



CREANDO LAS BASES GENÉTICAS DE LA COMPETITIVIDAD CITRÍCOLA: tecnologías aplicadas a la creación de variedades sin semillas

Lic. MSc Mario Giambiasi¹, Lic. MSc Ana Arruabarrena¹, Tec. Prod. Veg. Ana Britos¹, Ing. Agr. PhD Alicia Castillo¹, Ing. Agr. Ana Bertalmío², Asist. Lab. Roque Rolón², Aux. Lab. Estefany Bertoni², Asist. Inv. Lucía Goncalvez², Asist. Inv. Julio Laxague², Oper. Rur. Elbio Adalid², Ing. Agr. Beatriz Vignale⁴, Ing. Agr. PhD Fernando Rivas²

¹Unidad de Biotecnología, INIA

²Programa Nacional de Producción Citrícola, INIA

³Estación Experimental Facultad de Agronomía Salto, UdelaR

Con el objetivo de contribuir a una mejora en la competitividad de la cadena citrícola de nuestro país, el Programa de Mejoramiento Genético de Citrus de INIA profundiza en estrategias y tecnologías hacia un proceso continuo de liberación de variedades de cítricos sin semillas. A la vez que se mejora la calidad del producto, se favorecen diferentes aspectos de los sistemas productivos y se colabora con la reducción de los costos de producción.

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 búsqueda de variedades que cumplan con los requisitos de los mercados.

Así, en 2015 fueron liberados nuevos híbridos de mandarinas con características de fácil pelado, buen color externo y calidad de la cáscara, capacidad partenocárpica (capaces de dar fruta sin semilla en ausencia de polinización), excelente sabor, altos ° Brix y, en la mayoría de los casos, con tolerancia a enfermedades importantes como Alternaria y Cancro Cítrico.

En la búsqueda de objetivos más ambiciosos, tratando de producir masivamente nuevas variedades sin semilla, el programa ha orientado sus esfuerzos hacia la obtención de variedades triploides (3x) e inducción de mutaciones. De este modo se han originado líneas parentales superiores tetraploides (4x) y se están induciendo mutaciones en variedades comerciales e híbridos nacionales derivados de cruzamientos dirigidos entre variedades diploides (2x). 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 y sin semillas.

Para ello diseñamos una estrategia que se compone de cuatro ejes:

- 1) Inducción de mutaciones.
- 2) Obtención de parentales tetraploides.
- 3) Obtención de plantas triploides.
- 4) Uso de marcadores moleculares.

ESTRATEGIAS Y RESULTADOS ALCANZADOS

1 - INDUCCIÓN DE MUTACIONES

1.1 - Irradiación de yemas de variedades conocidas

La tecnología de irradiación es ampliamente utilizada y avalada por la FAO para la creación de variabilidad genética de especies vegetales. Para los cítricos, la técnica consiste en exponer yemas a dosis muy bajas (30-70 Gy) de irradiación con rayos gamma. La irradiación causa mutaciones aleatorias y, dada la amplitud de genes que regulan el proceso de reproducción, frecuentemente están relacionadas con la fertilidad, lo que es beneficioso en la búsqueda de cítricos que no producen semillas (Figura 1). Actualmente contamos con 9500 plantas injertadas con yemas irradiadas de diferentes mandarinas. Cada año se evalúa el número de semillas por fruta y, las plantas que producen frutos sin semillas son seleccionadas y multiplicadas para ensayos de evaluación de estabilidad (Figura 2).



Figura 1 - Fruta sin semilla de mandarina M19 (Ellendale x Satsuma) irradiada.

INIA cuenta con un programa de mejoramiento integral a largo plazo y con un objetivo general claro: mandarinas de excelente sabor, color, fácil pelado y sin semillas.



Figura 2 - Módulo de mandarinas irradiadas ubicado en INIA Salto Grande.

1.2 - Variaciones somaclonales

Esta técnica se basa en estimular las mutaciones espontáneas que se dan en el cultivo *in vitro* de tejidos indiferenciados (callos embriogénicos). Luego de dos años de trabajo con este tejido, se avanza en el proceso de obtención de plantas a partir de callos embriogénicos de variedades comerciales (Figura 3). Se busca identificar nuevos genotipos sin semilla y con diferentes fechas de maduración. La meta es generar 2000 plantas candidatas usando esta tecnología (Figura 4); muchas de ellas irán a campo en la próxima primavera para comenzar su proceso de evaluación.



Figura 3 - Callo embriogénico de mandarina con embriones diferenciados.

2 - OBTENCIÓN DE PARENTALES TETRAPLOIDES

2.1 - Parentales autotetraploides

Los autotetraploides son plantas con el doble de contenido cromosómico (4x) utilizadas como parentales en cruzamientos dirigidos ($2x \times 4x$) para la obtención de plantas triploides (3x). Las plantas autotetraploides se generan espontáneamente en variedades apomípticas (poliembriónicas) y tienen la misma información genética que la planta madre, pero duplicada. Cada año se siembran miles de semillas de diferentes variedades o híbridos nacionales promisorios y luego se seleccionan las plantas 4x mediante selección fenotípica y confirmación por ci-

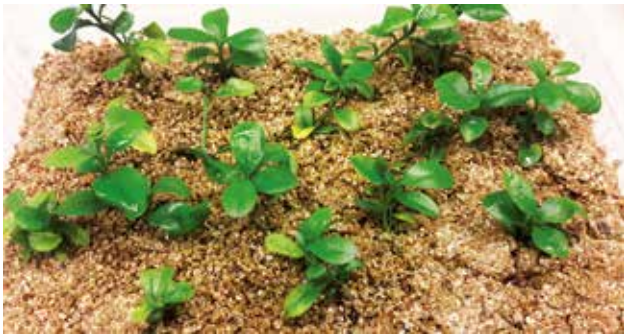


Figura 4 - Plantas de mandarinas obtenidas a partir de callos embriogénicos.



Figura 5 - Plantas autotetraploides (4x) de mandarinas generadas espontáneamente en semillas poliembriónicas.

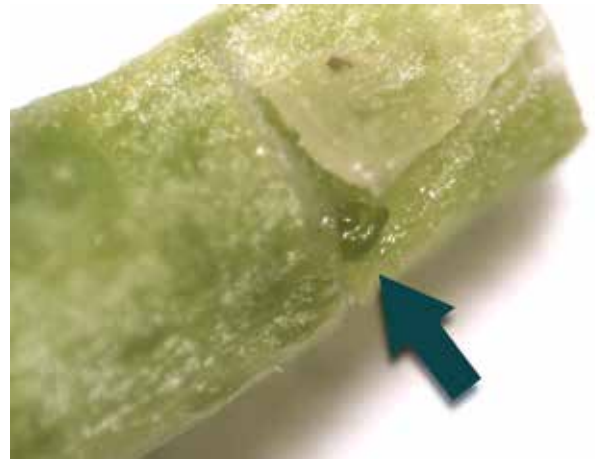


Figura 6 - Microinjerto con una gota de colchicina para estimular la duplicación del contenido de ADN.

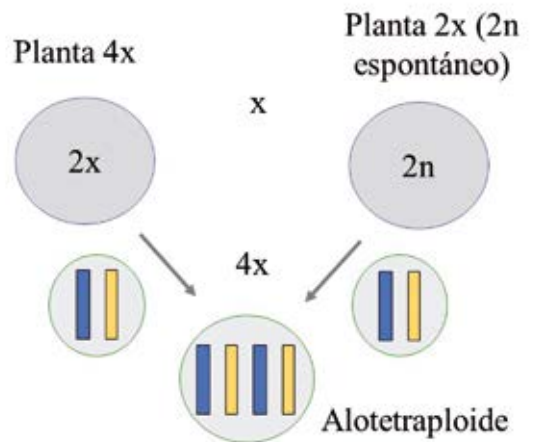


Figura 7 - Esquema de la combinación de un gameto "normal" de una planta tetraploide y un gameto no reducido de una planta diploide, lo que da como resultado una planta alotetraploide (4x).

tometría de flujo (Figura 5). En la actualidad se cuentan con plantas 4x de más de 25 genotipos, en su mayoría de mandarinas, pero también de limones y naranjas.

Asimismo, para variedades monoembriónicas las que no son capaces de producir plantas 4x por el método antes descrito, se utiliza la técnica combinada de microinjerto e incubación de ápices meristemáticos con colchicina, alcaloide capaz de inducir duplicaciones cromosómicas en el tejido tratado (Figura 6). Mediante esta técnica se obtuvieron plantas 4x promisorias de una variedad de alto potencial.

2.2 - Parentales alotetraploides

En un programa de mejoramiento, contar con diversidad genética es sumamente importante. La descendencia de un alotetraploide presenta mayor variabilidad genética que la de un autotetraploide.

A través de la tecnología de irradiación se logran obtener plantas con frutos sin semillas, que son seleccionadas y multiplicadas para ensayos de evaluación de estabilidad.

Esto se debe a que los alotetraploides comparten información genética de dos variedades ($2x + 2x$), ya que son obtenidos por la combinación de dos células, cada una de un individuo genéticamente diferente. Pueden obtenerse por la combinación de dos gametos no reducidos ($2x$) de cruzamientos a campo (Figura 7), o por la fusión de células somáticas en laboratorio (Figura 8). En nuestro caso estamos explorando las dos alternativas; hasta el momento se obtuvieron seis plantas alotetraploides provenientes de cruzamientos que combinan características productivas, sanitarias y de calidad de fruta.

3 - OBTENCIÓN DE PLANTAS TRIPLOIDES

Muchas de las variedades actualmente cultivadas son capaces de producir frutos sin semillas cuando se plantan aisladas, lejos de otras variedades compatibles capaces de polinizarlas. En nuestras condiciones de cultivo, donde se cultivan diferentes variedades en un mismo predio en busca de ampliar el período de recolección y oferta varietal, no resulta sencillo producir fruta sin semillas.

Los alotetraploides comparten información genética de dos variedades, su obtención mediante cruzamientos permite combinar características productivas, sanitarias y de calidad de fruta.

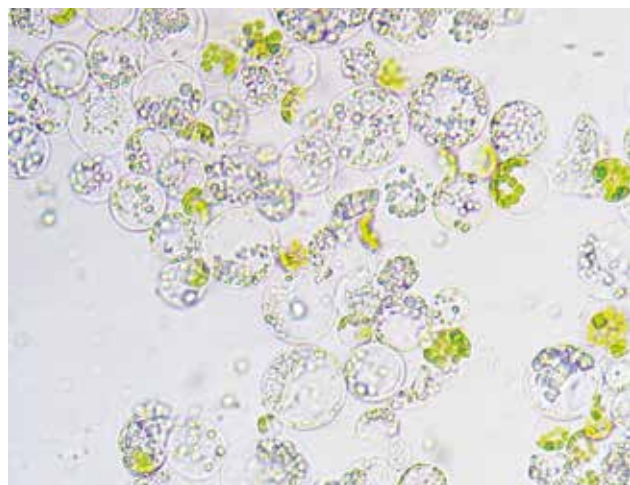


Figura 8 - Mezcla de protoplastos de callo embriogénico (blancos) y de hojas (verdes) en la técnica de fusión de protoplastos.

Dado que la polinización en cítricos es entomófila (principalmente por abejas), los productores que buscan producir fruta sin semillas se ven obligados a aislar físicamente a las variedades. Una de las estrategias más usadas son las mallas anti abejas durante todo el período de floración (Figura 9). Esta tecnología, si bien es efectiva, aumenta significativamente los costos de producción (costo de materiales, estructuras, instalación) y además va en detrimento de los intereses de la industria apícola.

Las plantas triploides ($3x$) se caracterizan por ser completamente estériles (tanto el polen como sus óvulos) y por tal motivo son capaces de producir frutos sin semillas bajo cualquier circunstancia y no son capaces de polinizar a otras variedades cercanas. Esto es importante a nivel de campo ya que permite plantar estas variedades junto con otras sin que se produzca el fenómeno de polinización cruzada. Asimismo, esta tecnología permitirá que convivan no solo productores con diferentes estrategias varietales, sino también la producción cítrica y la apícola sin conflicto de intereses. Desde hace algunos años el Programa de Mejoramiento viene creando plantas triploides generadas espontáneamente, y desde 2018 se comenzó la realización de cruzamientos para obtener una producción masiva de triploides. Estos cruzamientos son realizados utilizando plantas tetraploides ($4x$) y plantas diploides ($2x$).

Dado que los embriones triploides no producen endosperma (se encuentran en las semillas subdesarrolladas), no son capaces de germinar en condiciones naturales, para lo cual es necesario implementar la técnica de rescate de embriones *in vitro* y colocarlos en medio de cultivo en condiciones estériles (Figura 10).

Luego de que las plantas se desarrollan completamente, se determina el nivel de ploidía (número de juegos de cromosomas) a través de Citometría de Flujo y aquellas que son identificadas como triploides, son seleccionadas, aclimatadas en condiciones de vivero, se injertan en el portainjeto *P. trifoliata*, y luego se plantan a campo para su evaluación.



Figura 9 - Cultivo de mandarina protegido con malla antiabejas para evitar la polinización con polen externo y así la presencia de semillas.

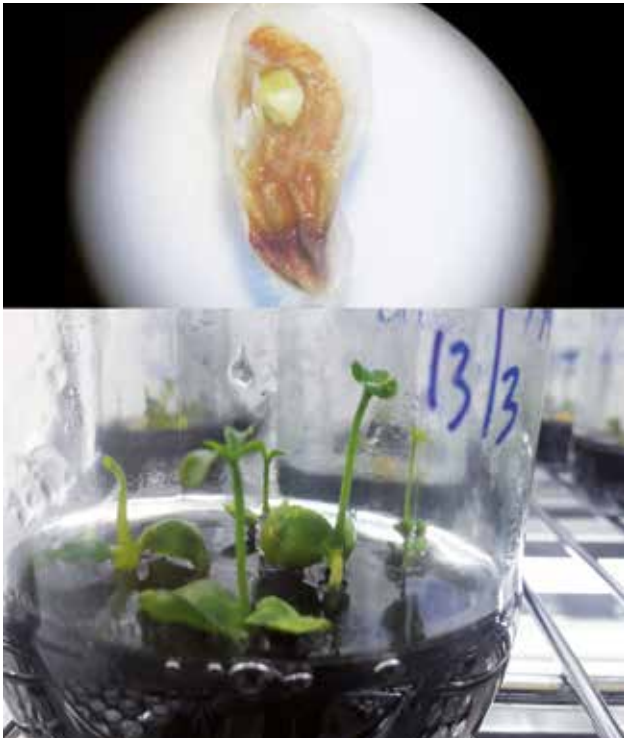


Figura 10 - Rescate de embrión presente en semilla vana y plantas generadas en condiciones de cultivo *in vitro*.

Anualmente se están rescatando aproximadamente 5000 embriones anualmente en búsqueda de triploides. Actualmente contamos con plantas 3x de más de 20 cruzamientos con parentales con alto potencial. Algunos de estos triploides ya están a nivel de campo. Nuestro primer triploide, híbrido de Ellendale y Page, fue registrado y liberado en 2016 y está a disposición para que los productores del país puedan adquirirlo (Figura 11).



Figura 11 - Primer planta triploide liberada por INIA-FAGRO con código F4P2. No presenta semillas en sus frutos.

La tecnología de plantas triploides permite producir frutos sin semillas bajo cualquier circunstancia y no son capaces de polinizar a otras variedades cercanas.

4 - USO DE MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares corresponden a regiones del ADN que muestran diferencias entre diferentes individuos dentro de una especie. El análisis de ADN es una herramienta muy valiosa en un programa de mejoramiento genético ya que logra entregar información genética precisa, permitir el análisis simultáneo de un gran número de muestras y es independiente del medio ambiente.

Existen marcadores que están ligados a genes de interés agronómico. Pueden ser utilizados para realizar selección genotípica temprana de plántulas que aún están en etapa juvenil. También se evita manejar cientos o miles de plantas en la selección fenotípica en invernáculo o a campo. En definitiva, la selección asistida por marcadores moleculares permite acelerar la selección y disminuir los costos en el manejo de grandes poblaciones de plantas.

En INIA contamos con diferentes marcadores moleculares que pueden ser utilizados según la necesidad. Uno de los usos más frecuentes es la caracterización en cuanto a la poliembriónia, lo que determina si un genotipo puede ser utilizado como parental femenino o masculino. MITE1 es el caso de un marcador que permite determinar si una plántula es poliembriónica o monoembriónica, sin importar su ploidía (Figura 12), y así seleccionarla como parental.

Por otro lado, contamos con marcadores que permiten realizar análisis de paternidad. Esto significa que es posible determinar los parentales de un nuevo genotipo. Este aspecto es de gran utilidad ya que es posible determinar qué especie está polinizando a una determinada variedad y causando la presencia de semillas.

Estas estrategias y tecnologías desarrolladas nos permitirán en un futuro próximo seguir un proceso continuo de liberación de variedades de cítricos sin semillas, mejorando la calidad del producto y de los sistemas productivos citrícolas, reduciendo los costos de producción. En definitiva, permitirá mejorar la competitividad citrícola de nuestro país.



Figura 12 - Determinación de la poliembriónia en mandarinas diploides y tetraploides con el marcador molecular MITE 1. F: falló; P: poliembriónico; M: monoembriónico.