Comité de Cítricos Chile

ASOEX
ASOCIACIÓN DE EXPORTADORES DE FRUTAS DE CHILE A.G.

INIA

Identificación de polen contaminante mediante marcadores moleculares en huertos de mandarinas e híbridos

En Chile hay alrededor de 4.000 ha de mandarinos (mandarinas y clementinas), las cuales van aumentando año a año, repartidas entre las regiones de Atacama y O`Higgins

El principal mercado de destino de ambas especies es EE.UU. (>90%)

Problema

El desarrollo de semillas en el fruto limita su venta, castigando la fruta en demanda y precio

Flujo de polen

Uno de los aspectos centrales a controlar en la producción de frutos sin semillas, es la polinización cruzada en cultivares autoincompatibles, que genera gametos viables.

Problema adicional

Se observa poliembrionía en cítricos:

Se pueden encontrar tanto embriones cigóticos como nucelares (origen materno)

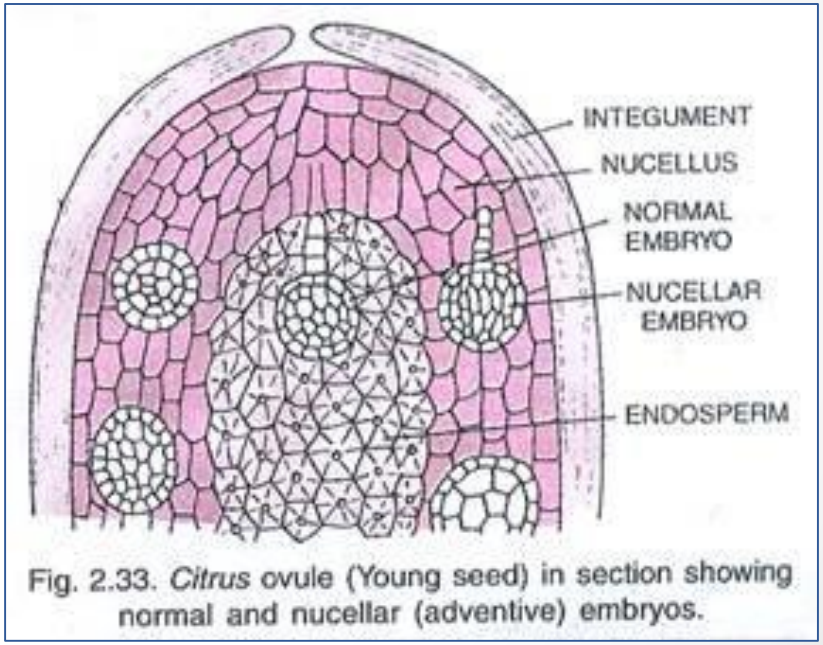


Fig. 2.33. *Citrus* ovule (Young seed) in section showing normal and nucellar (adventive) embryos.

Objetivo

Desarrollar un método basado en marcadores moleculares que permita la identificación de las principales especies/variedades de cítricos presentes en Chile y la determinación de paternidad en frutos semillados (*origen del polen*).

Primera etapa

1. Evaluar al menos 40 marcadores de microsatélites (SSR) en su capacidad para discriminar 16 variedades comerciales de mandarinas y otros cítricos presentes en Chile.
2. Desarrollar un método de obtención de ADN a partir de embriones
3. Evaluar la capacidad de los SSR seleccionados para identificar la paternidad en cultivares de mandarinas.

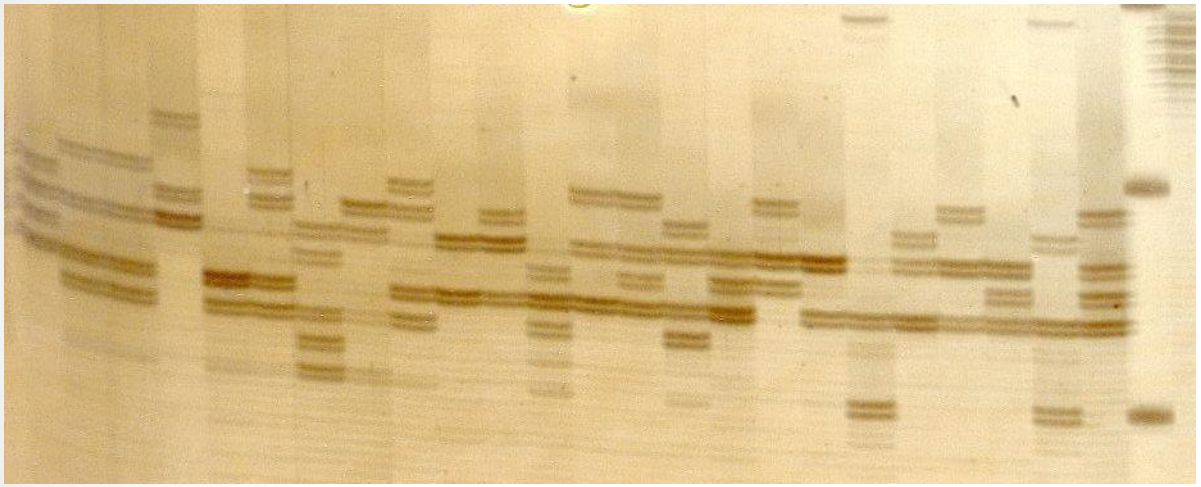
Fingrerpinting (ID) de variedades frutales de diversas especies

- Vid
  - Vid de mesa
  - Cepas de vino (clones de cultivares tintos)
  - Portainjertos (Vitis spp., híbridos)
- Frutos de carozo
  - *P. persica*
  - *P. salicina/P. domestica*
  - *P. cerasus/ P. avium*
  - *P. armeniaca*
  - *P. spp* (portainjertos híbridos)
- Arándanos (*Vaccinium* sp.)
- Frutilla/fresa
- Pomáceas (manzanos, peras, membrillo. Portainjertos)
- Frambuesa, mora
- Kiwi
- Granados
- Paltos
- Nogal, avellano europeo, otras nuts…
- Especies nativas; desarrollo de nuevos marcadores SSR ad hoc para:
  - Murtilla (*Ugni molinae*)
  - Calafate (*Berberis spp*)
  - Quillay (*Quillaja saponaria*)

Variedades en estudio

Nombre	Tipo	Especie
W.Murcott	Mandarina (hibrido: Tangor)	Citrus reticulata
Clemenules	Clementina	Citrus clementina Citrus reticulata x (Citrus × sinensis)
Genova	Limón	Citrus limon
Fino 49	Limón	Citrus limon
Olinda Valencia	Naranja	Citrus sinensis
Naranja chilena	Naranja	Citrus sinensis
Carrizo	Citrange	Citrus sinensis × Poncirus trifoliata
C35	Citrange	Citrus sinensis × Poncirus trifoliata
Fortuna	Mandarina	Citrus deliciosa
Nova	Mandarina híbrida	Citrus reticulata x (C. paradisi x C. tangerina)
Orri	Mandarina híbrida	Citrus reticulata x ¿?
Macrophylla	Limon	Citrus macrophylla
Limón de Pica	Lima	Citrus aurantifolia
Lisboa (Limoneira 8A)	Limón	Citrus limon
Murcott SL	Mandarina	Citrus reticulata
Tangelo Minneola	Híbrido de mandarina y pomelo	Citrus reticulata × C. paradisi

Herramienta utilizada

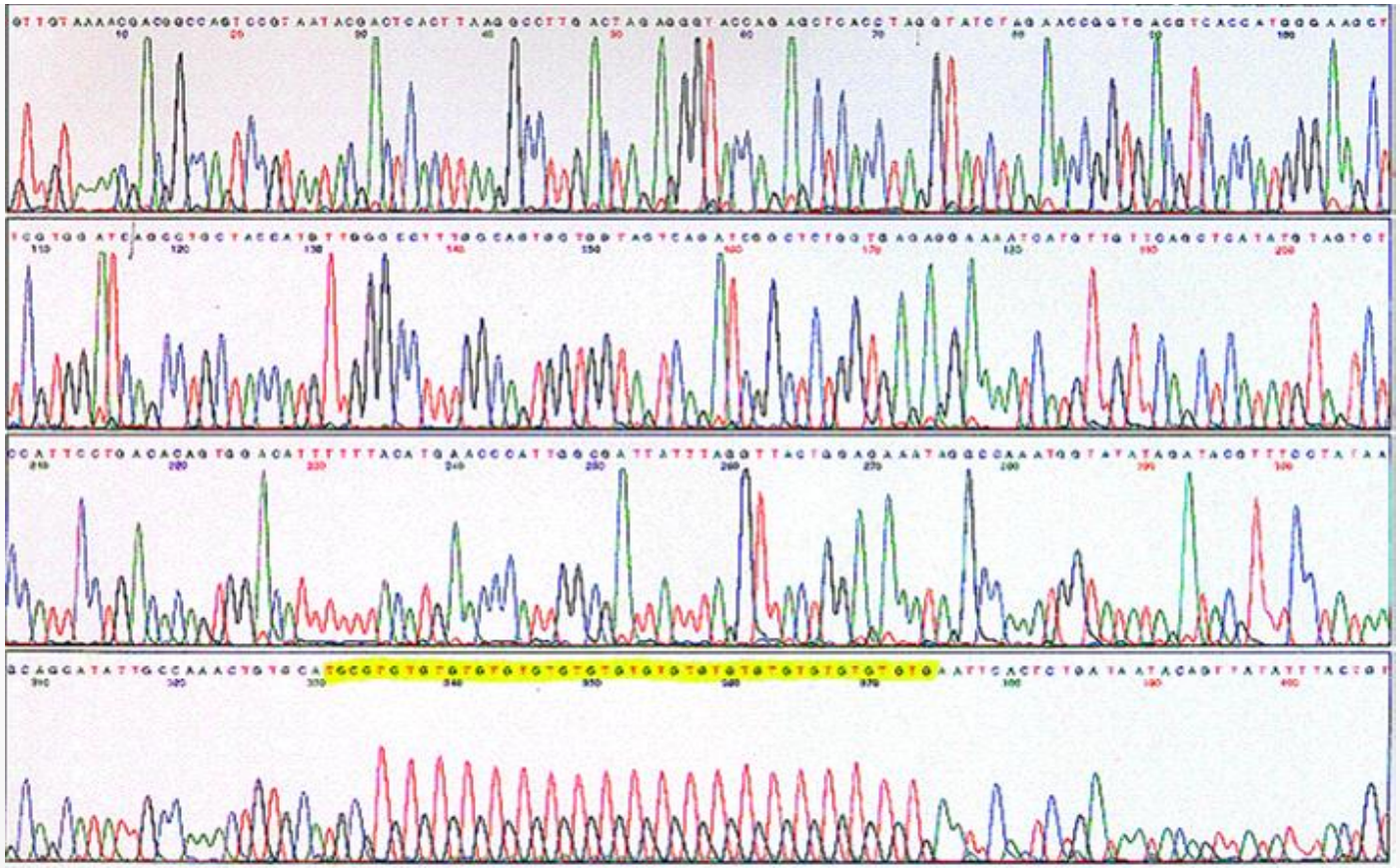


Marcadores moleculares tipo microsatélites (SSR)

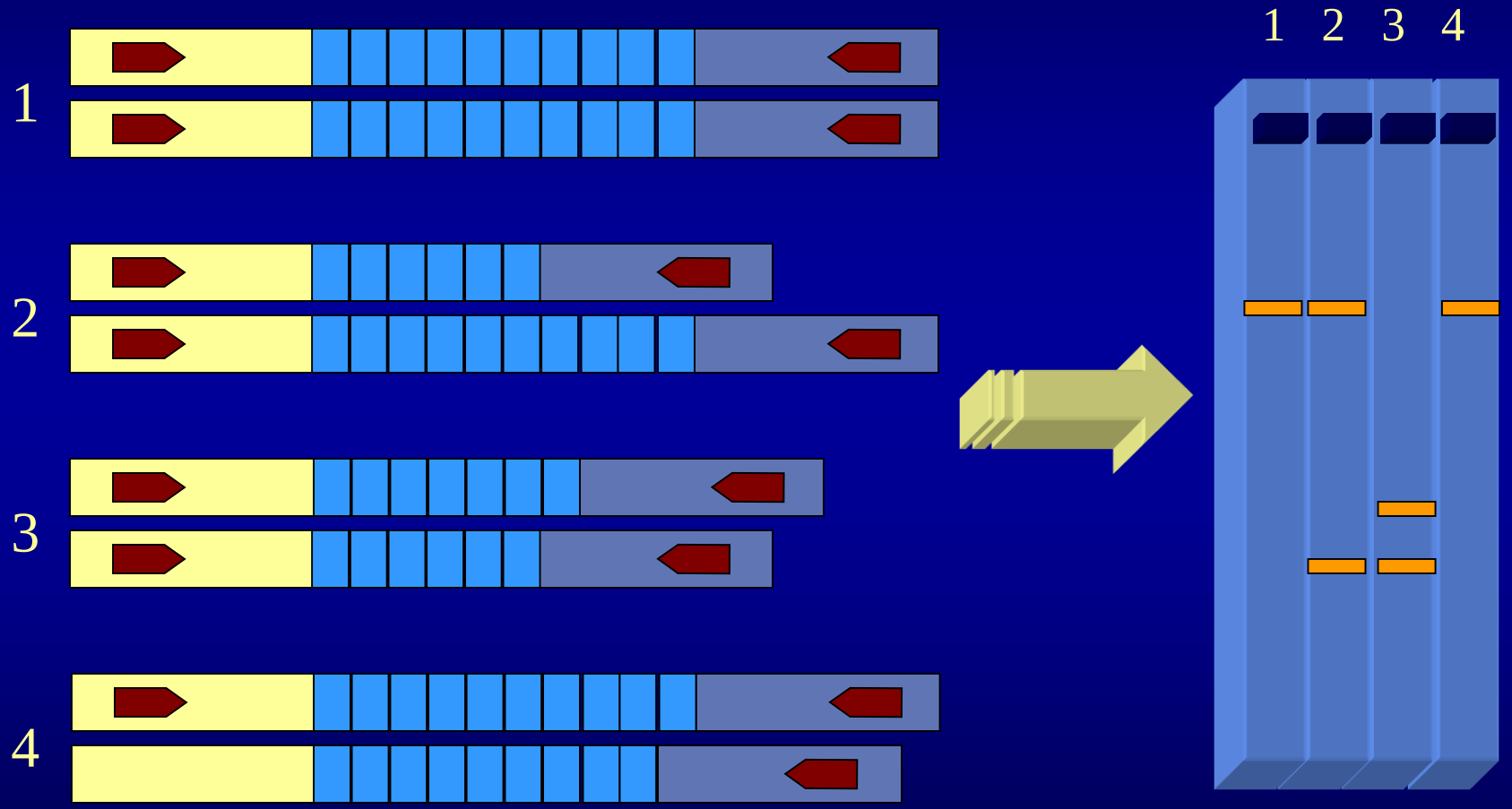
Se basa en la existencia de secuencias repetidas en el genoma (2-6 pares de bases) conocidos como microsatélites (SSR, Simple Sequence Repeat). La variación en el número de repeticiones genera la existencia de diferentes alelos.

Desarrollo de marcadores de “microsatélites” (SSR)

Secuencia del genoma en *loci* específicos



Microsatélites: marcadores de muy fácil interpretación de resultados!!



Resultados obtenidos

1. Extracción de ADN a partir de hojas y brotes frescos

Extracción de ADN a partir de hojas

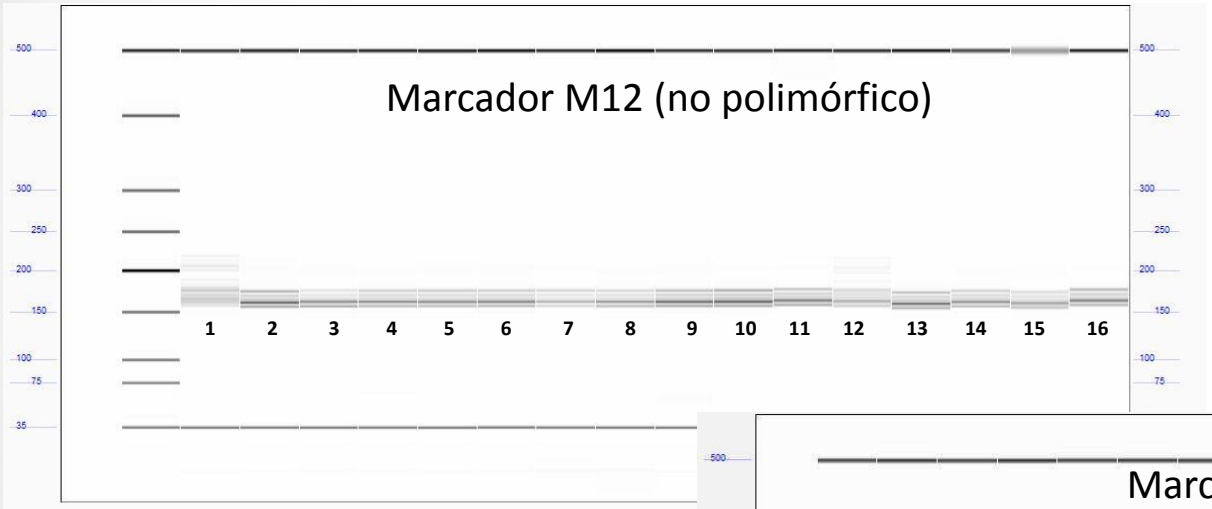
↓

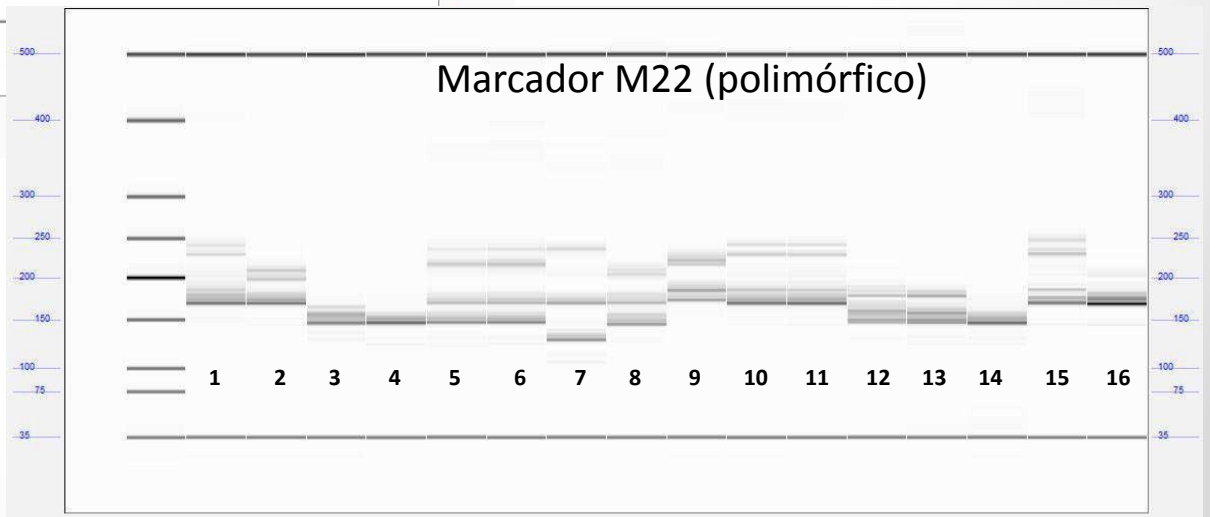
Reacción de PCR

2. Amplificación por PCR con 40 marcadores SSR

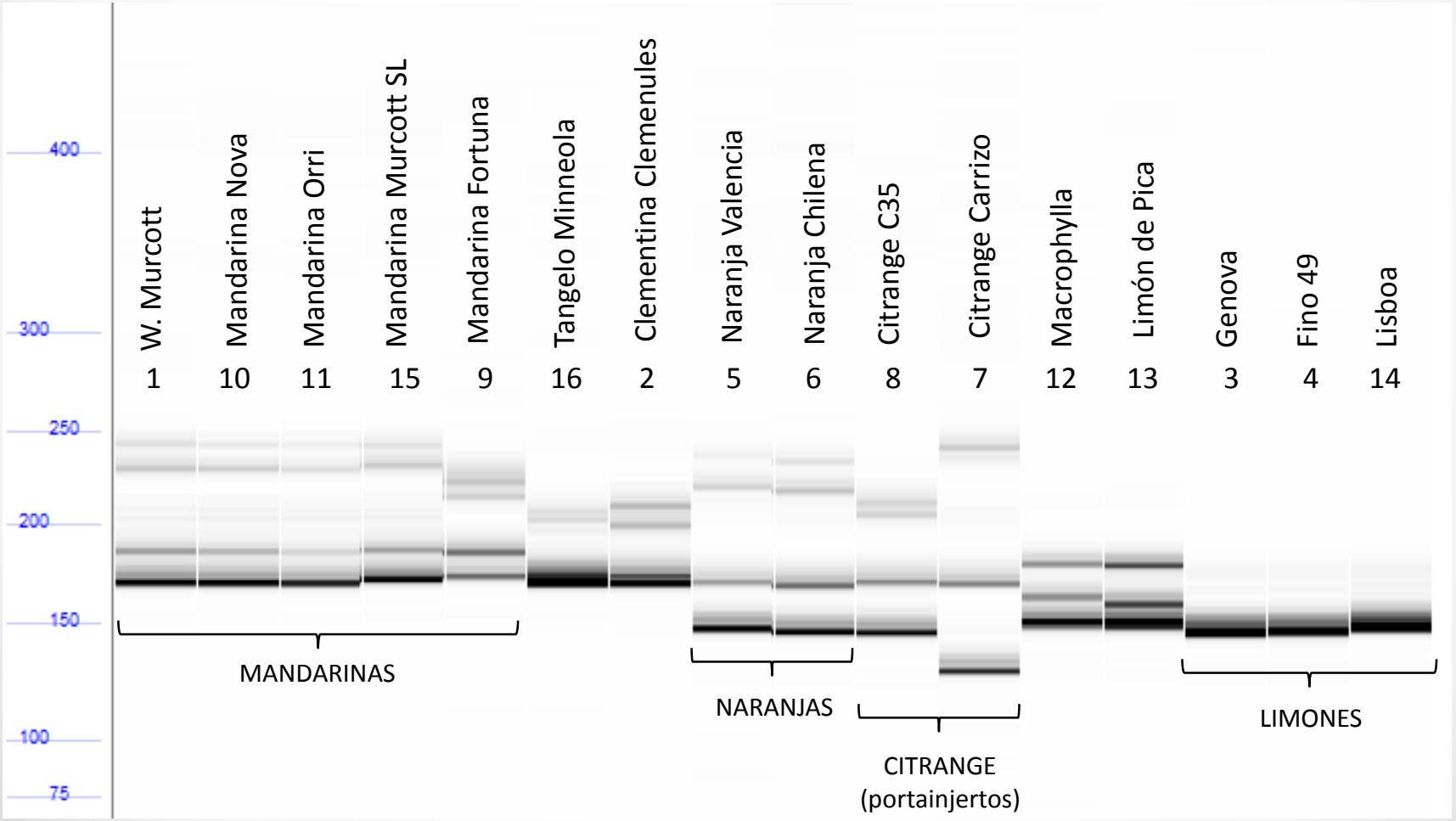
Análisis de polimorfismos en Fragment Analyzer

Ejemplo de polimorfismos observados con dos marcadores





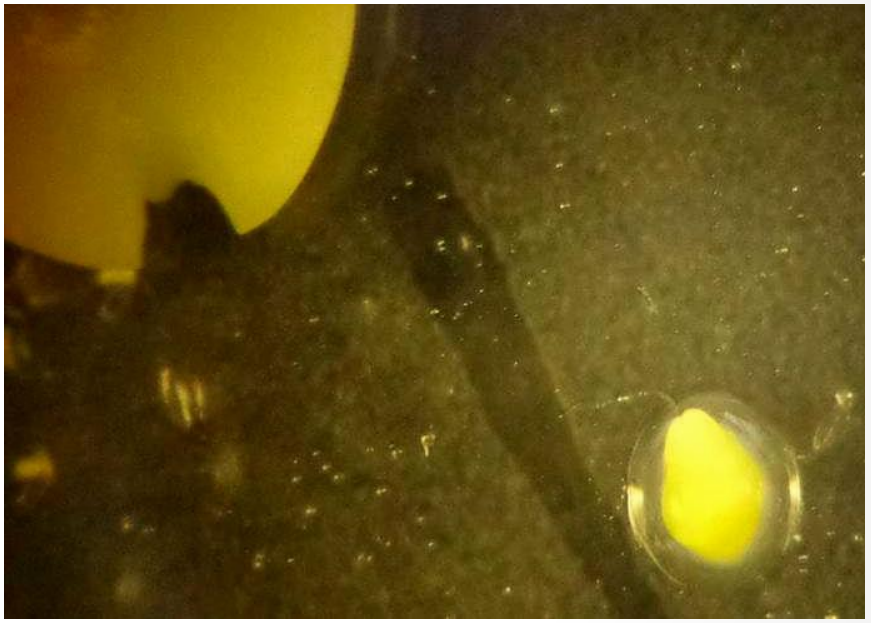
Perfiles de amplificación para las 16 especies/variedades - Marcador M22



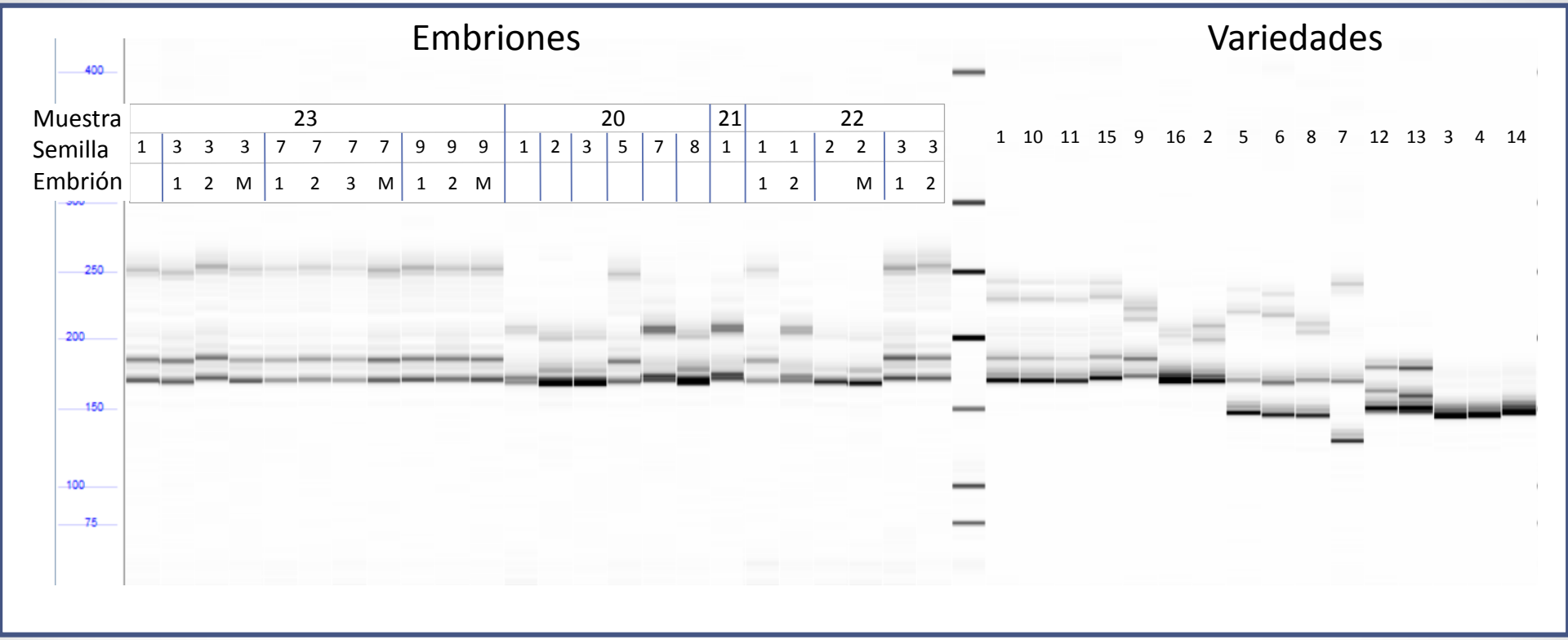
Discriminación entre las 16 especies/variedades con tres marcadores SSR

- M22: separa las variedades/especies en 8 grupos
- M26: permite diferenciar dentro del grupo de las mandarinas a mandarina Nova y Murcott SL. Además permite diferenciar Tangelo Mineola y Clementina Clemenules
- M35: permite diferenciar entre W. Murcott y Mandarina Orri
- Con los marcadores ensayados no se pudo discriminar dentro del grupo 7 (Macrophylla y Limón de Pica) ni del grupo 8 (Génova, Fino 49 y Lisboa).

3. Obtención de embriones individuales



4. Amplificación por PCR desde embriones individuales



Segunda etapa

- Actualmente se ha establecido contacto con investigadores del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) para realizar un convenio de cooperación en el marco de este Proyecto.

- En este centro de investigación, a través de su proyecto CITRUSGENN, se ha logrado la secuenciación de más de 150 genomas de cítricos.

- Esta información será de gran ayuda para obtener nuevos marcadores genéticos (SNP, InDels y otras variaciones de secuencias del genoma) que permitan discriminar entre variedades cercanas.

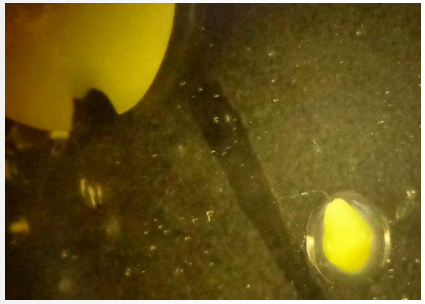
Segunda etapa

- Colaboración con el Proyecto “Diseño de una estrategia para reducir la presencia de semillas en mandarinas de exportación” (Prof. Johanna Martiz, Comité de Cítricos-PUC, CORFO 15COTE-46285)

  - Aportarán semillas de frutos obtenidos por polinización controlada

		CULTIVAR MATERNO	
CULTIVAR PATERNO		Clemenules	W.Murcott
Clementinas	Clemenules		x
	Clemenluz		x
	Oronules		x
	Orogrande		x
Mandarinas e Hibridos	W.Murcott	x	
	Fortune	x	x
	Orri	x	x
	T.Minneola	x	x
Limoneros	Eureka	x	x
	Benjamin Andes	x	x
	Fino 49	x	x
	Messina	x	x
Naranjos	Valencia Late	x	x
	Valencia Midknight	x	x
Pomelo	Star Ruby	x	x

Segunda etapa



Obtención de embriones cigóticos

Germinación en placas

Establecimiento de plantas

Extracción de ADN genómico

Comité de Cítricos Chile

ASOEX
ASOCIACIÓN DE EXPORTADORES DE FRUTAS DE CHILE A.G.

INIA

Gracias