



Foto: Nicolas Zunini

USO DE MARCADORES MOLECULARES EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE CITRUS DE URUGUAY

Lic. Bioq. Mag. Mario Giambiasi, Lic. Biol. Mag. Ana Arruabarrena, Téc. Agr. Ana Lucía Britos, Sr. Christian de los Santos, Ing. Agr. Dr. Fernando Rivas

Sistema Vegetal Intensivo; Mejoramiento Genético y Biotecnología Vegetal

Para reducir los tiempos y recursos necesarios para el desarrollo de nuevas variedades de cítricos, INIA utiliza la Selección Asistida por Marcadores Moleculares, que permite seleccionar prematuramente las plantas analizando su ADN. Esta herramienta, combinada con el uso de marcadores moleculares que contribuyen en la identificación de las plantas, representan un gran avance en la eficiencia del proceso de selección, así como en la identificación y en la protección de las nuevas variedades de cítricos.

La producción de cítricos del Uruguay está orientada al consumo en fresco, por lo que la calidad del producto es clave para la sostenibilidad de la cadena. Desde hace varios años el Programa de Mejoramiento Genético de Citrus de INIA viene trabajando en la obtención de variedades que cumplan con los requisitos de los mercados de destino. De esta forma, hoy contamos con

un programa de mejoramiento integral a largo plazo y con un objetivo general claro: mandarinas de excelente sabor, color, fácil pelado, tolerantes a enfermedades y sin semillas. Una de las principales estrategias que se está llevando adelante es la producción de híbridos triploides (3x) a partir de cruzamientos dirigidos entre plantas tetraploides (4x) y diploides (2x),

los que son estériles y no producen semillas ni polen fértil (Figura 1). También se obtienen algunos híbridos 2x y 4x que, además, tienen el potencial de convertirse en líneas parentales superiores.



Foto: Fernando Rivas

Figura 1 - Híbrido triploide (3x) en fase de evaluación a nivel de campo.



Foto: Mario Giambiasi

Figura 2 - Híbridos triploides de citrus en fase de selección molecular.

Cada año, el programa de mejoramiento genético obtiene alrededor de 3000 híbridos nuevos. La selección tradicional de estos híbridos en campo requiere al menos cinco años, debido a la etapa de juvenilidad de los cítricos y luego algunos años más para la selección agronómica de los caracteres deseados.

Para reducir estos tiempos y recursos necesarios para la selección, comenzamos a utilizar la Selección Asistida por Marcadores Moleculares, que permite seleccionar prematuramente las plantas analizando su ADN (Figura 2). Con esta herramienta podemos identificar con precisión las plantas que poseen los genes deseados desde las primeras etapas de desarrollo. Esto implica un ahorro en términos de espacio, tiempo, mano de obra y costos asociados con el mantenimiento de grandes poblaciones de plantas a nivel de invernadero y campo.

La técnica de KASP facilita la identificación precisa y temprana de rasgos genéticos deseables en diversos híbridos de mandarinas.



Foto: Irvin Rodríguez

Figura 3 - Color interno en mandarinas regulado por el gen Ruby.

Por otro lado, contamos con otro tipo de marcadores moleculares (SSR) que contribuyen en la identificación de las plantas. Para el programa de mejoramiento genético es fundamental contar con la trazabilidad de sus materiales. Estos marcadores son una importante

Actualmente se procesa un gran volumen de muestras con mayor rapidez y precisión, optimizando así los recursos y reduciendo el tiempo para desarrollar nuevas variedades de cítricos.

herramienta que contribuye a que las nuevas variedades desarrolladas puedan ser correctamente identificadas y protegidas.

SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES EN MANDARINAS

El laboratorio de biotecnología de INIA Salto Grande ha ajustado la técnica de KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*), lo que nos permite acelerar significativamente el proceso de selección de plantas. Este avance tecnológico ha sido importante en nuestro programa de mejoramiento genético, facilitando la identificación precisa y temprana de rasgos genéticos deseables en diversos híbridos de mandarinas. Actualmente, estamos seleccionando plantas con resistencia al hongo *Alternaria alternata*; presencia del gen Ruby, que proporciona antocianinas (color rojo en la pulpa del fruto) (Figura 3 y 4); y logramos discriminar entre plantas con reproducción sexual y apomíctica (Figura 4).

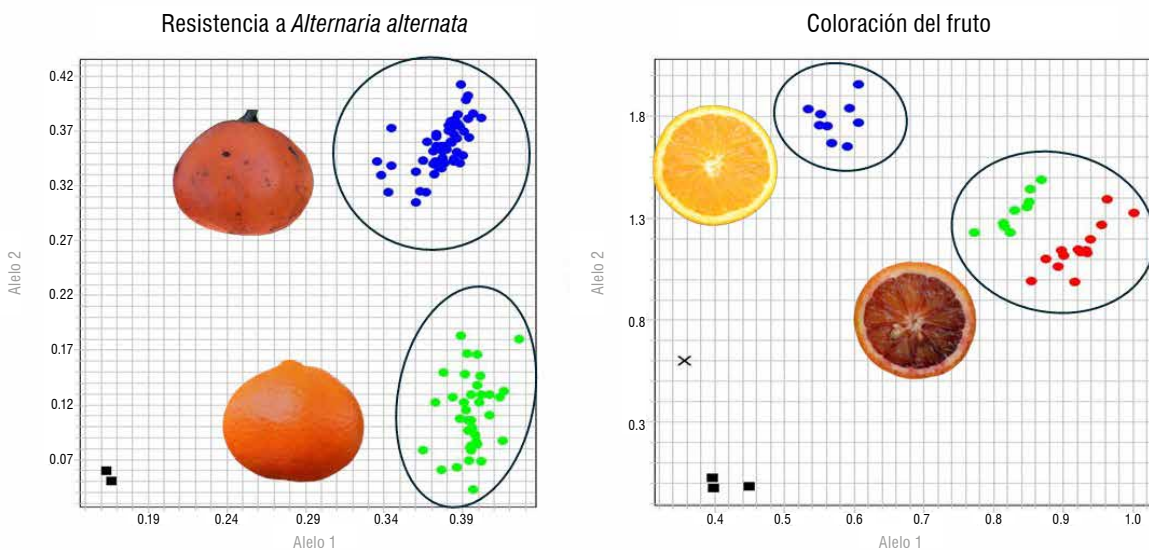


Figura 4 - Selección de plántulas de cítricos mediante la técnica de KASP PCR. A la izquierda se muestra la distribución de las muestras susceptibles (puntos azules) y tolerantes (verdes) a la enfermedad *Alternaria alternata*. A la derecha se muestran los grupos de muestras que presentan el gen Ruby, cuya fruta tendrá pulpa de color rojiza (puntos verdes y rojos); y muestras que no presentan el gen, por lo que la fruta presentará pulpa con su color naranja habitual (azules).

La implementación de esta herramienta ha transformado nuestra capacidad de selección. Actualmente, podemos procesar un gran volumen de muestras con mayor rapidez y precisión, optimizando así los recursos y reduciendo el tiempo necesario para desarrollar nuevas variedades de cítricos.

El desafío es continuar en la búsqueda de nuevos marcadores asociados a características de interés, algo que no es sencillo en cítricos debido a su etapa

En el laboratorio de biotecnología de INIA Salto Grande se utilizan marcadores microsatélites desde hace más de 10 años.

juvenil de varios años, que hace muy lento cada ciclo. Afortunadamente, hay varios grupos de investigación en diferentes partes del mundo que están buscando nuevos marcadores moleculares asociados a características cualitativas de interés.

USO DE MARCADORES SSR PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE CITRUS

Los marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*), también conocidos como microsatélites, son una herramienta importante para el mejoramiento genético. Son secuencias cortas de ADN, compuestas por repeticiones de 2-6 nucleótidos, que son altamente polimórficas y se distribuyen en todo el genoma. La detección de estos SSR o microsatélites nos permite identificar variabilidad genética de manera precisa y reproducible. La alta variabilidad que presentan y su herencia mendeliana permiten la identificación de diferencias genéticas incluso entre individuos estrechamente emparentados.

En el laboratorio de biotecnología de INIA Salto Grande se utilizan este tipo de marcadores hace más de 10 años. Se cuenta con 19 marcadores nucleares y seis cloroplásticos ajustados para cítricos, con los que se ha conformado una base de datos que contiene las configuraciones alélicas de las variedades y clones avanzados de INIA, y de otras variedades comerciales que se cultivan en Uruguay (Figura 5). Esta base de datos es un recurso valioso para el programa de mejoramiento genético de citrus, ya que facilita la identificación de variedades o clones y permite identificar los parentales de un determinado híbrido, entre otras aplicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Aleza P, Froelicher Y, Schwarz S, Agustí M, Hernández M, Juárez J, Luro F, Morillon R, Navarro L, Ollitrault P. 2011. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Ann Bot.* Jul;108(1):37-50. doi: 10.1093/aob/mcr099. Epub 2011 May 17. PMID: 21586529; PMCID: PMC3119611.

Cuenca, J., Aleza, P., Garcia-Lor, A., Ollitrault, P., & Navarro, L. (2016). Fine mapping for identification of citrus *alternaria* brown spot candidate resistance genes and development of new SNP markers for marker-assisted selection. *Frontiers in plant science*, 7, 1948.

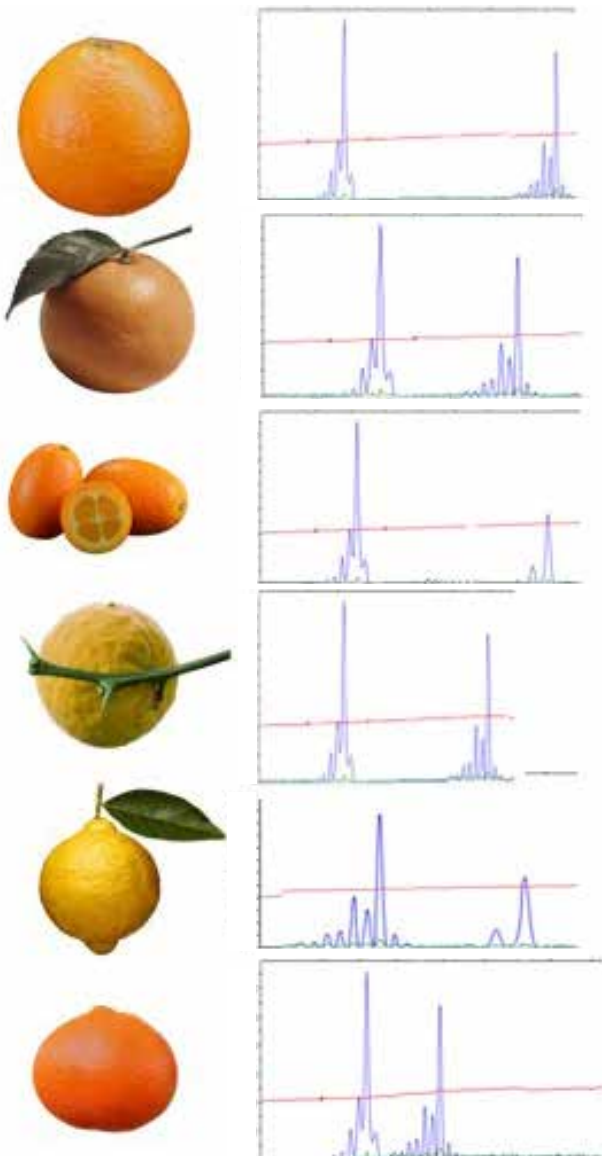


Figura 5 - Representación esquemática de la información genética proporcionada por los marcadores SSR. La posición de los picos obtenidos en este análisis determina la configuración alélica de cada variedad/genotipo avanzado.