



## **TITULO/ TITLE**

**Uso de la selección asistida por marcadores en el mejoramiento genético de Citrus**

## **Autores/ Authors**

**Mario Giambiasi; Ana Arruabarrena; Fernando Rivas**

## **Institución/ Institution**

Inia Salto Grande

**Palabras clave/ Key words (3-5):** poliembriónía, reproducción, Ruby, coloración, genotipado

## **INTRODUCCIÓN/ INTRODUCTION**

El sector cítrico es el rubro hortifrutícola de mayor relevancia en el Uruguay. En 2021 se estima una producción de 261 mil toneladas y una exportación del 40% a mercados muy exigentes como el de EEUU y Europa (Encuesta cítrica primavera 2021, DIEA/MGAP). En la actualidad, el Programa de mejoramiento genético de cítricos de INIA se encuentra abocado a generar nuevas variedades que contemplen las necesidades de estos mercados y de los productores. En este contexto, la ausencia de semillas en las frutas y mejoras en características nutricionales aportadas por las antocianinas, son aspectos relevantes.

Las variedades de mandarinas triploides, completamente estériles que no producen semillas ni polen viable, surgen del cruzamiento entre una planta tetraploide (4x) y una diploide (2x), donde uno de estos parentales debe ser monoembriónico para actuar como parental femenino. La creación y selección de los parentales con estas características, requiere de herramientas moleculares que permitan entre otros, una caracterización de la forma de reproducción. Los marcadores moleculares SSR (Simple Sequence Repeats) se adaptan a este objetivo, por ser específicos, reproducibles, codominantes y robustos (Kijas et al., 1997). Otro de los usos habituales de estos marcadores es el genotipado de los clones avanzados y las variedades liberadas.

Las antocianinas son compuestos antioxidantes que se encuentran naturalmente en algunos cítricos, como es el caso de las naranjas sanguíneas. Actualmente se está realizando cruzamientos dirigidos para la obtención de mandarinas con este pigmento. La etapa de juvenilidad de los cítricos es una limitante para la selección tradicional de los nuevos híbridos, ya que se debe esperar entre 5 y 7 años desde el cruzamiento, hasta que se produzcan los primeros frutos. Por otro lado, se ha observado que casi toda la variación natural en la pigmentación por antocianinas en especies de cítricos puede explicarse por diferencias en la actividad del denominado gen Ruby, causadas por mutaciones puntuales y deleciones e inserciones de elementos transponibles (Butelli et al 2019). Una inserción en el gen Ruby asociada a la forma activa del gen, permite seleccionar mediante marcadores moleculares las plantas híbridas que producirán frutas coloreadas. Esta selección podrá realizarse inmediatamente después que el plantín tenga hojas verdaderas.

El objetivo de este trabajo fue ajustar la selección asistida por marcadores moleculares para las características de “tipo de reproducción” y “presencia de antocianinas” en frutos de mandarinas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS/ MATERIALS AND METHODS**



## **1. Selección de parentales femeninos para cruzamientos dirigidos: estudio del grado de poliembriónía**

Para el análisis del tipo de reproducción se utilizaron 5 SSR (TAA41, TAA15, TAA1, Mest56, CaC15) obtenidos Kijas et al. (1997) y previamente ajustados a nuestras condiciones. Se analizó el nivel de poliembriónía de los 12 híbridos de mandarinas. “Ellendale” y “Satsuma” fueron utilizados como controles monoembriónicos y poliembriónicos, respectivamente. Se escogieron tres árboles por genotipo en buenas condiciones fisiológicas y expuestos a libre polinización. Se cosecharon 50 frutas de cada genotipo, se extrajeron todas sus semillas y se sembraron en almácigueras. Luego se seleccionaron 20 plantines al azar de cada genotipo y se extrajo el ADN de los mismos y de los parentales femeninos

## **2. Análisis de la progenie de un cruzamiento de Ellendale x Moro: presencia de antocianinas en frutos**

En primer lugar, se diseñó un par de primers específicos para visualizar la inserción ocurrida en el gen Ruby en la variedad Moro según Butelli (2012). El primer R se hibrida en la región del inserto, por lo cual, solo habrá amplificación cuando esté presente la inserción. Para el ajuste de este primer se utilizaron las variedades Valencia, Montenegrina y Ellendale como controles negativos; Moro blood, Moro SRA301, Sanguinelli SRA352, Blood Oval y el híbrido (coloreado) Ellendale x Moro, como controles positivos. Finalmente, se utilizaron 10 individuos de la progenie del híbrido Ellendale x Moro que se polinizó naturalmente.

La extracción de ADN de las hojas de los diferentes individuos se realizó mediante el método de CTAB descrito por Doyle and Doyle (1987). El mix de PCR consistió en 200 ng de ADN, 10 pmol de cada primer, 200  $\mu$ mol de cada dNTP, 2.5  $\mu$ l de PCR buffer (con 20 mmol MgCl<sub>2</sub>), 0,8 unidades Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), se completó el volumen final de 25  $\mu$ l con agua ultrapura. Las secuencias de los primers utilizados fueron: PMC-G3 (F): GAGAGTATACCGTATGCGTACACA y Ruby SG (R): TTTTAGCCTACGTCCACGGG. Las temperaturas del ciclo fueron: 95 °C (4 min), 40 ciclos de 95 °C (50 s), 52 °C (50 s), 72 °C (50 s), y una extensión final de 72 °C (5 min).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN/ RESULTS AND DISCUSSION**

El estudio con marcadores SSR mostró que toda la progenie de “Satsuma” presentó la misma configuración alélica que su parental femenino, confirmando su origen poliembriónico. Por otro lado, todos los individuos de la progenie de “Ellendale”, presentaron algún alelo diferente a los de su progenitor femenino, evidenciando que este genotipo es monoembriónico. En cuanto a los híbridos, la progenie de H23, Ellendale x Moro y H47 mostraron un valor muy bajo de plantines con la misma configuración alélica que su parental femenino, lo que significa que son monoembriónicos y pueden ser utilizados como parentales femeninos (Figura 1). Por otro lado, B166, A209, B47 presentan configuraciones alélicas muy similares al parental femenino, evidenciando la presencia de poliembriónía. Finalmente, los genotipos que presentan porcentajes intermedios, deberán ser utilizados con cautela, ya que un porcentaje importante de los embriones serán nucelares (no serán producto de fecundación). Los resultados indican que los 5 marcadores SSR seleccionados (TAA41, TAA15, TAA1, Mest56, CaC15) permiten determinar el nivel de poliembriónía de los genotipos seleccionados.

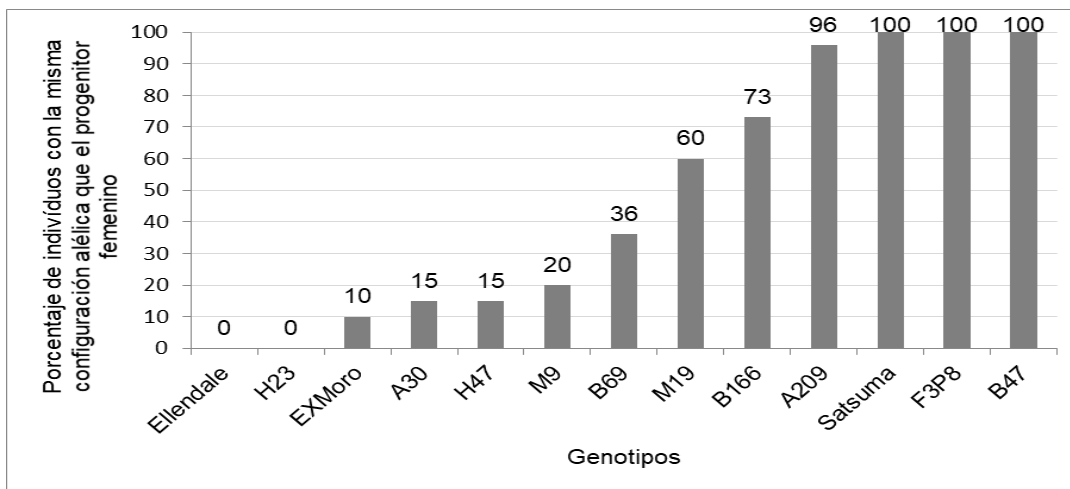


Figura 1. Porcentaje de individuos iguales al progenitor femenino, en cada genotipo estudiado.

El ajuste del nuevo par de primers para evidenciar la inserción ocurrida en el gen Ruby en las naranjas sanguíneas se realizó con éxito, logrando una amplificación de 800pb únicamente en aquellas naranjas pigmentadas (Figura 2). Por otro lado, se logró discriminar individuos de una progenie, cuyo parental femenino presenta coloración y cuyo parental masculino no se conoce.

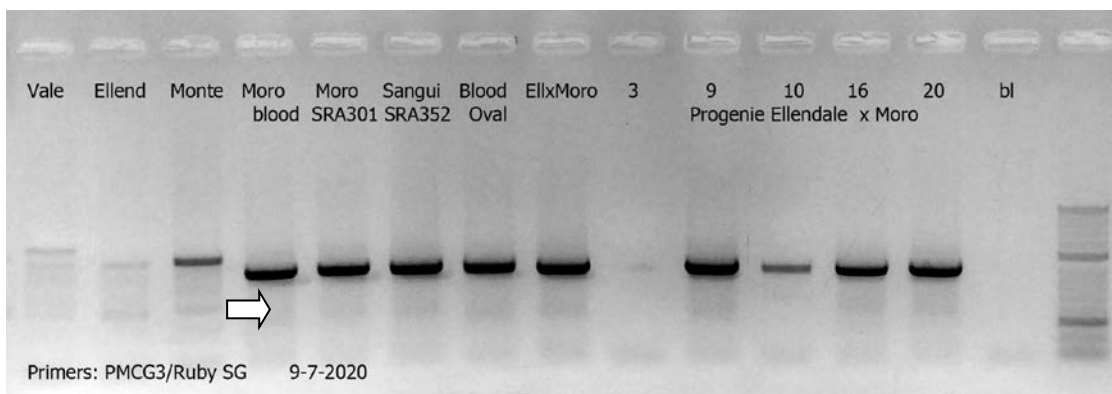


Figura 2. Presencia de inserción en gen Ruby que determina la presencia de antocianinas en cítricos, determinada por la banda de 800pb señalada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS/ REFERENCES

DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2021. Encuesta cítrica “primavera 2021”. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 19 octubre 2021. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presenta-resultados-del-pronostico-cosecha-citricola-2021>.



Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15

Kijas J, Thomas M, Fowler J, Roose M. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theoretical and Applied Genetics*. 94(5): 701-706.