

DESENHO DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA A DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE CULTIVARES DE LARANJA VALÊNCIA (*Citrus sinensis*)

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

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N – Guararema - 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, tacianecbs@gmail.com, clarahenrique@edu.ufes.br, matheus.l.machado@edu.ufes.br, dealmeidarf@gmail.com, karolbbritto@hotmail.br, greiciane.paneto@ufes.br.

Resumo

A laranja-doce (*Citrus sinensis*), em especial a cultivar Valência, possui grande relevância econômica. Entretanto, a elevada semelhança entre cultivares dificulta a identificação por métodos morfológicos. Este estudo teve como objetivo desenvolver primers específicos baseados em SNPs para diferenciar geneticamente esses cultivares, utilizando a técnica de *High Resolution Melting* (HRM) como ferramenta de validação.

As sequências genômicas foram obtidas através de DArT-seq, e regiões polimórficas foram identificadas para o desenho de primers, que foram avaliados nos softwares **Primer3**, **PerlPrimer** e **uMelt**.

As análises indicaram que três primers possuem capacidade de gerar perfis de fusão distintos, demonstrando seu potencial para discriminar cultivares de forma rápida, sensível e de baixo custo.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*. SNPs. HRM. Diferenciação genética. Citricultura.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas, Biologia Molecular

Introdução

A espécie de laranja doce (*Citrus sinensis*) é composta por diversos grupos parietais de extrema importância econômica nos quais se destacam a Pêra, a Seleta, a Bahia, a Natal folha murcha e a Valência (Britto *et al.*, 2020). O grupo varietal Valência, assim como os outros, é amplamente valorizado comercialmente devido a sua composição nutricional e qualidade sensorial, o que culmina em sua grande aceitação no mercado (Bastianel *et al.*, 2006). A diferenciação precisa entre esses cultivares é essencial para garantir autenticidade, prevenindo fraudes comerciais e assegurando a qualidade do produto final. Entretanto, a alta semelhança morfológica entre cultivares torna a identificação fenotípica pouco confiável (Britto *et al.*, 2020).

Diante dessa necessidade de diferenciação supracitada, os métodos moleculares juntamente com a bioinformática se consolidaram como ferramentas essenciais e indispensáveis no cenário da citricultura, culminando em uma produção agrícola mais sustentável e eficiente sobretudo diante dos desafios globais emergentes, como o crescimento populacional e as mudanças climáticas. Estimativas indicam que a população mundial poderá alcançar cerca de 9 bilhões de habitantes até 2050 (Ash *et al.*, 2010), exigindo estratégias que assegurem a alimentação sem comprometer os recursos naturais. Nesse contexto a melhoria genética e a confiabilidade dos cultivares desempenham um papel crucial para garantir qualidade, produtividade e sustentabilidade na produção agrícola.

Dentro desse contexto biotecnológico, um dos métodos mais promissores é a análise de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) que consistem em variações entre a mesma espécie em um único nucleotídeo na sequência de DNA. Apesar de pequenas, essas variações funcionam como marcadores altamente informativos permitindo que a diferença genética entre cultivares da mesma espécie seja possível, mesmo possuindo elevado grau de semelhança fenotípica.

Para a detecção de SNPs, uma das técnicas que está ganhando destaque e reconhecimento é o HRM (*High Resolution Melting*) que se baseia na análise de desnaturação do DNA após a amplificação por PCR. Esse método monitora as curvas de fusão de fragmentos de DNA na presença de corantes fluorescentes, o que permite a identificação de pequenas diferenças nas regiões baseando-se nas variações das curvas de fusão. Essa técnica se destaca pela rapidez, alta sensibilidade, de baixo custo e não necessita de etapas posteriores de sequenciamento, o que a torna mais acessível quando comparadas a técnicas como DArT-seq (Sansaloni *et al.*, 2011). Diante do apresentado, o estudo teve como objetivo o desenho de primers específicos baseados em SNPs para a diferenciação genética de cultivares de laranja Valência, utilizando a análise por HRM como ferramenta de validação.

Metodologia

1. Identificação de SNPs

As sequências genômicas de *Citrus sinensis* foram obtidas em laboratório por meio da técnica de DArT-seq correspondentes aos cultivares de interesse. Elas foram submetidas a um script desenvolvido em Python, responsável por realizar a varredura em arquivos no formato FASTA para a detecção de posições genômicas contendo polimorfismos do tipo SNP. O script gera arquivos em formato HTML com a localização exata dos SNPs identificados. Para o desenho de primers, foram selecionadas regiões flangeadoras contendo três linhas de sequência acima e três linhas abaixo da posição do SNP (Figura 1).

Figura 1 - Representação das regiões flangeadoras contendo o SNP de interesse: (lilás) região flangeadora, (azul) região com o SNP de interesse, (amarelo) SNP de interesse.

```
GAGTGCTTGTTAGAGATGTTTCCATCATCGATTGAGATTTTGTAGAACACCAATTGAGGAG
ATTGTGAGACTCGAAGTTGAAGTGTTGATTGCGGTTCTGTGATGTAAAGAAATTGTTGCAAA
CATTATTGATTATCACTTCGCAACCAAGATTTATTTTATGCTGGAACGAAGCTTGAAGCTTGC
AAGACCTTGGCTAGTTATGGCATCAAAAATAATTACGTCGTAGACGTGCTACCTTCCCCATT
CAGATATTTGTTAAGACTTGGGGTGGAAAGACTATAACACTTGATGTCCAGCCATATAACACG
GTCCAAGATGTGAAAGTCAAACCTTTTGGACAAAC TGCAGACTCCTCTTCATCTTCAGAGTAT
CGTT TTTGATGGAAAGCGGCTATTTGAAAACCATGTTCTGG CAAGCTACAACATCCAAAA
GCATTGCACTCTTCACATGGTTTTGGCACCTCTTCAAGGATCATCGAATTGCCATTAACTTT
TATTGATCCTTCAATATCACTGTCTATTTCCATTTCTGAAGTGAAAGAAATGGCTAAAGTCAAA
TTTCAAGCTGCAGTGAAGGAGTTATTAGTCGATCAAGTGGCATTACAGGATGACCGCACTCT
GGCTGATTATGGTATGGACTTGTCCGAGAAAGTGGTTCTCGTGTTTTGAGAAGGCAATAATA
GAGTCTTATTCCATATTGTTGATGCCATTATTTACCTGATATAATTACATTGAAAACCTATAC
ACAGATGCTTCAAAGGACATGTATTTAGACCCTTTTCTTAA
```

Fonte: Elaboração própria

2. Desenho dos primers

O desenho dos primers foi realizado utilizando o software **Primer3** (<https://primer3.ut.ee/>), desenvolvido especificamente para a projeção de iniciadores. A sequência contendo o SNP (Figura 1) foi inserida no campo *sequence target*, que corresponde à área na qual o programa lê a sequência completa e identifica regiões adequadas para o desenho dos primers. Foram estabelecidos intervalos de tamanho (70–120 bp, 100–200 bp e 150–250 bp), e, a partir desses parâmetros, o programa gerou automaticamente os pares de primers *forward* (left) e *reverse* (right).

3. Etapa de verificação e simulação das curvas

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

A verificação inicial foi realizada no **PerlPrimer** (<https://perlprimer.sourceforge.net/>) software utilizado para avaliar parâmetros dos primers gerados, tais como: comprimento (18–24 nucleotídeos), conteúdo de GC (40–60%), temperatura de anelamento (T_m) (58–60 °C), além de verificar a possibilidade de formação de dímeros ou estruturas secundárias indesejáveis.

Os primers validados foram então inseridos na plataforma **uMelt** (<https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/>), que simula curvas de dissociação de DNA a partir das sequências de primers e do alvo. Essa análise permite avaliar a diferença de temperatura de melting (ΔT_m) entre os alelos. Para a etapa de HRM, considerou-se adequado um ΔT_m mínimo de 0,5 °C, garantindo que o SNP seja capaz de gerar perfis de dissociação distintos e, consequentemente, diferenciar os cultivares de *C. sinensis*.

Resultados

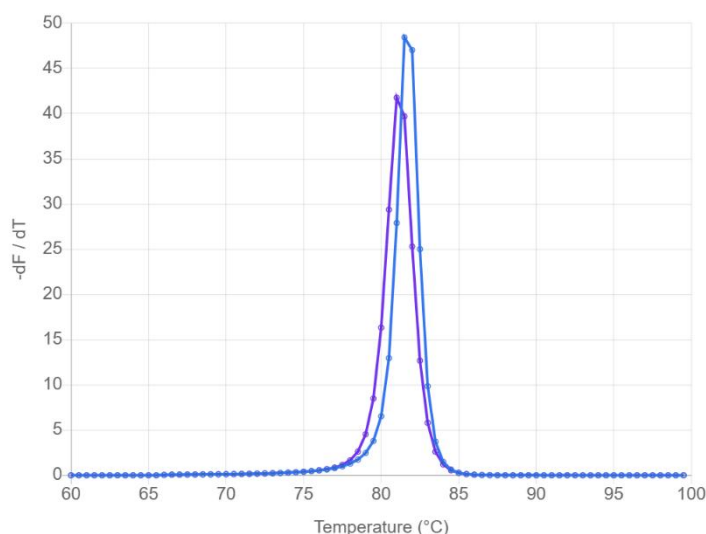
Diante da varredura genômica baseada em dados de sequenciamento por Dart-seq das amostras foi possível realizar a identificação de **X** SNPs nos cultivares do grupo varietal Valência. Com base nessas regiões foi possível fazer a confecção de **X** pares de primers específicos.

O desenho dos primers foi realizado com o auxílio do software **PerlPrimer** (<https://perlprimer.sourceforge.net/>) considerando todos os parâmetros específicos recomendados, como: T_m , GC%, ausência de dímeros e tamanho dos primers. O tamanho dos primers possuem uma variação de tamanho variando entre 53 e 69 pares de base, com T_m médio de x°C, atendendo aos critérios de qualidade predefinidos para a aplicação em ensaios de HRM.

As regiões flangeadoras selecionadas foram analisadas também pelo software **uMelt** (<https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/>) que é responsável por simular curvas de fusão e previsão de T_m dos amplicons. As curvas obtidas (Figura 2) evidenciam pontos de fusão distintos com mais de 0,5°C, sugerindo que os primers possuem um potencial para a diferenciação genética confiável.

Os primers ainda serão testados experimentalmente por meio da amplificação do DNA extraído das amostras de laranja Valência seguido da análise de dissociação por HRM com o intuito de confirmar a capacidade de diferenciação genética entre os cultivares.

Figura 2: Curvas de fusão obtidas no **uMelt**



Fonte: Elaboração própria

Discussão

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

O uso de marcadores moleculares são ferramentas fundamentais para a identificação genética em muitas espécies de plantas (Bastianel *et al.*, 2006). Os marcadores baseados em SNPs tem se mostrado uma estratégia promissora para a diferenciação genética devido a sua alta abundância e sensibilidade. No presente trabalho foi possível identificar X regiões polimórficas e a partir delas desenhar primers específicos.

Os parâmetros de qualidade obtidos para os primers estão de acordo com os critérios descritos em estudos anteriores, nos quais o sucesso do HRM depende de amplicons curtos e regiões polimórficas bem definidas (Simko, 2016). Ainda que não tenham sido testados experimentalmente até o momento, os primers desenhados apresentam características promissoras para a diferenciação de cultivares de Valência. Além disso, as curvas de melting obtidas no uMelt (<https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/>) reforçam a eficácia dos primers desenhados, evidenciando a diferenciação entre os cultivares.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que a identificação de SNPs em regiões genômicas específicas de *Citrus sinensis*, aliada ao desenho de primers otimizados para HRM, permite a diferenciação genética potencial entre cultivares do grupo Valência. As análises *in silico* indicaram que os primers possuem características adequadas, como tamanho, T_m, conteúdo de GC e ΔT_m suficiente para gerar perfis de fusão distintos, evidenciando seu potencial para discriminar cultivares de forma rápida, sensível e de baixo custo. Assim, a combinação de SNPs e HRM se mostra uma estratégia promissora para assegurar autenticidade, rastreabilidade e sustentabilidade na produção de laranja-doce, oferecendo uma ferramenta molecular eficiente para a citricultura.

Referências

- ASH, C. *et al.* Alimentando o futuro. *Ciência*, v. 327, p. 797, 2010.
- BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A. C. de; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murcott' avaliada por fAFLP e RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 5, p. —, maio 2006.
- BRITTO, K. B. Análise da diversidade genética e identificação de citros (*Citrus* spp) com marcadores moleculares e High Resolution Melting (HRM). 2024. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/items/bf79847e-b136-4596-a01e-8c4a8a4ce61e>. Acesso em: 22 ago. 2025.
- EHRlich, P. R.; HARTE, J. Para alimentar o mundo em 2050 será necessária uma revolução global. *Proc. Sci. USA*, v. 112, n. 48, p. 14743-14744, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1519841112>. Acesso em: 22 ago. 2025.
- PERLPRIMER. PerlPrimer: PCR primer design software. [S.l.]: [s.n.], [s.d.]. Disponível em: <https://perlprimer.sourceforge.net/methodology.html>. Acesso em: 22 ago. 2025.
- PRIMER3PLUS. Web interface for Primer3. [S.l.]: Primer3Plus, [s.d.]. Disponível em: <https://www.primer3plus.com/>. Acesso em: 21 ago. 2025.
- SANSALONI, C.; PETROLI, C.; JACCOUD, D. *et al.* Tecnologia de Diversidade de Arrays (DArT) e sequenciamento de próxima geração combinados: genotipagem genômica completa, de alto rendimento e altamente informativa para melhoramento molecular de eucalipto. *BMC Proceedings*, v. 5, supl. 7, p. P54, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S7-P54>. Acesso em: 22 ago. 2025.
- SIMKO, I. High-resolution DNA melting analysis in plant research. *Trends in Plant Science*, v. 21, n. 6, p. 528–537, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26827247/>. Acesso em: 22 ago. 2025.
- UNIVERSITY OF UTAH. uMELT Quartz: Predict Melting Curves for PCR Products. Salt Lake City, UT: [s.n.], [s.d.]. Disponível em: <https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/umb.php>. Acesso em: 21 ago. 2025.