

GOCITRUS

Identificación inequívoca de variedades comerciales de cítricos

8 de Septiembre de 2020

Dra. Victoria Ibáñez González
Técnico Producción y Desarrollo- ANECOOP
E-mail: victoriaibanez@anecoop.com

Identificación inequívoca de variedades comerciales de cítricos.



1. Identificación varietal actual y futura.
2. Objetivo 1 proyecto GOCITRUS
3. Protocolo de identificación generalizado por GOCITRUS.
4. Marcadores moleculares: tipos y usos.
5. Ejemplos aplicados:
 - Nules-Arrufatina-Nero.
 - 3 Clones comerciales
 - W.Murcott-Tango
6. Coste de obtención y uso de marcadores.
7. Validez del protocolo
8. Review: antes y después de GOCITRUS.
9. Conclusiones

1. Identificación varietal

Identificación (marcadores)

Bioquímico (sustancia medible: brix, acidez)

AMBIENTE

Morfológico (forma hoja, fruto...)

Molecular (secuencia de ADN)

~~**AMBIENTE**~~

Actual

Corto plazo

AGRONÓMICAMENTE (DHE)

Brix, Acidez, forma hoja, fruto...

AGRONÓMICAMENTE (DHE)

Brix, Acidez, forma hoja, fruto...

MOLECULARMENTE (ADN)

Cambios en la secuencia de ADN

Determinan Si un material vegetal puede registrarse como variedad comercial

Creación Unidad Identificación Varietal Molecular

CPVO-TP/201/2 (Pomelo-pummelo)
CPVO-TP/201/1 (Mandarinas)
CPVO-TP/202/1 (Naranjas)
CPVO-TP/203/1 (Limas-limones)

Sub-objetivo GOCITRUS

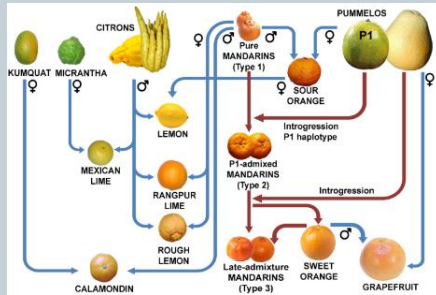
2. Objetivo 1 proyecto GOCITRUS

- **Objetivo 1 proyecto GOCITRUS: Generalización sistema identificación apoyado en base de datos Citrusseq.**
 - R3: Secuenciación de variedades no incluidas en la base de datos Citrusseq/Citrusgenn.
 - ✦ > 25% mandarinas comerciales españolas.
 - ✦ > 10% naranjas comerciales españolas.
 - R4 Obtención de marcadores moleculares de nuevas variedades seleccionadas
 - ✦ Al menos 1 marcador inequívoco de:
 - 25% variedades de mandarinas
 - 10% de naranjas dulces

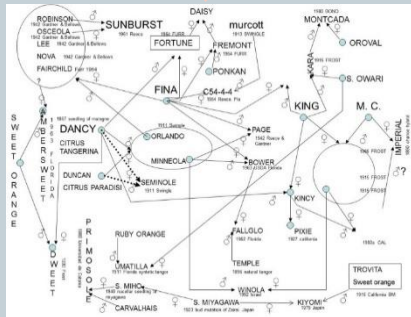
3. Protocolo de identificación generalizado por GOCITRUS.

ENFOCADO PRINCIPALMENTE A IDENTIFICAR VARIEDADES PROCEDENTES DE MUTACIÓN

ADMIXTURE, HIBRIDOS



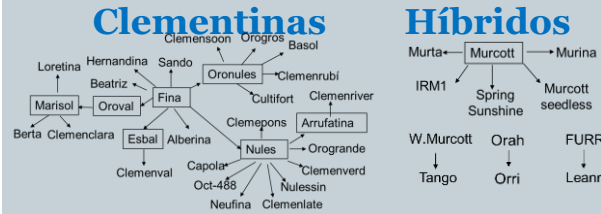
2018-Genomics of the origin and evolution of citrus. Nature. 554:311-316.



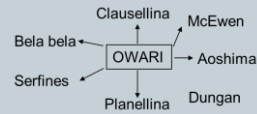
Images from López-García, Antonio

MUTACION

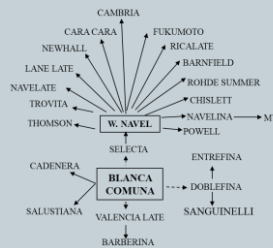
• MANDARINAS



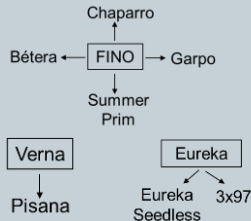
Satsumas



• NARANJAS

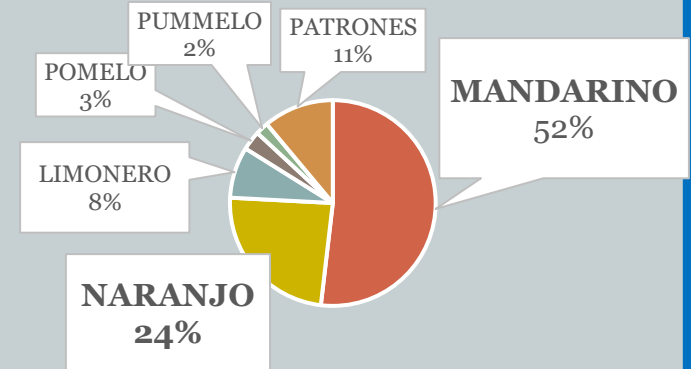


• LIMONES



291 Variedades Comerciales España

<https://www.mapa.gob.es/app/regVar/default.aspx>
<https://cpvo.europa.eu/en/applications-and-examinations/cpvo-varieties-database>



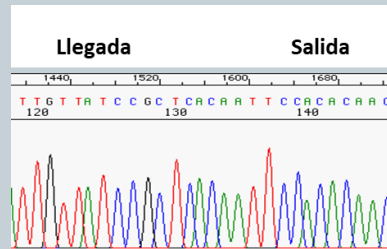
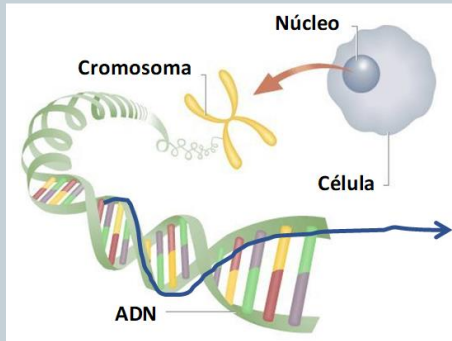
> 50% son mutación !!!

4. Marcador molecular.

❑ **Marcador Molecular = Biomarcador Genético = Marcador Genético**

FRAGMENTO DE ADN LOCALIZADO

❑ **ADN**



El orden de las bases determina el mensaje.

Un cambio en una letra o un orden de palabras cambia el mensaje

4. Marcador molecular. USOS.

❑ Utilidad de los marcadores moleculares

- Selección Asistida por Marcadores (SAM)
- **Identificación → CERTIFICACIÓN VARIETAL, trazabilidad**

✓ EL ADN ES EL MISMO EN TODAS LAS CÉLULAS DE CADA SER VIVO

✓ EL ADN NO CAMBIA ENTRE TEJIDOS O EDAD. → ~~AMBIENTE~~



- ✓ Cualquier material vegetal: hoja, raíz, pulpa, zumo...
- ✓ Cualquier especie, variedad...
- ✓ Cualquier momento de desarrollo de la planta: plántula, adulto



Plantón



Árbol



Fruto



Hoja

4. Marcador molecular. Tipos.

POR CRUCE

- Dos especies remotas
- Híbridos inter e intraespecíficos.
- Padre/Hijo

- ✓ Distancia genética
- Biomarcadores genéticos
 - ✓ - AFLPS, RAPDS...
 - ✓ - SSR (microsatélites)
 - ✓ - Variaciones estructurales
 - ✓ - Indels
 - ✓ - SNP

Requiere
Secuenciación

POR MUTACIÓN

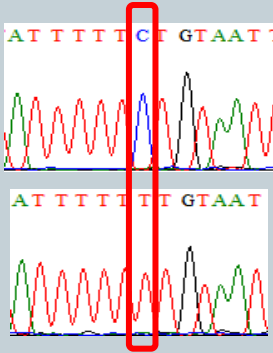
- Espontánea
 - Inducida
- Ejemplo: Clementina Fina y Clemenules

- ✗ - Distancia genética
- Biomarcadores genéticos
 - ✗ - AFLPS, RAPIDS...
 - ✗ - SSR (microsatélites).
 - ✓ - Variaciones estructurales
 - ✓ - Indels
 - ✓ - SNP

4. Marcadores usados en el protocolo generalizado por GOCITRUS.

✓ SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Cambia **una** letra



Elegante



Elefante

✓ INDEL (**IN**serción, **DE**lección)

Pérdida o ganancia de unas pocas letras.

T A A T T C T A C G A T G G T T T T C T T C A C C A A G
T A A T T C T A C T T T T C T T C A C C A A G
T A A T T C T A C G A G G T G G T T T T C T T C A C C A

*El perro se comió **la comida** de la abuela*



El perro se comió a la abuela

✓ VARIACIONES ESTRUCTURALES

Pérdida, Ganancia o reorganizaciones (Inversion, translocación) de fragmentos de **cientos, miles** o **millones** de letras.

*El perro se comió **la comida** del abuelo*



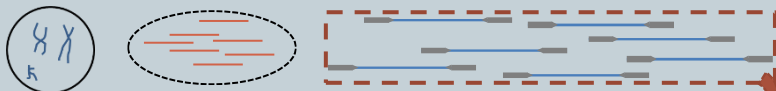
***La comida del perro** se la comió el abuelo*

4. Protocolo de identificación generalizado por GOCITRUS.

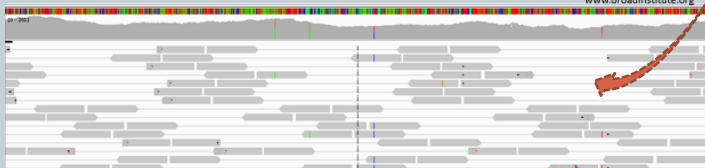
1. Secuenciar genoma (variedad)



ADN Fragmentos pair-end fragmentos



2. Alinear con referencia.



3. Comparar genomas

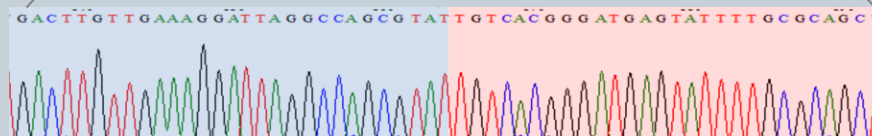
Base datos: CITRUSEQ-CITRUSGENN

- ✓ SNPs: .vcf
- ✓ INDELs: .vcf
- ✓ VE (Dup/Del), (Trans/Inv):
Scripts; .bam, .tdf, LOH...etc

4. Selección, Interpretación y reconstrucción *in silico* secuencia variedad A.

5. Verificación variantes en bancada por PCR. Diseño oligonucleótidos. Sec Pto.

CATTCTGTAATGTTTATGTGTAGATTCTAGCTCAAAGGGTTTCGCTGTTTGATTATGAGCTTGTGAG
GGGAAACCAAGGGAAGAGAAGGTTGATTGCTTTTGGAAAGTTTGCTGGTAGAGCTGCCATAATTGACT
TGTGAAAGGATTAGCCAGCGTATGTCACGGGATGAGTGTGTTTGCAGCTAACCCGTGCGGCACIT
AGACAACTTTCGCGAATGTTGCTAAGTAAGCCTAGAGATTCTCGGAATAGAGAAGAGCAATTGAGC
CAAAGAAGAACTTGTATTGCACAAAGAGAGATTACAATGCTTGTGTAAGTGTGTTGATACAA
TGCCTAATGCCATCCCATATTTATAGGGGAGGCTTGCCAAGCTCTAGAGATTCTAGAGAATTCTACCAT
GTTCCTAGAATTCTAGATATT



6. Verificación con muestras ciegas.

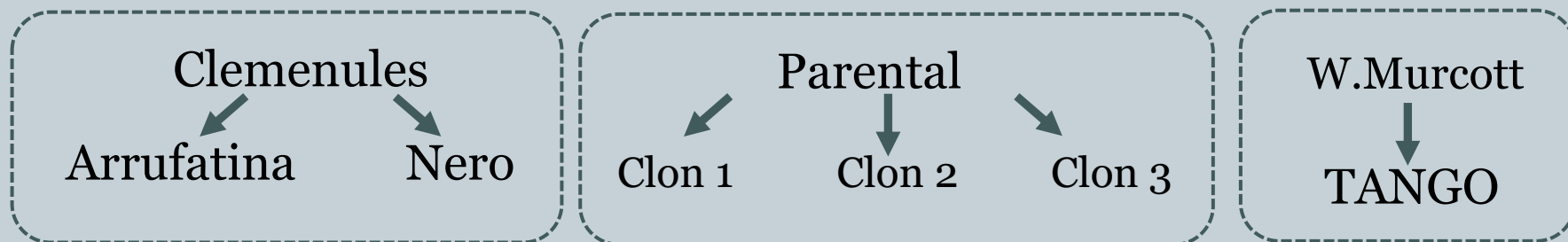


SET DE MARCADORES MOLECULARES

PERMITEN DISCRIMINAR ENTRE
Especies Híbridos **Mutaciones**

5. Ejemplo IDENTIFICACIÓN variedades procedentes de mutación

- > 95% genomas procedentes de mutación tienen variaciones estructurales.



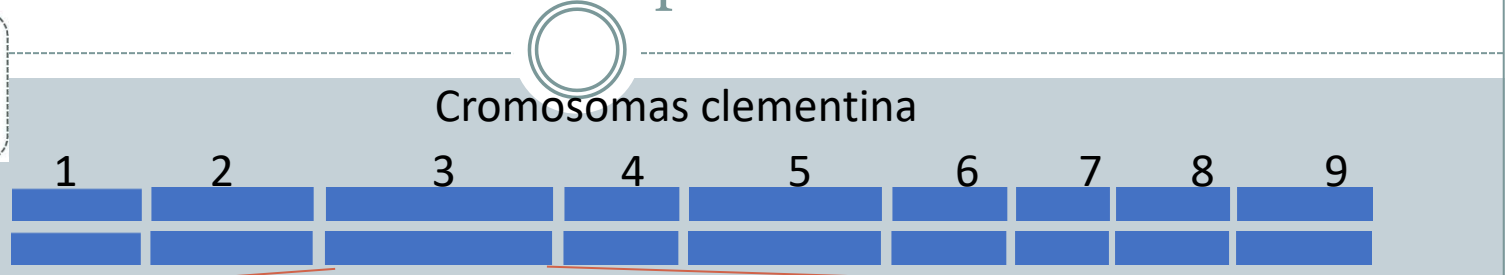
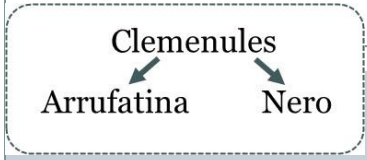
1 Cambio estructural = 1 Marcador de Identificación



Identificación inequívoca

5. Ejemplo Arrufatina y Nero

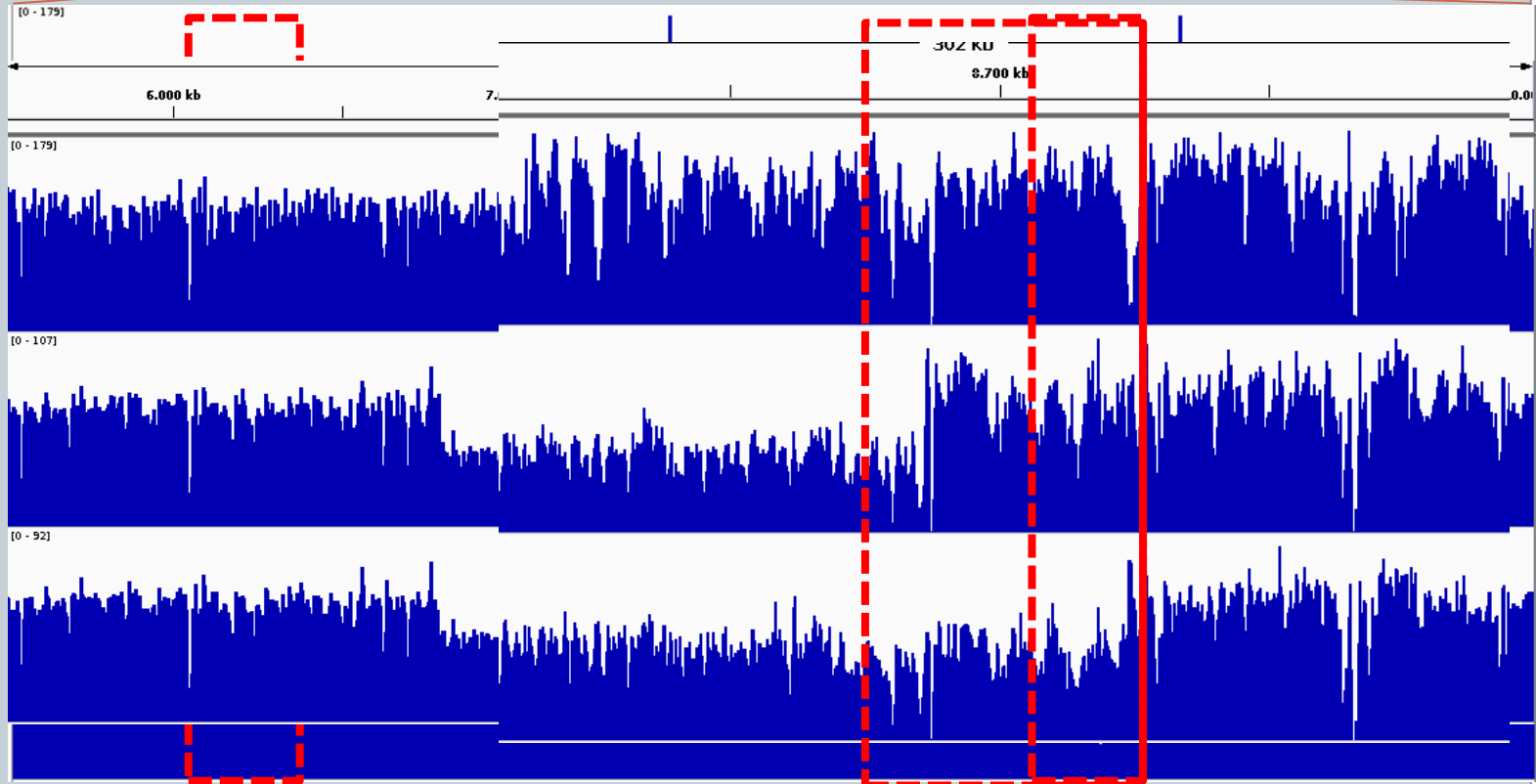
IDENTIFICACIÓN variedades procedentes de mutación



Parental
(Clemenules)

Natural
(Arrufatina)

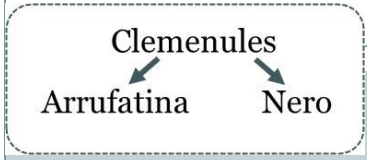
Inducida
(NERO)



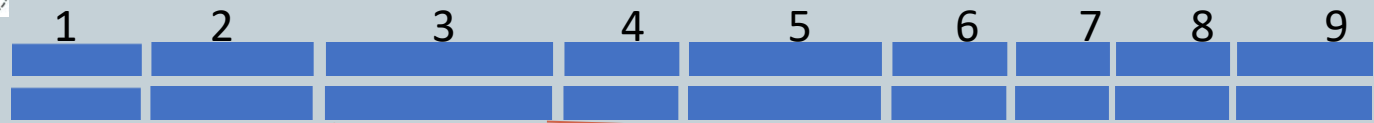
Cromosoma 3

5. Ejemplo Arrufatina y Nero

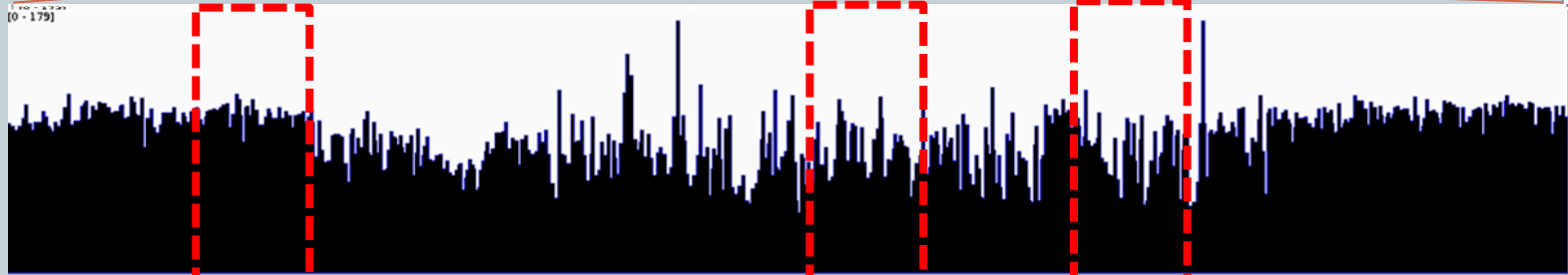
IDENTIFICACIÓN variedades procedentes de mutación



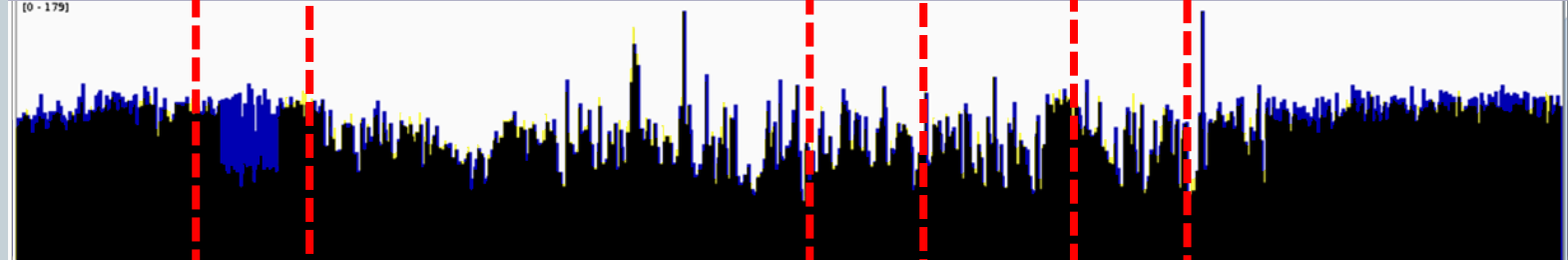
Cromosomas clementina



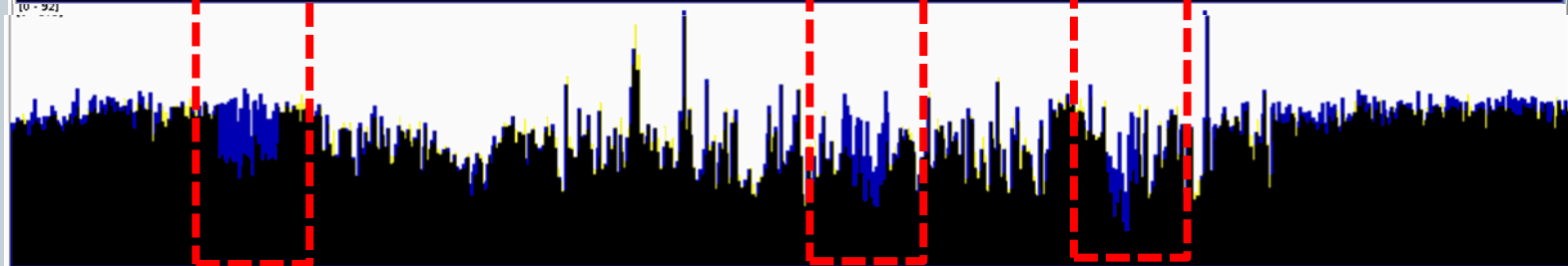
Parental
(Clemenules)



Natural
(Arrufatina)



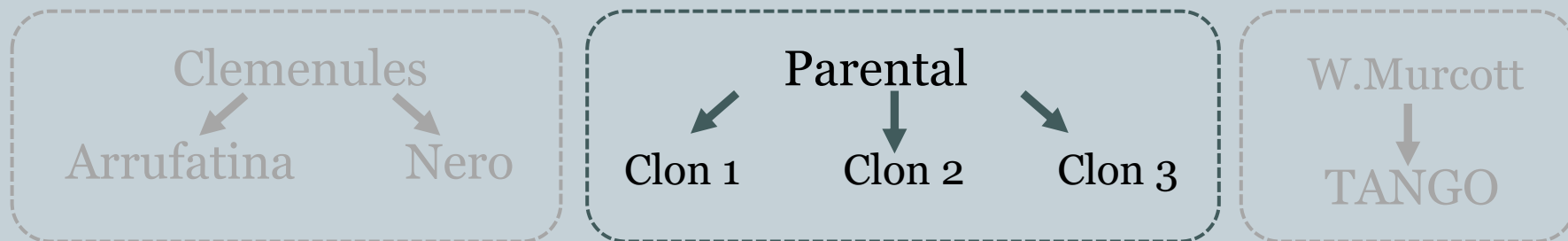
Inducida
(NERO)



Cromosoma 3

5. Ejemplo IDENTIFICACIÓN variedades procedentes de mutación. **CLONES VARIETALES**

- > 95% genomas procedentes de mutación tienen variaciones estructurales.

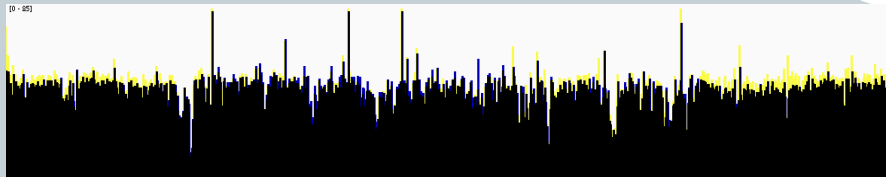


1 Cambio estructural = 1 Marcador de Identificación

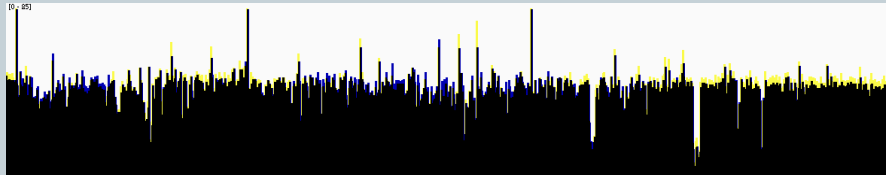
Identificación inequívoca

5. Ejemplo IDENTIFICACIÓN CLONES VARIETALES: CLON 1

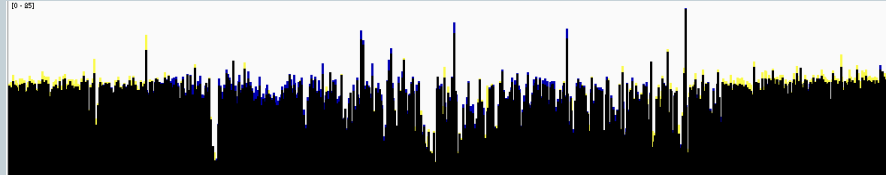
Cromosoma 1



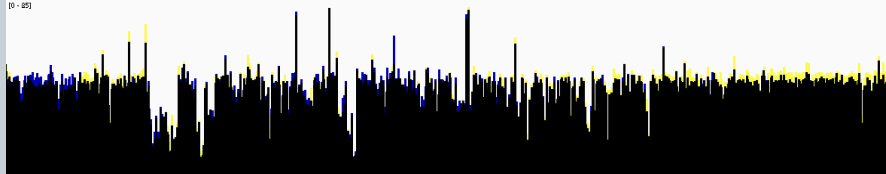
Cromosoma 2



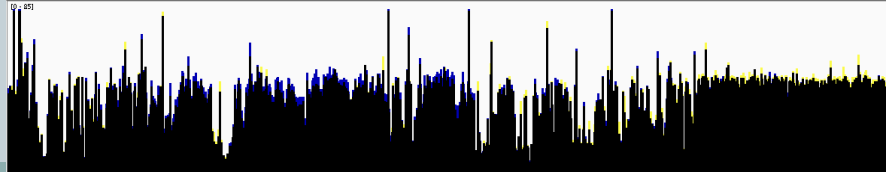
Cromosoma 3



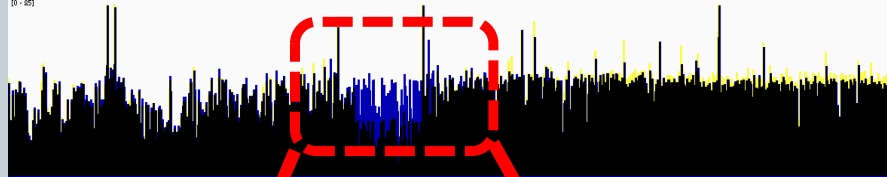
Cromosoma 4



Cromosoma 5

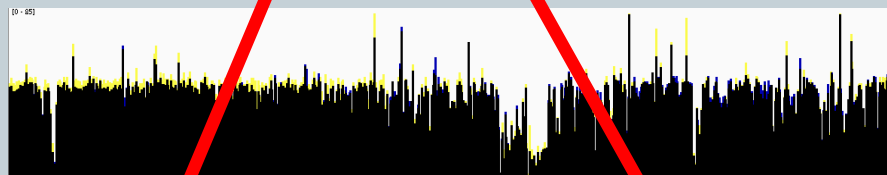


Cromosoma 6

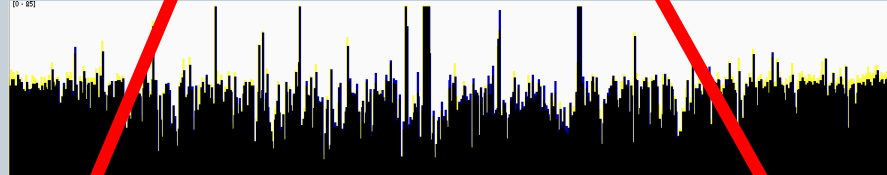


**BAJADA DE COBERTURA EN
CROMOSOMA 6**

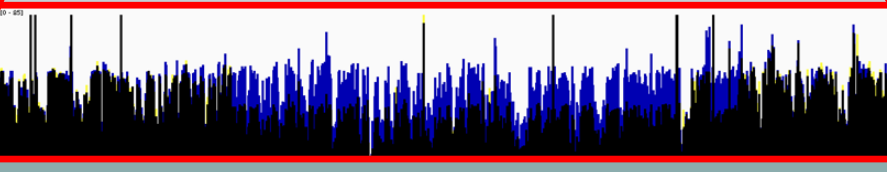
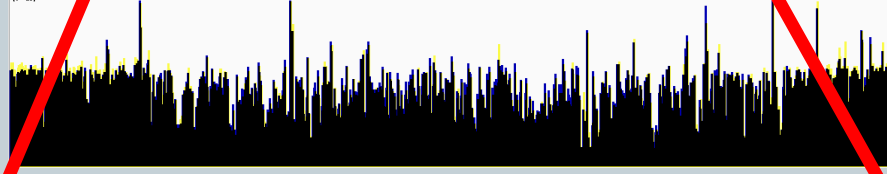
Cromosoma 7



Cromosoma 8



Cromosoma 9



5. Ejemplo IDENTIFICACIÓN CLONES VARIETALES: CLON 1

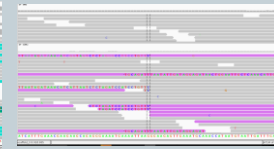
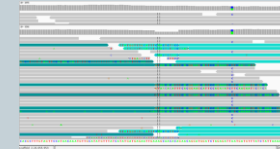
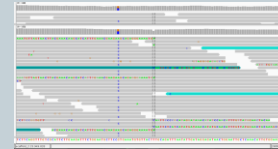
Scripts SV...



Clon	Parental	SV	SV	SV	SV	SV	SV	SV	SV	SV
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

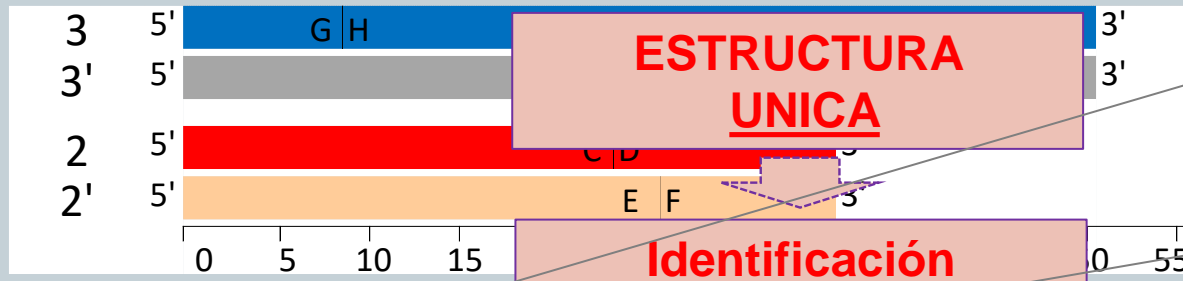


PARENTAL
CLON 1

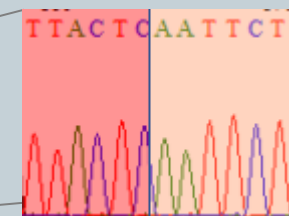
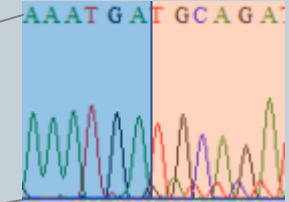
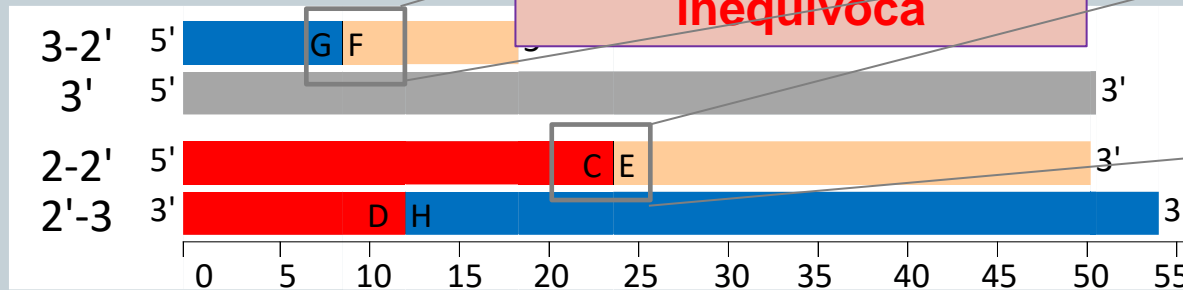


- CROMOPLEXIA entre los cromosomas 2 y el cromosoma 3.

Parental

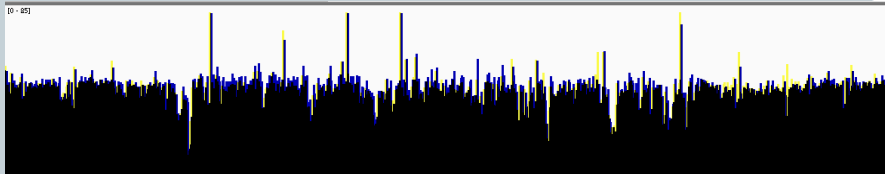


CLON 1

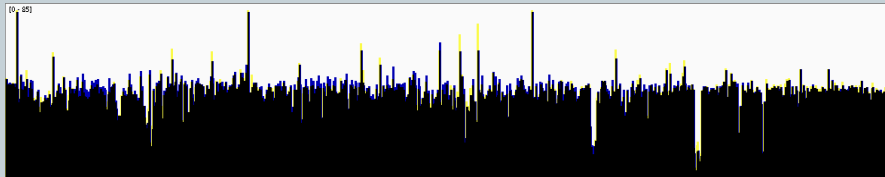


6. Ejemplo IDENTIFICACIÓN CLONES VARIETALES: CLON 2

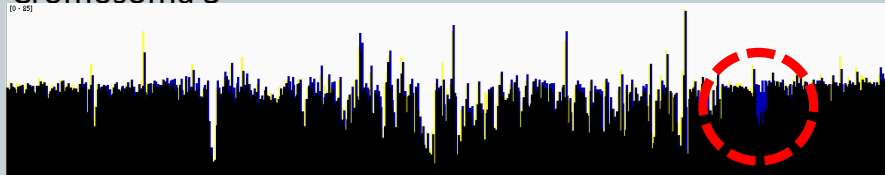
Cromosoma 1



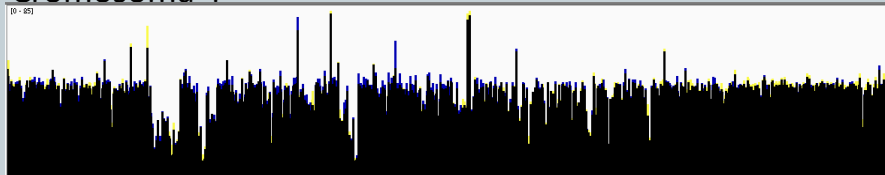
Cromosoma 2



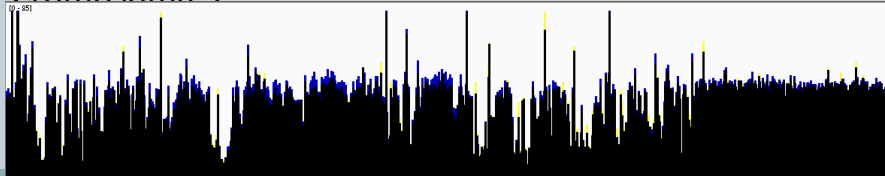
Cromosoma 3



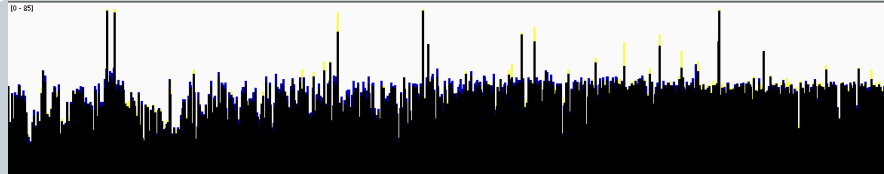
Cromosoma 4



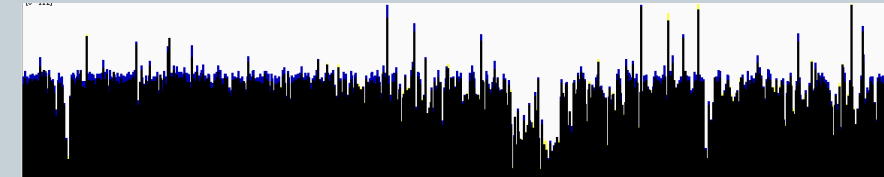
Cromosoma 5



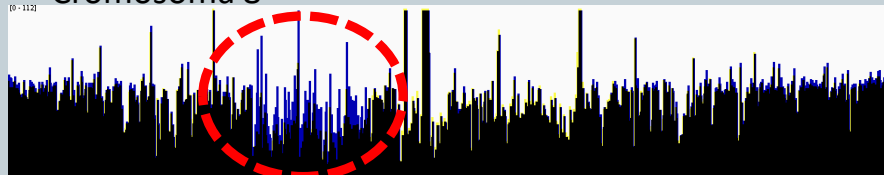
Cromosoma 6



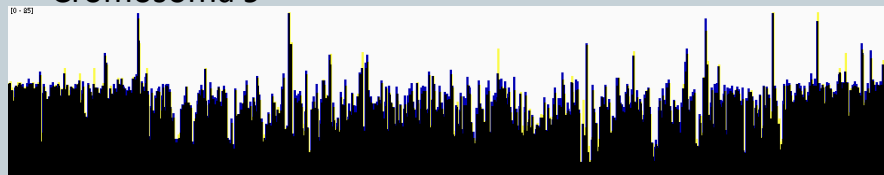
Cromosoma 7



Cromosoma 8



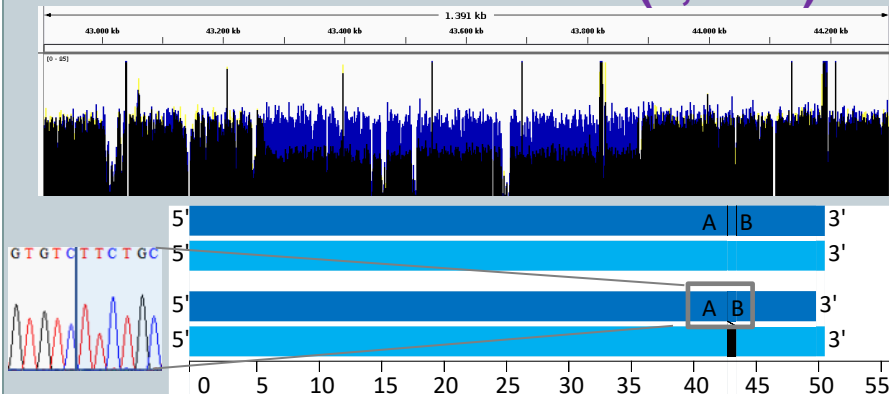
Cromosoma 9



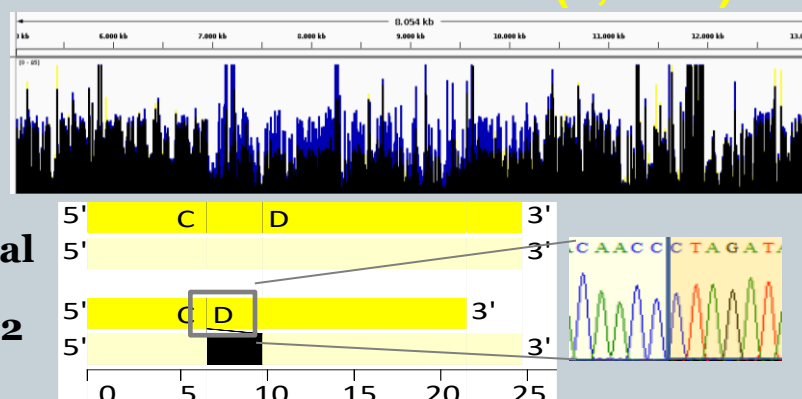
- DELECIÓN EN CROMOSOMA 3
- DELECIÓN EN CROMOSOMA 8

6. Ejemplo IDENTIFICACIÓN CLONES VARIETALES: CLON 2

• Deleción Cromosoma 3 (0,6 Mb)

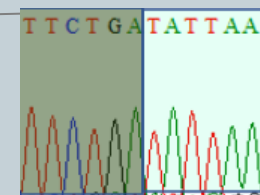
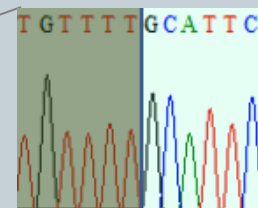
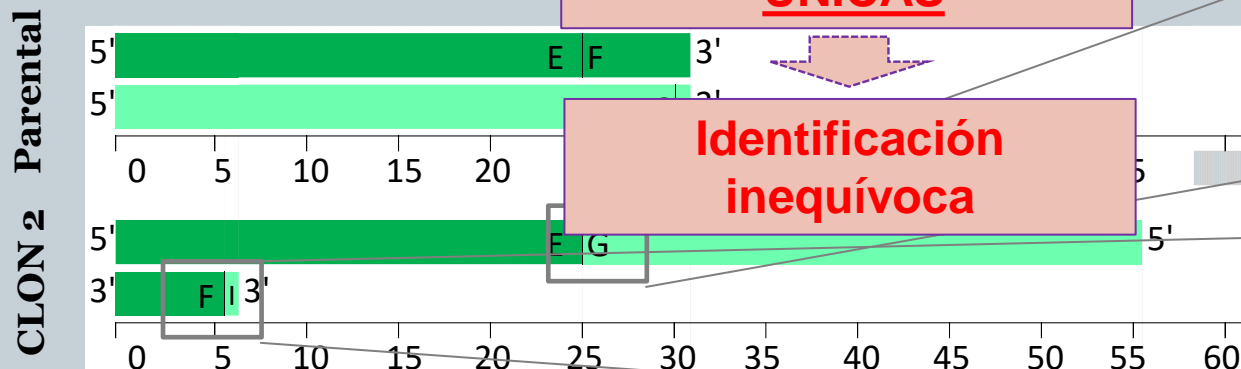


Deleción Cromosoma 8 (3,2 Mb)



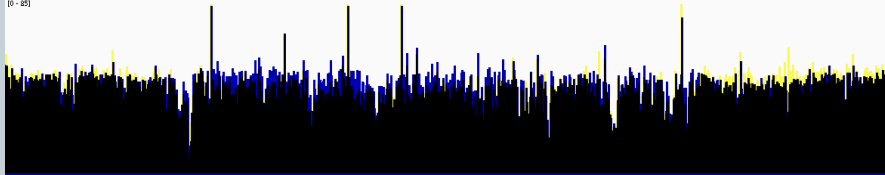
• Translocación recíproca

- Nuevos cromosomas: 9

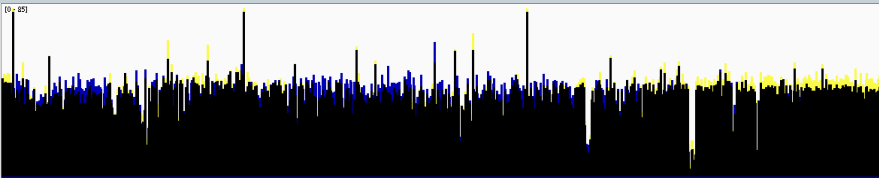


6. Ejemplo IDENTIFICACIÓN CLONES VARIETALES: CLON 3

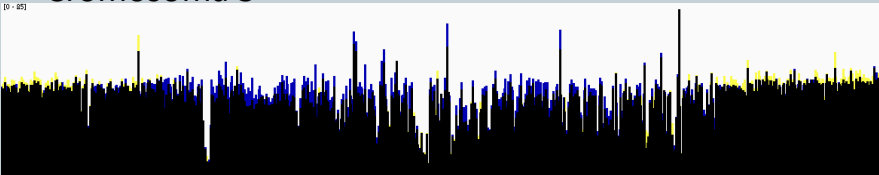
Cromosoma 1



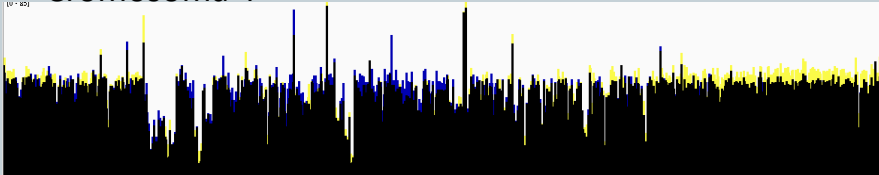
Cromosoma 2



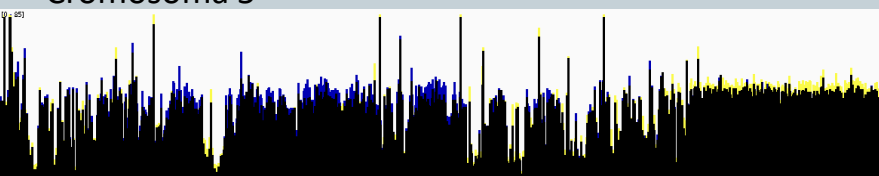
Cromosoma 3



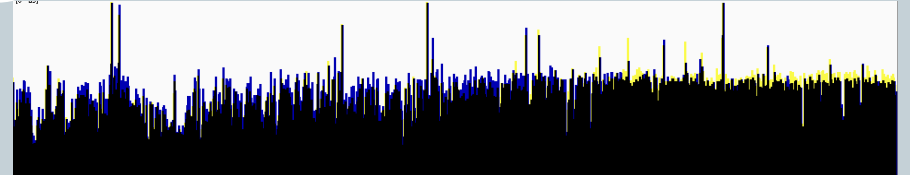
Cromosoma 4



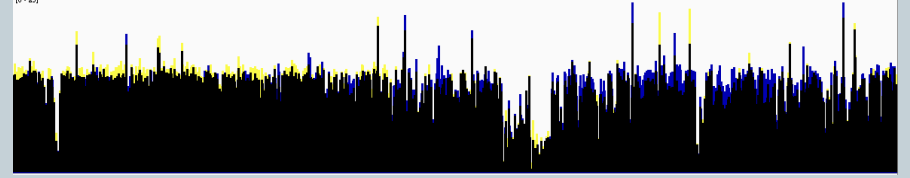
Cromosoma 5



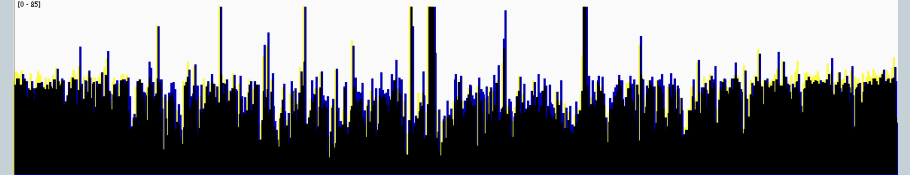
Cromosoma 6



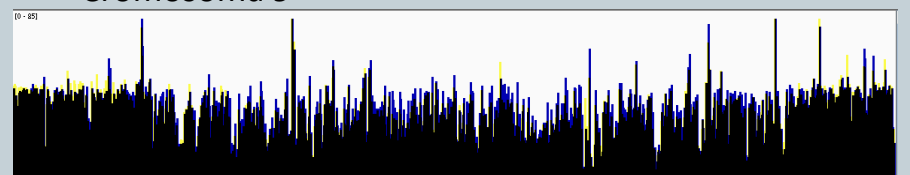
Cromosoma 7



Cromosoma 8



Cromosoma 9



No Variaciones Estructurales
DELECIÓN o DUPLICACIÓN

6. Ejemplo IDENTIFICACIÓN CLONES VARIETALES: CLON 3

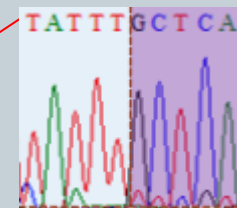
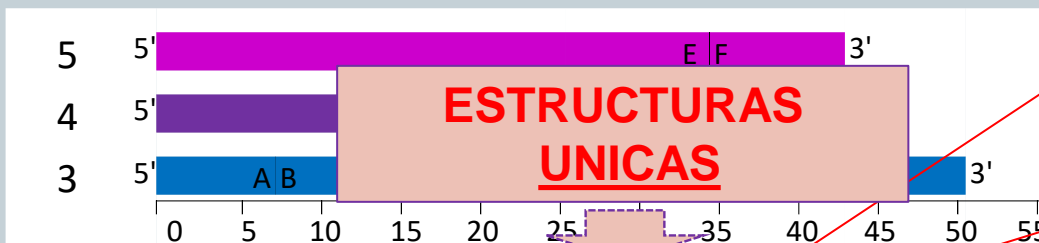
Scripts SV...



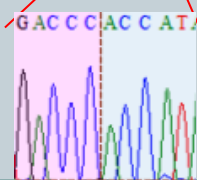
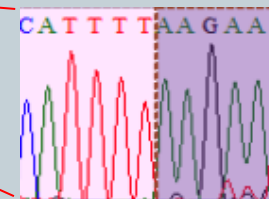
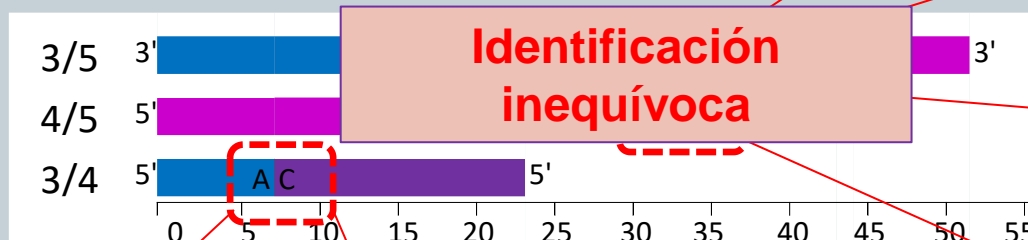
Chr	Start	End	Strand	Gene
1	10000	10000	+	Gene1
1	20000	20000	-	Gene2
1	30000	30000	+	Gene3
1	40000	40000	-	Gene4
1	50000	50000	+	Gene5
1	60000	60000	-	Gene6
1	70000	70000	+	Gene7
1	80000	80000	-	Gene8
1	90000	90000	+	Gene9
1	100000	100000	-	Gene10
1	110000	110000	+	Gene11
1	120000	120000	-	Gene12
1	130000	130000	+	Gene13
1	140000	140000	-	Gene14
1	150000	150000	+	Gene15
1	160000	160000	-	Gene16
1	170000	170000	+	Gene17
1	180000	180000	-	Gene18
1	190000	190000	+	Gene19
1	200000	200000	-	Gene20
1	210000	210000	+	Gene21
1	220000	220000	-	Gene22
1	230000	230000	+	Gene23
1	240000	240000	-	Gene24
1	250000	250000	+	Gene25
1	260000	260000	-	Gene26
1	270000	270000	+	Gene27
1	280000	280000	-	Gene28
1	290000	290000	+	Gene29
1	300000	300000	-	Gene30
1	310000	310000	+	Gene31
1	320000	320000	-	Gene32
1	330000	330000	+	Gene33
1	340000	340000	-	Gene34
1	350000	350000	+	Gene35
1	360000	360000	-	Gene36
1	370000	370000	+	Gene37
1	380000	380000	-	Gene38
1	390000	390000	+	Gene39
1	400000	400000	-	Gene40
1	410000	410000	+	Gene41
1	420000	420000	-	Gene42
1	430000	430000	+	Gene43
1	440000	440000	-	Gene44
1	450000	450000	+	Gene45
1	460000	460000	-	Gene46
1	470000	470000	+	Gene47
1	480000	480000	-	Gene48
1	490000	490000	+	Gene49
1	500000	500000	-	Gene50
1	510000	510000	+	Gene51
1	520000	520000	-	Gene52
1	530000	530000	+	Gene53
1	540000	540000	-	Gene54
1	550000	550000	+	Gene55

- **CROMOPLEXIA** entre los cromosomas 3, 4 y 5
 - Chr 3/4 de 23.7 Mb
 - Chr 5/3 de 51.8 Mb
 - Chr 5/4 de 44.4 Mb

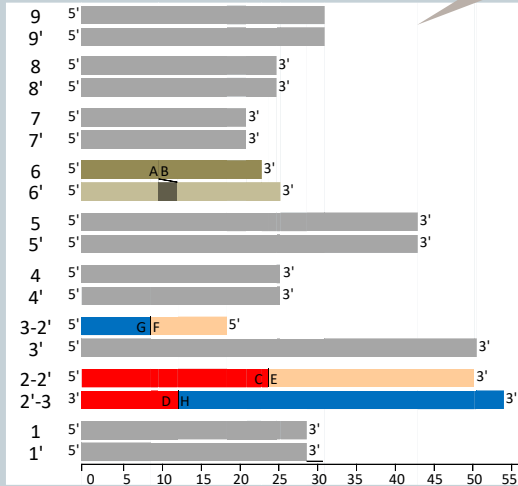
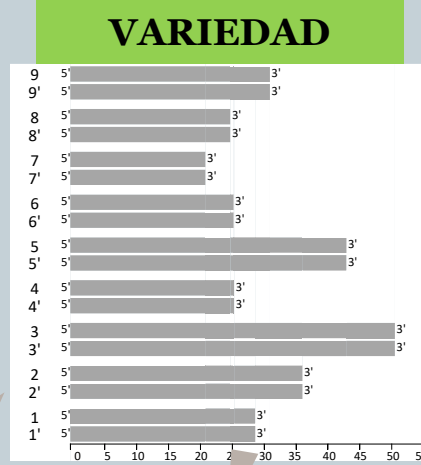
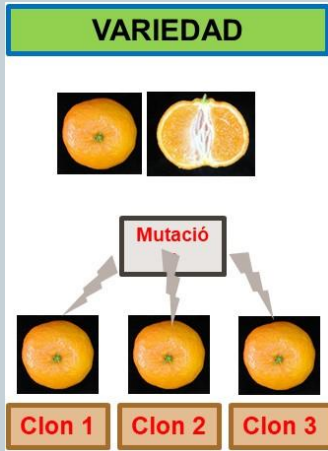
PARENTAL



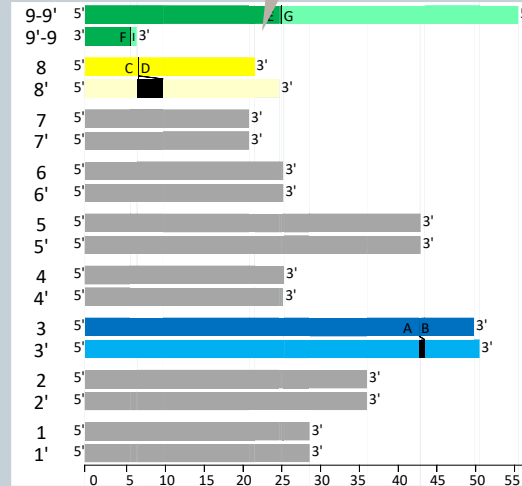
CLON 3



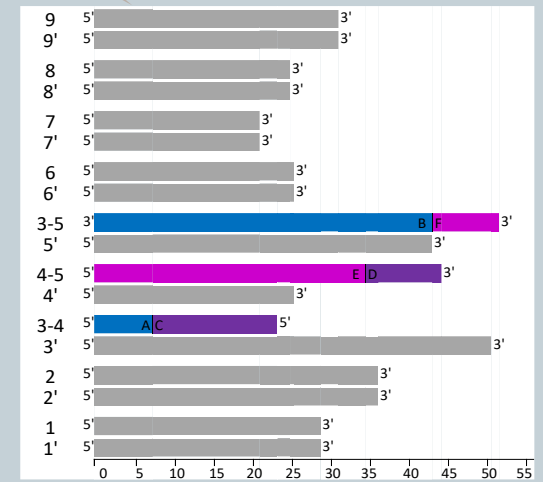
6. Ejemplo IDENTIFICACIÓN CLONES VARIETALES



CLON 1



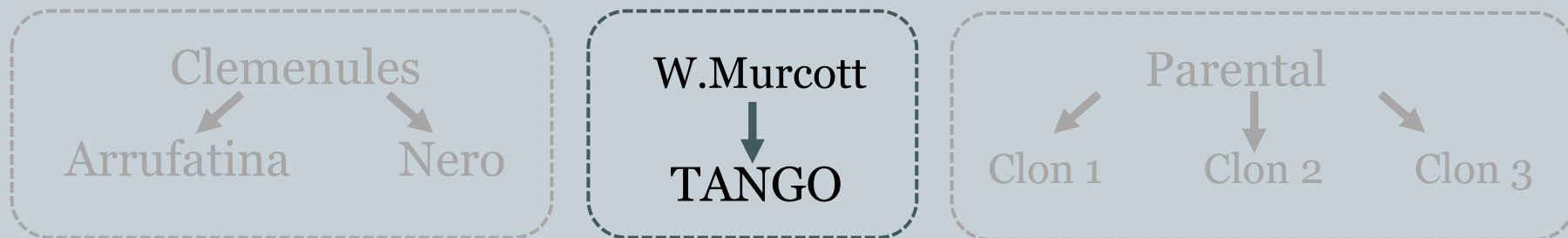
CLON 2



CLON 3

6. Ejemplo IDENTIFICACIÓN variedades procedentes de mutación

- > 95% genomas procedentes de mutación tienen variaciones estructurales.



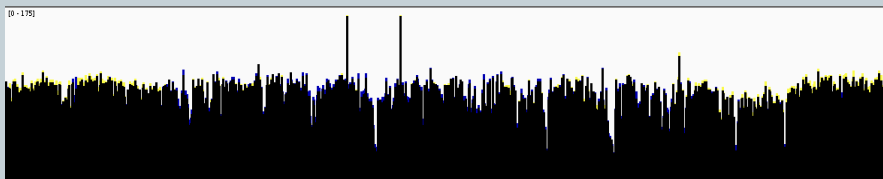
1 Cambio estructural = 1 Marcador de Identificación

Identificación
inequívoca

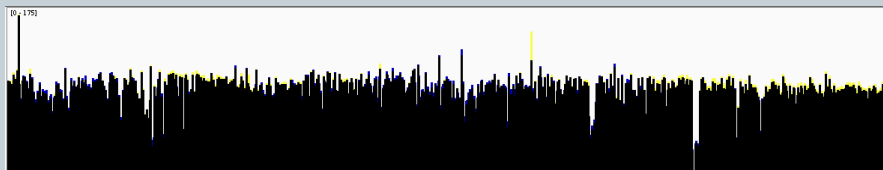
6. Ejemplo TANGO

IDENTIFICACIÓN variedades procedentes de mutación

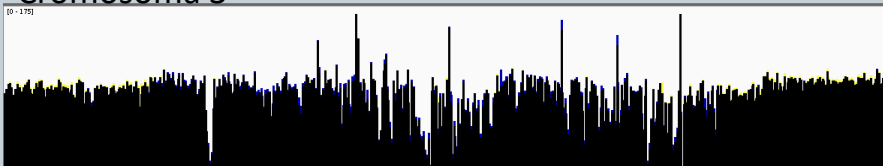
Cromosoma 1



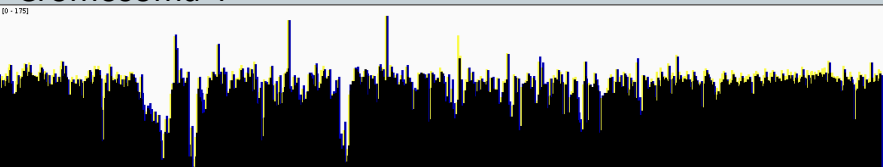
Cromosoma 2



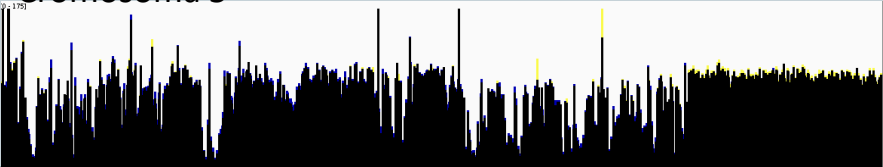
Cromosoma 3



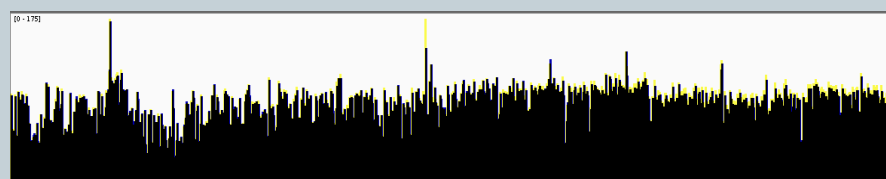
Cromosoma 4



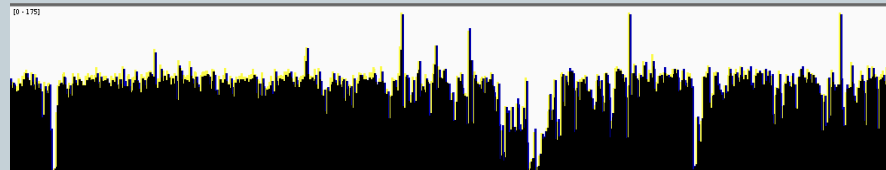
Cromosoma 5



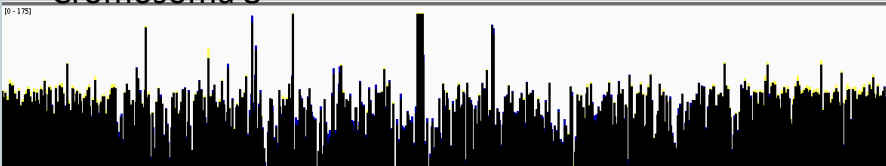
Cromosoma 6



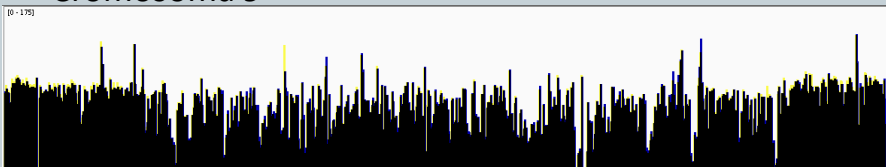
Cromosoma 7



Cromosoma 8



Cromosoma 9

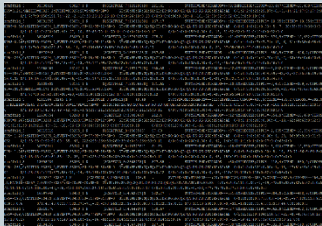


NO SE APRECIAN CAMBIOS COBERTURA
→
NO DELECIÓN NI DUPLICACIÓN GRANDES FRAGMENTOS

6. Ejemplo TANGO

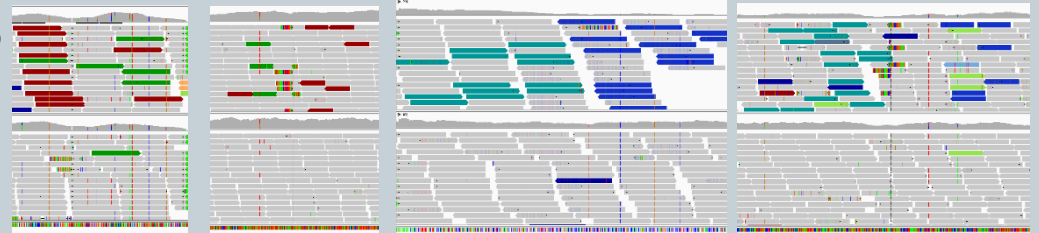
IDENTIFICACIÓN variedades procedentes de mutación

Script SV...



Contig	Start	End	Strand	Score	Match
1	1437800	1437800	+	100	100
2	1437800	1437800	-	100	100
3	1437800	1437800	+	100	100
4	1437800	1437800	-	100	100
5	1437800	1437800	+	100	100
6	1437800	1437800	-	100	100
7	1437800	1437800	+	100	100
8	1437800	1437800	-	100	100
9	1437800	1437800	+	100	100
10	1437800	1437800	-	100	100
11	1437800	1437800	+	100	100
12	1437800	1437800	-	100	100
13	1437800	1437800	+	100	100
14	1437800	1437800	-	100	100
15	1437800	1437800	+	100	100
16	1437800	1437800	-	100	100
17	1437800	1437800	+	100	100
18	1437800	1437800	-	100	100
19	1437800	1437800	+	100	100
20	1437800	1437800	-	100	100
21	1437800	1437800	+	100	100
22	1437800	1437800	-	100	100
23	1437800	1437800	+	100	100
24	1437800	1437800	-	100	100
25	1437800	1437800	+	100	100
26	1437800	1437800	-	100	100
27	1437800	1437800	+	100	100
28	1437800	1437800	-	100	100
29	1437800	1437800	+	100	100
30	1437800	1437800	-	100	100

W.Murcott Tango

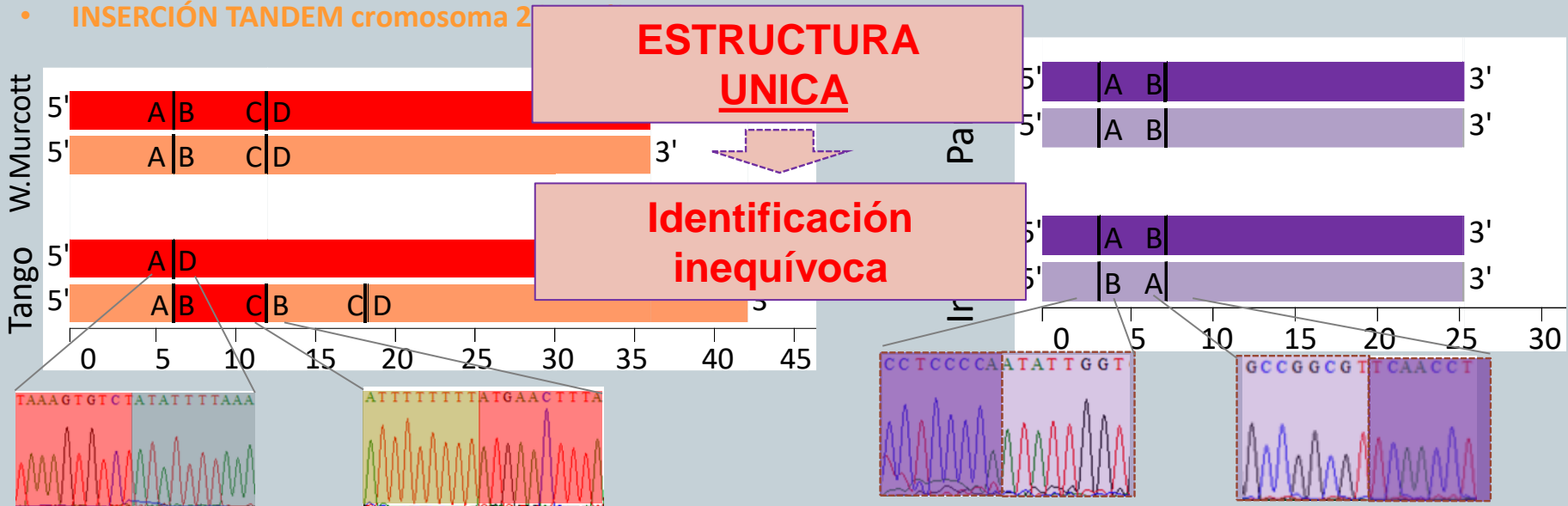


- **DELECIÓN** cromosoma 2 (6 Mb)

+

- **INSERCIÓN TANDEM** cromosoma 2

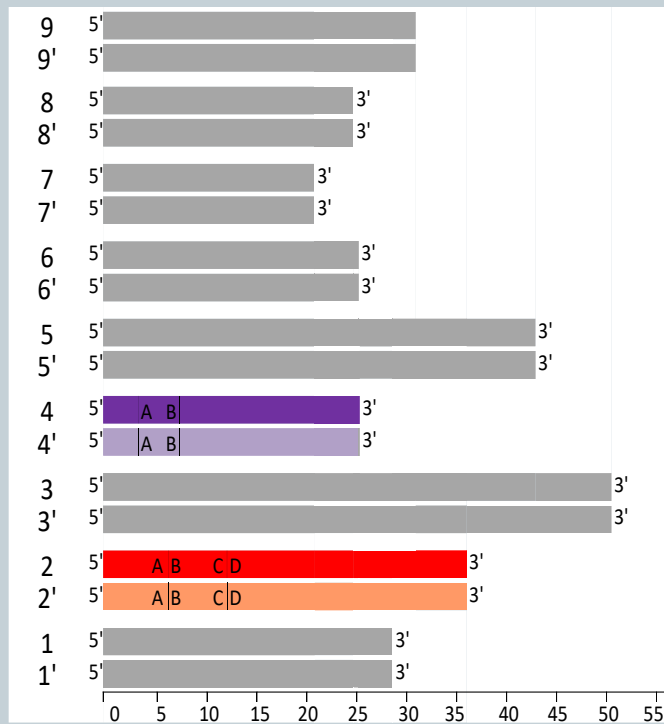
- **INVERSIÓN** en cromosoma 4 (3.97 Mb)



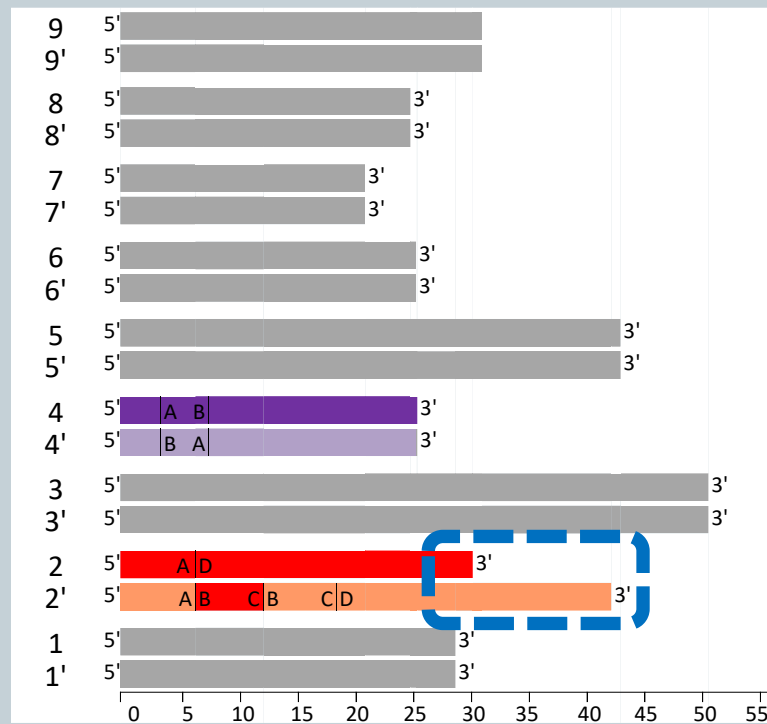
6. Ejemplo TANGO

IDENTIFICACIÓN variedades procedentes de mutación

W.MURCOTT



TANGO



Usos:
Identificación de variantes estructurales presentes en la variedad de mandarina TANGO

certificacion.cyberagropolis.com

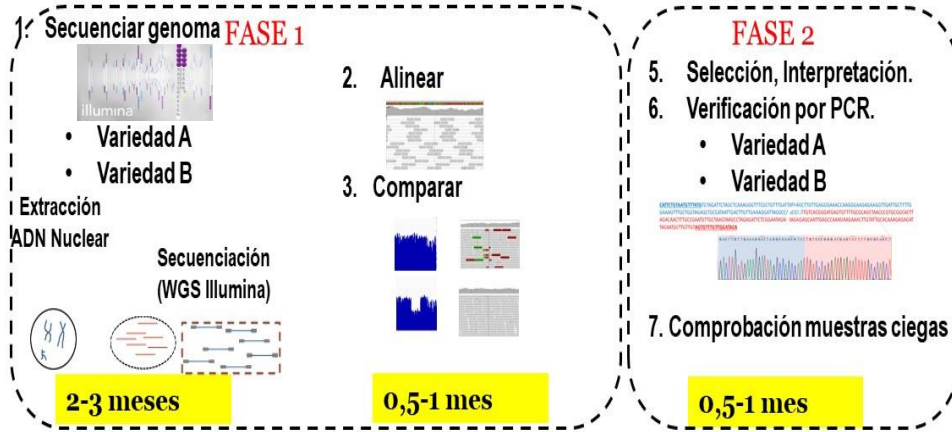


Certificación Variedad Protegida Tang-Gold



6. Coste de OBTENCIÓN y USO de marcadores moleculares

1. COSTE de obtención de marcadores moleculares.



2. Coste de Uso de marcadores moleculares → IDENTIFICACION.

1. Extraer ADN: 2-6h
2. Realizar PCR: 2-4h

Aproximadamente:
- 1-2 días
- 50-100 €/muestra

Aproximadamente:

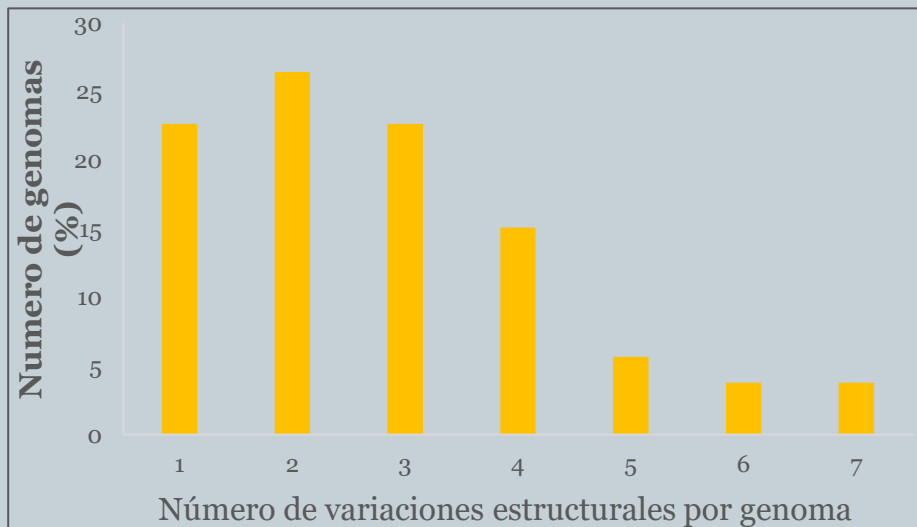
- 5-6 meses
- 1500-2000 € reactivos + personal = 10 000 €/variedad



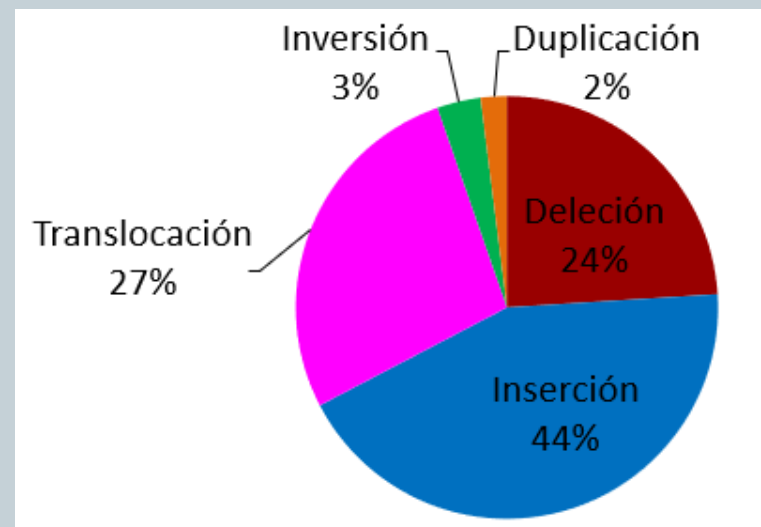
7. Validez del protocolo

- **PREVIO A GOCITRUS**
- **Analizado más de 50 genomas procedentes de **mutación****
 - **> 95% genomas procedentes de mutación tienen variaciones estructurales.**

Número de variantes estructurales por genoma



Tipología de variantes estructurales > 150



8. Antes y Después de GOCITRUS

- Polémicas derivadas de la incertidumbre en la identificación varietal.
- Marcadores existentes ínfimamente eficientes para variedades derivadas (procedentes de mutación)



GOCITRUS. BASE DE DATOS CITUSEQ-CITRUSGENN

Contiene > 350 genomas de cítricos. Ancestrales, réplicas...

- 324 Registros comerciales de cítricos en España (291 variedades + 33 patrones).
 - 83 secuenciadas
 - 24 en proceso de secuenciación



- 1/3 registro secuenciado a finales de 2020
- 1 marcador inequívoco de variedades procedentes de mutación a mitad de 2021:
 - 25% de variedades de mandarinas
 - 10% de naranjas dulces.

CONCLUSIONES



- El objetivo 1 del proyecto es la generalización de un protocolo de obtención de marcadores moleculares de tipo variación estructural, indel e SNP validado previamente.
- Protocolo dirigido principalmente a la identificación de variedades procedentes de mutación (> 50% variedades comerciales) dado que los anteriores marcadores empleados no resultaban eficaces en este grupo.
- Los MM pueden ser empleados en cualquier especie, en cualquier tipo de tejido y en cualquier estado de desarrollo de una planta.
- Trazabilidad (evitar errores):
 - Vivero: garantizar identidad del material adquirido por agricultores.
 - Distribuidores: garantizar identidad material comercializado. MARCA.
 - Consumidores: garantiza la identidad del producto adquirido.
- A finales de 2020, 1/3 de las variedades comerciales españolas estarán secuenciadas.
- A mitad de 2021 25% mandarinas y un 10% naranja dulce tendrá 1 marcador inequívoco.

GOCITRUS

¿PREGUNTAS? Identificación inequívoca de variedades comerciales de cítricos

8 de Septiembre de 2020

Dra. Victoria Ibáñez González
Técnico Producción y Desarrollo- ANECOOP
E-mail: victoriaibanez@anecoop.com