



Informativo Centro de Citricultura

Cordeirópolis, Janeiro de 2013 • Número 212

Genoma dos citros: uma ferramenta para o futuro da pesquisa

Desde de que o sequenciamento do genoma da *Xylella fastidiosa* foi patrocinado pela Fapesp em uma rede de vários laboratórios no Estado de São Paulo no final dos anos 1990, o termo genoma é referido recorrentemente na mídia com expectativa de solução de problemas e desafios fitossanitários.

Assim também tem sido após a conclusão do genoma humano. Muitas promessas e ainda poucas soluções. Evidentemente que, para a comunidade científica, genoma sempre foi e será um conjunto de informações, das quais se pode ou não extrair conhecimento na medida em que se aprofunda em seus estudos. Assim também com o genoma citros.

As iniciativas para sequenciar o genoma dos citros iniciaram-se com a formação do Consórcio Internacional do Genoma Citros (International Citrus Genome Consortium - ICCG) reunindo grupos do Brasil, Estados Unidos, França, Espanha e Itália. Grupos com perfis semelhantes, como os grupos de melhoramento do Brasil (Centro de Citricultura), Estados Unidos (Universidade da Flórida) e Espanha (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias), reuniram-se a grupos de sequenciamento e bioinformática dos Estados Unidos (Joint Genome Institute, do Departamento de Energia e o HudsonAlpha Institute, da Universidade do Alabama), França (Genoscope) e Itália (Istituto di Genomica Applicata, Udine) para produzirem o primeiro genoma de referência para citros. O ICCG foi formalizado em 2005, em Valencia, Espanha.

Dois fatores iniciais contribuíram para a demora no processo. Primeiro

a definição do que sequenciar. Afinal citros é um grupo complexo de espécies. Evidentemente que a primeira tentativa deveria ser com laranja, pela importância dessa espécie na citricultura mundial. As tentativas do JGI nesse sentido mostraram-se infrutíferas, uma vez que esse genoma é altamente heterozigoto e com alta frequência de sequências repetidas, o que dificultou sobremaneira sua montagem. O segundo fator dizia respeito à disponibilidade de recursos. Poucos grupos tinham recursos prontos para serem alocados no projeto naquele momento.

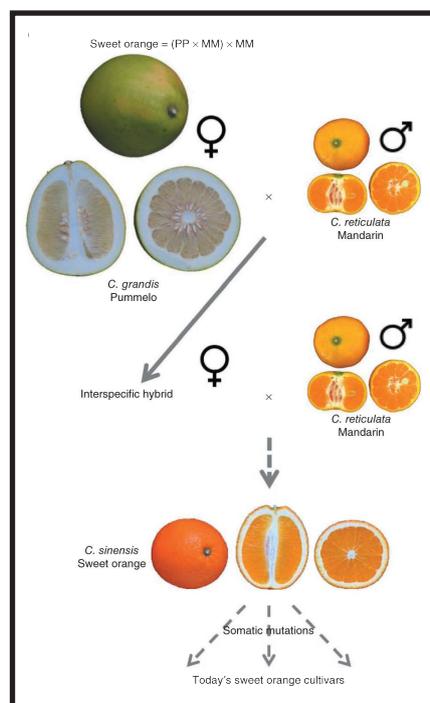
A solução para o primeiro desafio foi escolher para sequenciar um genoma de referência, que pudesse ser aplicado em todo grupo dos citros e que apresentasse menor complexidade.

Para tanto, foi escolhido um genoma haplóide (metade da carga original de cromossomos) de uma clementina disponibilizada pelo IVIA. Por ser um genoma de referência, ele deveria ser sequenciado com alta qualidade de sequenciamento, o que somente seria possível utilizando-se a tecnologia Sanger. Esse trabalho foi feito principalmente pelo HudsonAlpha Institute, com recursos do INCT Citros (Fapesp e CNPq), MP2 da Embrapa/Monsanto, Universidade da Flórida (FCRD) e IVIA. A anotação do genoma ficou sob responsabilidade do grupo do JGI. Os resultados podem ser vistos em www.phytosome.org.

Com os avanços nas novas tecnologias de sequenciamento, especialmente nas plataformas 454/Roche e Illumina/Solexa, outros genomas passaram a ser sequenciados, entre eles os de laranja doce (Estados Unidos e China), clementinas (Espanha), tangerina Ponkan (Brasil), *Poncirus trifoliata* (Brasil), toranja (Estados Unidos e Brasil) e limão Cravo (Brasil).

O grande avanço no sequenciamento com a nova tecnologia foi favorecido pela existência de um genoma de referência sequenciado com alta qualidade, como é o genoma da clementina haplóide. Isso permite que se façam montagens mais robustas dos genomas. Embora as novas tecnologias de sequenciamento gerem sequências menores e, portanto, de mais difícil montagem, elas são capazes de gerar 100 vezes mais informações quando comparada com a tecnologia Sanger.

Atualmente não existem limites para sequenciamento de todos os genomas. A base de dados da China (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange>).



Provável origem da laranja doce como híbrido de toranja com tangerina (Xu et al., 2012, Nature Genetics)

Editorial

Parcerias necessárias

Digna de elogios e expectativas a iniciativa da Fapesp em promover, em Norwich - Inglaterra, de 24 a 26 de janeiro, o Workshop sobre Biologia Vegetal, junto com a East Anglia University, o John Innes Centre e The Sainsbury Laboratory, que em conjunto compõem o Norwich Research Park (NRP).

O evento contou com vários pesquisadores do Estado de São Paulo, inclusive do Centro de Citricultura. O objetivo principal foi promover o contato entre os vários grupos de pesquisa em biologia vegetal, de modo a fomentar parcerias.

Nos últimos anos os desafios nos diferentes patossistemas de citros têm crescido de modo considerável.

*Quando a Fapesp, no final dos anos 1990, assumiu e fomentou o projeto genoma da *Xylella fastidiosa* rompeu com paradigma que as agências não deveriam fomentar temas específicos, mas deixar por conta da demanda da comunidade científica.*

Seguramente não teria havido tanto progresso no conhecimento sobre um patossistema como foi depois da conclusão do genoma da bactéria, fazendo com que ela se tornasse a sétima mais estudada bactéria de planta no mundo. Além de capacitar grupos de pesquisa, o projeto genoma ampliou a base do conhecimento, culminando com propostas concretas de controle da CVC.

Por outro lado, a complexidade dos temas envolvendo citros não permite criar expectativas de solução a médio prazo. Ilude-se quem crê que haverá a 'bala de prata' para resolver sistemas complexos, como HLB, CVC, leprose, cancro, entre outros. Quem assim pensa desconhece o que é ciência. Somente com desenvolvimento de conhecimentos básicos e multidisciplinares será possível vislumbrar as melhores estratégias para controle dessas doenças.

Nesse sentido insere-se o esforço da Fapesp em reunir esse grupo de cientistas em Norwich. O NRP é um dos mais importantes grupos mundiais que trabalham com ciências de plantas, com foco em vários aspectos aplicáveis aos patossistemas de citros. Potenciais parcerias foram discutidas e deverão ser incluídas em novos projetos do Centro de Citricultura Sylvio Moreira.

As parcerias com grupos de referências são essenciais para a evolução do conhecimento e busca por novas soluções. Na pesquisa com citros não é diferente.

Nos últimos vinte anos houve expressiva evolução no conhecimento científico e tecnológica sobre citros. No entanto, muito ainda se faz necessário.

O Centro de Citricultura está nesse caminho de busca para esses desafios.

Matéria de Capa

contém vários deles disponíveis. A Espanha está sequenciando 110 genótipos de citros (ainda não disponíveis). O Centro de Citricultura já tem pelo menos cinco genomas montados, com vários outros em sequenciamento.

A primeira publicação sobre genoma dos citros foi do grupo chinês (Xu *et al.*, Nature Genetics, 2012), que não participou do Consórcio Internacional. Esse grupo liderado pelo Pesquisador Xiu-Xin Deng, da Universidade de Wuhan, não respeitou acordo feito com o Consórcio e submeteu o manuscrito, antecipando resultados gerados pelo Consórcio, utilizando-se de dados parciais gerados no próprio consórcio. Atitude antiética e condenada por toda a comunidade envolvida no programa. O grupo chinês sequenciou o genoma de laranja Valência duplo haplóide, obtida por cultura de anteras, enquanto o consórcio sequenciou o genoma haplóide de clementina.

Se o consórcio gerou um genoma de alta qualidade por tecnologia Sanger, o genoma produzido pelos chineses é baseado no sequenciamento de nova geração, com enorme quantidade de dados para compensar parcialmente a falta de qualidade no sequenciamento.

O genoma da laranja é compacto, com 367 milhões de pares de base, com 18 cromossomos, sendo que mais de 25% desse genoma é representado por elementos móveis (transposons). A comparação do genoma de laranja doce com o genoma de toranja e tangerina Ponkan, consideradas espécies puras e ancestrais de laranja, indica que a espécie de laranja doce conhecida atualmente pode ser resultado do cruzamento de toranja com tangerina, cujo híbrido teria retrocruzado com tangerina gerando um indivíduo, a partir do qual as atuais variedades de laranja teriam se originado por mutação somática (esquema ilustrativo na capa). Estima-se que isso possa ter ocorrido há cerca de 2.300 anos.

Afinal, para que serve as informações decifradas quando um genoma é sequenciado? Qual a utilidade de tais informações? Em

primeiro lugar, são informações científicas que podem ser utilizadas como ferramentas para diversas frentes de trabalho. Podem ser comparadas a uma enciclopédia, na qual todos as regiões de codificantes para genes ou não codificantes podem ser conhecidas e estudadas.

Associação de genomas com mapas genéticos permite identificar genes responsáveis por características importantes, como resistência ou suscetibilidade a doenças, ou produção de compostos, como vitamina C, óleos essenciais, flavonóides, entre outros. Tais informações são essenciais para novas estratégias de melhoramento por transformação genética sem envolver transgenia. A comparação entre genomas de espécies de citros permitirá entender o que determina que uma espécie seja, por exemplo, tangerina e outra limão, isto é, irá definir quais os genes que caracterizam a espécie. Evidentemente que será possível também entender porque uma espécie é resistente e outra altamente suscetível a um determinado patógeno.

Assim, a utilidade de um genoma é diretamente proporcional à capacidade de uso dessa informação. No entanto, é claro que todas essas ferramentas deverão cada vez mais se incorporarem aos programas de melhoramento de citros. É a pesquisa trilhando caminhos mais seguros para alcançar resultados.

Notas

Participação em Bancas

No dia 24 de janeiro de 2013, a Pesquisadora Katia Cristina Kupper participou da Comissão Examinadora da defesa de Tese de Doutorado de Ana Carolina Ribeiro Machado, aluna em Microbiologia Agropecuária da Unesp/FCAV. O trabalho, intitulado 'Otimização da produção massal e formulação de *Bipolaris euphorbiae* visando obtenção de um bioherbicida', apresentou dados importantes sobre a formulação de um bioproduto à base de um fungo para controle de *Euphorbia heterophylla*, importante espécie infestante comumente conhecida como leiteiro.

Citros na Conferência Internacional de Genoma de Plantas e Animais

Os Pesquisadores Marco Aurélio Takita e Mariângela Cristofani-Yaly participaram da Conferência Plant and Animal Genome, realizada entre os dias 12 e 16 de janeiro de 2013, em San Diego, Estados Unidos. Na Conferência estiveram presentes 2.396 pessoas (59 brasileiros), representando 57 diferentes países.

Foram apresentados trabalhos desenvolvidos no Centro de Citricultura nas áreas de genômica e mapeamento genético. Um deles foi sobre síntese de terpenos e proteínas de resistência a patógenos, outro foi sobre genotipagem por sequenciamento para construção de mapas genéticos saturados de citros.

No *workshop* sobre citros, além da apresentação da Pesquisadora Mariângela Cristofani-Yaly, foram apresentados os trabalhos realizados pelo Consórcio Internacional do Genoma de Citros, representado pelo pesquisador Guohong Albert Wu, do Joint Genome Institute do Departamento de Energia dos Estados Unidos. Nessa apresentação relatou-se que os genomas de toranjas representam espécies puras de citros, ao passo que no genoma de tangerina, até então considerada uma espécie pura, há mistura de genomas, com possibilidades de reconstrução do genoma original. As análises do genoma de laranja doce mostram que esta seria resultado dos cruzamentos de toranja com tangerina, sendo o híbrido resultante retrocruzado com tangerina. A partir desse híbrido pode ter havido retrocruzamento com toranja.

Os Pesquisadores Manuel Tallon e Javier Terol, do IVIA, Espanha, mostraram dados gerados com o sequenciamento e comparação dos genomas de variedades de clementina. A Espanha tem em seu banco de dados sequências de genomas de 110 variedades, resultado de um trabalho realizado com recursos da iniciativa privada. Com isto, eles estão buscando identificar mutações relacionadas a diversos aspectos da produção de clementinas.

Chunxian Chen, da Universidade da Flórida, apresentou dados de identificação de SNPs (single nucleotide polymorphism) em pontas de BACs

(bacterial artificial chromosomes) e a utilização destes para mapeamento de citrange, possibilitando a construção de um mapa genético de laranja doce, que está sendo utilizado para melhorar a qualidade da montagem do genoma dessa espécie. A Pesquisadora Sook Jung, da Washington State University, apresentou aspectos que foram incorporados na base de dados de citros (<http://www.citrusgenomedb.org/>).

Na sessão de pôsteres, sete dos apresentados estão relacionados a trabalhos com marcadores moleculares, bioinformática e sequenciamento de genomas em citros, sendo que dois deles são do Centro de Citricultura. Na sessão de genômica de artrópodos foi apresentada pelo pesquisador Wayne Hunter, do USDA/ARS Fort Pierce, a palestra sobre o genoma de psilídeo dos citros.

Visita ao Centro de Citricultura

No dia 1 de fevereiro, os Pesquisadores Marco Aurélio Takita, Rodrigo Boaretto, Mariângela Cristofani-Yaly e Kátia Cristina Kupper receberam a visita de três Professores Zachary Senwo da Universidade do Alabama, Yong Wang, da Alabama A&M University, e Conrad K. Bonsi, da Tuskegee University. Um dos objetivos da visita foi avaliar oportunidades para intercâmbio de alunos e pesquisadores do Instituto Agrônomo com aquelas universidades.

Foram apresentados à organização do Centro e suas instalações, como banco de matrizes, borbulheiras, BAG protegido e laboratórios.

Workshop de Biologia Vegetal

A Fapesp e a Universidade de East Anglia em Norwich, Inglaterra, mantêm acordo de cooperação científica nas mais diversas áreas do conhecimento, que tem como objetivo o desenvolvimento conjunto de projetos de pesquisa, selecionados por meio de chamadas de propostas. O acordo prevê a realização de workshops voltados para a identificação de áreas de interesse mútuo.

Neste sentido, entre os dias 24 a 26 de janeiro, a Fapesp promoveu 'Workshop on Plant Science', em Norwich, com a participação de

Pesquisa do Centro

Bases moleculares da resposta ao HLB

As interações compatíveis da planta com microrganismos têm normalmente como resultado a alteração de vários processos metabólicos e celulares, cujo resultado final é o que conhecemos como doença. Nessas interações, a planta pode ter mecanismos de defesa impedindo o progresso do patógeno e, portanto, são chamadas de resistentes. No entanto, ou a planta pode não ter mecanismos de resistência ou o patógeno pode superar esses mecanismos, tornando-a suscetível, e pode desenvolver a doença. Em citros não é diferente, muito embora os mecanismos possam ter regulação diferenciada pelo fato de serem plantas lenhosas e perenes.

A complexidade do patossistema do *huanglongbing* (HLB), com o patógeno sendo uma bactéria intracelular nos vasos crivados do floema e tendo um vetor que o transporta de planta a planta, deixa antever que vários mecanismos conhecidos na interação de plantas com bactérias podem estar ocorrendo no desenvolvimento da doença. Objetivando entender os mecanismos de interação de citros com as bactérias do HLB, uma das abordagens é o estudo da expressão de genes durante o processo de infecção. Esse estudo pode ocorrer em larga escala, isto é, com grande parte de todos os genes expressos avaliados ao mesmo tempo, ou em menor escala, quando apenas genes específicos são estudados. Esse tipo de estudo é denominado transcriptoma (coleção de transcritos, isto é, coleção de RNA mensageiros derivados diretamente dos genes no DNA), permitindo vislumbrar quais são os genes ou vias metabólicas que estão sendo afetados quando a planta está sob o estresse da infecção.

Durante o processo de infecção do HLB observam-se modificações significativas em genes associados à via de resposta do ácido salicílico, proteínas de defesa, genes do metabolismo de carboidratos e calose, assim como vários fatores de transcrição (reguladores da transcrição do DNA). As evidências apontam para uma reação ativa da planta contra a infecção, mas insuficiente para conter o desenvolvimento da bactéria e sua dispersão para outras regiões de crescimento da planta. Muito provavelmente há setorização desse processo dentro da planta, com regiões mais afetadas que outras, o que poderia explicar a distribuição irregular dos sintomas.

O detalhamento da expressão de genes de vias encontradas nessa fase do trabalho está em andamento e poderá esclarecer de vez quais os principais mecanismos de desenvolvimento da doença. Será uma informação valiosa na busca de estratégias de controle.

Responsável: Valéria Mafra, Bolsista de Pós Doutorado do INCT Citros.

Supervisão: Marcos Antonio Machado e Juliana Freitas-Astúa.

pesquisadores do Estado de São Paulo e do Norwich Research Park (NRP) que trabalham com biologia vegetal. O NRP é composto pela Universidade de East Anglia (UEA), John Innes Centre (JIC) e The Sainsbury Laboratory (TSL). Foram convidados pela Fapesp 18 pesquisadores brasileiros para apresentarem os resultados de seus trabalhos, com o intuito de promover a colaboração entre os grupos de interesse científico comum.

Pelo Centro de Citricultura participaram os Pesquisadores Marcos Antonio Machado e Alessandra Alves de Souza, que apresentaram os resultados das pesquisas com *Candidatus Liberibacter spp/HLB* e *Xylella fastidiosa/CVC*, em desenvolvimento no Centro. Marcos Antonio Machado ministrou palestra intitulada "Transcriptome of citrus in the infection of *Candidatus Liberibacter ssp*, agent of *huanglongbing*," enquanto que Alessandra Alves de Souza apresentou a palestra "Translating knowledge into field application for controlling *Xylella fastidiosa*."

No final do evento, a discussão dos grupos com interesse comum

contribuiu para uma colaboração mais efetiva entre os pesquisadores. Na ocasião foram estabelecidas colaborações entre os pesquisadores do Centro de Citricultura e o do NRP, abrindo novas fronteiras para o avanço do conhecimento da interação planta-patógeno e possibilidades de controle para doenças que afetam a citricultura..



FAPESP/NRP Plant Sciences Workshop 2013

Pesquisadores do Estado de São Paulo e pesquisadores da NRP, Norwich, Inglaterra, no Workshop sobre Biologia Vegetal promovido pela Fapesp.



Expediente

Informativo Centro de Citricultura

Conselho Editorial

Arthur Antonio Ghilardi
José Dagoberto De Negri
Marcos Antonio Machado

Colaboração

Alessandra Alves de Souza
Katia Cristina Kupper
Juliana Freitas-Astúa
Marco Auréio Takita
Mariângela Cristofani-Yaly
Valéria Mafra
Vivian Michelle dos Santos

Rod. Anhanguera, km 158
Caixa Postal 04, CEP 13490-970,
Cordeirópolis, SP
Fone/fax: (19) 3546-1399
www.centrodecitricultura.br
informativo@centrodecitricultura.br



14 de março de 2013

VI Dia do Huanglongbing

- 08:30 h Recepção e abertura
- 09 h HLB: fisiologia da relação planta-patógeno e possibilidades para manejos nutricionais - Camilo Lázaro Medina
- 9:45 h Atualização sobre pesquisa com HLB no mundo - Juliana Freitas-Astúa
- 11 h Situação do HLB e cancro cítrico na Flórida - Gilberto Tozatti
- 13:30 h Monitoramento regional de psilídeos na região sudoeste do Estado de SP Marcelo P. Miranda
- 14:15 h Aquisição de *Liberibacter asiaticus* por psilídeos adultos e sua importância na epidemiologia do HLB - Helvécio Della Coletta Filho
- 15 h Manejo nutricional e HLB: resultados de dois anos sobre estado nutricional do pomar - Dirceu de Mattos Jr
- 15:45 h Manejo nutricional e HLB: resultados de dois anos sobre epidemia e produção - Renato B. Bassanezi
- 16:30 h Encerramento



**GOVERNO DO ESTADO
SÃO PAULO**

Secretaria de Agricultura
e Abastecimento