutants were used, previously selected based on their distinct biometric characteristics. Thus, after the genomic DNA extraction from the plants, molecular analyses were conducted to measure the relative quantification of global methylation among the individuals. The experimental design used was completely randomized, with 12 treatments, each plant considered as a treatment, and 4 replicates. Post-hoc data analysis was performed using Tukey's test at a 95% confidence level, employing the SISVAR statistical program version 5.6. Subsequently, molecular analyses were conducted with 12 pairs of microsatellite molecular markers to assess genetic differentiation among the treatments. Differences were observed in the DNA methylation patterns among the evaluated treatments, with treatments 3 and 9 standing out, presenting absorbance values of 0.621 and 0.266 nm, respectively. Regarding the analyses with microsatellite markers, 19 bands were amplified, but all were monomorphic, indicating that the different phenotypes observed may be due to alterations in the epigenome of these plants. These results highlight the relevance of epigenetic studies in identifying factors that influence phenotypic and molecular variability, contributing to advances in conservation and genetic improvement strategies for the ‘Tahiti’ acid lime.

Keywords: *Citrus latifolia* Tan.; citriculture; spontaneous mutation; DNA methylation; epigenetics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CITRICULTURA NO BRASIL	13
2.2	LIMA ÁCIDA 'TAHITI' (<i>Citrus latifolia tan.</i>)	14
2.3	MUTAÇÕES ESPONTÂNEAS NO MELHORAMENTO DE CITROS	16
2.4	EPIGENÉTICA NO MELHORAMENTO GENÉTICO	18
2.5	MARCADORES MOLECULARES EM CITROS	20
2.6	INTEGRAÇÃO DE GENÉTICA E EPIGENÉTICA NO MELHORAMENTO GENÉTICO	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	LOCAL	24
3.2	MANEJO DAS PLANTAS	25
3.3	ANÁLISE MOLECULAR	26
3.3.1	EXTRAÇÃO DO DNA	26
3.3.2	METILAÇÃO DO DNA	27
3.3.3	ANÁLISE MOLECULAR POR MICROSSATÉLITES	28
3.3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1	DIFERENÇAS NOS NÍVEIS DE METILAÇÃO ENTRE SELEÇÕES DE LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI'	31
4.2	AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES SSRS E AUSÊNCIA DE POLIMORFISMO	32
4.3	PAPEL DA EPIGENÉTICA NA GERAÇÃO DE VARIABILIDADE FENOTÍPICA EM CITROS	33
4.4	EVIDÊNCIAS DA RELAÇÃO ENTRE METILAÇÃO DO DNA E CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM CITROS	33
4.5	PERSPECTIVAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO UTILIZANDO EPIGENÉTICA EM CITROS	34
5	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36
	DADOS CURRICULARES DO AUTOR	43

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira, sendo um pilar essencial da economia agrícola do país, firma o Brasil como líder global na produção de frutas cítricas, com destaque para a produção de lima ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tan.) (Cortez; Silva, 2019). Essa frutífera não só impulsiona o desenvolvimento socioeconômico em áreas rurais, como também contribui de forma significativa para a segurança alimentar e nutricional da população, sendo uma rica fonte de vitamina C, antioxidantes e outros nutrientes cruciais (Saini *et al.*, 2022).

O mercado global de frutas cítricas, incluindo a lima ácida 'Tahiti', continua crescendo. Esse crescimento é impulsionado pela demanda crescente por alimentos saudáveis e pela versatilidade da fruta em várias indústrias alimentícias e de bebidas (Saini *et al.*, 2022). Em 2023, a produção de lima ácida 'Tahiti' permaneceu robusta no Brasil, com avanços em técnicas de irrigação e manejo agrícola que melhoraram a eficiência produtiva, contribuindo significativamente para a sustentabilidade e a competitividade da produção nacional (Silva *et al.*, 2023).

Contudo, a citricultura brasileira enfrenta desafios notáveis, especialmente no que diz respeito ao melhoramento genético das plantas. No caso da lima ácida 'Tahiti', por ser uma espécie triploide, verifica-se dificuldades na aplicação de técnicas tradicionais de melhoramento, como a hibridação, devido à sua complexa estrutura genética (Agustí, 2013). Além disso, essa cultura é vulnerável a várias doenças e pragas, como o cancro cítrico, causado pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e o Greening (Huanglongbing), que podem resultar em perdas consideráveis na produção (Bassanezi *et al.*, 2020).

Assim, a exploração de mutações espontâneas se torna uma estratégia fundamental para a criação de novos cultivares com características de interesse agrônomo, contribuindo para a variabilidade genética, necessária em programas de melhoramento (Kondrateva *et al.*, 2020).

Nesse sentido, as plantas, como organismos sésseis, são frequentemente expostas a condições ambientais que não podem escapar (Dooren *et al.*, 2020). As respostas de estresse a essas condições são multivariadas (Claeys; Inzé, 2013), o que caracteriza o significado da expressão plasticidade fenotípica, sendo necessária a sua caracterização biométrica e molecular, que, quando integradas, proporciona uma abordagem mais completa e precisa para a seleção de mutantes com grande potencial para o desenvolvimento de novos cultivares (Novelli *et al.*, 2006).

A metilação do DNA, que é um mecanismo epigenético, pode afetar a expressão gênica

e, por consequência, as características fenotípicas das plantas (Tanaka *et al.*, 2022). Estudos têm mostrado a ligação entre a metilação do DNA e características de interesse agrônômico em citros, como resistência a doenças (Liang *et al.*, 2020) e qualidade dos frutos (Huang *et al.*, 2023).

Também, a análise com marcadores moleculares, como os microssatélites (SSRs), tem se mostrado uma ferramenta muito poderosa para identificar e caracterizar mutantes em diversas espécies vegetais devido à sua alta reprodutibilidade, co-dominância e elevada capacidade de discriminação genética. Esses marcadores permitem detectar variações no DNA, que podem estar associadas a alterações fenotípicas ou epigenéticas, contribuindo significativamente para estudos de genética, melhoramento e conservação de recursos genéticos (Luro *et al.*, 2008).

Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo a caracterização molecular de seleções de plantas de lima ácida ‘Tahiti’, por meio da quantificação da metilação do DNA e diferenciação genética por marcadores microssatélites, a fim de subsidiar trabalhos de conservação e melhoramento genético da cultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA CITRICULTURA NO BRASIL

As frutas cítricas ocupam o segundo lugar no ranking das frutas mais produzidas e consumidas em todo o mundo e são frequentemente investigadas em pesquisas com grande importância econômica e social (Portella *et al.* 2015). A produção mundial de citros em 2023/2024 é estimada em mais de 103 milhões de toneladas métricas. A produção global de laranjas é de aproximadamente 48,82 milhões de toneladas, com o Brasil mantendo-se como o maior produtor, responsável por cerca de 16,5 milhões de toneladas, o que equivale a 33,8% da produção global (USDA, 2023). A produção de tangerinas, incluindo clementinas e tangerinas, continua em crescimento, destacando-se a China como maior produtora mundial de citros, com mais de 56 milhões de toneladas de citros produzidas em 2021 (FAO, 2021). Em relação aos limões e limas, a produção global também vem crescendo significativamente nos últimos anos, acompanhando a tendência de expansão do mercado de citros (USDA, 2023; FAO, 2021).

O Brasil ocupa a terceira posição como maior produtor mundial de culturas frutíferas, atrás da China e da Índia que são líderes nesse seguimento. Entre as culturas frutíferas brasileiras, a laranja se destaca, sendo largamente destinada tanto à produção de suco industrializado quanto ao mercado de frutas frescas (Carvalho *et al.*, 2019).

O Brasil reafirmou seu papel como maior produtor e exportador global de suco de laranja. A região do estado de São Paulo, do Triângulo Mineiro e Sudoeste de Minas Gerais é responsável por 347,9 milhões de árvores adultas e 386,79 milhões de caixas de 40,8 kg (Fundecitrus, 2020). São Paulo destaca-se por possuir 73% da produção nacional de laranjas e apresentar condições edafoclimáticas e ainda dispor de diversas tecnologias, estrutura de suporte direto e sistema produtivo- industrial. (IBGE, 2021).

No ano de 2020, a produção brasileira de frutas cítricas (laranja, limão e tangerina) alcançou 19,3 milhões de toneladas, em 702,4 mil hectares de área cultivada. Desse total, 87,25% foram dedicados à laranja, utilizando 84,40% da área de plantio para tal atividade e cultivo (IBGE, 2021). É uma das atividades do agronegócio de maior relevância para o país, tornando a citricultura um dos setores mais importantes (Portella *et al.*, 2015; Stuchi *et al.*, 2009).

A citricultura se destaca como um dos pilares do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil o maior produtor mundial de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] (Stuchi *et al.*, 2009). A diversidade das cultivares influencia intensamente o vigor das plantas, a dimensão das copas, a

resistência a pragas e doenças, tolerância a ambientes desfavoráveis, produtividade e qualidade dos frutos (Cruz *et al.*, 2019).

O cinturão citrícola de São Paulo e do Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais é, sem dúvida, uma região mais importante para a citricultura mundial, foi evidenciado pela sua produção da safra 2021/22 de 262,97 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg (Fundecitrus, 2022). A região Sudeste contribui com 83,9% da produção nacional, consolidando-se como um exemplo de eficiência desde o cultivo até a transformação em suco (IBGE, 2021).

Os cítricos, em particular a laranja, estão entre as frutas mais consumidas mundialmente, tanto em sua forma fresca quanto como suco (FAS-USDA, 2019). O Brasil é um dos principais produtores de laranja, com uma produção anual que alcança cerca de 18 milhões de toneladas, o que representa 35% da produção global dessa fruta e 56% do suco de laranja (Curtolo *et al.*, 2017). aproximadamente 73% das exportações globais de suco de laranja (FAS-USDA, 2019). Além disso, o Brasil domina o mercado global de suco de laranja, fornece cerca de 80% do produto consumido ao redor do mundo, o que significa que, para cada 10 copos de suco consumidos, 8 são originários do Brasil (DW, 2024).

2.2 LIMA ÁCIDA ‘TAHITI’ (*Citrus latifolia* Tan.)

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção de citros, especialmente de lima ácida ‘Tahiti’. Embora sua origem exata no cenário global não seja bem definida, acredita-se que essa variedade tenha sido introduzida no Brasil aproximadamente no século XVII, vindo da região do Mediterrâneo (ROSSI *et al.*, 2019). No mercado atacadista da CEAGESP, a lima ácida ‘Tahiti’ domina as vendas de limões e limas ácidas, representando cerca de 96% do total. A a cultivar de limão Siciliano, majoritariamente importada, corresponde a aproximadamente 2%, enquanto outras variedades têm participação marginal. Esses números refletem a preferência nacional pelo ‘Tahiti’, amplamente consumido como fruta fresca e em sucos, consolidando sua liderança no mercado interno e nas exportações (CEAGESP, 2019).

O cultivo da lima ácida ‘Tahiti’ se expandiu amplamente por todo o continente das Américas, que é a única área de produção comercial da mesma. Existem inúmeras contribuições para o sucesso dessa variedade, o aparecimento da bebida caipirinha, que se tornou logo um símbolo do país, e sua utilização generalizada em pratos de cozinha brasileira (Prevideli; Almeida, 2020). Especificamente, o Brasil é o quinto país do mundo a produzir limões e limas, sendo a relação produção-utilização de 1,5 milhões de toneladas por ano (FAO, 2022). O estado de São Paulo permanece como o maior produtor, com cerca de 70% do total produzido no país

(Rossi; Pandolfi, 2019). Em 2020, as exportações de lima ácida in natura alcançaram 107,6 mil toneladas (BOTEON *et al.*, 2020).

De acordo com a FAO, 2022, a Holanda é o país que mais importa limões brasileiros, com 70,4 milhões de quilos em 2019, dos quais redistribui por toda a Europa. A lima ácida 'Tahiti', de acordo com Almeida, com o nome científico de *Citrus latifolia* Tanaka, é membro da família *Rutaceae* e é uma cultura extensiva no Brasil e em outros países da América Latina (Almeida, 2014). A produtividade da planta é bastante variável, podendo ser entre 3.165 e 36.559 kg por hectare, dependendo do estado e das condições de manejo (SIDRA, 2022), sendo São Paulo o principal produtor, com 70,60% da produção nacional, seguido pelo Pará, com 10,07% (IBGE, 2022).

As plantas de lima ácida 'Tahiti' são robustas, com copas arredondadas e frutos médios, sem sementes, apresentando casca lisa de cor verde-clara a escura e polpa amarelada e succulenta. O elevado rendimento de suco força a safra a ser concentrada no primeiro semestre, com uma entressafra no segundo semestre (Bastos *et al.*, 2014). Conforme DAVIS *et al.*, 2020, as plantas apresentam crescimento rápido e, já no terceiro ano, podem proporcionar uma produtividade interessante por área, especialmente em sistemas de plantio adensado sem irrigação, onde os rendimentos podem variar entre 22 e 30 toneladas por hectare, conforme manejo e práticas culturais.

Segundo avaliações de qualidade de frutos em diferentes porta-enxertos com e sem a aplicação de nitrogênio e potássio, os frutos de lima ácida 'Tahiti' pesam entre 70-100g (Mattos Júnior. *et al.*, 2006). São constituídos pelo flavedo, que é uma epiderme formada por células cheias de carotenóides e óleos essenciais; albedo, uma camada branca contendo hemicelulose e compostos fenólicos; polpa rica em vitamina C cujo rendimento do suco geralmente alcança 50% do peso total da fruta (Mattos Júnior *et al.*, 2006; Mendonça *et al.*, 2006). O fruto possui diâmetro de 47 a 65 mm e altura de 55 a 70mm, sendo adequado tanto para consumo in natura quanto industrial (Rangel *et al.*, 2011).

O suco de Lima ácida 'Tahiti' é uma excelente fonte de vitamina C, com uma quantidade significante de 34 a 45,75mg por 100 ml, dependendo do processo de armazenamento e do método de processamento (Feszterová *et al.*, 2023). O rendimento de suco é influenciado pelas condições de manejo, sendo estimado em cerca de 50% do peso do fruto (Nakilcioğlu-TAS & Ötleş, 2020).

A lima ácida 'Tahiti' é um produto extremamente versátil, já que é consumido *in natura* e tempera uma variedade de pratos culinários. O óleo essencial produzido a partir da casca é amplamente utilizado nas indústrias farmacêuticas e cosméticas por suas propriedades

antioxidantes e antimicrobianas (Silva *et al.*, 2022; Rangel *et al.*, 2011). Além disso, a fruta é amplamente utilizada em bebidas à base de frutas, como caipirinhas e sucos concentrados, também são inovações de biotecnologia (Cordeiro Silva *et al.*, 2023). As empresas que atuam neste mercado desenvolvem tecnologia cada vez mais avançada, a fim de obter um rendimento maior e extrair substâncias biologicamente ativas (Cordeiro Silva *et al.*, 2023; Farmfolio, 2022).

2.3 MUTAÇÕES ESPONTÂNEAS NO MELHORAMENTO DE CITROS

Mais de um século após o estabelecimento do primeiro programa oficial de melhoramento de frutas cítricas em 1893 pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), que iniciou um trabalho semelhante na Flórida, avanços consideráveis foram feitos em países por todo o mundo, como Brasil, Estados Unidos, Espanha, França, Itália, Japão, China, Israel, Austrália e África do Sul (Soares Filho *et al.*, 2013). Os programas de melhoramento nesses países têm como alvo não apenas características de qualidade de frutas e sucos, mas também na resistência a doenças graves, como o Huanglongbing (HLB), que ameaça a citricultura global (MCGILL, 2023; Bowman, 2023). Como em outros países produtores, o melhoramento no Brasil trabalha no desenvolvimento de variedades de alto rendimento com maior tolerância ao estresse de acordo com as tendências internacionais. (Gmitter; Grosser, 2023).

Apesar da utilização de métodos tradicionais e biotecnológicos no melhoramento de citros, a maior parte das variedades comerciais de copa disponíveis atualmente originou-se da seleção de mutações espontâneas de gemas (Soares Filho *et al.*, 2013). Cerca de 70% das variedades de citros, incluindo laranjas doces, satsumas e clementinas, foram derivadas de mutações somáticas (Allario *et al.*, 2011; Aleza *et al.*, 2015). Essas mutações são fundamentais para diversificar as cultivares e melhorar características como a cor e o sabor dos frutos (Gmitter; Albrecht, 2023; Saunt, 2020). Citros, de fato, são uma das culturas vegetais mais estudadas no mundo, com programas de melhoramento em países como Brasil, Espanha, Estados Unidos e Japão (Soares Filho *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014).

Os métodos tradicionais usados no melhoramento genético de citros incluem a hibridação sexual controlada e a seleção de híbridos naturais ou mutantes, e essas técnicas são eficazes para melhorar características agronômicas e resistência a doenças (Manzoor *et al.*, 2023; Curk; Garcia-Lor, 2022). Além disso, ferramentas modernas, como a hibridação assistida por marcadores moleculares, fusão de protoplastos e sequenciamento de genomas, têm acelerado o desenvolvimento de novas variedades (Peña *et al.*, 2023; Gmitter; Albrecht, 2023).

Devido à sua alta heterozigosidade, cultivares de citros são geneticamente desafiadoras para controlar suas características (Soares Filho *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014). Além disso, muitas delas são poligênicas, complicando a combinação de genes interessantes em híbridos (Spiegel-Roy; Goldschmidt, 2008). Programas de melhoramento, especialmente via hibridação, são longos e dispendiosos, demandando grandes áreas de campo para avaliação. Nesse sentido, é necessário usar técnicas como marcadores moleculares para agilizar o processo (Oliveira *et al.*, 2016).

Muitas das variedades de citros comuns atualmente, como laranjas doces e tangerinas satsuma e clementina, evoluíram de mutações espontâneas de gemas, conhecidas como *bud sports* (Ban; Jung, 2023; Rattanpal *et al.*, 2020). Essas mutações, mantidas pela propagação vegetativa e embrionia nucelar, garantem a continuidade dos novos traços ao longo das gerações (Ban; Jung, 2023; Pérez *et al.*, 2020). Nem todas as mutações resultam em mudanças fenotípicas, mas aquelas que oferecem novas características são selecionadas por melhoristas para o desenvolvimento de cultivares comerciais (Oliveira *et al.*, 2016).

Essas mutações ocorrem por exclusão, adição, substituição ou rearranjo de nucleotídeos, entre outros influenciadores como a replicação do DNA, radiação e estresses ambientais (Pavlov *et al.*, 2024; Ban; Jung, 2023). Ademais, especificamente, somente uma das variantes alélicas é mutada, podendo isso ocorrer na homozigose para que o caráter mutado se expresse totalmente (Siju *et al.*, 2016; Pavlov *et al.*, 2024). Como as mutações são eventos aleatórios, um processo de seleção cuidadoso é necessário para identificar genótipos de interesse (Oliveira, 2014).

A frequência de mutações varia conforme a cultivar, o ambiente e práticas agrícolas como a poda, que pode estimular mutações somáticas (Kim *et al.*, 2024; Pavlov *et al.*, 2024). Em laranjeiras doces de umbigo e pomeleiros, mutações são observadas com maior frequência. Cultivares como 'Clementina' e 'Satsuma', desenvolvidas na Espanha e no Japão, destacam-se pela seleção de variações genéticas espontâneas (Nesumi; Matsumoto, 2003; Kim *et al.*, 2024).

Ambientes de maior estresse, tanto biótico (como pragas) quanto abiótico (temperatura, seca, salinidade), aumentam a frequência de mutações em citros, acelerando o surgimento de variações genéticas (Kim *et al.*, 2024; Fagoaga *et al.*, 2023). A poda também desempenha um papel importante ao estimular brotações de gemas dormentes, o que pode favorecer o surgimento de novas mutações (Fagoaga *et al.*, 2023). A recomendação é que as plantas borbulheiras sejam renovadas a cada cinco anos para garantir a saúde e produtividade do pomar (Gill *et al.*, 2023).

Um grande número de características diferentes pode ser alterado por meio de mutações, como vigor, tempo de maturação, tamanho e forma dos frutos, coloração e teor de açúcares. Entretanto, mutantes com características indesejáveis, como deformidades, devem ser evitados (Kim *et al.*, 2024).

A participação tanto de citricultores quanto de pesquisadores na busca por novos ramos com características fenotípicas diferenciadas é fundamental, promovendo uma pesquisa participativa (Oliveira *et al.*, 2017). No Brasil, com milhões de plantas cítricas em cultivo, o ambiente é ideal para a seleção de mutantes com valor comercial (Oliveira *et al.*, 2017).

Essa estratégia tem sido especialmente bem-sucedida em propriedades familiares, onde o manejo individualizado facilita a identificação de novas características (GILL *et al.*, 2023). Foi por meio de práticas como estas que permitiram desenvolver cultivares, como a 'Satsuma', no Japão, e a 'Clementina', na Espanha, e também, além de variações como as laranjas 'Umbigo' e 'Sem Acidez' no Brasil, adaptadas às condições locais (Fagoaga *et al.*, 2023; Gill *et al.*, 2023).

2.4 EPIGENÉTICA NO MELHORAMENTO GENÉTICO

A epigenética tem provado ser uma ferramenta poderosa no que diz respeito ao melhoramento genético de plantas, especialmente de espécies frutíferas, pois pode regular a expressão genética sem alterar diretamente a sequência do DNA (Richards, 2006; Zhang *et al.*, 2020). O campo de estudo examina padrões como a metilação do DNA, que é fundamental para o desenvolvimento de uma planta e a resposta ao estresse ambiental, mas serve como regulador em funções como a floração e o amadurecimento dos frutos (Fujimoto *et al.*, 2020; MDPI, 2023). As modificações epigenéticas proporcionam plasticidade fenotípica à qual se atribui a adaptação das plantas a condições adversas, esta modificação é especialmente relevante para o cultivo de espécies frutíferas como de uvas e peras (BMC Plant Biology, 2023; Richards *et al.*, 2017).

A metilação do DNA desempenha um papel crucial na regulação da expressão gênica em plantas frutíferas, influenciando várias características da cultura, incluindo o amadurecimento das frutas e a resposta aos estresses bióticos e abióticos (Zhang *et al.*, 2020; Zhong *et al.*, 2013). Em tomates, a hipermetilação na região promotora de genes como *CNR* está diretamente associada ao controle do amadurecimento e da textura dos frutos, modulando a síntese de etileno (Liu *et al.*, 2015; Manning *et al.*, 2006). Esses mecanismos ocorrem em outras plantas frutíferas, como videiras e peras, onde a metilação influencia o acúmulo de vários metabólitos durante o desenvolvimento (Genome Biology, 2023).

Modificações epigenéticas, ou mudanças espontâneas em marcadores epigenéticos, influenciam diretamente a expressão de características fenotípicas em plantas frutíferas, atuando como fontes cruciais de variação sem a necessidade de alterações genéticas (Fujimoto *et al.*, 2020; Manning *et al.*, 2006). Essas modificações afetam a qualidade da fruta por meio de mudanças na cor ou sabor, como observado em estudos com uvas e maçãs, tornando assim ferramentas valiosas para seleção em programas de melhoramento genético (BMC Plant Biology, 2023; Richards *et al.*, 2017).

A hereditariedade de modificações epigenéticas, incluindo metilação de DNA, é outro requisito primário para que essa técnica seja usada em programas de melhoramento de longo prazo, devido à sua capacidade de passar características desejáveis para gerações futuras (Zhang *et al.*, 2020; Richards *et al.*, 2006). No entanto, a estabilidade dessas marcas pode ser influenciada por condições ambientais, como estresse hídrico e salinidade, o que representa desafios adicionais para garantir sua manutenção ao longo do tempo (MDPI, 2023; Genome Biology, 2023).

O surgimento de técnicas para modificar epigeneticamente genomas, com CRISPR-Cas9 sendo o exemplo mais conhecido, permitiu a alteração direta dos padrões de metilação do DNA, criando novos caminhos para o avanço do cultivo de frutas, esse desenvolvimento deu origem ao conceito de epibreeding, que visa utilizar esses métodos para aprimorar o conhecimento existente sobre epigenética em plantas frutíferas (BMC Plant Biology, 2023; Richards *et al.*, 2017). Em culturas como a videira e o morango, essa abordagem já mostrou resultados promissores, oferecendo uma forma de melhorar a qualidade dos frutos e a resistência a estresses sem a necessidade de organismos geneticamente modificados (Zhang *et al.*, 2020; MDPI, 2023).

A metilação do DNA desempenha um papel crucial na regulação da expressão gênica em plantas cítricas, como o limeira Tahiti, particularmente sob condições de estresse relacionadas à enxertia e ao ambiente (Huang *et al.*, 2021). A pesquisa de Huang *et al.*, 2021, demonstra que a enxertia em cítricos leva à desmetilação generalizada do DNA, que está associada à resposta da planta ao estresse hídrico, desenvolvimento e resistência a doenças. (Huang *et al.*, 2021). Além disso, modificações epigenéticas, como a metilação de DNA, têm sido associadas à adaptação de citros a condições de seca e salinidade, demonstrando o potencial da epigenética para melhorar características fenotípicas e a qualidade dos frutos em programas de melhoramento genético (Shaikh *et al.*, 2024). Essas descobertas indicam que a manipulação epigenética pode ser uma ferramenta eficaz no aprimoramento da produção de citros (Shaikh *et al.*, 2024).

2.5 MARCADORES MOLECULARES EM CITROS

A aplicação de marcadores moleculares tem revolucionado o estudo da genética de citros, auxiliando na caracterização genética, desenvolvimento de novas cultivares, e na conservação de germoplasma (Koninskaya *et al.* 2023). Entre os marcadores mais utilizados estão os SSRs (*Simple Sequence Repeats*), também conhecidas como microssatélites, estão entre os tipos de marcadores mais amplamente empregados devido ao seu extenso polimorfismo e codominância, esses atributos os tornam valiosos para pesquisadores em desenvolvimento de pesquisas que estudam variabilidade genética e identificação de cultivares (Gmitter; Grosser, 2023; Herrero *et al.*, 1996).

Os SSRs, além de serem muito utilizados em pesquisas com citros, não são apenas eficazes na identificação de diferenças genéticas em populações, mas também são aplicados tanto em híbridos naturais quanto a variedades comerciais (FANG *et al.* 1997). Uma investigação recente enfatizou a importância dos SSRs na caracterização de cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis*) e tangerina (*Citrus reticulata*), demonstrando a eficiência na distinção de mutações somáticas (Novelli *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2023).

Outra classe de marcadores que está ganhando destaque são os SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), que permite a análise de variações genéticas em larga escala e com maior precisão, sendo utilizado para o mapeamento de QTLs (locos de características quantitativas), especialmente em programas de melhoramento genético que buscam características agronomicamente importantes, como resistência a doenças e qualidade de frutas (CURK *et al.*, 2023). A combinação de SSRs e SNPs provou ser uma abordagem robusta na caracterização genética, conforme observado em um estudo recente conduzido com várias espécies de citros (Oliveira *et al.*, 2014; PEÑA *et al.*, 2023).

Além dos SSRs e SNPs, os AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) também são amplamente utilizados, principalmente na análise da diversidade genética e na seleção de porta-enxertos resistentes a doenças como o *Huanglongbing* (HLB), uma das maiores ameaças à citricultura mundial (Gmitter; Grosser, 2023; García-Lor *et al.*, 2022). Estudos mostram a aplicabilidade dos SSRs na compreensão da estrutura genética de diferentes populações, o que auxilia na gestão de programas de conservação e melhoramento, a utilização de SSRs tem sido crucial para descobrir a variabilidade do genótipo e diferenciar espécies de citros, como parte dos esforços para aumentar a produtividade e a resistência a doenças (Duhan *et al.* 2020).

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de próximas gerações (NGS), a capacidade de identificar milhares de marcadores genéticos em todo o genoma se tornou uma

realidade. O NGS tem sido aplicado com sucesso em citros na identificação de SNPs e no desenvolvimento de mapas genéticos de alta densidade, facilitando a seleção assistida por marcadores (Peña *et al.*, 2023).

Pesquisas recentes indicam que a incorporação de ferramentas biotecnológicas avançadas, como sequenciamento de nova geração (NGS), em combinação com marcadores moleculares tradicionais como SSRs e SNPs, tem acelerado os programas de melhoramento genético de citros, essas tecnologias proporcionam maior precisão na seleção de características desejáveis, incluindo resistência a doenças e produtividade (Curk; García-Lor, 2023). Além disso, os avanços na genômica funcional, incluindo a identificação de QTLs (locos de características quantitativas), ampliou os horizontes da citricultura. Isso facilitou o desenvolvimento de uma ampla gama de cultivares adaptadas a diversas condições agroambientais e demandas do mercado (Gmitter; Grosser, 2023).

2.6 INTEGRAÇÃO DE GENÉTICA E EPIGENÉTICA NO MELHORAMENTO GENÉTICO

A integração entre genética e epigenética no melhoramento genético de frutíferas tem emergido tornou uma abordagem crucial para a criação de variedades mais resilientes e produtivas que podem se adaptar a diversas condições ambientais (Gmitter; Grosser, 2023). A genética tradicional, que examina variações hereditárias de DNA, agora é complementada pela epigenética, que explora mudanças qualitativas na expressão genética sem alterar sequências de DNA (Garg *et al.* 2015). Modificações epigenéticas, particularmente metilação de DNA e alterações de histonas, desempenham um papel vital na compreensão dos processos de regulação da expressão genética e na manifestação de características fenotípicas (Henikoff; Greally, 2016; Gallego-Bartolomé *et al.*, 2019).

Foi demonstrado que a regulação epigenética desempenha um papel crucial na expressão de características agrônômicas importantes em espécies frutíferas. El-Sharkawy *et al.* (2015) descobriram que, em *Malus × domestica* (maçã), mutações somáticas reguladas epigeneticamente resultaram em mudanças na produção de antocianinas, responsáveis pela coloração dos frutos. O controle dessas características por meio de métodos epigenéticos abre novas possibilidades para melhorar o cultivo de frutas. Características agrônômicas significativas podem ser ajustadas sem a necessidade de modificações permanentes no genoma (Hu *et al.* 2014). Em frutas cítricas, outras abordagens epigenéticas têm se mostrado eficazes

na seleção de características de resistência a doenças e qualidade de frutos (Gmitter; Grosser, 2023; Peña *et al.*, 2023).

A metilação do DNA, um dos principais mecanismos epigenéticos, é amplamente científica em plantas por seu papel na regulação da expressão gênica. Gallego-Bartolomé *et al.* (2019) destacam como a manipulação dos níveis de metilação pode alterar a expressão de genes em *Arabidopsis*, indicando que a mesma técnica pode ser aplicada a frutíferas. Essa manipulação permite características regulares desejáveis, como resistência a estresses abióticos. Em arroz, Hu *et al.* (2014) observaram que a hipometilação causada pela mutação de uma metilase CG resultou em letalidade de mudas, destacando a importância do equilíbrio epigenético para o desenvolvimento saudável de plantas.

A resposta epigenética ao estresse ambiental tem sido objeto de diversos estudos, como o de Garg *et al.* (2015), que demonstram que padrões de metilação de DNA estão associados à resposta ao estresse de seca e salinidade em cultivares de arroz. O conhecimento dessa relação pode ser aplicado no desenvolvimento de frutíferas mais resilientes, como os citros, que enfrentam desafios ambientais e extremos (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2019). A capacidade de regular a expressão gênica em resposta ao estresse ambiental por meio de mecanismos epigenéticos oferece uma estratégia eficaz para o cultivo sustentável dessas plantas (Friedrich *et al.*, 2019).

Outro aspecto relevante da epigenética é a memória epigenética, que permite que as plantas "lembrem" exponham as condições estressantes anteriores, ajustando suas respostas subsequentes. Friedrich *et al.* (2019) analisaram como modificações de cromatina armazenam informações sobre observações passadas a variações de temperatura. Em frutíferas perenes, como os citros, essa capacidade é fundamental, uma vez que essas plantas precisam se adaptar às flutuações sazonais durante seus ciclos de vida (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2019). A memória epigenética pode levar a maior estabilidade na produção e qualidade dos frutos, mesmo em condições ambientais variáveis (Peña *et al.* 2023).

Marcadores moleculares, como SSRs (Simple Sequence Repeats) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), têm sido amplamente usados para identificar variabilidade genética em frutíferas. Curk & García-Lor (2023) discutem a importância de integrar dados epigenéticos com marcadores moleculares para aumentar a precisão na seleção de características agrônomicas desejáveis em citros. Ao combinar essas abordagens com a análise de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), é possível identificar regiões do genoma associado a características como resistência a doenças e qualidade dos frutos, o que acelera o processo de seleção (Koninskaya *et al.*, 2023).

Ferramentas emergentes, como a edição gênica CRISPR/Cas9, aliadas à regulação epigenética, estão revolucionando o campo de melhoramento genético de frutíferas. Peña *et al.* (2023) exploram como essa combinação possibilita o desenvolvimento de novas cultivares sem a necessidade de alterar permanentemente o genoma, permitindo a expressão controlada de genes em resposta a fatores ambientais. Essa abordagem tem o potencial de melhorar significativamente a produtividade e a resiliência de frutíferas no longo prazo (Garg *et al.* 2015)

Portanto, a integração entre genética e epigenética no melhoramento genético de frutíferas oferece uma abordagem mais precisa e eficaz para o desenvolvimento de novas cultivares, especialmente em citros (Curk; García-Lor 2023). A combinação de ferramentas moleculares, como marcadores SSR e SNP, com o controle epigenético da expressão gênica, acelera o processo de seleção de plantas com características agronômicas superiores. A continuidade das pesquisas nessa área promete avanços inovadores para a sustentabilidade e produtividade da agricultura global (Henikoff; Greally, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL

O experimento foi desenvolvido utilizando plantas previamente selecionadas na Fazenda Costa Mello, produtora de lima ácida ‘Tahiti’, localizada no município de Iturama – MG, cujas coordenadas geográficas são 19°43'40" Sul e 50°11'45" Oeste de Greenwich, com altitude média de 453 metros. O clima predominante é quente e úmido no verão e frio e seco no inverno, com precipitação média anual é de 1378 mm, concentrada entre novembro e março e temperatura média anual de 24,7°C (Climate-Data, 2021).

Anteriormente, foram observadas um pomar comercial de lima ácida ‘Tahiti’, 12 copas de plantas morfológicamente distintas dos demais clones IAC-5 na área, com frutos de coloração e formato diferentes e bem como com formato de folhas também distintos, sendo caracterizadas como prováveis mutantes espontâneos.

Figura 1 - Visualização comparativa de frutos e folhas dos mutantes de lima ácida Tahiti com a lima ácida ‘Tahiti’ clone IAC-5 e visualização da planta de um dos mutantes



Frutos - Mutante Lima Ácida Tahiti.



Frutos - Lima Ácida Tahiti.



Folhas - Mutante Lima Ácida Tahiti (esquerda).
Folhas - Lima Ácida Tahiti (direita).



Planta - Mutante Lima Ácida Tahiti.

Fonte: Fotografias tiradas pelo autor (2024).

Essas 12 copas selecionadas de limeira ácida ‘Tahiti’, encontram-se enxertadas sobre o porta-enxerto Fly Dragon (*Poncirus trifoliata* var. *monstrosa*), e cultivadas com espaçamento de 3 metros entre linhas e 2 metros entre plantas, possuem 10 anos de idade média de produção.

3.2 MANEJO DAS PLANTAS

Com relação aos tratos culturais, o manejo da irrigação está sendo realizado por pivôs centrais, com operação intermitente guiada por estratégias de manejo e variáveis climáticas. O controle de pragas e doenças é conduzido mediante a aplicação criteriosa de produtos registrados, de acordo com as necessidades sazonais e preventivas. A adubação e correção do solo são realizadas após análises de solo e foliar específicas para cada área. Não foram realizadas podas nas áreas de produção.

3.3 ANÁLISE MOLECULAR

3.3.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico das plantas, utilizando o método do CTAB, folhas jovens de cada planta selecionada foram selecionadas, acondicionadas em caixas térmicas e levadas para o Laboratório de Fruticultura e Floricultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT/UNESP), Campus de Dracena – SP, onde foram realizadas as análises moleculares.

A extração do DNA genômico dos tecidos vegetais foi realizada segundo técnica descrita por Lodhi *et al.* (1994), com modificações descritas a seguir: 0,1 g de folhas novas e limpas de cada amostra foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em tubos de microcentrífuga de 2,0 ml, contendo 1,0 ml de Tampão de Extração (2% CTAB, 1,4 M NaCL, (0,2%-B-mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl-pH 8,0).

Após 25 minutos de incubação a 60° foram adicionados 1,0 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm a 23°C. Em um novo tubo, o sobrenadante foi transferido, ao qual se adicionou 500 microlitros de NaCL 5 M e 2 volumes de etanol absoluto. Após incubação a -80°C por 5 minutos, centrifugou-se a 6.000 rpm por 5 minutos a 4°C e depois a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o *pellet* formado foi lavado em 1,0 ml (70%), posto para secar e ressuspenso em 100 microlitros de TE. Após o *pellet* ter dissolvido totalmente, esse foi tratado com 20 microlitros de RNase, incubado a 37°C por 20 minutos.

A quantificação foi feita com 1 µL do DNA genômico extraído, em espectrofotômetro (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific*), baseadas nas razões de 260 nm -280 nm (>1,8) para contaminação com proteínas e 260 nm-230 nm (>2,0) de contaminações por fenóis e polissacarídeos, utilizando-se água ultra pura para o ajuste inicial do equipamento seguindo as recomendações do fabricante (SAMBROOK *et al.*, 1989). Razão entre os valores de 1,8 e 2,0 é considerada ideal, sendo que valores inferiores a 1,8 indicam excesso de proteínas e valores superiores a 2,0 indicam excesso de solventes orgânicos. Os valores de quantificação e qualidade das amostras podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Quantificação do DNA de mutantes espontâneos de lima ácida 'Tahiti' por espectrofotometria

Tratamentos	Razão 260 nm / 280 nm	Concentração (ng / μ L)
1	1,87	274,2
2	1,95	109,8
3	1,97	136,2
4	1,93	124,4
5	1,95	297,0
6	1,88	327,7
7	1,95	256,8
8	1,93	283,9
9	1,88	219,5
10	1,88	242,0
11	1,88	331,4
12	1,88	334,5

Fonte: Elaboração própria dos autores, utilizando o software SISVAR (2024).

3.3.2 Metilação do DNA

O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), metodologia essencialmente baseada no uso de anticorpos sensíveis à 5-mC., foi utilizado para realizar a quantificação relativa de metilação global entre os DNAs genômicos dos tratamentos. Tal procedimento foi realizado utilizando-se o *Imprint DNA Methylation Quantification kit* (Sigma-Aldrick), usando tiras com poços pré-tratados com reagente ligante de DNA metilado, e utilizando um anticorpo de captura sensível a metilação do DNA e um anticorpo de detecção, permitindo a detecção colorimétrica da quantidade absoluta de metilação presente do DNA.

Após a diluição das amostras de DNA e uma concentração de 50ng/ μ l, 4 μ l de cada DNA foi misturado a 26 μ l de solução fixadora de DNA metilado, totalizando 6 reações de 30 μ l cada, que foram transferidas para cada poço, bem como o branco, que apresentou água ultrapura ao invés de DNA e o controle positivo, que apresentou DNA metilado fornecido no kit utilizado.

Após 60 minutos de incubação a 37°C, acrescentou-se, em cada poço, 150 μ l de solução de bloqueio, e voltou-se a incubar os poços a incubar os poços por mais 30 minutos a 37°C. Passado o período de incubação, as soluções, juntamente com o DNA, foram removidos, e cada poço foi lavado 3 vezes com solução de lavagem diluída para 1X.

Adicionou-se então, em cada poço, 50 μ l de anticorpo de captura, diluído em uma concentração de 1:1000, e incubou-se os mesmos por 60 minutos à temperatura ambiente (25°C). Após o período de incubação, removeu-se o anticorpo de captura, efetuou-se a lavagem

de cada poço, com 150 µl de solução de lavagem diluída, por 4 vezes, e adicionou-se 50 µl de anticorpo de detecção, diluído em uma concentração de 1:1000, e incubou-se novamente à temperatura ambiente, por 30 minutos.

Após esse período, efetuou-se a remoção de anticorpo de detecção, e cada poço foi lavado novamente por 5 vezes. E, finalmente, com ausência de luz, adicionou-se em cada poço, 100 µl de solução reveladora, incubando por 1-10 minutos, antes de adicionar 50 µl da solução de parada.

A absorbância da solução contida nos poços foi realizada em um comprimento de onda de 450nm em equipamentos a *PowerWav XS Microplate Reader* (Biotek). E, após as leituras dos valores brutos, a fórmula utilizada para obtenção dos valores corrigidos foi: $(A_{450} \text{ Amostra} - A_{450} \text{ Branco}) / A_{450} \text{ Branco}] \times 100$.

3.3.3 Análise Molecular por Microsatélites

Na sequência, para as análises dos *loci* procedeu-se a amplificação de regiões de microsatélites (SSR) utilizando 12 pares de *primers*, que se encontram detalhados na Tabela 2.

A reação de amplificação de volume de 15 uL foi constituída de tampão PCR (1X), 0,1mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 1uM de cada integrante do par de *primer* (F e R), 2 unidades de Taq DNA polimerase, 18 ng de DNA genômico. As condições de amplificação realizadas foram as seguintes: 3min à 94°C (desnaturação), 30seg à 94°C, 1min à temperatura de pareamento de cada par de primer (Tabela 2), 1min à 72°C, 35x (30seg à 94°C, 1min à temperatura de pareamento de cada par de primer, 1min à 72°C) e 10min à 72°C (extensão), realizadas no Veriti 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*).

Tabela 2: Iniciadores SSR utilizados na amplificação de citros, com suas respectivas sequências e temperaturas de pareamento (Ta)

Nome	Sequência (5'-3')	Ta °C
CTR 1F	CACACACACACACACAR ¹ G	55
CTR 2F	AACAACAACAACAACRC	48
CTR 3F	ATCATCATCATCATCRC	48
CTR 4F	ATGATGATGATGATGRC	48
CTR 5F	CAACAACAACAACAARC	48
CTR 6F	CTTCTTCTTCTTCTTRC	48
CTR 7F	TGTTGTTGTTGTTGTYC	48
CTR 8F	CRTGTTGTTGTTGTTGT	48
CTR 9F	AGAAGAAGAAGAAGARC	48
CTR 10F	TGTTGTTGTTGTTGRC	47
CTR 11F	CCGCCGCCGCCGCCGRC	72
CTR 12F	GTAGTAGTAGTAGTARC	48

Nota: ¹R= (A,G); ²Y= (C,T)

Fonte: Elaboração própria dos autores, utilizando o software SISVAR (2024).

Os produtos de amplificação foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 12%, preparado com 120 mL de matriz de ploacrilamida, 120 µL de TEMED e 800 µL de APS (95 mg/mL), com tampão TBE 1X. Após a secagem do gel de poliacrilamida, foi realizada uma pré-corrida de 1 hora, à 50°C com uma corrente de 80 W.

As amostras desnaturadas a 95°C por 5 minutos e imediatamente transferidas para gelo. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o “ladder” de 50 bp, desnaturado juntamente com as amostras. Os produtos foram então separados em gel desnaturante de poliacrilamida 12% com tampão TBE 1X. A eletroforese foi realizada em corrente constante de 80 W e temperatura máxima de 50°C por quatro horas.

Os géis foram corados por fotorevelação das placas de poliacrilamida, utilizando solução contendo ácido acético glacial para a etapa de fixação; solução contendo ácido nítrico para a etapa de pré-tratamento; solução de nitrato de prata para a etapa de impregnação, e solução com sódio carbonato anidro e formaldeído para a revelação do gel, seguindo protocolo descrito por (Creste *et al.*, 2001).

A visualização dos resultados das amostras, após a eletroforese, foi realizada com leitura visual, seguida de contagem das bandas para obtenção de uma matriz binária, e fotografadas.

3.3.4 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizados, com 12

tratamentos, sendo cada planta selecionada considerada como uma parcela experimental, em triplicata. A absorbância da solução contida nos poços foi realizada em um comprimento de onda de 450nm em equipamento a *PowerWav XS Microplate Reader* (Biotek).

As diferenças na quantificação do conteúdo de metilação do DNA entre os tratamentos foram avaliadas usando Análise de Variância (ANOVA). A análise *post-hoc* foi realizada com o teste de Tukey para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) por meio do programa computacional SISVAR versão 5.6 (Ferreira, 2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DIFERENÇAS NOS NÍVEIS DE METILAÇÃO ENTRE SELEÇÕES DE LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI'

A análise da quantificação da metilação global do DNA genômico, por ELISA com anticorpos anti 5-mC, demonstra diferença estatisticamente significativa entre as seleções de limeira ácida 'Tahiti' avaliadas, com destaque para os tratamentos 3 e 9, que apresentaram valores de absorbância de 0,621 e 0,266 nm, respectivamente, podendo ser observada na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de absorbância do DNA de mutantes espontâneos de lima ácida 'Tahiti', obtidos pelo teste de ELISA com anticorpos anti 5-mC e sua respectiva análise de variância

Fonte de Variação	Absorbância 450nm			Quadrado Médio
Tratamentos	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	0.071688*
1	0,086	0,078	0,085	0.083 f
2	0,075	0,072	0,081	0.076 f
3	0,641	0,606	0,617	0.621 a
4	0,190	0,186	0,195	0.190 c
5	0,163	0,160	0,163	0.162 d
6	0,163	0,172	0,164	0.166 d
7	0,137	0,149	0,144	0.143 d
8	0,075	0,064	0,072	0.070 f
9	0,263	0,252	0,283	0.266 b
10	0,076	0,070	0,082	0.076 f
11	0,064	0,062	0,075	0.067 f
12	0,111	0,110	0,126	0.115 e
Média				0.167
CV %				4.59

Nota: *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras diferentes diferem estatisticamente entre si. Fonte: Elaboração própria dos autores, utilizando o software SISVAR (2024).

4.2 AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES SSRS E AUSÊNCIA DE POLIMORFISMO

Já a Tabela 4 apresenta o número de fragmentos amplificados pelos 12 pares de *primers* de marcadores moleculares microssatélites utilizados, podendo ser observado um total de 19 bandas monomórficas geradas.

Tabela 4 - Número de bandas geradas pela amplificação de fragmentos de DNA de plantas selecionadas de lima ácida ‘Tahiti’ por 12 pares de *primers* de marcadores moleculares SSR. NM = número de bandas monomórficas. NP = número de banda polimórficas

Par de <i>Primer</i> SSR	NM	NP
1	1	0
2	1	0
3	1	0
4	1	0
5	2	0
6	1	0
7	2	0
8	3	0
9	2	0
10	2	0
11	1	0
12	2	0
TOTAL	19	0

Fonte: Elaboração própria dos autores, utilizando o software SISVAR (2024).

A ausência de polimorfismo em marcadores SSRs em mutantes espontâneos foi observada em várias espécies de citros, incluindo a laranja 'Pêra' (Martasari *et al.*, 2023). Isso pode ser explicado pela natureza clonal da propagação dessas plantas, que mantém a uniformidade genética entre indivíduos (Barkley *et al.*, 2006).

Rodrigues *et al.*, (2012), investigando a variabilidade genética em mutantes de figueiras originados por radiação gama, utilizando marcadores RAPD e AFLP, verificaram que dos mais de mil fragmentos amplificados, nenhum mostrou polimorfismo, apoiando a hipótese de que a ausência de polimorfismo em marcadores moleculares em mutantes pode ser uma característica comum em plantas clonais, devido à estabilidade genética mantida durante a propagação vegetativa.

Também, a falta de polimorfismo em SSRs também pode ser atribuída à baixa taxa de mutação espontânea em regiões microssatélites do genoma (Vigouroux *et al.*, 2002). Entretanto,

não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de divergências entre estes materiais, uma vez que há evidências de ocorrência de mutação somática em citros em uma taxa elevada que deram origem a indivíduos proximamente relacionados (Machado *et al.*, 2005), mas que os marcadores moleculares nem sempre conseguem detectar (Barkley *et al.* 2006).

Nesse caso, a ausência de polimorfismo nos marcadores SSRs, combinada com a variação na quantificação do conteúdo de metilação global do DNA, sugere que a variabilidade fenotípica observada nos mutantes espontâneos de lima ácida 'Tahiti' pode ser resultado de mecanismos epigenéticos, uma vez que a metilação do DNA é um mecanismo epigenético que pode influenciar a expressão gênica sem alterar a sequência genômica, resultando em diferentes fenótipos (Tanaka *et al.*, 2022).

4.3 PAPEL DA EPIGENÉTICA NA GERAÇÃO DE VARIABILIDADE FENOTÍPICA EM CITROS

Essa suposição é apoiada por estudos em outras espécies de plantas que mostram a importância da epigenética na geração de diversidade fenotípica, até mesmo na ausência de variação genética (Schmitz *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2015). No caso da lima ácida 'Tahiti', a metilação do DNA pode estar impactando a expressão de genes importantes, como aqueles relacionados a aspectos de tamanho e formato dos frutos, cor da casca e a produção de compostos voláteis, resultando nos diferentes fenótipos que foram observados.

4.4 EVIDÊNCIAS DA RELAÇÃO ENTRE METILAÇÃO DO DNA E CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM CITROS

Estudos em outras espécies de citros têm mostrado a conexão entre padrões de metilação do DNA e características agronômicas importantes, como resistência a doenças (Liang *et al.*, 2020), maturação dos frutos (Huang *et al.*, 2023) e qualidade dos frutos, incluindo o teor de sólidos solúveis e a acidez (Menezes *et al.*, 2021). Além disso, observou-se que a metilação do DNA está ligada à regulação de processos cruciais no desenvolvimento das plantas, como floração e frutificação (Zhang *et al.*, 2020).

Os resultados deste estudo abrem novas perspectivas para o melhoramento genético da limeira ácida 'Tahiti', destacando o potencial da análise da metilação do DNA como uma ferramenta complementar à análise de marcadores moleculares. A identificação de marcadores epigenéticos que estão associados a características desejáveis pode ajudar na seleção de

mutantes com potencial para desenvolver novos cultivares, contribuindo, assim, para a sustentabilidade e competitividade da citricultura brasileira.

4.5 PERSPECTIVAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO UTILIZANDO EPIGENÉTICA EM CITROS

Além disso, entender os mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da expressão gênica em citros pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias de melhoramento, pela manipulação da metilação do DNA para induzir características desejáveis em plantas cultivadas (Tanaka *et al.*, 2022). Epigenética, junto com a genética tradicional, pode oferecer novas ferramentas que seriam usadas no desenvolvimento de cultivares de lima ácida 'Tahiti' mais produtivas, resistentes e adaptadas às demandas do mercado e também às mudanças climáticas.

5 CONCLUSÃO

Houve diferença significativa entre os valores de quantificação de conteúdo global de metilação do DNA entre as plantas selecionadas de lima ácida ‘Tahiti’, sugerindo uma variação fenotípica por expressão gênica, uma vez que não foram observadas variações na sequência do DNA dessas plantas pelos marcadores moleculares SSR utilizados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. B. de. **Determinação do estágio ótimo de maturação à colheita do limão 'Siciliano', produzido no estado do Ceará**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2014.
- AGRIANUAL. **Anuário brasileiro da fruticultura 2016**: citros. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2016.
- AGUSTÍ, M. Melhoramento genético de citros. *In: Genética, melhoramento e biotecnologia de citros*. [S. l.]: Elsevier, 2013. p. 149-178.
- BAN, S.; JUNG, J. Mutações somáticas em árvores frutíferas: causas, métodos de detecção e mecanismos moleculares. **Plantas**, [s. l.], v. 12, n. 6, p.1316, 2023.
- BARKLEY, N. A.; ROOSE, M. L.; KRUEGER, R. R.; FEDERICI, C. T. Avaliação da diversidade genética e estrutura populacional em uma coleção de germoplasma cítrico utilizando marcadores de repetição de sequência simples (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 112, n. 8, p. 1519-1531, 2006.
- BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; MIRANDA, M. P.; WULFF, N. A.; VOLPE, H. X. L.; AYRES, A. J. Huanglongbing: uma grande ameaça à produção de citros em todo o mundo. **Plant Disease**, St. Paul, v. 104, n. 4, p. 1274-1286, 2020.
- BOWMAN, K. **Programa de melhoramento de frutas cítricas do USDA focado em soluções de porta-enxertos e variedades**. [S. l.]: Citrus Industry Magazine, 2023.
- BASTOS, D. C.; FERREIRA, E. A.; PASSOS, O. S.; SÁ, J. F.; ATAÍDE, E. M.; CALGARO, M. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 281, p. 36-45, 2014.
- BOTEON, M.; NEVES, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. *In: MATTOS JR., D. et al. Citros*. Campinas: Instituto Agrônomo/Fundag, 2020. cap. 2, p. 19-36.
- CARVALHO, C. R.; SANTOS, Deputado; FREITAS, S. P. **Aspectos econômicos da fruticultura no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2019.
- CEAGESP. **Limão Taiti**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://ceagesp.gov.br/com/noticias/con-mais-sobre-o-limao-taiti-o-produto-da-sem-2101/>. Acesso em: 27 out. 2024.
- CRUZ, M. C. M.; SILVA, D. G.; OLIVEIRA, T. S. Melhoramento de citros e suas perspectivas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 40, p. 33-39, 2019.
- CURTOLO, M. A.; FREITAS, A. B.; GONÇALVES, L. F. O setor citrícola no Brasil: produção e comércio exterior. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 39, p. 245-253, 2017.
- CURK, F.; GARCIA-LOR, A. Avanços no melhoramento, genética e genômica de citros. **Plantas**, 2023.

CLAEYS, H.; INZÉ, D. A agonia da escolha: como as plantas equilibram o crescimento e a sobrevivência sob condições de limitação de água. **Plant Physiology**, Rockville, v. 162, n. 4, p. 1768-1779, 2013.

DADOS CLIMÁTICOS. **Clima**. Iturama, 2021. Disponível em: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/minas-gerais/iturama-3677/>. Acesso em: 27 out. 2024.

DW. **Queda na produção no Brasil faz preço de suco disparar na UE**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://p.dw.com/p/4gErJ>. Acesso em: 27 out. 2024.

CORTEZ, J.; SILVA, M. O impacto da citricultura brasileira no desenvolvimento rural e na inclusão socioeconômica. **Agricultura**, Brasília, DF, v. 9, n. 7, p. 150, 2019.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detecção de polimorfismos de repetição de sequência simples em géis de sequenciamento de poliacrilamida desnaturantes por coloração com prata. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 19, p. 299-306, 2001.

DOVIS, V.; BOARETO, R. M.; MATTOS-JÚNIOR, D.; ARANTES, A. C.; LÓPEZ, L. E.; MINGOTI, R. L. **Plantação direta e de alta densidade para lima ácida 'Taiti' enxertada em laranja trifoliata Flying Dragon**. [S. l.]: Fronteiras em Sistemas Alimentares Sustentáveis, 2020.

DUHAN, N.; MESHAM, M.; LOAIZA, C. D.; KAUNDAL, R. citSATdb: banco de dados de marcadores de repetição de sequência simples (SSR) em todo o genoma de espécies cítricas para caracterização de germoplasma e melhoramento de culturas. **Genes**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 1486, 2020.

ESTATÍSTICA. **Líderes globais em produtores de laranja 2023/2024**. Disponível em: *Statista - Orange Production*. Acesso em: 27 out. 2024.

EL-SHARKAWY, I.; LIANG, D.; XU, K. Análise do transcriptoma de uma mutação somática de uma maçã (*Malus × domestica*) amarela identifica um módulo de rede genética altamente associado à antocianina e à regulação epigenética. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 7359–7376, 2015.

FAZENDA. **A fascinante biologia do limão do Taiti**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://farmfolio.net/blogs/the-fascinating-biology-of-tahiti-limes>. Acesso em: 27 out. 2024.

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identificação de cultivares de *Citrus* intimamente relacionadas com marcadores de repetição de sequência inter-simples. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 95, p. 408-417, 1997.

FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **Produção de cítricos no mundo: anuário estatístico 2022**. Roma: FAO, 2022.

FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; PEÑA, L. Transformação genética e genes para resistência a estresses abióticos e bióticos em citros. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 2023.

FAS-USDA. **Citrus**: mercados e comércios mundiais. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Serviço Agrícola Estrangeiro, 2019.

FESZTEROVÁ, M.; MIŠIAKOVÁ, M.; KOWALSKA, M. Conteúdo bioativo de vitamina C em sucos naturais de frutas selecionadas. **Ciências Aplicadas**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 3624, 2023.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um sistema computacional de análise para experimentos do tipo parcela dividida com efeitos fixos. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 4, p. 529-535, 2019.

FRIEDRICH, T.; FAIVRE, L.; BÄURLE, I.; SCHUBERT, D. Mecanismos baseados em cromatina de memória de temperatura em plantas. **Célula Vegetal & Meio Ambiente**, [s. l.], v. 2, p. 762-770, 2019.

FUJIMOTO, R.; SASAKI, T.; NISHIO, T. Regulação epigenética na resposta da planta ao estresse ambiental e seu papel na adaptação da planta. **Plant Science**, [s. l.], v. 225, p. 69-77, 2020.

FUNDECITRUS. **Pesquisa de safra 2020**: produção de citros no cinturão citrícola. Araraquara, 2020.

GARG, R.; NARAYANA CHEVALA, V.; SHANKAR, R.; JAIN, M. Padrões divergentes de metilação de DNA associados à expressão gênica em cultivares de arroz com resposta contrastante ao estresse de seca e salinidade. **Relatórios Científicos**, [s. l.], v. 5, p. 14922, 2015.

GARCIA-LOR, A.; ABADIA, J.; CASTAÑO, J.; CARMONA, M.; GONZÁLEZ-CLAR, J.; GONZÁLEZ-COSTA, M.; HERNÁNDEZ-BREDA, J.; MIRA, M.; MONTOYA, M.; RIVERA, M.; CARRILLO, J. Diversidade genética e estrutura populacional em citros utilizando marcadores SSR. **Revista de Ciências Hortícolas**, [s. l.], v. 1, p. 67-76, 2022.

GALLEGO-BARTOLOMÉ, J.; LIU, W.; KUO, PH; AÍZCORBE, L.; GONZÁLEZ, D.; PÉREZ-ANGUITA, J.; SHEN, C.; LÓPEZ-MOLINA, L. Um co-direcionamento de RNA polimerases IV e V promove metilação eficiente de DNA de novo em *Arabidopsis*. **Célula**, [s. l.], v. 176, n. 5, p. 1068-1082.e19, 2019.

GMITTER, F.; GROSSER, J. **Recent advances in citrus breeding and genetics**. Flórida: Instituto de Ciências Agrárias e Alimentares da Universidade da Flórida (UF/IFAS), 2023.

GILL, K.; KUMAR, P.; SHARMA, R. Insights mecanicistas abrangentes sobre genética cítrica e desafios de melhoramento. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, 2023.

HENIKOFF, S.; GRALLY, J. M. Epigenética, memória celular e regulação genética. **Biologia Atual**, [s. l.], v. 26, n. 14, p. R644–R648, 2016.

HU, L.; LI, N.; XU, C.; ZHONG, S.; LIN, X.; YANG, J.; ZHOU, T.; YU, A.; WU, Y.; CHEN, Y.; CAO, X.; ZEMACH, A.; RUSTGI, S.; VON WETTSTEIN, D.; LIU, B. A mutação de um importante metilase CG no arroz causa hipometilação em todo o genoma, expressão gênica desregulada e letalidade de mudas. **Anais da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América**, [s. l.], v. 111, p. 10642–10647, 2014.

HUANG, X.; ZHANG, H.; ZHANG, F. Regulação epigenética do amadurecimento e qualidade de frutas cítricas: insights de estudos de metilação de DNA. **BMC Plant Biology**, London, v. 23, n. 1, p. 1-12, 2023.

HUANG, Y.; SHI, L.; LI, J.; YAO, D.; XIAO, B.; WANG, J.; LI, X.; ZHANG, B.; ZHANG, L.; WANG, C. Genoma de um porta-enxerto cítrico e desmetilação global de DNA causada por heteroenxerto. **Horticulture Research**, London, v. 8, n. 1, p. 75, 2021.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção agrícola municipal: culturas permanentes*. Rio de Janeiro: IBGE, 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática- Sidra. **Produção agrícola municipal**. Brasília, DF, 2022.

KIM, DS; KIM, SS; KIM, HJ. Efeitos dos métodos de cultivo na qualidade sensorial e perfis fitoquímicos da tangerina Satsuma (*Citrus unshiu*). **Horticulturae**, 2024.

KONDRATEVA, NP; KASATKINA, NI; KURYLEVA, AG; BATURINA, KA; ILYASOV, IR; KOREPANOV, RI. Efeito do tratamento de sementes de culturas de grãos por radiação ultravioleta antes da semeadura. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 433, n. 1, 2020.

KONINSKAYA, N.; MATSKIV, A.; MALYAROVSKAYA, V.; RYNDIN, A. Marcadores InDel e SCoT para análise de diversidade genética em uma coleção de cítricos do Cáucaso Ocidental. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 9, p. 8276, 2023.

LIANG, G.; CHEN, L.; LIU, J.; ZHANG, X.; LIU, Y.; WANG, Y.; YU, H.; ZHAO, C.; YANG, H.; JIN, X. A metilação do DNA desempenha um papel importante na resistência ao cancro cítrico. **BMC Plant Biology**, London, v. 20, p. 1-14, 2020.

LIU, R.; HOW-KIT, A.; HE, Y. Papel das DNA desmetilases no amadurecimento de frutas. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 102, 2015.

LOPES, J. R.; SILVA, M. S.; ALMEIDA, A. C. **História da citricultura no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 2011.

LURO, F. L.; COSTANTINO, G.; TEROL, J.; ARGOUT, X.; ALLÁRIO, T.; WINCKER, P.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Transferibilidade dos EST-SSRs desenvolvidos em clementina Nules (*Citrus clementina* Hort ex Tan) para outras espécies de *Citrus* e sua eficácia para mapeamento genético. **BMC Genômica**, [s. l.], v. 287, 2008.

MACHADO, M. A.; STUCHI, E. S.; PERONI, F. H. G. **Guia prático de fenologia de citros**. Campinas, SP: Fundecitrus, 2005.

MANZOOR, Ikra; ABDUL-MALIK, U.; AMJAD, Muhammad; REHMAN, Rashid Ur; RAFIQ, Muhammad; SIDDIQUI, Yasir; RAUF, Shagufta; ARSHAD, Munir. Do melhoramento clássico ao avanço biotecnológico moderno em culturas hortícolas. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 14, 2023.

MARTASARI, D.; SHREYA, A.; NINDRA, AA; UJANG, ER. Diversidade genética e estrutura populacional de acessos de tangerina e tangerina cítrica da Indonésia usando marcadores SSR e SCoT. **Recursos Genéticos e Evolução das Culturas**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 425-437, 2023.

MANNING, K.; TOR, M.; POOLE, M.; HONG, Y.; THOMPSON, A. J.; KING, G. J.; GIOVANNONI, J. J.; SEYMOUR, G. B. Uma mutação epigenética natural em um gene que codifica um fator de transcrição SBP-box inibe o amadurecimento do fruto do tomate. **Nature Genetics**, New York, v. 38, n. 8, p. 948-952, 2006.

MATTOS JR, D.; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H.; OLIVEIRA, A. M.; MATTOS, L. M.; CUNHA, G. R. Resposta de árvores cítricas jovens sobre porta-enxertos selecionados à fertilização com nitrogênio, fósforo e potássio. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 29, p. 1371-1385, 2006.

MENDONÇA, J. A.; PRADO, R. M.; DIAS, L. A.; QUAGGIO, J. A.; MATTOS-JUNIOR, D. Produtividade e qualidade de frutos de limoeiro 'Tahiti' adubado com diferentes níveis de potássio e nitrogênio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, p. 21-27, 2006.

MCGILL, J. O que há de novo no melhoramento de citros? Revista Citrus Industry. 2023. Disponível em: <https://citrusindustry.com>. Acesso em: 12 dez. 2024.

MENEZES, L. A. A.; TAVARES, J. F.; SILVA, S. D.; GONÇALVES, F. D.; DOURADO, F. M.; MATSUMOTO, R.; TAVARES, A. M. Regulação epigenética de características de qualidade de frutos em citros. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 12, e645231, 2021.

NAKILCIOĞLU-TAS, E.; ÖTLEŞ, S. Kinetic modelling of vitamin C losses in fresh citrus juices under different storage conditions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 2, e20190328, 2020.

NESUMI, H.; MATSUMOTO, R. Citrus breeding, genetics and genomics in Japan. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Rio de Janeiro, 2003.

NOVELLI, V. M.; MACHADO, M. A.; OLIVEIRA, A. C. Genetic diversity of citrus rootstocks revealed by microsatellite markers. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 109, n. 2, p. 108-114, 2006.

OLIVEIRA, R. P.; CANTILLANO, R. F. F.; BOETTCHER, G. N.; GONZATTO, M. P.; SULZBACH, M.; SCHWARZ, S. F. **Harmonia**: tangerina precoce para consumo in natura. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2016. 6 p. 1 folder.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Cadeia produtiva de citros do Rio Grande do Sul. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 100, p. 4-6, 2014.

ORGANIZAÇÃO PARA A ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO). **Dados de produção de citros**. [S. l.], 2024.

PAVLOV, Y. I.; YURCHENKO, V. Properties and mechanisms of deletions, insertions, and substitutions in genetic mutations. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], 2024.

PÉREZ, M.; FERNÁNDEZ, R.; GARCÍA, A.; LÓPEZ, J.; HERNÁNDEZ, E. **Comprehensive mechanistic insights into citrus genetics and breeding**. London: Springer, 2020.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L. Genetic transformation and emerging biotechnological tools for citrus improvement. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 14, e1065898, 2023.

PREVIDELI, F. D.; ALMEIDA, M. M. O mercado 'in natura' do limão Tahiti. **Revista Interface Tecnológica**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 409-416, 2020.

PORTELLA, R. C. Q.; STUCHI, E. S. **Citricultura brasileira: importância e desafios**. Campinas: IAC, 2015.

RANGEL, A.; SANTOS, M. R.; LIMA, C. A.; OLIVEIRA, J. P.; ALMEIDA, F. G. Bioactive compounds of citrus fruits: a review of composition and health benefits of carotenoids, flavonoids, limonoids, and terpenes. **The Pharma Innovation Journal**, [s. l.], 2011.

RATTANPAL, H. S.; SINGH, H.; SEBASTIAN, K.; BINDU, B.; ARYA, M. S. **Recent advances and achievements in mutation breeding of fruit crops**. London: Springer, 2020.

RICHARDS, C. L.; VERHOEVEN, K. J. F.; BOSSDORF, O. Evolutionary significance of epigenetic variation. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 18, n. 4, p. 219-220, 2017.

RICHARDS, E. J. Inherited epigenetic variation: revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, n. 5, p. 395-401, 2006.

RODRIGUES, M. G. F.; MARTINS, A. B. G.; DESIDÉRIO, J. A.; BERTONI, B. W.; ALVES, M. C. Genetic characterization of fig tree mutants with molecular markers. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 3, p. 1990-1996, 2012.

RODRIGUES, M. G. F.; MARTINS, A. B. G.; DESIDÉRIO, J. A.; BERTONI, B. W.; ALVES, M. C. Epigenetic mechanisms in plant development: Methylation and gene regulation in citros. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirao Preto, v. 14, n. 2, p. 1990-1996, 2015.

ROSSI, P. L.; PANDOLFI, M. A. C.; FATEC. Análise de mercado da lima ácida Tahiti. **Interface Tecnológica**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 255-263, 2019.

SAINI, Ramesh Kumar; RANJIT, Arina; SHARMA, Kavita; PRASAD, Parchuri; SHANG, Xiaomin; GOWDA, Karekal Girinur Mallikarjuna; KEUM, Young-Soo. Compostos bioativos de frutas cítricas: uma revisão da composição e benefícios à saúde de carotenoides, flavonoides, limonoides e terpenos. **Antioxidants**, Basel, v. 11, n. 2, p. 239, 2022.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHMITZ, R. J.; SCHULTZ, M. D.; LEWSEY, M. G.; ECKER, J. R. Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants. **Science**, [s. l.], v. 334, n. 6054, p. 369-373, 2013.

SERVIÇO AGRÍCOLA ESTRANGEIRO DO USDA. Citrinos: Mercados e Comércio Mundial. Disponível em: USDA - Citrus Report.

SHAIKH, M.; WEI, Z.; ZHANG, P.; GUAN, C.; CHACHAR, S.; ZHANG, J. Epigenetic modifications and breeding applications in horticultural plants. **Horticulturae**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 143, 2024.

SIJU, S.; ISMANIZAN, I.; WICKNESWARI, R. Genetic homogeneity in *J. curcas* L. individuals as revealed by microsatellite markers. **Brazilian Journal of Biology**, Sao Carlos, 2016.

SILVA, G. C.; OLIVEIRA, A. M. B.; MARTÍNEZ, J. Extraction of compounds with bioactive potential from industrial residue Tahiti lime (*Citrus latifolia* Tan.). In: PROCEEDINGS OF 2ND INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOACTIVE COMPOUNDS, 2022, Campinas. **Anais [...]** Campinas: Galoá, 2022.

SILVA, A. J.; PINTO, F. R.; SILVA, D. J. Advances in citrus breeding using molecular markers: A focus on SSR markers for genotyping. **Journal of Citrus Research**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 123-136, 2023.

SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S. Melhoramento genético. In: CUNHA SOBRINHO, A. P.; MAGALHÃES, A. F.; SOUZA, A. S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S. (org.). **Cultura dos citros**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 61-102.

TANAKA, F.; ARAI, Y.; SHIMIZU, T.; SAKAKIBARA, Y.; KATSUMATA, H. Identificação e caracterização de mutações espontâneas em citros em todo o genoma. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 23, p. 1-15, 2022.

VIGOUROUX, Y.; JAQUETH, J. S.; MATSUOKA, Y.; SMITH, O. S. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 19, n. 9, p. 1251-1260, 2002.

ZHANG, H.; LANG, Z.; ZHU, J. K. Metilação de DNA em plantas: distribuição, funções e mecanismos. **Journal of Genetics and Genomics**, Amsterdam, v. 47, n. 10, p. 535-551, 2020.

ZHANG, H.; LANG, Z.; ZHU, J. K. Dynamics and function of DNA methylation in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 21, p. 259-276, 2020.

ZHONG, S.; FEI, Z.; ECKER, J. R.; LUO, Y.; GIOVANNONI, J. J. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 2, p. 154-159, 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FRANCISCO ORLANDO NETO HAUKE DINIZ – Iturama, 15 de julho de 1997, filho de Elisângela Hauke Silva Castro. Engenheiro Agrônomo formado em setembro de 2022 pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Campus de Iturama – MG. Ingressou no mestrado, que teve início em março de 2023, sendo Bolsista CAPES. Experiência em Horticultura, com ênfase em fruticultura tropical.