24 y 25 - SETIEMBRE 2015

Resultados de Investigación en CITRICULTURA

+ GENÉTICA SANIDAD PRODUCTIVIDAD

INIA
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY

BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL DESARROLLO DE NUEVAS VARIEDADES

1. Manipulación de la ploidía para obtención de mandarinas sin semilla
2. Marcadores moleculares para caracterización de variedades y portainjertos

Laboratorio de Biotecnología
INIA Salto Grande
INIA Las Brujas
LEDP Facultad de Agronomía

MANIPULACIÓN DE LA PLOIDÍA PARA LA OBTENCIÓN DE MANDARINAS SIN SEMILLA

1. **Obtención de triploides por rescate de embriones**

2. **Obtención de parentales tetraploides**
   a. Espontáneos (duplicación somática)
   b. Fusión de protoplastos (hibridación somática)

1. Obtención de triploides por rescate de embriones

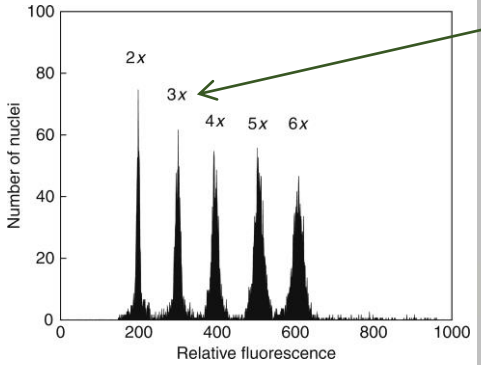
Recolección y desinfección de semillas vanas

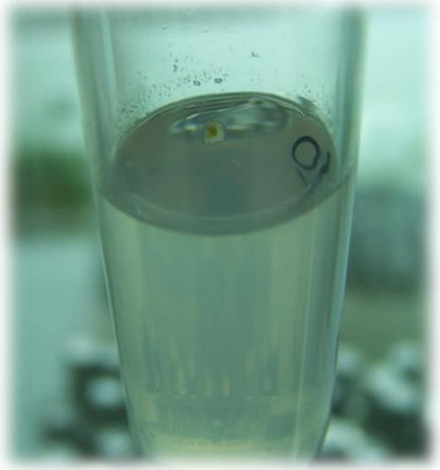
Siembra del embrión en medio de cultivo (MS + Giberelina + Adenina)

Desarrollo de plantas → citometría de flujo: selección de individuos tripliodes

Sobreinjerto

Posibles embriones triploides





Triploides obtenidos por rescate de embriones (INIA-LB e INIA-SG)

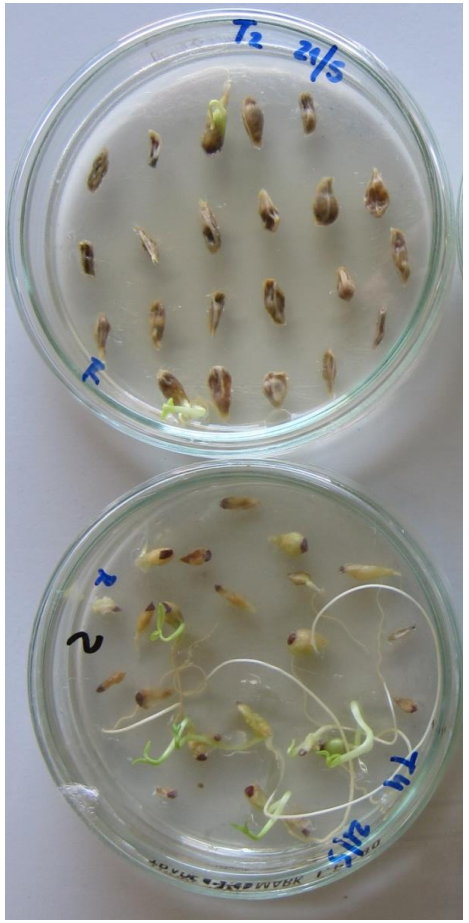
Variedad	N° triploides
Marisol	25
Clemenules	9
Tomatera	1
Clemenpons	6
Ellendale	3
Daisy	6
A30	1
B25	6
Carte Noir X Sunburst	1
Ana Claudia X Limón Fino	1

Proceso muy complejo:

personal calificado
insume muchas horas

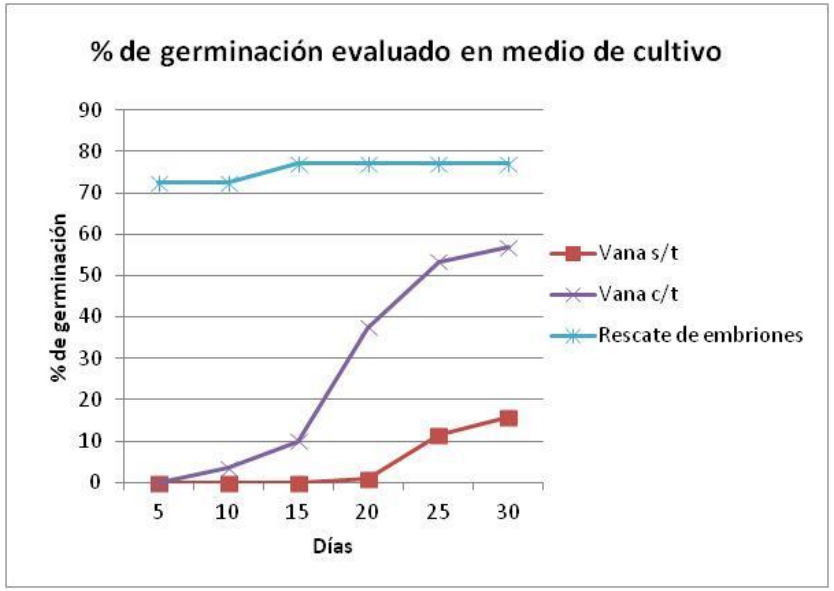
Poco eficiente: menor a 10%

Escarificado químico de semillas para facilitar proceso de rescate de embriones



Semillas vanas sin escarificar luego de 30 días en cultivo

Semillas vanas escarificadas luego de 30 días en cultivo



ESCARIFICACIÓN QUÍMICA DE SEMILLAS DE *P. trifoliata*.

CARTILLA Nº

R. Grasso, M. Giambiasi, F. Malaquina, F. Rivas.
Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola.
INIA Salto Grande

La cobertura de la semilla (testa) actúa como barrera física que retarda su germinación. La eliminación de la misma previo a la siembra acelera y uniformiza la emergencia de los plantines y por tanto acelera y mejora la calidad del almácigo. El siguiente protocolo permite, de modo práctico, remover la testa mediante un proceso de escarificación química.

PROTOCOLO DE ESCARIFICACIÓN:

1. Pesar 1 kg de semillas y cubrirlas con agua durante toda la noche (12 h).
2. Descartar el agua y agregar una solución de cal apagada [$Ca(OH)_2$; 10 g/L] hasta cubrir las semillas. Agitar durante 10 min.
3. Verter el contenido en un colador y enjuagar con abundante agua corriente (3 min).
4. Colocar las semillas en un recipiente limpio y agregar 1 L de agua y 0,5 L de hipoclorito de sodio (40 g/L). Es indispensable cubrir todas las semillas.
5. Ajustar el pH a 11-12 con la solución de soda cáustica (10 g/L).

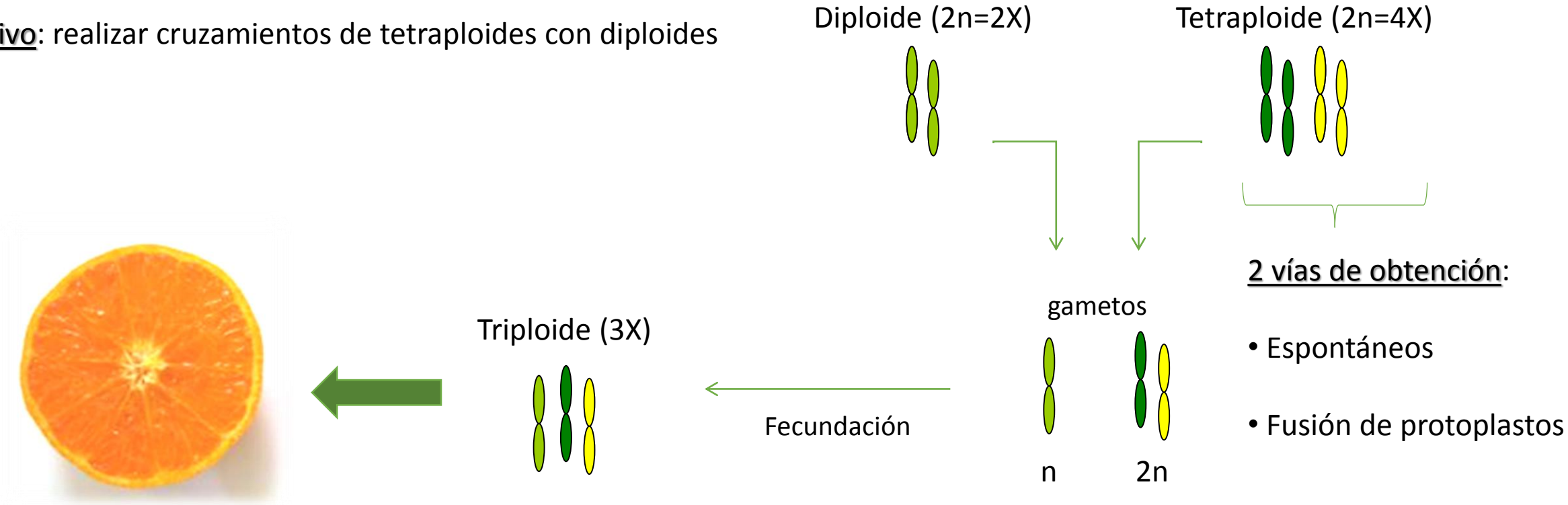
6.1 Colocar en baño María a 35-40ºC hasta que se remueva la testa (aprox. 2½ h). Controlar el pH durante todo el proceso; agregar solución de soda cada vez que el pH baje a menos de 11.

6.2 Es posible evitar el baño María, dejando la semilla en la misma solución de hipoclorito durante toda la noche (12 h).

7. Luego, verter el contenido en un colador y enjuagar (5 min) con agua corriente.
8. Colocar las semillas sobre un paño y frotarlas para desprender la testa.
9. Sembrar lo antes posible.

2. Obtención de parentales tetraploides

<u>Objetivo</u>: realizar cruzamientos de tetraploides con diploides

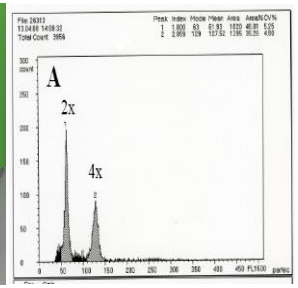


Tetraploides espontáneos: duplicación somática

Selección de parentales (con semilla poliembriónica)

Siembra de semillas

Análisis por Citometría de Flujo



Variedad	Plantines 4x
B49	8
B475	4
B47	4
B30	6
F3P9	1
F12P3	1
A218	3
A201	5
A30	1
M9	2

Variedad	Plantines 4x
Murcott	10
Afourer	4
Montenegrina	5
Fremont	10
Carvalais	7
Page	3
Satsuma	4

Total: 78 tetraploides espontáneos

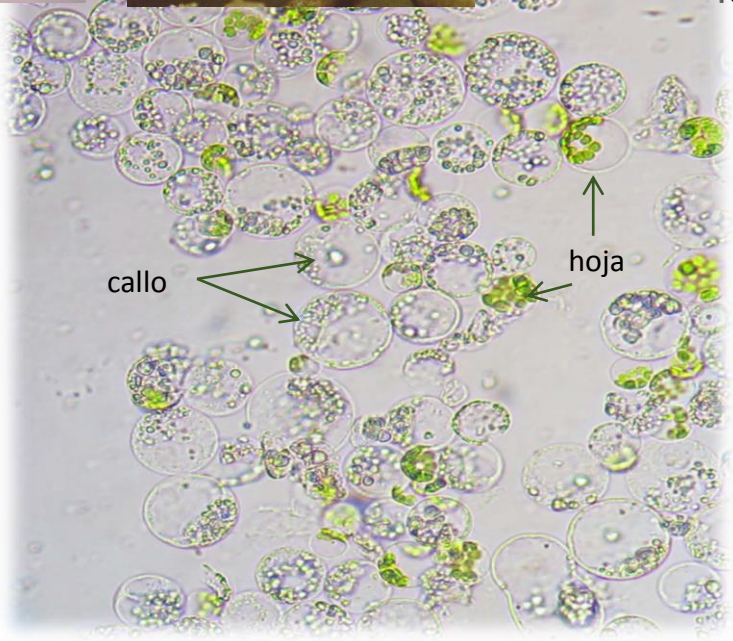
Selección de tetraploides para cruzamientos

Fusión de protoplastos: hibridación somática

0) Obtención de callos embriogénicos

pueden

1) Obtención de protoplastos



Callos embriogénicos		Genotipos de hoja (híbridos nacionales)
M9		M19
Murcott		F3P8, F2P3, F6P8, F4P8
Afourer		A218
A30		B30
Page		
Valencia		

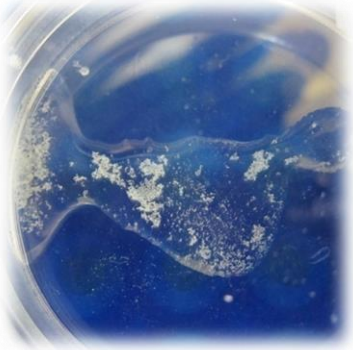
Fusión de protoplastos: hibridación somática

0) Obtención de callos embriogénicos

1) Obtención de protoplastos

2) Fusión de protoplastos

3) Regeneración de plantas



Murcott X F6P8

¿es realmente tetraploide?

¿proviene de la fusión de 2 células de variedades diferentes o de la misma variedad?

Caracterización con Marcadores Moleculares

Desarrollo de la herramienta

Aplicaciones alternativas