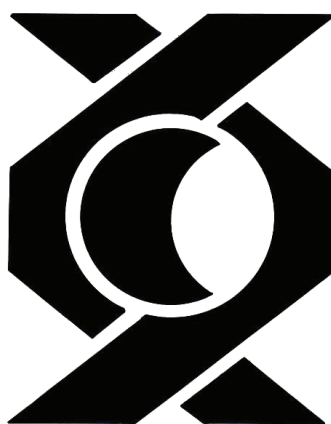


ANAIS
31º ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E
MELHORAMENTO

2ª REUNIÃO PAULISTA DE MELHORAMENTO DE
PLANTAS

VOLUME 31



“SELEÇÃO GENÔMICA AMPLA:
PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES”

7 E 8 DE OUTUBRO DE 2013
Piracicaba - SP

EDITORES

ROBERTO FRITSCHÉ-NETO (COORDENADOR / COORDINATOR)
MARA FERNANDES MOURA (COORDENADOR / COORDINATOR)
JOSÉ BALDIN PINHEIRO
GABRIEL R. A. MARGARIDO
GERHARD BANDEL
ROLAND VENCovsky

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Encontro sobre Temas de Genética e Melhoramento (31: 2014: Piracicaba, SP)
"Seleção Genômica Ampla: Princípios e Aplicações" ; anais ... / edição de Roberto
Fritsche-Neto... [et al.]. - - Piracicaba: ESALQ/LGN, 2014.
44 p.

Bibliografia.

1. Genética de populações 2. Melhoramento genético vegetal I. Fritsche-Neto, R.
ed. II. Moura, M. F., ed. III. Pinheiro, J. B., ed. IV. Margarido, G. R. A., ed. V. Bandel,
G., ed. VI Título

CDD 631.522
G335e

APLICAÇÃO DA SELEÇÃO GENÔMICA EM CITROS

Mariângela Cristofani-Yaly¹, Itamara Gois², Marcos Deon Vilela de Resende³, Marinês Bastianel¹, Valdenice Moreira Novelli¹, Marcos Antonio Machado¹

¹ Centro APTA Citros Sylvio Moreira - IAC, Rod. Anhanguera Km 158, Cordeirópolis, SP, 13.490-970, Brasil.

² Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

³ Embrapa Florestas/Universidade Federal de Viçosa, Dep. de Engenharia Florestal, Viçosa, MG, 36.570-000, Brasil.

O Brasil é o maior produtor de laranja, sendo responsável por 26,4% da produção mundial (FAO, 2014), sendo o estado de São Paulo detentor de 77% da produção brasileira de citros.

Apesar de o grupo citros apresentar grande diversidade de gêneros, espécies e variedades, um número relativamente pequeno é utilizado nos atuais plantios o que tem contribuído para o agravamento dos problemas fitossanitários na cultura. Além disso, tais problemas têm dificultado o estabelecimento e manutenção de experimentos em condições de campo, uma vez que, para algumas doenças a erradicação de plantas infectadas é uma das poucas formas de controle. O Centro de Citricultura do Instituto Agrônomo - IAC vem realizando, desde a década de 1990, um programa de melhoramento genético de citros via cruzamentos dirigidos. Populações de híbridos obtidas a partir de cruzamentos entre diversas variedades de citros, selecionadas por marcadores moleculares, foram estabelecidas em várias regiões do estado de São Paulo, constituindo-se em uma rede experimental de novos genótipos.

As populações foram avaliadas para características como produção, qualidade da fruta e resistência a doenças e para construção de mapas de ligação genética, como por exemplo: tangerina Cravo vs laranja Pêra (Oliveira et al., 2004), tangerina Sunki vs *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux (Cristofani et al., 1999, 2003) e tangor Murcott vs laranja Pêra (Oliveira et al., 2007). Regiões genômicas associadas às características quantitativas e qualitativas foram localizadas nestes mapas tais como: apomixia, resistência/tolerância ao vírus da tristeza dos citros (CTV), à clorose variegada dos citros (CVC), à gomose de *Phytophthora* e ao vírus da leprose dos citros (Cristofani-Yaly et al., 1999; Siviero et al., 2006; Bastianel et al., 2009) utilizando marcadores SSR, RAPD e AFLP.

Assim como para outras plantas, o melhoramento genético de citros avançou, nas últimas décadas, devido à possibilidade de associação entre ferramentas biotecnológicas e métodos clássicos de melhoramento. O uso de marcadores moleculares para a seleção inicial de indivíduos zigóticos de cruzamentos controlados resultou na possibilidade de seleção de um número elevado de novas combinações e, em consequência, o estabelecimento de um grande número de híbridos em experimentos de campo. A construção de mapas de ligação foi de fundamental importância em programas de melhoramento, permitindo a associação de regiões genômicas com as características de interesse agrônomo. O mapeamento de QTLs tem auxiliado os programas de várias espécies de plantas perenes e em citros foi possível mapear diversas características com herança quantitativa e qualitativa. Por outro lado, a existência de mapas de ligação gênica e QTLs mapeados (Bastianel et al., 2009; Ollitrault et al., 2012), a consolidação de uma base de dados de sequências de diferentes espécies de citros, incluindo bibliotecas feitas a partir de plantas submetidas a várias condições de estresse biótico (Cristofani-Yaly et al., 2007), as informações de expressão gênica global usando microarranjos (Boava et al., 2011) e RNA_seq, o desenvolvimento de bibliotecas de bibliotecas BAC (Ollitrault et al., 2010) e o sequenciamento do genoma completo de citros (Gmitter et al., 2012; Xu et al., 2013; Wu et al., 2014), tornam inevitável e urgente a necessidade de explorar e combinar todas as informações no sentido de aprofundar os estudos sobre genética desse grupo. Entretanto, ainda não foi possível estabelecer marcadores para seleção assistida.

A disponibilidade de recursos e ferramentas genômicas está revolucionando o melhoramento de plantas, por possibilitar o estudo do genótipo e sua relação com o fenótipo. O desenvolvimento de plataformas de genotipagem de alto desempenho utilizando sequenciamento de nova geração possibilita o sequenciamento em massa de genomas e transcriptomas e produz um grande volume de informações.

A Seleção Genômica Ampla (GWS) enfatiza a predição simultânea (sem o uso de testes de significância para marcas individuais) dos efeitos genéticos de milhares de marcadores de DNA (SNP, DArT, Microsatélites) dispersos em todo o genoma de um organismo, de forma a capturar os efeitos de todos os locos (tanto de pequenos quanto de grandes efeitos) e explicar toda a variação genética de um caráter quantitativo. A condição fundamental para isso é que haja desequilíbrio de ligação, em nível populacional, entre alelos dos marcadores e alelos dos genes que controlam o caráter (Resende, 2014).

Os primeiros trabalhos com citros estão sendo realizados utilizando marcadores DArT_seqTM que combinam a redução da complexidade do genoma dos marcadores DArT (*Diversity Arrays Technology*) com a genotipagem por sequenciamento de última geração. O DNA total foi extraído de cada população, quantificado em Espectrofotômetro Nanodrop-8000, normalizado para 100 ng/uL, distribuídas em placas (96 poços) e enviado para a plataforma de genotipagem para a *Diversity Arrays Technology Pty Ltd* (DArT P/L, Austrália).

Depois do sequenciamento e de análises estatísticas para controle de qualidade e corte do código de barras, as sequências foram alinhadas com o genoma de referência tangerina Clementina, disponível em *Phytozome* v9.1. Os dados foram classificados como presença / ausência. A genotipagem utilizando tecnologia DArT_seqTM produziu 10.369 marcadores polimórficos para a população mapa de tangor Murcott (TM) x laranja Pera (LP), 7.851 marcadores para a população mapa de tangerina Sunki e *Poncirus trifoliata* e 13.514 marcadores polimórficos para a população do híbrido 163 (TM x LP 163) x laranja Pêra de Abril.

Utilizando os dados de genotipagem com marcadores DArT_seqTM e dados fenotípicos, demos início aos estudos de seleção genômica com a população de tangor Murcott x laranja Pera utilizando 185 indivíduos e quatro variáveis relacionadas às características dos frutos como largura, altura, número de gomos e número de sementes. Foram obtidos valores de herdabilidade genômica baseada em marcas (h_{2M}) de 0,31, 0,49 e 0,50 para número de sementes, gomos e altura de fruto e acurácia da seleção genômica de 0,58, 0,68 e 0,69 para estas mesmas características. Com estes resultados preliminares, pode-se concluir que os marcadores estão explicando bem as características e, portanto, há potencial para a efetividade da seleção genômica em *Citrus*. Nesse sentido, a seleção com o auxílio de um catálogo contendo os valores genéticos de marcas associadas aos fenótipos poderá impactar favoravelmente o melhoramento. No melhoramento genético a GWS aumenta a eficiência e rapidez do processo seletivo. Com a GWS, a predição e a seleção poderão ser realizadas em fases muito juvenis de plantas de citros, acelerando assim o processo de melhoramento genético. As acurácias da seleção baseada em fenótipos foram 0,77, 0,69 e 0,88, respectivamente, as quais são superiores àquelas da seleção genômica. Mas, um índice incluindo simultaneamente as informações fenotípicas e moleculares conduziu a acurácias de 0,81, 0,80 e 0,90, respectivamente, portanto, superiores àquelas da seleção baseada em fenótipos, especialmente para a segunda variável.

Referências bibliográficas

- Bastianel, M., Cristofani-Yaly, M., Oliveira, A. C., Ástua, J. F., Garcia, A. A. F., Resende, M. D. V., Rodrigues, V., Machado, M. A. Quantitative trait loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* L. Osbeck) x *C. sinensis* L. Osb. Euphytica (Wageningen), v. 169, p. 101-111, 2009.
- Boava, L.P., Cristofani-Yaly, M., Mafra, V.S., Kubo, K.S., Kishi, L., Takita, M.A., Ribeiro-Alves, M., Machado, M. Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. BMC Genomics, 12:39, 2011.
- Cristofani, M., Machado, M.A., Grattapaglia, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. Ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. Euphytica 109:25-32, 1999.
- Cristofani-Yaly, M., Berger, I. J., Targon, M. L. P. N. ; Takita, M. A., Dorta, S.O., Ástua, J. F., Souza, A. A. De, Camargo, R. L. B., Reis, M.S., Mendes, B. J., Machado, M. A. Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through ESTs analysis using an in silico hybridization. Genetics and Molecular Biology, v. 30, p. 972-979, 2007.
- FAO (Food and Agriculture Organization). Faostat. Statistical database. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx> >. Acesso em: 29 mar 2014.
- Gmitter, F.G. et al. Citrus genomics. Tree Genet. Genomes 8, 611–626, 2012.
- González, J.R. et al. An analysis SNPassoc An R package to perform whole genome association studies Bioinformatics, 23(5):654-655, 2007.
- Ollitrault P. et al. Development of SSR markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in Citrus. Am J Bot. 2010;97(11):e124-9. doi: 10.3732/ajb.1000280.
- Ollitrault, P. et al. A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.: citrus evolution inferences from comparative mapping. BMC Genomics 13, 593, 2012.
- Resende, M.D.V. Selegen Genômica – Software para Seleção Genômica Ampla (GWS), 2014. [HTTP://www.det.ufv.br/ppestbio/corpo_docente.php](http://www.det.ufv.br/ppestbio/corpo_docente.php).
- Resende, M.D.V.; Sliva, F.F.; Lopes, P.S.; Azevedo, C.F. Seleção Genômica Ampla (GWS) via Modelos Mistos (REML/BLUP), Interferência Bayesiana (MCMC), Regressão Aleatória Multivariada (RRM) e Estatística Espacial. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Estatística. 2012. 291p.
- Siviero, A., Cristofani, M., Furtado, E. L., Garcia, A. A. F., Coelho, A.S., Machado, M.A. Identification of QTLs associated with citrus resistance to *Phytophthora gummosis*. J Appl Genet 47(1): 23-28, 2006.
- Wu, G.A. et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. Nature Biotechnology, 2014.
- Xu, Q. et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). Nat. Genet. 45, 59–66, 2013.