

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

Departamento de Biotecnología



Obtención de híbridos triploides de cítricos

Tesis Doctoral

Presentada por:

Pablo Aleza Gil

Para optar al grado de:

DOCTOR INGENIERO AGRÓNOMO

Directores:

Dr. Luís Navarro Lucas

Dr. Patrick Ollitrault

Valencia, 2008



GENERALITAT VALENCIANA
Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació

**INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES
AGRARIAS**

Carretera Moncada a Náquera Km. 4,5, 46113-
MONCADA, VALENCIA, SPAIN

D. Luís Navarro Lucas, Doctor Ingeniero Agrónomo, Director del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y D. Patrick Ollitrault, Doctor en Ciencias Biológicas, Director de Investigación y responsable del equipo de cítricos del Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD),

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral 'Obtención de híbridos triploides de cítricos' presentada por Pablo Aleza Gil, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del IVIA, para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 29 de septiembre de 2008

Fdo: Dr. Luís Navarro Lucas

Fdo: Dr. Patrick Ollitrault

RESUMEN: La presencia de semillas en los frutos de mandarina es una característica indeseable ya que el mercado de consumo en fresco no acepta frutos con semillas. Los híbridos triploides de cítricos son de gran interés ya que no producen semillas ni inducen la formación de semillas en otros genotipos por polinización cruzada. Los híbridos triploides se pueden obtener mediante hibridación somática entre protoplastos haploides y diploides y mediante hibridación sexual entre parentales diploides y entre parentales diploides y tetraploides. El objetivo general de esta tesis doctoral es la obtención de parentales para la producción de híbridos triploides de cítricos, la caracterización de los diferentes tipos de hibridaciones sexuales que permiten obtener híbridos triploides y un mejor conocimiento de la biología reproductiva de los cítricos en relación con la obtención de híbridos triploides. Estos objetivos generales se concretan en los siguientes objetivos específicos: 1. Obtención de plantas haploides mediante la técnica de ginogénesis *in situ* inducida por polen irradiado y posterior rescate y cultivo de embriones *in vitro*. Se han obtenido genotipos haploides, dobles haploides y aneuploides de clementina 'Clemenules' y uno de los genotipos haploides ha sido elegido por el Consorcio Internacional de Genómica de Cítricos para la secuenciación del genoma completo de los cítricos. 2. Obtención de plantas tetraploides de diferentes genotipos apomícticos de mandarinos, naranjos dulces y pomelos que puedan ser utilizados como parentales masculinos en hibridaciones $2x \times 4x$ para la obtención de híbridos triploides. Mediante citometría de flujo se han identificado plantas tetraploides espontáneas en 15 genotipos de los 17 estudiados, con frecuencias que oscilaron entre el 9,7% en mandarino 'Kinnow' y el 0,5% en mandarino 'Page'. Se demuestra que todos los genotipos tetraploides obtenidos proceden de la duplicación del número de cromosomas de células de la nucela. 3. Obtención de plantas tetraploides de genotipos no apomícticos de mandarino que puedan ser utilizadas como parentales masculinos y femeninos en hibridaciones $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$. Para ello se realizó el microinjerto *in vitro* de ápices caulinares tratados con colchicina y orizalina. Se han obtenido plantas tetraploides a partir de la brotación directa del ápice microinjertado y a partir de la segregación de citoquimeras, obteniendo plantas tetraploides estables de las clementinas 'Clemenules', 'Fina', 'Marisol' y mandarino 'Moncada'. 4. Obtención de híbridos triploides mediante hibridaciones $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$. Se demuestra que los embriones triploides se encuentran en diferentes tipos de semillas en función del tipo de hibridación realizada y se propone una mejora en cada etapa del proceso de obtención de híbridos triploides. Se evaluaron las eficiencias de las diferentes estrategias en función de los genotipos parentales. Las hibridaciones $4x \times 2x$ y $2x \times 4x$ presentaron la mayor eficiencia en la obtención de híbridos triploides; sin embargo en aquellos genotipos capaces de producir frecuencias muy elevadas de gametos $2n$, como mandarino 'Fortune', la estrategia $2x \times 2x$ es muy eficiente. Los resultados obtenidos también demuestran la gran influencia que tiene el parental masculino en la obtención de híbridos triploides, lo que implica la selección de una estrategia u otra. Por fin, se discuten las implicaciones de los diferentes tipos de hibridación a nivel de las segregaciones y de la diversidad genotípica teórica de las poblaciones triploides. 5. Determinación del origen genético de las plantas regeneradas a partir de semillas parcialmente desarrolladas originadas en las hibridaciones $2x \times 4x$ utilizando genotipos no apomícticos como parentales femeninos. Se demuestra con marcadores microsatélites que el origen de este tipo de poliembrionía ocurre como consecuencia de una embriogénesis secundaria a partir del embrión zigótico original. Así mismo, esta característica se confirma mediante la regeneración de plantas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* de genotipos no apomícticos de cítricos. Se concluye que la formación de embriones adventicios a partir del embrión zigótico original es un fenómeno frecuente en los genotipos no apomícticos de cítricos y que el desarrollo de estos embriones está generalmente inhibido por el embrión principal. Se discuten las implicaciones que tiene este mecanismo en los programas de mejora genética y además se describe por primera vez la ocurrencia de este mecanismo en la biología reproductiva de los genotipos no apomícticos de cítricos. 6. Establecer un perfil molecular con marcadores microsatélites de 15 nuevos híbridos triploides de mandarino presentados por el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias en el Registro de Variedades Protegidas de la Oficina Española de Variedades Vegetales. El análisis genético se realizó con un secuenciador automático mediante electroforesis capilar que permite calcular para marcadores heterocigóticos la dosis alélica de cada híbrido triploide lo que genera una diferenciación varietal mucho más potente.

RESUM: La presència de llavors en els fruits de mandarina és una característica indesitjable ja que el mercat de consum en fresc no accepta fruits amb llavors. Els híbrids triploides de cítrics són de gran interès ja que no produïxen llavors ni induïxen la formació de llavors en altres genotips per pol·linització encreuada. Els híbrids triploides es poden obtenir per mitjà d'hibridació somàtica entre protoplastos haploides i diploides i per mitjà d'hibridació sexual entre parentals diploides i entre parentals diploides i tetraploides. L'objectiu general d'esta tesi doctoral és l'obtenció de parentals per a la producció d'híbrids triploides de cítrics, la caracterització dels diferents tipus d'hibridacions sexuals que permeten obtenir híbrids triploides i un millor coneixement de la biologia reproductiva dels cítrics en relació amb l'obtenció d'híbrids triploides. Estos objectius generals es concreten en els següents objectius específics: 1. Obtenció de plantes haploides per mitjà de la tècnica de ginogènesis *in situ* induïda per pol·len irradiat i posterior rescat i cultiu d'embrions *in vitro*. S'han obtingut genotips haploides, dobles haploides i aneuploides de clementina 'Clemenules' i un dels genotips haploides ha sigut triat pel Consorci Internacional de Genòmica de Cítrics per a la seqüenciació del genoma complet dels cítrics. 2. Obtenció de plantes tetraploides de diferents genotips apomíctics de mandariners, tarongers dolços i pomelos que puguen ser utilitzats com parentals masculins en hibridacions $2x \times 4x$ per a l'obtenció d'híbrids triploides. Per mitjà de citometria de flux s'han identificat plantes tetraploides espontànies en 15 genotips dels 17 estudiats, amb freqüències que van oscil·lar entre el 9,7% en mandariner 'Kinnow' i el 0,5% en mandariner 'Page'. Es demostra que tots els genotips tetraploides obtinguts procedixen de la duplicació del nombre de cromosomes de cèl·lules de la nucl·la. 3. Obtenció de plantes tetraploides de genotips no apomíctics de mandariner que puguen ser utilitzades com parentals masculins i femenins en hibridacions $2x \times 4x$ i $4x \times 2x$. Per a això es va realitzar el microempelt *in vitro* d'àpecs caulinars tractats amb colchicina i orizalina. S'han obtingut plantes tetraploides a partir de la brotació directa de l'àpec microempeltat i a partir de la segregació de citoquimeres, obtenint plantes tetraploides estables de les clementines 'Clemenules', 'Fina', 'Marisol' i mandariner 'Moncada'. 4. Obtenció d'híbrids triploides per mitjà d'hibridacions $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ i $4x \times 2x$. Es demostra que els embrions triploides es troben en diferents tipus de llavors en funció del tipus d'hibridació realitzada i es proposa una millora en cada etapa del procés d'obtenció d'híbrids triploides. Es van avaluar les eficiències de les diferents estratègies en funció dels genotips parentals. Les hibridacions $4x \times 2x$ i $2x \times 4x$ van presentar la major eficiència en l'obtenció d'híbrids triploides; no obstant això en aquells genotips capaços de produir freqüències molt elevades de gàmetes $2n$, com a mandariner 'Fortune', l'estratègia $2x \times 2x$ és molt eficient. Els resultats obtinguts també demostren la gran influència que té el parental masculí en l'obtenció d'híbrids triploides, la qual cosa implica la selecció d'una estratègia o una altra. Per fi, es discutixen les implicacions dels diferents tipus d'hibridació a nivell de les segregacions i de la diversitat genotípica teòrica de les poblacions triploides. 5. Determinació de l'origen genètic de les plantes regenerades a partir de llavors parcialment desenrotllades originades en les hibridacions $2x \times 4x$ utilitzant genotips no apomíctics com parentals femenins. Es demostra amb marcadors microsatèl·lits que l'origen d'este tipus de poliembriònia ocorre com a conseqüència d'una embriogènesi secundària a partir de l'embrió cigòtic original. Així mateix, esta característica es confirma per mitjà de la regeneració de plantes a partir del cultiu de nucl·las *in vitro* de genotips no apomíctics de cítrics. Es conclou que la formació d'embrions adventicis a partir de l'embrió cigòtic original és un fenomen freqüent en els genotips no apomíctics de cítrics i que el desenrotllament d'estos embrions està generalment inhibit per l'embrió principal. Es discutixen les implicacions que té este mecanisme en els programes de millora genètica i a més es descriu per primera vegada la idea d'este mecanisme en la biologia reproductiva dels genotips no apomíctics de cítrics. 6. Establir un perfil molecular amb marcadors microsatèl·lits de 15 nous híbrids triploides de mandariner presentats per l'Institut Valencià d'Investigacions Agràries en el Registre de Varietats Protegides de l'Oficina Espanyola de Varietats Vegetals. L'anàlisi genètica es va realitzar amb un seqüenciador automàtic per mitjà d'electroforesi capil·lar que permet calcular per a marcadors heterocigòtics la dosi al·lèlica de cada híbrid triploide el que genera una diferenciació varietal molt més potent.

ABSTRACT: The presence of seeds in the fruits of mandarin is an undesirable feature for the fresh fruit market. The citrus triploid hybrids have a great interest because they do not produce seeds and don't induce the formation of seeds in other genotypes by cross-pollination. Triploids hybrids can be obtained through somatic hybridization between haploid and diploid protoplasts and through sexual hybridization between diploid parents and diploids and tetraploids parents. The overall objectives of this thesis are to obtain parents for the production of citrus triploid hybrids, to characterize different sexual hybridizations that produce triploid hybrids and to understand citrus reproductive biology in connection with triploid hybrids recovering. These broad objectives are realized in the following specific objectives: 1. Obtaining haploid plants using *in situ* gynogenesis induced by irradiated pollen and subsequent *in vitro* rescue and embryos culture. We obtained haploid, double haploid and aneuploid genotypes of clementina 'Clemenules'. One of the haploid genotypes has been selected by the International Genomics Citrus Consortium for the whole citrus genome sequencing. 2. Obtaining tetraploids plants of different apomictic genotypes of mandarin, sweet orange and grapefruit that can be used as a male parent in $2x \times 4x$ hybridizations. Spontaneous tetraploids of 15 genotypes, of the 17 analysed, have been identified by flow cytometry with frequencies ranged from 9.7% in 'Kinnow' mandarin and 0.5% in 'Page' mandarin. We have shown by SSR (Simple Sequence Repeats) markers that all tetraploid genotypes were obtained from chromosomes number duplication in nucellar cells. 3. Obtaining tetraploid plants of no apomictic genotypes of mandarin that can be used as male and female parents in $2x \times 4x$ and $4x \times 2x$ hybridizations. They have been obtaining after colchicine and orizaline treatment of *in vitro* shoot tips micrografting. Tetraploid plants have been obtained directly from the micrografting apex and from the segregation of citoquimeras obtaining stable tetraploid plants of clementines 'Clemenules', 'Fina', 'Marisol' and 'Moncada' mandarin. 4. Obtaining triploid hybrids through $2x \times 2x$, $4x \times 2x$ and $4x \times 2x$ hybridizations. Triploid embryos have been selected in different kind of seeds depending on the type of hybridization. We evaluated the efficiencies of the different strategies depending on parental genotypes. The $2x \times 4x$ and $4x \times 2x$ hybridizations showed the highest efficiency in production of triploid hybrids. However, for the genotypes producing very high frequency of $2n$ gametes, such as 'Fortune' mandarin, the $2x \times 2x$ strategy has been very efficient. We also demonstrate the great influence of the male parent in the production of triploid hybrids. Finally, we discuss the implications of different types of hybridization at the level of segregation and theoretical genotypic diversity of the triploid populations. 5. Identification of the genetic origin of plants recovered from undeveloped polyembryonic seeds originated in the $2x \times 4x$ hybridization using no apomictic genotypes as female parent. We demonstrate with SSR markers that the origin of the polyembryony occurs as a result of a secondary embryogenesis from original zygotic embryo. Likewise, this feature is confirmed by the regeneration of plants from nucelas cultured *in vitro* of the no apomictic citrus genotypes. We conclude that the formation of adventitious embryos from the original zygotic embryo is a frequent occurrence in no apomictic citrus genotypes and that the development of these embryos is generally inhibited by the main embryo. We discuss the implication in the genetic improvement programme of this reproductive biology mechanism described here for the first time. 6. Establishing a molecular profile with SSR markers of 15 new triploid hybrids of mandarin presented by the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias in the register of protected varieties of the Oficina Española de Variedades Vegetales. The genetic analysis was performed with an automatic sequencer through capillary electrophoresis. This tool allowed estimating the allelic doses for each triploid hybrid and thus results in powerful varietal differentiation.

AGRADECIMIENTOS

A Luís por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo, por permitirme realizar esta tesis doctoral y por lo que he aprendido durante todos estos años

A Patrick Ollitrault por su total disposición a cualquier momento y por dirigir y estructurar todo este jaleo

A Pepe Juárez porque mucho de lo aquí escrito también es suyo, por recordarme que las plantas son algo más que un tubo, por enseñarme a trabajar en un laboratorio, por los buenos ratos pasados y por su amistad

A toda la gente que está o ha estado en los laboratorios de Cultivo de Tejidos y Transformación Genética, pero muy especialmente a Cloti, Carmen, Juana Mari, Vio, María, Magda, Mamen, Juan, Josep, Toni, Óscar y Leandro por el especial ambiente de trabajo, porque siempre me habéis echado una mano en lo que sea, por vuestra ayuda, predisposición, amistad y esos ratos divertidos

A Frederique, Rosa Mar, José y Andrés por ser unos excelentes Analizadores Genéticos® y consumidores empedernidos de geles de acrilamida

Al laboratorio de Viroides y particularmente a Nuria

A todos los compañeros del Departamento y especialmente a Giovanni, Alida, Ana, Nuria y Elsa

A todos los que están o han estado en los invernaderos de Cultivo de Tejidos por ser capaces de llevar adelante todo ese follón y particularmente a José Antonio Pina, Diego, Tonín, Eduardo y José Manuel

A Eduardo Alonso, Alejandro Medina, Aurelio Buj, Rafa Bono y Salvador Zaragoza por ser los primeros en enseñarme algo de los cítricos

A Jordi Pérez y Emilio Carbonell por sus tratamientos estadísticos

A la familia de Pepa y especialmente a Irene por toda la fuerza que tiene
A mi abuelo Enrique, a mis padres y a los dos terremotos de hermanos que tengo

y muy especialmente a **Pepa** por todo el apoyo, ayuda, paciencia y comprensión que he recibido de tu parte desde hace ya unos cuantos años. Muchas gracias, *Te quiero*

Pablo

LISTADO ABREVIATURAS

AFLP Amplified Fragment Length Polymorphisms
AVASA Agrupación de Viveristas de Agrios S.A.
BACs Bacterial Artificial Chromosome
CAPA Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación
CAPs Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CIGC Consorcio Internacional de Genómica de Cítricos
CIRAD Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le développement
CTV Citrus Tristeza Virus
ESTs Expressed Sequence Tags
FAO Food and Agriculture Organization
FDR First Division Restitution
GOT Glutamato Oxaloacetato Trans-minasa
INRA Institut Scientifique de Recherche Agronomique
IRAP Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism
ISSR Inter-Simple Sequence Repeats
IVIA Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
MAPA Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
OCVV Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales
OEVV Oficina Española de Variedades Vegetales
PA Ploidy Analyzer
PCR Polymerase Chain Reaction
RAPDs Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP Restriction Fragment Length Polymorphisms
REMAP Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism
SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SCARs Sequence Characterised Amplified Region
SDR Second Division Restitution
SNPs Single Nucleotide Polymorphisms
SSRs Simple Sequence Repeats
UPOV Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales

ÍNDICE.

	Página
INTRODUCCIÓN.	3
1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE LOS CÍTRICOS.	3
2. ORIGEN DE LOS CÍTRICOS Y SU INTRODUCCIÓN EN ESPAÑA.	6
3. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LOS CÍTRICOS.	8
3.1 La flor.	8
3.2 El fruto.	9
3.3 Los óvulos.	9
3.4 La semilla.	10
3.5 Apomixis.	10
3.6 Esterilidad masculina, femenina y autoincompatibilidad.	11
4. POLIPLÓIDES NATURALES EN CÍTRICOS.	12
5. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SOCIAL DE LOS CÍTRICOS.	13
6. PROBLEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA VARIETAL DE MANDARINOS EN ESPAÑA.	14
7. MEJORA GENÉTICA DE LOS CÍTRICOS.	16
7.1 Mejora genética clásica.	17
7.1.1 Inducción de mutantes.	17
7.1.2 Hibridación sexual clásica.	18
7.2 La biotecnología en la mejora genética de los cítricos.	19
7.2.1 Variación somaclonal.	19
7.2.2 Hibridación somática.	20
7.2.3 Mapeo genético y marcadores moleculares.	21
7.2.3.1 Microsatélites.	22
7.2.4 Genómica.	24
7.2.5 Transformación genética.	25
7.2.6 Manipulación del nivel de ploidía para la obtención de híbridos triploides.	25
OBJETIVOS GENERALES.	33
CAPÍTULO 1. OBTENCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES, DOBLES HAPLOIDES Y ANEUPLOIDES DE CITRUS CLEMENTINA HORT. EX TAN. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA.	37
1.1. INTRODUCCIÓN.	39
1.2. MATERIAL Y MÉTODOS.	39
1.2.1 Material vegetal.	39
1.2.2 Obtención de polen e irradiación.	39
1.2.3 Polinización y recolección de frutos.	39

1.2.4 Extracción de semillas y rescate de embriones.....	40
1.2.5 Regeneración de plantas y trasplante a maceta.....	40
1.2.6 Determinación del nivel de ploidía.....	41
1.2.7 Análisis genético.....	41
1.2.8 Conteo de cromosomas.....	42
1.2.9 Caracterización morfológica.....	43
1.2.10 Caracterización histológica de anteras, ovarios, estilos y estigma de una planta haploide y diploide de clementina `Clemenules´.....	43
1.2.11 Análisis estadístico.....	43
1.3 RESULTADOS.....	44
1.3.1 Obtención de frutos, semillas y rescate de embriones.....	44
1.3.2 Nivel de ploidía.....	44
1.3.3 Trasplante a maceta.....	44
1.3.4 Análisis genético.....	45
1.3.5 Conteo de cromosomas.....	45
1.3.6 Caracterización morfológica.....	45
1.3.7 Caracterización histológica.....	46
1.4 DISCUSIÓN.....	46
1.4.1 Eficiencia de la ginogénesis <i>in situ</i> inducida por polen irradiado.....	46
1.4.2 Origen de las plantas obtenidas.....	47
1.4.3 Efecto del nivel de ploidía en las características morfológicas de las plantas regeneradas.....	49
1.5. CONCLUSIONES.....	51

CAPÍTULO 2. OBTENCIÓN DE TETRAPLOIDES ESPONTÁNEOS EN GENOTIPOS APOMÍCTICOS DE CÍTRICOS. 63

2.1 INTRODUCCIÓN.....	63
2.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	64
2.2.1 Material vegetal.....	64
2.2.2 Semilleros.....	64
2.2.3 Análisis del nivel ploidía.....	65
2.2.3.1 Citometría de flujo.....	65
2.2.3.2 Conteo de cromosomas.....	65
2.2.4 Análisis genético.....	65
2.3 RESULTADOS.....	66
2.3.1 Identificación de tetraploides espontáneos.....	66
2.3.2 Análisis genético de las plantas obtenidas.....	66
2.4 DISCUSIÓN.....	67
2.4.1 Origen y estructura genética de las plantas tetraploides.....	67
2.4.2 Frecuencia de plantas tetraploides en los semilleros.....	67
2.5 CONCLUSIONES.....	69

CAPÍTULO 3. OBTENCIÓN DE PLANTAS TETRAPLOIDES DE GENOTIPOS NO APOMÍCTICOS DE MANDARINO MEDIANTE MICROINJERTO IN VITRO DE ÁPICES CAULINARES TRATADOS CON COLCHICINA Y ORIZALINA. 79

3.1 INTRODUCCIÓN.....	79
3.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
3.2.1 Material vegetal.....	81
3.2.2 Producción de brotes y aislamiento de los ápices.....	81
3.2.3 Tratamiento de los ápices.....	81
3.2.4 Microinjerto <i>in vitro</i> de ápices caulinares.....	82
3.2.5 Trasplante.....	82
3.2.6 Determinación del nivel de ploidía.....	82
3.2.7 Análisis genético.....	83
3.2.8 Caracterización histológica de anteras, ovarios, estilos y estigmas de una planta diploide y dos plantas tetraploides de clementina 'Clemenules'.....	83
3.2.9 Caracterización morfológica.....	83
3.2.10 Germinación de los granos de polen.....	84
3.2.11 Análisis estadístico.....	84
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	84
3.3.1 Efecto de la concentración, tiempo y modo de aplicación de la colchicina y orizalina sobre el desarrollo de los ápices. Determinación del nivel de ploidía.....	84
3.3.2 Obtención de plantas tetraploides estables a partir de citoquimeras..	86
3.3.3 Análisis genético y estabilidad del nivel de ploidía.....	88
3.3.4 Caracterización morfológica.....	89
3.3.5 Caracterización histológica de anteras, ovarios, estilos y estigmas de una planta diploide y dos plantas tetraploides de clementina 'Clemenules'.....	90
3.3.6 Germinación de los granos de polen.....	90
3.4 CONCLUSIONES.....	91

CAPÍTULO 4. OBTENCIÓN DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES DE CÍTRICOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN SEXUAL ENTRE PARENTALES DIPLOIDES Y ENTRE PARENTALES DIPLOIDES Y TETRAPLOIDES. 107

4.1 INTRODUCCIÓN.....	107
4.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	108
4.2.1 Material vegetal.....	108
4.2.1.1 Material vegetal utilizado para la descripción y caracterización de las semillas.....	109
4.2.1.2 Hibridaciones 2x X 2x.....	109
4.2.1.3 Hibridaciones 2x X 4x.....	109
4.2.1.4 Hibridaciones 4x X 2x.....	109
4.2.2 Obtención de polen, polinización y recolección de frutos.....	109
4.2.3 Clasificación y caracterización de las semillas.....	110

4.2.4 Rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i>	110
4.2.5 Semillero.....	111
4.2.6 Regeneración de plantas y trasplante a maceta.....	111
4.2.7 Determinación del nivel de ploidía.....	111
4.3 RESULTADOS.....	111
4.3.1 Clasificación y caracterización de las semillas obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x (clementina `Clemenules´ por zamboa `Pink`), 2x X 4x (clementina `Fina´ por mandarino `Común´ tetraploide) y 4x X 2x (clementina `Clemenules´ tetraploide por mandarino `Moncada´). Regeneración de plantas y nivel de ploidía.....	111
4.3.2 Hibridaciones 2x X 2x.....	113
4.3.2.1 Cuajado y tipos de semillas.....	113
4.3.2.2 Rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i>	113
4.3.2.3 Regeneración de plantas.....	113
4.3.2.4 Nivel de ploidía.....	114
4.3.2.5 Eficiencia en la obtención de híbridos triploides.....	114
4.3.3 Hibridaciones 2x X 4x.....	114
4.3.3.1 Cuajado y tipos de semillas.....	115
4.3.3.2 Rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i>	115
4.3.3.3 Regeneración de plantas.....	116
4.3.3.4 Nivel de ploidía.....	117
4.3.3.5 Eficiencia en la obtención de híbridos triploides.....	117
4.3.4 Hibridaciones 4x X 2x.....	118
4.3.4.1 Cuajado y tipos de semillas.....	118
4.3.4.2 Rescate, cultivo de embriones <i>in vitro</i> y regeneración de plantas.....	118
4.3.4.3 Nivel de ploidía.....	119
4.3.4.4 Eficiencia en la obtención de híbridos triploides.....	119
4.3.5 Comparación en la eficiencia de obtención de híbridos triploides entre las hibridaciones 2x X 2x, 2x X 4x y 4x X 2x utilizando como parental femenino la clementina `Clemenules´ diploide y tetraploide y como parental masculino el mandarino `Común´ diploide y tetraploide.....	120
4.4 DISCUSIÓN.....	120
4.4.1 Hibridaciones 2x X 2x.....	120
4.4.1.1 Producción de semillas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i>	120
4.4.1.2 Obtención de híbridos triploides; origen y eficiencia.....	121
4.4.1.3 Consideraciones prácticas.....	122
4.4.1.4 Estructura genética.....	122
4.4.2 Hibridaciones 2x X 4x.....	123
4.4.2.1 Producción de semillas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i>	123
4.4.2.2 Obtención de híbridos triploides; origen y eficiencia.....	124
4.4.2.3 Origen de las plantas no triploides.....	125

4.4.2.4 Consideraciones prácticas.....	126
4.4.2.5 Estructura genética.....	127
4.4.3 Hibridaciones 4x X 2x.....	128
4.4.3.1 Producción de semillas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i>	128
4.4.3.2 Obtención de híbridos triploides; origen y eficiencia.....	128
4.4.3.3 Origen de las plantas no triploides.....	129
4.4.3.4 Consideraciones generales.....	130
4.4.3.5 Estructura genética.....	130
4.4.4 Comparación entre las hibridaciones 2x X 2x, 2x X 4x y 4x X 2x respecto a la eficiencia en la obtención de híbridos triploides de cítricos.....	130
4.5 CONCLUSIONES GENERALES.....	132

CAPÍTULO 5. POLIEMBRIONÍA IN VIVO E IN VITRO EN GENOTIPOS NO APOMÍCTICOS DE CÍTRICOS; ORIGEN E IMPLICACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES. 149

5.1 INTRODUCCIÓN.....	149
5.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	150
5.2.1 Hibridaciones 2x X 4x.....	150
5.2.1.1 Material vegetal.....	150
5.2.1.2 Obtención de polen.....	151
5.2.1.3 Polinizaciones 2x X 4x.....	151
5.2.1.4 Extracción de semillas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i> obtenidos en las hibridaciones 2x X 4x.....	151
5.2.2 Hibridaciones 2x X 2x.....	151
5.2.2.1 Material vegetal.....	151
5.2.2.2 Obtención de polen.....	151
5.2.2.3 Polinizaciones 2x X 2x.....	151
5.2.2.4 Extracción de semillas y cultivo de nucelas <i>in vitro</i> obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x.....	152
5.2.3 Determinación del nivel de ploidía.....	152
5.2.4 Análisis genético.....	152
5.2.5 Estudio histológico.....	153
5.3 RESULTADOS.....	153
5.3.1 Hibridaciones 2x X 4x.....	153
5.3.1.1 Obtención de frutos y semillas.....	153
5.3.1.2 Rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i>	153
5.3.1.3 Nivel de ploidía.....	154
5.3.1.4 Análisis genético.....	154
5.3.2 Hibridaciones 2x X 2x.....	154
5.3.2.1 Obtención de frutos y semillas.....	156

5.3.2.2 Cultivo de nucelas <i>in vitro</i> y rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i>	156
5.3.2.2.1 Hibridación entre clementina `Clemenules´ y <i>P. trifoliata</i> `Benecke´.....	156
5.3.2.2.2 Hibridación entre mandarino `Fortune´ y <i>P. trifoliata</i> `Benecke´.....	156
5.3.2.3 Nivel de ploidía.....	157
5.3.2.4 Análisis genético.....	157
5.3.2.5 Histología.....	159
5.4 DISCUSIÓN.....	159
5.4.1 Origen de los embriones múltiples producidos en las semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x y su implicación en los programas de mejora genética.....	159
5.4.2 Origen de los diferentes embriones producidos por el cultivo de nucelas <i>in vitro</i> aisladas de semillas obtenidas en hibridaciones 2x X 2x y su implicación en el saneamiento de genotipos no apomícticos de cítricos.....	161
5.4.3 Biología reproductiva de los genotipos no apomícticos de cítricos....	162
5.5 CONCLUSIONES.....	163
<hr/>	
CAPÍTULO 6. IDENTIFICACIÓN VARIETAL DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES DE CÍTRICOS MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES.	179
<hr/>	
6.1 INTRODUCCIÓN.....	179
6.2 MATERIAL Y MÉTODOS.....	180
6.2.1 Material vegetal.....	180
6.2.2 Análisis genético.....	182
6.2.3 Determinación de la dosis alélica.....	183
6.2.4 Clasificación de los genotipos en función de sus disimilaridades genéticas.....	183
6.2.5 Determinación de la heterocigosidad parental, coeficiente de diversidad de Nei, potencia de diferenciación y restitución de la heterocigosidad materna.....	184
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	184
6.3.1 Estimación de la dosis alélica.....	184
6.3.2. Identificación varietal.....	185
6.3.3 Estructuración global.....	187
6.4 CONCLUSIONES.....	188
<hr/>	
CONCLUSIONES GENERALES.	201
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA.	205
<hr/>	

ÍNDICE DE TABLAS.

	Página
Tabla I.1. Híbridos triploides de mandarina obtenidos en el IVIA.....	27
Tabla 1.1. Análisis genético de los parentales y una planta haploide, doble haploide y aneuploide de clementina `Clemenules´ con marcadores microsátélites.....	52
Tabla 1.2. Nivel de ploidía de los callos embriogénicos y de los embriones somáticos obtenidos a partir de la polinización de clementina `Clemenules´ con polen irradiado de mandarina `Fortune´.....	53
Tabla 1.3. Caracterización morfológica de hojas de diferentes plantas haploides, doble haploide, diploide y aneuploide de clementina `Clemenules´.....	53
Tabla 1.4. Medidas de secciones histológicas de anteras de una planta haploide y diploide de clementina `Clemenules´.....	53
Tabla 1.5. Medidas de secciones histológicas de ovarios de una planta haploide y diploide de clementina `Clemenules´.....	54
Tabla 1.6. Medidas de secciones histológicas de estilos y estigmas de una planta haploide y diploide de clementina `Clemenules´.....	54
Tabla 2.1. Genotipos de cítricos utilizados para la obtención de plantas tetraploides.....	70
Tabla 2.2. Nivel de ploidía de la progenie de plantas diploides de diversos genotipos de cítricos.....	71
Tabla 2.3. Nivel de ploidía de las plántulas procedentes de semillas de plantas diploides de diferentes genotipos de cítricos que dieron lugar a alguna plántula tetraploide.....	72
Tabla 2.4. Análisis genético con marcadores microsátélites de los parentales utilizados.....	73
Tabla 3.1. Influencia de la concentración y tiempo de inmersión en colchicina sobre el desarrollo de los ápices posteriormente microinjertados y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	93
Tabla 3.2. Efecto de la aplicación directa de una solución de colchicina sobre el desarrollo de ápices previamente microinjertados y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	93
Tabla 3.3. Efecto de la aplicación directa de una solución de colchicina y orizalina sobre el desarrollo de ápices previamente microinjertados y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	93
Tabla 3.4. Análisis genético con marcadores microsátélites de genotipos diploides y tetraploides de clementina y mandarina `Moncada´.....	94
Tabla 3.5. Caracterización morfológica de hojas de genotipos diploides y tetraploides de clementina `Clemenules´.....	94
Tabla 3.6. Caracterización morfológica de espinas de genotipos diploides y tetraploides de clementina `Clemenules´.....	95
Tabla 3.7. Germinación <i>in vitro</i> de granos de polen de genotipos diploides y tetraploides de clementina `Clemenules´.....	95
Tabla 4.1. Tipos y medidas de las semillas obtenidas en la hibridación entre clementina `Clemenules´ por zamboa `Pink´. Número y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	134
Tabla 4.2. Tipos y medidas de las semillas obtenidas en la hibridación entre clementina `Fina´ por mandarina `Común´ tetraploide. Número y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	134
Tabla 4.3. Tipos y medidas de las semillas obtenidas en la hibridación entre clementina `Clemenules´ tetraploide por mandarina `Moncada´. Número y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	134
Tabla 4.4. Datos de cuajado, número de semillas pequeñas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i> , plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x.....	135

Tabla 4.5. Medias de los datos de cuajado, número de semillas pequeñas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i> , plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x en función de los parentales femeninos y masculinos.....	135
Tabla 4.6. Datos de cuajado, número de semillas parcialmente desarrolladas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i> y plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x.....	136
Tabla 4.7. Medias de los datos de cuajado, número de semillas parcialmente desarrolladas y rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i> obtenidos en las hibridaciones 2x X 4x en función de los parentales femeninos y masculinos.....	137
Tabla 4.8. Número de semillas normales completamente desarrolladas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i> y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x.....	137
Tabla 4.9. Número de semillas normales completamente desarrolladas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i> , plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x en función de los parentales femeninos y masculinos.....	138
Tabla 4.10. Nivel de ploidía de las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas producidas en las hibridaciones 2x X 4x.....	138
Tabla 4.11. Medias de los datos del número de plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x a partir de semillas parcialmente desarrolladas en función de los parentales femeninos y masculinos.....	139
Tabla 4.12. Datos de cuajado, número de semillas pequeñas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i> , plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 4x X 2x.....	139
Tabla 4.13. Datos de cuajado, número de semillas parcialmente desarrolladas, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i> , plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 4x X 2x.....	140
Tabla 4.14. Número de semillas normales, rescate y cultivo de embriones <i>in vitro</i> , plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 4x X 2x.....	140
Tabla 4.15. Comparación en la eficiencia de obtención de híbridos triploides entre los diferentes tipos de hibridación 2x X 2x, 2x X 4x y 4x X 2x utilizando como parental femenino la clementina 'Clemenules' diploide y tetraploide y como parental masculino el mandarino 'Común' diploide y tetraploide.....	141
Tabla 5.1. Cuajado, número y tipos de semillas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x.....	165
Tabla 5.2. Cultivo <i>in vitro</i> de los embriones producidos en las semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones entre parentales diploides y tetraploides.....	165
Tabla 5.3. Análisis genético de las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas en hibridaciones 2x X 4x entre las clementinas 'Clemenules', 'Fina' y 'Hernandina' con mandarino 'Nova' tetraploide.....	166
Tabla 5.4. Análisis genético de las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas en hibridaciones 2x X 4x entre las clementinas 'Clemenules' y 'Fina' con tangelo 'Orlando' tetraploide.....	166
Tabla 5.5. Análisis genético de las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas en hibridaciones 2x X 4x entre las clementinas 'Bruno' y 'Tomatera' con naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide.....	167
Tabla 5.6. Cuajado y número de semillas obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x....	167
Tabla 5.7. Número de nucelas evolucionadas en cultivo <i>in vitro</i> y número de embriones y plantas obtenidas.....	167
Tabla 5.8. Número de embriones contenidos en las semillas obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x.....	168

Tabla 5.9. Cultivo <i>in vitro</i> de los embriones aislados de las semillas originadas en las polinizaciones entre parentales diploides.....	168
Tabla 5.10. Nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas <i>in vitro</i>	168
Tabla 5.11. Nivel de ploidía de las plantas obtenidas a partir de la germinación de los embriones aislados de las semillas cultivadas <i>in vitro</i> obtenidas en hibridaciones $2x \times 2x$	168
Tabla 5.12. Análisis genético de las plantas diploides regeneradas a partir del cultivo de nucelas <i>in vitro</i> obtenidas en la hibridación entre clementina `Clemenules´ por <i>P. trifoliata</i> `Benecke´.....	169
Tabla 5.13. Análisis genético de las plantas diploides regeneradas a partir del cultivo de nucelas <i>in vitro</i> obtenidas en la hibridación entre mandarina `Fortune´ por <i>P. trifoliata</i> `Benecke´.....	170
Tabla 5.14. Análisis genético de las plantas triploides regeneradas a partir del cultivo de nucelas <i>in vitro</i> obtenidas en las hibridaciones entre clementina `Clemenules´ y mandarina `Fortune´ con <i>P. trifoliata</i> `Benecke´.....	171
Tabla 6.1. Diferencias teóricas en la capacidad de discriminación máxima suponiendo 10 <i>loci</i> microsatélites independientes considerando y sin considerar la dosis alélica.....	189
Tabla 6.2. Proporciones de las áreas y alturas de los picos correspondientes a los alelos específicos del <i>locus</i> microsatélite Ci02D09 correspondientes a dos reacciones independientes de PCR y resolución de fragmentos en el Analizador Genético Automático CEQTM 800 de Beckam Coulter.....	189
Tabla 6.3.a. Análisis genético de los parentales e híbridos triploides seleccionados con marcadores microsatélites.....	190
Tabla 6.3.b. Análisis genético de los parentales e híbridos triploides seleccionados con marcadores microsatélites.....	191
Tabla 6.4. Heterocigosidad de los parentales, diversidad de Nei, potencia de diferenciación considerando la dosis alélica y porcentaje de restitución de la heterocigosidad maternal en los híbridos triploides de mandarina `Fortune´ analizados.....	192

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura I.1. Origen de las especies del género <i>Citrus</i> y géneros afines.....	6
Figura I.2. a. Flor de clementina `Clemenules`. b. Pistilo de naranjo dulce `Washington Navel`. c. Óvulo de clementina `Clemenules`. d. Semilla poliembriónica de naranjo dulce `Pineapple`. e. Semilla monoembriónica de zamboa `Pink`. f. Plántulas obtenidas a partir de una semilla poliembriónica. g. Fruto de clementina `Clemenules`. h. Plántula obtenida a partir de una semilla monoembriónica.....	8
Figura 1.1. a. Semillas pequeñas obtenidas en los frutos de clementina `Clemenules` originados a partir de la polinización de flores con polen irradiado de mandarino `Fortune`. b. Tipo de embrión contenido en las semillas. c. Callos embriogénicos originados a partir del cultivo de embriones <i>in vitro</i> . d. Proliferación de embriones obtenidos a partir de callo embriogénico. e. Brotes producidos por los embriones regenerados a partir de callo embriogénico. f. Plántula obtenida a partir de la germinación directa del embrión. g. Microinjerto <i>in vitro</i> de los brotes producidos por los embriones. h. Detalle del microinjerto de un brote haploide.....	55
Figura 1.2. Histograma correspondiente al genotipo haploide 5.1.2 (pico 1) y a una planta triploide control (pico 2).....	56
Figura 1.3. Histograma correspondiente al genotipo doble haploide 5.2.1 regenerado a partir del callo haploide 5.2.1 (pico 1) y a una planta triploide control (pico 2).....	56
Figura 1.4. Histograma correspondiente a una planta control diploide (pico 1), genotipo aneuploide 2.4.1.1 regenerado a partir del callo aneuploide 2.4 (pico 2) y una planta control triploide (pico 3).....	57
Figura 1.5. Posición en el mapa genético de clementina descrito por Luro <i>et al.</i> (2007) de los <i>loci</i> microsatélites utilizados en el análisis genético. En color rojo se indican los <i>loci</i> microsatélites heterocigóticos para la clementina `Clemenules` y para la planta aneuploide 2.4.1.1, y en azul se indican los <i>loci</i> microsatélites heterocigóticos para clementina `Clemenules` y homocigotos para la planta aneuploide 2.4.1.1.....	57
Figura 1.6. Análisis genético realizado con el <i>locus</i> microsatélite Ci03C08. (1) Clementina `Clemenules`. (2) Mandarino `Fortune`. (3) Haploide 1.1. (4 al 11) Haploides obtenidos del callo embriogénico 2.3. (12) Haploide 5.1.2. (13) Haploide 7.3.2. (14) Haploide 7.3.5. (15) Haploide 1.9.2. (16) Doble haploide 5.2.1. (17 al 19). Aneuploides obtenidos a partir del callo embriogénico 2.4.....	58
Figura 1.7. Análisis genético realizado con el <i>locus</i> microsatélite TAA 15 en los genotipos: (1) Clementina `Clemenules`. (2) Mandarino `Fortune`. (3) Haploide 5.1.2. (4) Doble haploide 5.2.1. (5) Aneuploide 2.4.1.1.....	58
Figura 1.8. a. Metafase planta haploide 5.1.2. b. Metafase planta doble haploide 5.2.1. c. Metafase planta aneuploide 2.4.1.1.....	58
Figura 1.9. Secciones transversales de antera haploide (a) y diploide (b) de clementina `Clemenules`. SP sacos polínicos, T tapetum, TC tejido conectivo, GP granos de polen, EN endotecio, EX exotecio.....	59
Figura 1.10. Secciones transversales de ovario haploide (a) y diploide (b) de clementina `Clemenules`. E epidermis, S septa, CE canal estilar, EC eje central, HVD haces vasculares dorsales, HVM haces vasculares marginales, HVS haces vasculares de las septas, PVZ primordios vesículas de zumo, O óvulo, EX tegumento exterior, I tegumento interior, N nucela.....	59
Figura 1.11. Secciones transversales de estilo haploide (a) y diploide (b) de `Clementina de Nules`. E epidermis, C cortex, CE canal estilar, HV haz vascular.....	59

Figura 1.12. Secciones transversales de estigma haploide (a) y diploide (b) de clementina `Clemenules`. ZET zona estigmática, P papilas, ZED zona estigmatoide, CE canales estilares, CSE canales secreción estigmática.	60
Figura 1.13. a. Genotipo doble haploide 5.2.1 de clementina `Clemenules`. b. Genotipo haploide 5.1.2 de clementina `Clemenules`. c. Detalle floración planta haploide. d. Flor haploide y diploide de clementina `Clemenules`. e. Genotipo aneuploide 2.4.1.1 de clementina `Clemenules`.....	60
Figura 2.1. Histograma de una planta diploide control (pico 1) y de una plántula tetraploide de mandarino `Kinnow` (pico 2).....	74
Figura 2.2. Histograma de una planta diploide control (pico 1) y de una plántula triploide de mandarino `Tardivo di Ciaculli` (pico 2).....	74
Figura 2.3. Cromosomas correspondientes a una planta tetraploide ($2n = 4x = 36$) de tangor `Murcott`.....	75
Figura 2.4. Variabilidad alélica correspondiente a los <i>loci</i> microsatélite TAA 15 y Ci07D06 de los genotipos diploides utilizados como fuente de semillas: 1 `Afourer`, 2 `Murcott`, 3 `Ortanique`, 4 `Kara`, 5 `T. Ciaculli`, 6 `Anana`, 7 `Kinnow`, 8 `Fairchild`, 9 `Sunburst`, 10 `Mapo`, 11 `Minneola`, 12 `Sanguinelli`, 13 `Duncan`, 14 `Star Ruby`.....	75
Figura 3.1. a. Incisión en el patrón en forma de ventana sobre la que se depositó el ápice. b. Gota de una solución de colchicina sobre la incisión del patrón donde se situó el ápice.....	95
Figura 3.2. Histograma de una planta control diploide y de una plántula diploide de clementina `Clemenules` obtenida tras el tratamiento de ápices con colchicina. El único pico indica que ambos materiales tienen el mismo nivel de ploidía.....	96
Figura 3.3. Histograma de una planta mixoploide ($2x - 4x$) mostrando células diploides (pico 1) y células tetraploides (pico 2) en la misma muestra sin control diploide.....	96
Figura 3.4. Histograma de una planta tetraploide de clementina `Fina` (pico 1) sin control diploide.....	97
Figura 3.5. Histograma de una planta diploide control (pico 1) y de una plántula tetraploide de clementina `Fina` (pico 2).....	97
Figura 3.6. a. Necrosamiento de los ápices. b. Abultamiento del patrón en la zona de injerto. c. Aspecto ápice desarrollado y no tratado con colchicina (control). d. Ápice tratado con colchicina de aspecto basto con hojas muy abultadas y recurvadas.....	98
Figura 3.7. Esquema de segregación de clementina `Fina` a partir de una citoquimera $2x - 4x$	99
Figura 3.8. Esquema de segregación de clementina `Fina` a partir de una quimera sectorial $4x / 2x - 4x$	100
Figura 3.9. Esquema de segregación de clementina `Marisol` a partir de una quimera sectorial $2x / 2x - 4x$	101
Figura 3.10. Alelos correspondientes al <i>locus</i> microsatélite Ci02D09 presentes en las clementinas diploides y tetraploides obtenidas a partir de los tratamientos de ápices caulinares con colchicina y orizalina.....	102
Figura 3.11. Germinación de los granos de polen <i>in vitro</i> de los genotipos: a. Clementina `Clemenules` diploide. b. Genotipo 8.10 de clementina `Clemenules` tetraploide. c. Genotipo 8.5 clementina de clementina `Clemenules` tetraploide. d. Detalle germinación grano de polen genotipo 8.10.....	102
Figura 3.12. a. Antera $2x$, b. antera $4x$, c. ovario $2x$, d. ovario $4x$, e. estilo $2x$, f. estilo $4x$, g. estigma $2x$ y h. estigma $4x$. Se observa claramente el mayor tamaño de los órganos florales tetraploides respecto a los diploides.....	103

Figura 4.1. a. Tipos de semillas obtenidas en la hibridación entre clementina 'Clemenules' por zamboa 'Pink'. a.1) Semillas completamente desarrolladas normales, a.2) semillas parcialmente desarrolladas, a.3) semillas completamente desarrolladas pequeñas. b. Semillas obtenidas en la hibridación entre clementina 'Fina' por mandarino 'Común' tetraploide. b.1) Semillas completamente desarrolladas normales, b.2) semillas parcialmente desarrolladas. c. Semillas obtenidas en la hibridación entre clementina 'Clemenules' tetraploide por mandarino 'Moncada'. c.1) Semilla completamente desarrollada normal, c.2) semillas parcialmente desarrolladas y c.3) semillas completamente desarrolladas de pequeño tamaño.....	142
Figura 4.2. a. Histograma correspondiente a una planta diploide junto con un control diploide (pico1). b. Histograma correspondiente a una planta control diploide (pico 1) y a una planta triploide (pico 2). c. Histograma correspondiente a una planta control diploide (pico 1) y a una planta tetraploide (pico 2). d. Histograma correspondiente a una planta control diploide (pico 1) y a una planta pentaploide (pico 2).....	142
Figura 4.3. a. Semilla pequeña completamente desarrolladas de mandarino 'Fortune' con un embrión. b. Detalle germinación embrión rescatado de una semilla pequeña de mandarino 'Fortune' y cultivado en placa de Petri. c. Embriones germinados de mandarino 'Fortune' cultivados en placa de Petri.....	143
Figura 4.4. a. Planta triploide obtenida a partir de semillas pequeñas producidas en hibridaciones 2x X 2x. b. Planta triploide obtenida a partir de una semilla parcialmente desarrollada originada en una hibridación 2x X 4x. c. Planta triploide obtenida a partir de una semilla normal producida en una hibridación 2x X 4x. d. Planta triploide obtenida a partir de una semilla pequeña originada en una hibridación 4x X 2x.....	143
Figura 4.5. a – b. Semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x en las que se puede observar la presencia de varios embriones de tamaño variable englobados por los restos de la nucela. c. Semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en hibridaciones 2x X 4x en las que se observa macroscópicamente un embrión. d. Germinación de los numerosos embriones contenidos en las semillas parcialmente desarrolladas poliembriónicas. e – f. Embriones germinados contenidos en semillas parcialmente desarrolladas monoembriónicas. g – h. Semillas normales obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x en las cuales se observa un único embrión por semilla.....	143
Figura 4.6. Histograma correspondiente a una planta control diploide (pico 1) y a una planta hexaploide (pico 2).....	144
Figura 4.7. a. Izquierda, semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en hibridaciones 4x X 2x. Derecha, semillas pequeñas completamente desarrolladas obtenidas en hibridaciones 4x X 2x. b - c. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones en placa de Petri aislados de semillas pequeñas obtenidas en hibridaciones 4x X 2x en los que se observa la germinación de los embriones.....	145
Figura 4.8. Restitución de la heterocigosidad del parental productor de gametos 2x (Ollitrault <i>et al.</i> 2008).....	146
Figura 5.1. a. Estado de desarrollo de la semilla utilizada para el cultivo de nucelas <i>in vitro</i> extraída de frutos recolectados a los 100 días de haber realizado la polinización. b. Semilla a la que se le han eliminado parcialmente los tegumentos observándose la nucela con el embrión zigótico en su interior. c. Nucela a la que se le han eliminado totalmente los tegumentos y en la que se puede observar la incisión realizada para extraer el embrión zigótico. d. Embrión zigótico extraído de la nucela.....	172

Figura 5.2. a. Semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x. b – c. Múltiples embriones contenidos en el interior de las semillas parcialmente desarrolladas. d – e. Múltiples embriones germinados a partir de una semilla parcialmente desarrollada.....	172
Figura 5.3. Análisis genético con el <i>locus</i> microsatélite Ci02B07 y el ADN genómico de los genotipos: 1 clementina ‘Clemenules’, 2 clementina ‘Fina’, 3 tangelo ‘Orlando’ tetraploide, 4, 5 y 6 híbridos triploides obtenidos en una semilla parcialmente desarrollada de la hibridación entre clementina ‘Fina’ por tangelo ‘Orlando’ tetraploide, 6, 7, 8 y 9 híbridos triploides obtenidos en una semilla parcialmente desarrollada de la hibridación entre clementina ‘Fina’ por tangelo ‘Orlando’ tetraploide, 11, 12, 13 y 14 híbridos triploides obtenidos en una semilla parcialmente desarrollada de la hibridación entre clementina ‘Clemenules’ por tangelo ‘Orlando’ tetraploide, 15 y 16 híbridos triploides obtenidos en una semilla parcialmente desarrollada de la hibridación entre clementina ‘Clemenules’ por tangelo ‘Orlando’ tetraploide, C control negativo PCR.....	173
Figura 5.4. a – e. Nucelas cultivadas <i>in vitro</i> en las cuales se observa la producción de embriones en la región micropilar de la misma. f – i. Nucelas cultivadas <i>in vitro</i> en las cuales se observa la producción de callo embriogénico en la región micropilar de la misma. j. Germinación de los embriones obtenidos a partir del cultivo de nucelas <i>in vitro</i> . k. Callo embriogénico obtenido a partir del cultivo de nucelas <i>in vitro</i> . l. Híbridos de clementina ‘Clemenules’ por <i>P. trifoliata</i> ‘Benecke’ regenerados en los cuales se puede observar las hojas trifoliadas características de <i>Poncirus</i>	173
Figura 5.5. Análisis genético de las plantas diploides regeneradas a partir del cultivo de nucelas <i>in vitro</i> y de la germinación del embrión zigótico contenido en el interior de la semilla obtenidas en la hibridación entre clementina ‘Clemenules’ por <i>P. trifoliata</i> ‘Benecke’. Cada número corresponde a un grupo de plantas. Z. Planta obtenida a partir del embrión zigótico. Las carreras no señaladas corresponden a las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas <i>in vitro</i> . Cl. Clementina ‘Clemenules’. P. <i>P. trifoliata</i> ‘Benecke’.....	174
Figura 5.6. Análisis genético de las plantas triploides regeneradas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de nucelas y de la germinación del embrión zigótico aislado del interior de la misma obtenidas en las hibridaciones entre clementina ‘Clemenules’ y mandarina ‘Fortune’ por <i>P. trifoliata</i> ‘Benecke’. Cada número corresponde a un grupo de plantas. El grupo 1 corresponde a la hibridación entre Clementina ‘Clemenules’ por <i>P. trifoliata</i> ‘Benecke’ y los grupos 2, 3 y 4 a la hibridación entre mandarina ‘Fortune’ por <i>P. trifoliata</i> ‘Benecke’. Z. Planta obtenida a partir del embrión zigótico. Las carreras no señaladas corresponden a las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas <i>in vitro</i> . Cl. Clementina ‘Clemenules’. F. Mandarina ‘Fortune’. P. <i>P. trifoliata</i> ‘Benecke’.....	174
Figura 5.7. Corte histológico de una semilla obtenida en una polinización entre clementina ‘Clemenules’ por <i>P. trifoliata</i> ‘Benecke’ fijada al cabo de 80 días de haber realizado la polinización. Te. tegumento exterior, Ti. tegumento interior, n. nucela, Ed. embrión dominante y Es. embriones secundarios.....	175
Figura 6.1. Electroferogramas correspondientes al análisis genético realizado con el <i>locus</i> microsatélite Ci03G05 en mandarina ‘Fortune’ (a), tangor ‘Ellendale’ (b) y el híbrido triploide ForEII 96-060 (c).....	193
Figura 6.2. Dendograma correspondiente al análisis genético realizado con el <i>locus</i> microsatélite Mest 123 sin considerar la dosis alélica obtenido mediante el cálculo del coeficiente de similitud de Dice y construcción del árbol mediante el método Weighted Neighbor – Joining.....	194

Figura 6.3. Dendograma correspondiente al análisis genético realizado con el <i>locus</i> microsatélite Mest 123 considerando la dosis alélica obtenido mediante el cálculo de la distancia euclídea y construcción del árbol mediante el método Weighted Neighbor – Joining.....	194
Figura 6.4. Dendograma correspondiente al análisis genético realizado con los <i>loci</i> microsatélites Ci08C05, Ci06B07 y Ci07F11 sin considerar la dosis alélica obtenido mediante el cálculo del coeficiente de disimilitud de Dice y construcción del árbol mediante Weighted Neighbor – Joining....	195
Figura 6.5. Dendograma correspondiente al análisis genético realizado con los <i>loci</i> microsatélite Ci08C05, Ci06B07 y Ci07F11 considerando la dosis alélica obtenido mediante el cálculo de la distancia euclídea y construcción del árbol mediante Weighted Neighbor – Joining.....	195
Figura 6.6. Dendograma correspondiente al análisis genético realizado con marcadores microsatélites sin considerar la dosis alélica obtenido mediante el cálculo de la distancia euclídea y construcción del árbol mediante el método Weighted Neighbor – Joining.....	196
Figura 6.7. Dendograma correspondiente al análisis genético realizado con marcadores microsatélites considerando la dosis alélica obtenido mediante el cálculo de la distancia euclídea y construcción del árbol mediante el método Weighted Neighbor – Joining.....	196
Figura 6.8. Dendograma correspondiente al análisis genético realizado con todos los <i>loci</i> microsatélites analizados considerando la dosis alélica obtenido mediante el cálculo de la distancia euclídea y construcción del árbol mediante el método Weighted Neighbor – Joining. a. Híbridos triploides obtenidos a partir de la hibridación entre mandarino `Fortune` y tangor `Murcott`. b. Híbridos triploides obtenidos a partir de la hibridación entre mandarino `Fortune` y tangor `Ellendale`. c. Híbridos triploides obtenidos a partir de la hibridación entre mandarino `Fortune` y mandarino `Kara`.	197

Introducción

INTRODUCCIÓN.

1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE LOS CÍTRICOS.

Los cítricos y géneros afines pertenecen al orden *Geraniales*, suborden *Geraninas* y familia *Rutaceas*. Las especies pertenecientes a esta familia tienen cuatro características importantes: 1) presencia de glándulas de aceites esenciales, 2) ovario apoyado sobre un disco nectarífero situado entre los carpelos y los estambres, 3) presencia de punteaduras transparentes en las hojas y 4) frutos con placentación axial (Swingle y Reece, 1967). La familia de las *Rutaceas* comprende seis subfamilias, siendo la subfamilia de las *Aurantioideas* la que contiene a los cítricos y géneros afines.

La clasificación botánica propuesta por Swingle y Reece (1967) divide la subfamilia de las *Aurantioideas* en dos tribus, *Clauseneae* y *Citreae*. La tribu *Citreae*, a su vez, se subdivide en tres subtribus, *Triphasiinae*, *Balsamocitrinae* y *Citrinae*. La subtribu *Citrinae* se vuelve a dividir en tres grupos subtribales: cítricos primitivos, árboles cercanos a los cítricos y cítricos verdaderos. Este último grupo subtribal incluye seis géneros, *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Clymenia* y *Citrus*.

El género *Fortunella* está formado por árboles y arbustos de pequeño tamaño que florecen más tarde que las especies de *Citrus* lo que les hace moderadamente resistentes a las bajas temperaturas debido a su dormancia invernal. Sus frutos son de tamaño reducido con la corteza dulce y comestible. Está constituido por cuatro especies: *Fortunella margarita* (Lour.) Swing., *F. japonica* (Thunb.) Swing., *F. polyandra* (Ridl.) Tan. y *F. hindsii* (Champ.) Swing. Todas las especies son diploides, aunque existen genotipos de *F. hindsii* diploides y tetraploides (Juárez y Navarro, datos no publicados). En China, los kumquats (nombre genérico con el cual se hace referencia a todas las especies del género *Fortunella*) han sido cultivados y sus frutos comidos desde tiempos ancestrales. Hibridan fácilmente con *Citrus* y algunos géneros afines y han sido utilizados en programas de mejora destinados a la obtención de cítricos resistentes a bajas temperaturas. *Fortunella* spp. son resistentes a cancrrosis y *Phytophthora*. Son plantas muy atractivas por lo que pueden ser cultivadas como ornato en patios y jardines (Krueger y Navarro, 2007).

Poncirus es un género constituido por una sola especie, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Es utilizado como patrón de forma casi exclusiva en Japón, Uruguay, Argentina y varias provincias de China. Sus híbridos con naranjo dulce, los citrangeres 'Carrizo' y 'Troyer' (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), tolerantes a CTV (*Citrus Tristeza Virus*), son los principales patrones utilizados en España. El citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) es otro patrón utilizado en algunas zonas de cultivo españolas. Es una especie ampliamente utilizada en programas de mejora genética ya que es resistente al nematodo de los cítricos (*Tylenchulus semipenetrans*), resistente a *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora citrophthora*, resistente a CTV y tolerante a las bajas temperaturas.

Eremocitrus, género monoespecífico (*Eremocitrus glauca* (Lindl.) Swing), es compatible sexualmente con *Citrus* y otros géneros afines. *E. glauca* es una especie xerofítica, por lo que es tolerante a la sequía, a las altas temperaturas y a elevadas concentraciones salinas. Además es

tolerante al boro, a la pudrición de la raíz por *Phytophthora* y puede ser injertado sobre *Citrus* como patrón (Krueger y Navarro, 2007).

El género *Microcitrus* está constituido por seis especies sin valor comercial destacado: *Microcitrus australasica* (F. Muell.) Swing., *M. australis* (Planch.) Swing., *M. garrowayi* (F.M. Bail.) Swing., *M. inodora* (F.M. Bail.) Swing., *M. maideniana* (Domin) Swing. y *M. warburgiana* (F.M. Bail.) Tan. El prefijo 'micro' alude al reducido tamaño de las hojas, flores y frutos en comparación con las especies de *Citrus*. Género descrito como resistente a nematodos y *Phytophthora* y tolerante a la sequía. El género *Microcitrus* hibrida fácilmente con *Citrus*, *Fortunella* y otros géneros afines (Krueger y Navarro, 2007). Faustrimedín (*M. australasica* x (*Fortunella* spp. x *Citrus* spp.)) es un híbrido trigenérico descrito por Swingle (1946).

Clymenia es el género más primitivo del grupo subtribal cítricos verdaderos y el que muestra mayores diferencias morfológicas respecto a *Citrus*, sobre todo en el tipo de hojas y vesículas de zumo. Género constituido por una especie, *Clymenia polyandra* (Tan.) Swing. compatible, sexualmente y por injerto, con *Citrus*.

La clasificación botánica de *Citrus* muestra grandes diferencias según autores. Swingle (1946) dividió el género *Citrus* en dos subgéneros, *Papeda* y *Eucitrus*, que presentan notables diferencias anatómicas, pero principalmente se distinguen en la comestibilidad de sus frutos. Los del subgénero *Papeda* contienen agregados de aceites esenciales, que proporciona al jugo un sabor acre y amargo muy desagradable que los hace incomedibles, mientras que los del subgénero *Eucitrus* contienen en las vesículas de la pulpa un jugo más o menos agradable, exento de aceites esenciales y de sabor ligeramente amargo, dulce o ácido. El subgénero *Papeda* comprende seis especies: *C. ichangensis* Swing. (papeda de Ichang), *C. latipes* (Swing.) Tan. (papeda de Kashi), *C. hystrix* D.C. (papeda de Mauricio), *C. micrantha* Wester (papeda de flor pequeña), *C. celebica* Koord. (papeda de Célebes) y *C. macroptera* Montr. (papeda de Melanesia).

En el subgénero *Eucitrus*, que engloba diez especies, se encuentran las ocho más importantes desde el punto de vista comercial: *C. medica* L., (cidros), *C. aurantium* L. (naranjos amargos), *C. limon* (L.) Burn. f. (limoneros), *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. (limeros), *C. grandis* (L.) Osb. (zamboá, denominado en la literatura inglesa como pummelo o shaddock), *C. sinensis* (L.) Osb. (naranjos dulces), *C. reticulata* Blanco (mandarinos) y *C. paradisi* Macf. (pomelos). Las otras dos especies, *C. indica* Tan. y *C. tachibana* (Mak.) Tan., tienen poco interés comercial.

Tanaka (1977) divide el género *Citrus* en dos subgéneros, *Archicitrus* y *Metacitrus*, ocho secciones, quince subsecciones y ciento sesenta y dos especies. No obstante, comparando las especies consideradas por Tanaka con las ocho más importantes comercialmente citadas por Swingle, las principales diferencias se encuentran en las limas y los mandarinos. Tanaka subdivide las limas y reconoce tres especies: además de *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. a la que nombra como lima Mexicana, Galago, Key o West Indian, considera también *C. latifolia* Tan. (lima Bearss, Tahití o Persa) y *C. limettioides* Tan. (lima Dulce de Palestina). Respecto a los mandarinos las discrepancias son mayores ya que establece varias especies. Swingle agrupa a todos los mandarinos como *C. reticulata* Blanco, mientras que Tanaka como *C. reticulata* Blanco incluye únicamente el mandarino 'Ponkan'. Además añade *C. deliciosa* Ten. (mandarinos comunes), *C. unshiu* Marc. (satsumas), *C.*

clementina Hort. ex Tan. (clementinas), *C. tangerina* Hort. ex Tan. (mandarino Dancy), *C. nobilis* Lour. (mandarino King) y otras de menor importancia (Swingle y Reece, 1967).

Ninguno de estos dos sistemas de clasificación están bien adaptados a la realidad, pero el sistema de Tanaka es el que mejor se adapta a las características agronómicas de los distintos grupos (Krueger y Navarro, 2007) y es el que generalmente se utiliza en los principales bancos de germoplasma de cítricos.

Trabajos de investigación realizados más recientemente usando tanto métodos clásicos (Scora, 1975, 1988; Barret y Rhodes, 1976; Mabberley, 1997) como moleculares (Asins *et al.* 1996; Federici *et al.* 1998; Herrero *et al.* 1995; Nicolosi *et al.* 2000; Gulsen y Roose, 2001; Moore, 2001) sugieren que las diversas clases de cítricos que hoy conocemos fueron originadas a partir de únicamente tres taxones principales: los cidros, las zamboas y los mandarinos, mientras que el resto de especies fueron originadas a partir de estos tres taxones principales favorecidas por hibridaciones ocasionales.

Los cidros son especies con semillas monoembriónicas que contienen un embrión sexual. El cidro fue el primer cítrico que se conoció en Europa y actualmente no tiene importancia en nuestro país, aunque existen plantaciones comerciales en el sur de Italia, Grecia y Córcega para consumo en confitería.

Las zamboas son cítricos con frutos de gran tamaño, con la corteza gruesa y de color amarillo. Su corteza se puede consumir confitada y la pulpa en fresco. Las semillas son monoembriónicas y son un reservorio de diversidad genética (Krueger y Navarro, 2007).

Los mandarinos constituyen un grupo muy variable que contiene desde variedades con frutos de excelente calidad hasta variedades con frutos incomedibles. Hay diferentes subgrupos de mandarino como las satsumas, las clementinas y los híbridos. Existen muchos híbridos de mandarino obtenidos de forma natural y por la acción del hombre, entre los que destacan los tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi*) y los tangors (*C. reticulata* x *C. sinensis*) (Swingle y Reece, 1967). En los mandarinos podemos encontrar especies con semillas monoembriónicas y otras con semillas poliembriónicas.

Los pomelos probablemente se originaron a partir de una hibridación entre una zamboa y un naranjo dulce (Scora *et al.* 1982). El pomelo tiene menor aceptación que las naranjas y mandarinas para el consumo en fresco, pero sin embargo su zumo es muy apreciado en muchas dietas.

El naranjo amargo probablemente es un híbrido entre mandarino y zamboa (Scora, 1975; Berhow *et al.* 2000; Gulsen y Roose, 2001; Moore, 2001). En España fue utilizado como portainjertos hasta finales de la década de los 50 cuando apareció el virus de la tristeza (CTV). Actualmente sigue teniendo interés su cultivo ya que de sus frutos se obtienen dulces, mermeladas y licores. Además también es utilizado como árbol ornamental en calles y avenidas.

Los limones probablemente se originaron como consecuencia de hibridaciones entre el naranjo amargo, como parental femenino, y el cidro como parental masculino (Nicolosi *et al.* 2000; Gulsen y Roose, 2001). El fruto no se consume directamente pero tiene importantes aplicaciones en la condimentación de alimentos, confección de bebidas, elaboración de dulces, obtención de aceites esenciales y pectinas.

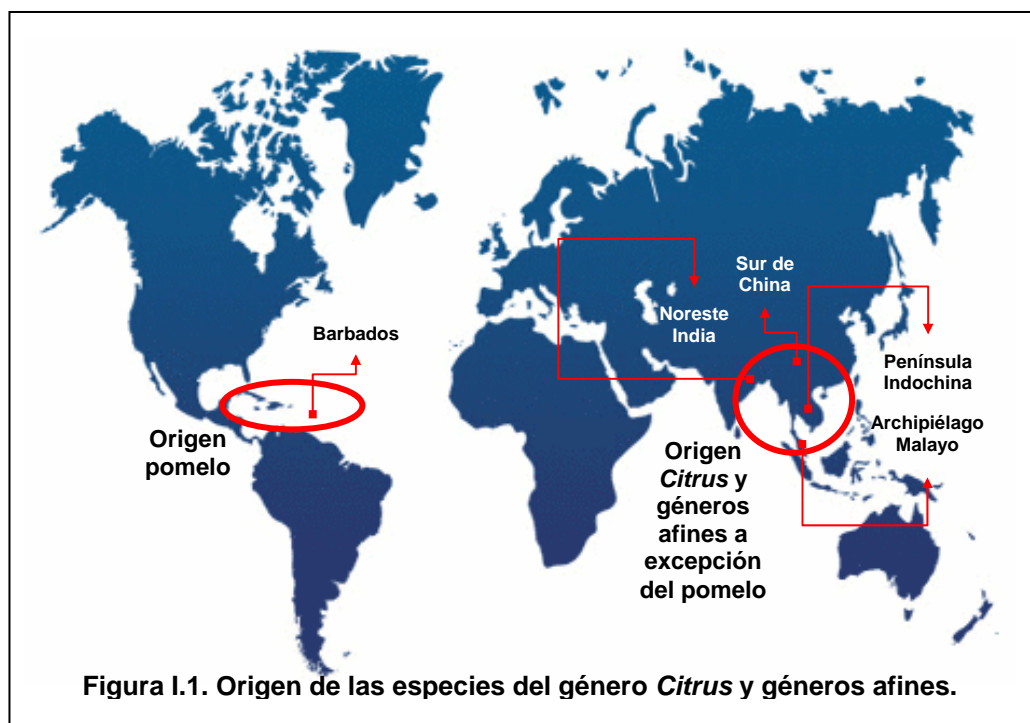
El naranjo dulce constituye la especie de cítrico más ampliamente distribuida y cultivada a nivel mundial. Las naranjas se consumen en fresco e industrializadas en forma de zumos. Las variedades de naranjo dulce son clasificadas en cuatro subgrupos: Navel, Blancas, Sanguinas y Naranjas sin acidez. Probablemente, el origen del naranjo dulce sea un híbrido entre diferentes especies de mandarino y zamboa (Barret y Rhodes, 1976; Berhow *et al.* 2000; Nicolosi *et al.* 2000).

Hay dos hipótesis sobre el origen de los limeros, la primera sostiene que es consecuencia de hibridaciones entre cidros y algunas especies de *Microcitrus* (Barret y Rhodes, 1976; Scora, 1988) y la segunda que se originaron a partir de un cruce entre cidro y *C. micrantha* (Nicolosi *et al.* 2000). En España tienen un interés muy escaso, ya que la climatología impide producir limas de calidad, aunque se cultiva con éxito en países como México.

2. ORIGEN DE LOS CÍTRICOS Y SU INTRODUCCIÓN EN ESPAÑA.

Todas las especies del género *Citrus* y géneros afines, a excepción del pomelo, aparentemente se originaron en las regiones tropicales y subtropicales del sureste de Asia (noreste de la India, sur de China y península Indochina) y del Archipiélago Malayo (figura I.1), a partir de las cuales se extendieron hacia otros continentes (Webber, 1967; Chapot, 1975).

El pomelo se originó en la isla de Barbados, situada al este del mar Caribe, espontáneamente en un semillero (Scora *et al.* 1982).



El cidro es el primer cítrico del que se tienen noticias en España, refiriéndose a él Isidoro de Sevilla en el siglo VII, aunque puede que fuera conocido con anterioridad dadas las relaciones que se mantenían con Italia, donde el cidro era conocido varios siglos antes. En cualquier caso, lo más

probable es que fueran introducidos a través de Italia y cultivados en algunas regiones del litoral mediterráneo español (Zaragoza, 2007).

Los comerciantes árabes instalados en la India llevaron, en el siglo X, el naranjo amargo hasta Omán, desde donde se difundió a Irak, Siria, Palestina y Egipto y más tarde, a través del norte de África, lo introdujeron en España, Sicilia y Cerdeña, hacia los siglos X y XI. No se sabe con certeza la época de la introducción del naranjo amargo en España (Zaragoza, 2007).

A partir de finales del siglo XI o principios del siglo XII destacados geóponos andalusíes, como al-Tignari, Abu l-Jayr, Ibn al-Awwan e Ibn Luyun, citan en sus tratados de agricultura la zamboa y lo diferencian claramente del cidro, del naranjo amargo y del limonero (Zaragoza, 2007).

El limonero se supone que llegó a España al mismo tiempo o poco después que el naranjo amargo. El geópono toledano Ibn Bassal (1048-1075) cita por primera vez al limonero, junto al cidro y el naranjo amargo, en su *Libro de Agricultura*. En la obra de Ibn al-Awwan, siglo XII, se contempla claramente que tanto el cidro, el naranjo amargo y el limonero ya eran cultivados en la región de Sevilla.

El poeta almeriense Ibn Luyûn (1282), citado por Zaragoza (2007), menciona al limero en su *Tratado de Agricultura*. También menciona el cidro, el naranjo, el limonero y la zamboa, lo que hace pensar que no fue identificado erróneamente y parece insinuar que el limero es algo diferente, ya que hasta entonces, probablemente no había sido identificado correctamente y en muchas ocasiones era confundido con el limón e incluso con el cidro y la zamboa.

El naranjo dulce se conoció en Europa unos cuatro siglos más tarde que el naranjo amargo (Zaragoza, 2007). Del naranjo dulce no hay citas anteriores al siglo XVI, aunque existen razones para creer que fue introducido a mediados del siglo XV por los genoveses a través de sus rutas comerciales con Oriente. No obstante, fueron los portugueses los que contribuyeron a su difusión en la península Ibérica, al importar de China semillas de variedades de naranja con frutos de sabor más agradable que los del naranjo amargo. De Portugal pasarían a España y posteriormente a Italia (Zaragoza, 2007).

Las primeras referencias del mandarino en España son del conde de Ripalda, junio de 1845, pero hasta once años más tarde y gracias al político y terrateniente Polo de Bernabé, no comenzó a difundirse su cultivo en la provincia de Castellón y sobre todo en Vila-real (Zaragoza, 2007).

La primera plantación comercial de pomelo de la que hay constancia se hizo en Carcaixent (Valencia) en el huerto de Santa Amelia, en 1929, de la variedad `Marsh´ (Herrero, 1929). Tres años antes, se importó de El Cabo (Sudáfrica) la variedad `Walter´, de Florida las variedades `Triumph´, `Duncan´ y `McCarty´ y de California la `Marsh´ seedless (Herrero, 1973), aunque sólo se difundió comercialmente esta última.

3. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LOS CÍTRICOS.

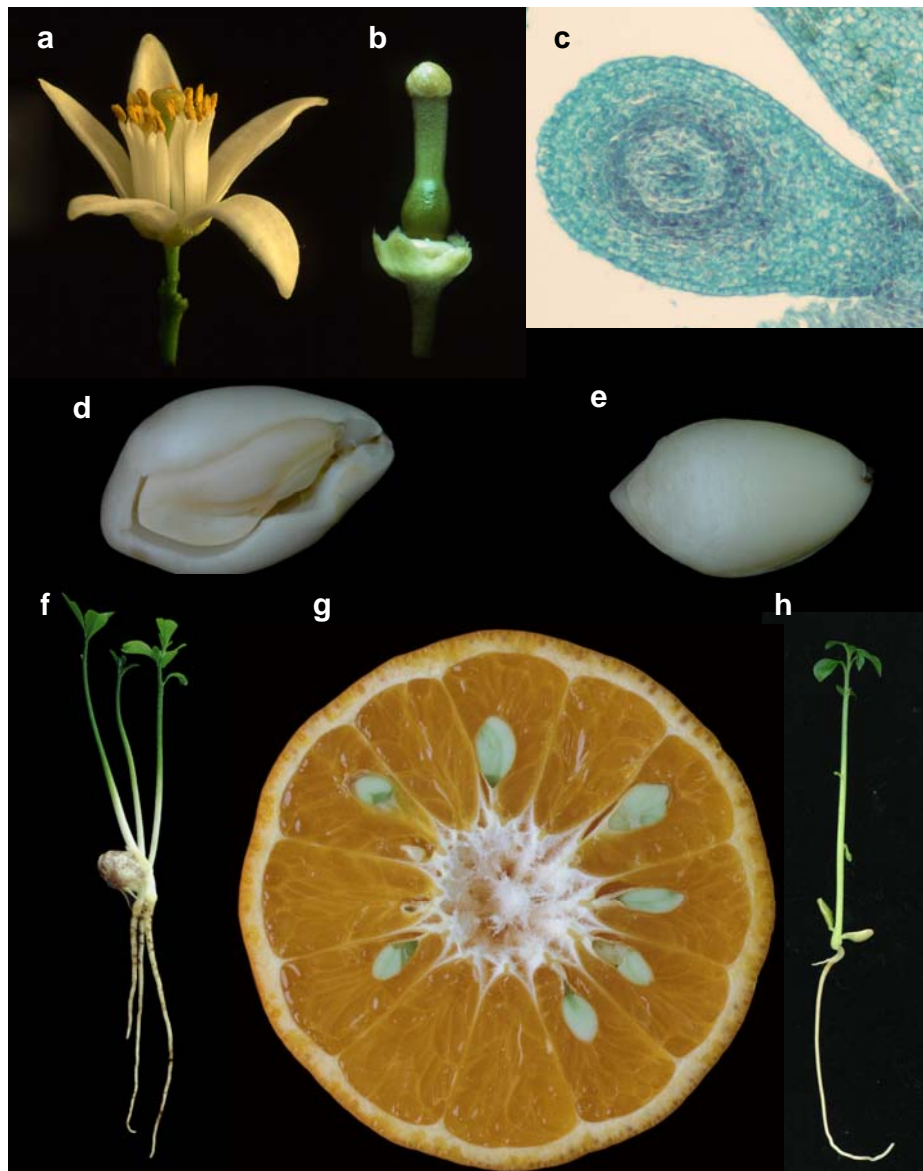


Figura 1.2. a. Flor de clementina `Clemenules´. b. Pistilo de naranjo dulce `Washington Navel´. c. Óvulo de clementina `Clemenules´. d. Semilla poliembriónica de naranjo dulce `Pineapple´. e. Semilla monoembriónica de zamboa `Pink´. f. Plántulas obtenidas a partir de una semilla poliembriónica. g. Fruto de clementina `Clemenules´. h. Plántula obtenida a partir de una semilla monoembriónica.

3.1 La flor.

Las flores de los cítricos son generalmente hermafroditas (figuras 1.2.a y 1.2.b). El cáliz está constituido por cinco sépalos dispuestos alrededor del receptáculo. La corola está formada por cinco pétalos que envuelven al androceo y el gineceo. El androceo está compuesto por 20 - 40 estambres, dependiendo de la especie, constituidos por un filamento con una antera con dos tecas y dos lóculos o sacos polínicos por teca. En el interior de estos lóculos se encuentra la célula madre productora de los granos de polen (microesporocito) y éstos quedan englobados por el tapete. El gineceo está

formado por el ovario, estilo y estigma. El ovario está constituido por un número variable de hojas carpelares o lóculos, según la especie, y está apoyado sobre el disco nectarífero. En su interior se encuentran los óvulos. El estilo es generalmente cilíndrico y en su interior hay tantos canales estilares como lóculos tiene el ovario. El estigma se localiza en el extremo del estilo y secreta una sustancia mucilaginosa que fija y favorece la germinación y crecimiento de los granos de polen.

3.2 El fruto.

El fruto es una baya modificada denominada hesperidio y se origina como consecuencia del crecimiento del ovario (figura 1.2.g). Está formado por un número variable de carpelos dispuestos alrededor del eje floral formando lo que posteriormente serán los gajos y en cuyo interior se encuentran las vesículas de zumo y las semillas. El pericarpo está formado por el exocarpo, el mesocarpo y el endocarpo. El exocarpo o flavedo es la parte más externa del fruto, el endocarpo es la parte más interna del pericarpo y el mesocarpo o albedo es de aspecto esponjoso y se encuentra entre el flavedo y el endocarpo.

3.3 Los óvulos.

La placentación de los óvulos es axilar, disponiéndose los óvulos en dos filas a lo largo de la hoja carpelar. Los óvulos maduros están constituidos por el micrópilo, el funículo, la nucela, el saco embrionario y dos tegumentos, interior y exterior, que envuelven a la nucela (figura 1.2.c). El micrópilo es un orificio de los tegumentos del óvulo por el que penetra el tubo polínico del grano de polen para realizar la fecundación.

El funículo es un filamento que une la placenta con la base de la nucela en un punto denominado chalaza. Actúa como una vía de transporte de elementos nutritivos necesarios para el desarrollo del óvulo.

La nucela es una masa de células rodeadas por el tegumento interior y que contienen el saco embrionario. La nucela actúa como tejido nutritivo del endospermo y conforme el óvulo se desarrolla, las células de la nucela se van absorbiendo y paulatinamente van desapareciendo con la expansión del endospermo (Schneider, 1968). En cítricos a partir de células de la nucela, mediante un proceso de embriogénesis adventicia, se originan embriones que comúnmente son denominados embriones nucelares. Esta circunstancia ocurre únicamente en los genotipos apomícticos que son los que producen semillas poliembriónicas (Kobayashi *et al.* 1981; Kepiro y Roose, 2007).

En *Citrus* y géneros afines el endospermo actúa transportando elementos nutritivos necesarios para el desarrollo de los embriones. Cuando el saco embrionario comienza a aumentar su tamaño, los núcleos de las células del endospermo comienzan a dividirse y estos núcleos libres se van distribuyendo y agrupando alrededor del saco embrionario (Frost y Soost, 1968). Bacchi, (1943) observó que el estado de núcleos libres permanece hasta 67 días después de la polinización. Posteriormente comienzan a formarse las paredes celulares y estas células comienzan a dividirse masivamente hasta formar el endospermo. En los genotipos diploides de cítricos el nivel de ploidía del

endospermo es triploide, originado como consecuencia de la fusión del núcleo generativo del grano de polen con los dos núcleos polares del saco embrionario (Banerji, 1954). Sin embargo, el nivel de ploidía del endospermo en híbridos triploides varía en función del tipo de hibridación por la cual se obtuvo dicho híbrido, obteniéndose embriones triploides con endospermos pentaploides en hibridaciones $2x \times 2x$, mientras que en hibridaciones $2x \times 4x$ se han obtenido embriones triploides con endospermos tetraploides (Esen y Soost, 1977; Wakana *et al.* 1981).

3.4 La semilla.

Las semillas se forman a partir de una serie de cambios en el crecimiento y desarrollo de los óvulos como consecuencia de la fecundación. Están compuestas por un tegumento exterior o testa y por un tegumento interior o tegmen. La testa es dura, de color blanco grisáceo, crema, de textura leñosa y recubierta por una gruesa capa mucilaginosa. El tegmen es un tegumento delgado, de color rojo a marrón, en cuyo extremo se encuentra la chalaza formada por células del tegmen más gruesas y de color más oscuro. El tegmen contiene restos del endospermo y de la nucela y envuelve al embrión (Frost y Soost, 1968).

El embrión maduro está constituido principalmente por dos cotiledones, de aspecto carnoso que son los encargados de aportar los nutrientes necesarios para la germinación, y por el eje embrionario con un hipocotilo muy corto que culmina con la radícula en la parte inferior y con la plúmula en la parte superior. En el interior de la semilla el embrión está dispuesto con la radícula hacia la zona del micropilo (Frost y Soost, 1968).

En los cítricos existen dos tipos de semillas, semillas monoembrionicas y semillas poliembrionicas (figuras I.2.d, I.2.e, I.2.f y I.2.h). Las semillas monoembrionicas son aquellas que contienen un único embrión de origen sexual, y las semillas poliembrionicas son las que contienen un embrión de origen sexual y uno o varios embriones nucelares. Las semillas que contienen un embrión generalmente tienen dos cotiledones de igual forma y tamaño, mientras que en las semillas que contienen varios embriones, la mayor parte de éstos están muy poco desarrollados y presentan cotiledones muy pequeños y de forma asimétrica (Frost y Soost, 1968). El número de embriones por semilla varía mucho en función del genotipo e incluso en un mismo árbol (Frost y Soost, 1968).

La forma y el tamaño de las semillas de los cítricos son muy variables. Podemos encontrar semillas de forma lenticular, esferoidal, cuniforme, ovoide, fusiforme y toda una gama de modificaciones de éstas. La forma y el tamaño de las semillas están influenciados, entre otros factores, por la especie, el número de semillas por fruto (Frost y Soost, 1968) y por el tipo de polinización que las ha originado ($2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$).

3.5 Apomixis.

La apomixis es un tipo de reproducción asexual a través de la formación de semillas, habitualmente denominada como agamosperma (Savindan, 2000; Grimanelli *et al.* 2001; Bicknell y Koltunow, 2004). Hay tres mecanismos apomicticos conocidos: aposporia, diplosporia y embriónia

adventicia. La embrionía adventicia es el mecanismo apomítico característico de los cítricos y se produce cuando los embriones se desarrollan exclusivamente por divisiones mitóticas a partir de células de la nucela, obteniéndose plantas idénticas genéticamente a la planta madre. La mayoría de los genotipos de cítricos son apomíticos a excepción de los cidros, las zamboas, los clementinos y algunos mandarinos. Las semillas de los genotipos apomíticos contienen un embrión de origen sexual y uno o varios embriones nucelares y tradicionalmente se les denomina como semillas poliembriónicas, mientras que las semillas de los genotipos no apomíticos contienen únicamente un embrión de origen sexual aunque en ocasiones excepcionales pueden contener más de uno y tradicionalmente se les denomina como semillas monoembriónicas.

En las semillas poliembriónicas la formación de los embriones nucelares se puede iniciar antes de la fertilización (Wakana y Uemoto, 1987). El momento de inicio de la embriogénesis nucelar y la ubicación de los embriones, dentro del saco embrionario, son considerados los principales factores en la competencia por el espacio y nutrientes disponibles en el saco embrionario y, consecuentemente, en la formación del embrión maduro (Frost y Soost, 1968; Koltunow, 1993). El embrión zigótico, por su ubicación en la misma región del micrópilo que los embriones nucelares, queda desfavorecido en relación con la ubicación de los nucelares, que en la mayoría de los casos impiden o dificultan su pleno desarrollo.

Los cítricos son plantas modelo para el estudio de la embrionía adventicia (Koltunow, 1993). La embrionía adventicia ha permitido la conservación de muchas de las mutaciones espontáneas e híbridos naturales (Cameron y Frost, 1968) y es una característica muy deseable en los portainjertos de cítricos, ya que permite obtener una progenie uniforme de forma sencilla manteniendo las características de la planta madre. El análisis mediante marcadores moleculares de las plántulas obtenidas a partir de una misma semilla en genotipos apomíticos permite confirmar el origen nucelar de las mismas (Ollitrault y Jacquemond, 1995). La embrionía nucelar era utilizada, hasta la aparición de la técnica de microinjerto (Navarro *et al.* 1975), para la obtención de plantas libres de patógenos en los principales genotipos de interés agronómico, ya que en cítricos la gran mayoría de los patógenos no se transmiten a través del proceso de embriogénesis (Weathers y Calavan, 1959; Roistacher, 1977). También permite obtener tetraploides espontáneos, ya que con más o menos frecuencia (dependiendo del genotipo) se producen errores en las divisiones mitóticas que originan el embrión nucelar, pudiéndose obtener tetraploides nucelares espontáneos en genotipos apomíticos de cítricos (Frost, 1925; Cameron y Frost, 1968).

3.6 Esterilidad masculina, femenina y autoincompatibilidad.

En los cítricos podemos encontrar esterilidad masculina, esterilidad femenina y autoincompatibilidad. La esterilidad masculina puede ser debida a aberraciones cromosómicas como la asinápsis en `Mukaku Yuzu`, que está controlada genéticamente, o inducida por las bajas temperaturas en limón `Eureka` y lima `Mexicana` (Nakamura, 1943; Iwamasa y Iwasaki, 1962; Iwamasa, 1966). Las traslocaciones recíprocas son la principal causa de esterilidad en naranjo dulce `Valencia` (Iwamasa, 1966), las inversiones también son un motivo de esterilidad parcial en la lima

‘Mexicana’ mientras que en el pomelo ‘Marsh’ la esterilidad del polen es debida a fallos en la formación de las fibras del huso (Raghuvanshi, 1962). El aborto de anteras en los híbridos de satsuma y la degeneración de la célula madre productora de granos de polen en naranja dulce ‘Washington Navel’ y lima ‘Tahiti’ son otras causas de esterilidad masculina en *Citrus* (Osawa, 1912; Frost y Soost, 1968).

La esterilidad femenina está controlada genéticamente en ‘Mukaku kishiu’, mutación del mandarino ‘Kinokuni’, por dos genes (Nesumi *et al.* 2001). La satsuma y los naranjos dulces del grupo navel tienen una elevada esterilidad femenina causada por una degeneración del saco embrionario (Osawa, 1912). Nesumi *et al.* (2000) asumen que la esterilidad femenina en satsuma es causada por dos genes mayores mapeables genéticamente (Omura *et al.* 2000). Además aberraciones cromosómicas, como en el caso de la esterilidad masculina, es probable que también ocurran en el saco embrionario (Ollitrault *et al.* 2007b).

La autoincompatibilidad es un mecanismo controlado genéticamente por el cual genotipos capaces de producir gametos funcionales no producen semillas cuando son autopolinizados. Casi todas las zamboas, ciertos pomelos y limones, algunos mandarinos y varios híbridos naturales o artificiales son autoincompatibles (Hearn, 1969). En los cítricos el sistema de incompatibilidad es homomórfico y de tipo gametofítico (Ollitrault *et al.* 2007b). Soost (1969) insinúa que está controlado por un gen S, mientras que Wakana *et al.* (1998) proponen que está controlado por dos genes, genes S y Z. Wakana *et al.* (1998) demostraron que el *locus* isoenzimático glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) está ligado al *locus* de incompatibilidad.

4. POLIPLÓIDES NATURALES EN CÍTRICOS.

Los genotipos diploides son los más habituales en cítricos y géneros afines, siendo $x = 9$ el número básico de cromosomas (Krug, 1943), aunque se han inducido o encontrado ocasionalmente euploides y aneuploides. Las variaciones euploides más comunes son triploides y tetraploides (Lee, 1988), mientras que la gama de variantes aneuploides es muy amplia. Esen y Soost (1972) detectaron un 11 % de plantas aneuploides en diferentes hibridaciones $2x \times 4x$, oscilando el número de cromosomas entre 22 ($2n = 2x+4$) y 41 ($2n = 4x+5$).

Longley (1925) fue el primero en identificar un tetraploide natural en *F. hindisii*. El limero triploide ‘Tahiti’, algunos genotipos tetraploides de *P. trifoliata*, *Clausena excavata* Burm. f. alotetraploide, *Clausena harmandiana* (Pierre) Guill. tetraploide y *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) Corrêa hexaploide son ejemplos de poliploides naturales pertenecientes a la subfamilia de las *Aurantioideae* (Ollitrault *et al.* 2008).

En los cítricos hay dos mecanismos implicados en la formación de poliploides naturales. La duplicación espontánea del número de cromosomas en células de la nucela (Cameron y Frost, 1968) y la producción de gametos $2n$ originados como consecuencia de una restitución de la primera o segunda división meiótica en el megasporofito, lo que conlleva a la producción de híbridos triploides en hibridaciones $2x \times 2x$ e híbridos alotetraploides en hibridaciones $2x \times 4x$ (Ollitrault *et al.* 2007b).

Además, en hibridaciones 4x X 2x es frecuente la obtención de plantas pentaploides, probablemente como consecuencia de la formación de gametos no reducidos 4n.

5. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SOCIAL DE LOS CÍTRICOS.

Los cítricos constituyen el primer cultivo frutal a nivel mundial con una producción en 2005 de 105 millones de toneladas y una superficie de 7,4 millones de hectáreas. Los principales países productores, de mayor a menor, son: Brasil, China, EEUU, México y España (FAO, 2006).

Los cítricos son el principal cultivo frutal en España con una producción de 5,3 millones de toneladas y una superficie total de 305.000 ha (MAPA, 2006), destinándose la mayoría de la producción para consumo en fresco. Según el Anuario de Estadística Agroalimentaria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2006), la Comunidad Valenciana es la principal comunidad productora de frutos cítricos con un 56 % de la producción, seguida de Andalucía y Murcia con un 26 y 14 % respectivamente.

España produce principalmente naranjas dulces, mandarinas y limones, exportando el 57 % de la producción. Los principales países importadores de cítricos españoles son Alemania, Francia y Reino Unido (MAPA, 2006).

En la Comunidad Valenciana, las naranjas dulces suponían durante la década de los noventa el 52 % de la producción y las mandarinas el 41 %, según datos de la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalidad Valenciana (CAPA, Varios años). Según el aforo estadístico para la campaña 2007 - 2008 realizado por la CAPA, el 45 % de la producción es de naranja dulce mientras que el 51 % es de mandarina. Este aumento en la producción de mandarina es debido fundamentalmente al incremento de la demanda de mandarina para consumo en fresco en los mercados europeos y al aumento de la producción de naranjas en Andalucía donde el costo de producción es más bajo.

El aforo de naranja dulce previsto para la campaña 2007-2008 en la Comunidad Valenciana es de 1.425.210 t (CAPA, 2008). El 81 % de la producción de naranjas dulces pertenece al grupo Navel, el 18 % a naranjas del grupo de las Blancas y el 0,2 % al grupo de las Sanguinas.

El 69 % de la producción de mandarinas en la Comunidad Valenciana es de clementinas seguidas de los híbridos con un 23 % y finalmente satsumas con el 8 % de la producción (CAPA, 2008). La clementina `Clemenules` es la clementina más cultivada. La previsión para la campaña 2007 - 2008 es de 633.929 t, lo que representa el 39 % de la producción de mandarina de toda la Comunidad. Respecto a los híbridos, la `Clemenvilla` o `Nova` y el tangor `Ortanique` son los más cultivados, representando el 10 y 7 % de la producción de mandarinas respectivamente (CAPA, 2008).

La citricultura, por su importancia económica, social y territorial, constituye la principal actividad productiva agraria de la Comunidad Valenciana. El cultivo de los cítricos agrupa a más de 100.000 agricultores o propietarios de plantaciones y proporciona trabajo durante casi todo el año, generando más de 70.000 empleos directos e indirectos.

6. PROBLEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA VARIETAL DE MANDARINOS EN ESPAÑA.

La citricultura española depende en gran medida de la disponibilidad de material vegetal de alta calidad. La competencia en los mercados internacionales está aumentando en los últimos años debido a la mejora en la calidad de la fruta de países terceros, mayor rapidez y eficacia en los transportes de largas distancias y apertura de nuevos mercados como consecuencia de la política agraria de la Unión Europea. Además las nuevas variedades se están protegiendo y resulta cada vez más complicado disponer de ellas, ya que los propietarios piden regalías muy elevadas o impiden la comercialización en otros países.

La necesidad de disponer de nuevas variedades de las distintas especies que asegurasen una producción continua a lo largo de la campaña, obligó al establecimiento de un programa de importación de variedades de otros países mediante un método de saneamiento y cuarentena basado en las técnicas de cultivo *in vitro* (Navarro *et al.* 1975, 1988; Navarro, 1976, 1992, 1994). Los programas de saneamiento y cuarentena han permitido establecer un banco de germoplasma en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) constituido por más de 500 genotipos libres de virus y otros patógenos transmisibles por injerto, que representan 44 especies del género *Citrus* y 32 especies de 17 géneros afines. Sin embargo, a pesar de la amplia colección de variedades disponibles para la propagación comercial en España, existen lagunas importantes en algunas especies, por lo que es necesario abordar programas de mejora para la obtención de nuevas variedades.

La estructura varietal del naranjo dulce y limonero está relativamente bien resuelta, pero en el grupo de los mandarinos existen importantes problemas a nivel nacional. Los mandarinos incluyen las satsumas, las clementinas y los híbridos. Las satsumas se recolectan desde principios de septiembre hasta principios de noviembre, aunque la satsuma 'Owari' puede recolectarse a finales de diciembre. Son variedades con un alto grado de partenocarpia y además se caracterizan porque el polen y óvulos son estériles, por lo que no producen ni inducen la formación de semillas. Tuvieron una gran importancia en la década de los ochenta y principios de los noventa, pues representaban el 20 – 30 % de las nuevas plantaciones de mandarino. Sin embargo en la actualidad su interés está disminuyendo, fundamentalmente por la aparición de mutaciones tempranas de clementina. El 35 % de la producción de satsuma se destina a la obtención de gajos en almíbar, sector en crisis debido a la comercialización de gajos en almíbar chinos a precios muy bajos (Navarro, 2005a).

Las clementinas son las variedades de mandarino más representativas de la citricultura española y han supuesto durante los últimos 25 años entre el 60 y el 80 % de las nuevas plantaciones de mandarinos, con un descenso del 30 – 50 % en el periodo comprendido entre 1988 - 1994 que coincidió con el auge de los híbridos.

Se recolectan desde mediados de septiembre hasta finales de febrero. Son autoincompatibles y no se polinizan entre ellas, por lo que los frutos no tienen semillas. Sin embargo, tanto el polen como los óvulos son viables pudiendo polinizar y ser polinizadas por otras especies.

Las variedades de clementina más representativas actualmente son 'Oronules', 'Marisol', 'Fina', 'Clemenules' y 'Hernandina'. 'Oronules' y 'Marisol' son variedades tempranas con frutos de

buen tamaño. Los frutos de `Oronules` son de alta calidad organoléptica mientras que la calidad de `Marisol` es relativamente baja y con tendencia al bufado. Clementina `Fina` y `Clemenules` son variedades de media estación, de buena calidad organoléptica, aunque los frutos de clementina `Fina` son de reducido tamaño. La `Hernandina` es la única variedad tardía que se comercializa. Sus frutos son de relativamente baja calidad organoléptica. Recientemente han aparecido nuevas variedades como `Clemenrubí`, `Basol`, `Cultifort`, `Prenules` y `Orogros` por mutación espontánea de `Oronules`. Son variedades de recolección muy temprana, a partir de mediados de septiembre, aunque tienen problemas relacionados con el pequeño tamaño del fruto y la formación de yemas múltiples en el tronco, que pueden llegar a producir el colapso de la planta.

Los híbridos se introdujeron en la citricultura española para cubrir la demanda de mandarinas tardías por los mercados internacionales. Se cultivan principalmente mandarino `Nova` (*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)), mandarino `Fortune` (*C. clementina* x *C. tangerina*) y tangor `Ortanique` (híbrido natural entre mandarino y *C. sinensis*), que permiten alargar la recolección hasta mayo. Son variedades autoincompatibles pero su polen y óvulos son viables. Los frutos de los híbridos tienen una calidad organoléptica claramente inferior a la de las clementinas y además resultan más difíciles de pelar. A pesar de ello, tuvieron inicialmente una gran aceptación en los mercados y han producido altas rentabilidades a los agricultores. No obstante, los híbridos ocasionan la polinización cruzada con las clementinas, produciendo frutos con semillas en ambos grupos de variedades. Esto produce un gran problema comercial, ya que el consumidor demanda mandarinas sin semillas (Navarro, 2005a).

Como consecuencia de la formación de semillas en los frutos de las mandarinas, en 2002 la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación elaboró un decreto sobre `Medidas para limitar la polinización cruzada entre plantaciones de cítricos` (Decreto 29/2002) que prohíbe instalar colmenas a menos de cinco kilómetros de plantaciones de cítricos durante la época de floración y permite la realización de tratamientos fitosanitarios en mandarinos contra las abejas. Además, han surgido problemas importantes provocados por el ataque del hongo *Alternaria alternata* en mandarino `Fortune` obligando al arranque o sobreinjerto de esta variedad. Debido a esta situación, las nuevas plantaciones de mandarino tardío han disminuido considerablemente y se ha pasado del 30 – 50 % de las nuevas plantaciones de mandarino en el periodo 1988 - 1993 al 23 % actual. La nueva variedad tangor `Nadorcott` que comenzó a cultivarse en España en la campaña 1996 - 1997 permite sustituir al mandarino `Fortune`, aunque también induce la formación de semillas en las clementinas. La mandarina `Moncada`, híbrido de clementina `Hernandina` y mandarino `Kara` (*C. clementina* x (*C. unshiu* x *C. nobilis*)) obtenida en el IVIA por el equipo de R. Bono, presenta el mismo problema, a pesar de su excelente calidad de fruto y período de recolección tardío. El tangor `Nadorcott`, por otra parte, está protegido y los propietarios piden regalías muy altas y condiciones de cultivo y comercialización inaceptables para la mayoría de citricultores. Además, los propietarios han decidido limitar las plantaciones, por lo que la variedad no está actualmente disponible para los nuevos agricultores. Por todo ello, la estructura varietal de los mandarinos en España no está resuelta (Navarro, 2005a).

En España, durante el periodo 1996 - 2005, alrededor del 80 % de la superficie destinada al cultivo de mandarina era de clementinas (MAPA, Varios años). La superficie de nuevas plantaciones de clementina ha ido aumentando ligeramente durante los últimos años, pasando del 79 % en el año 1998 hasta el 86 % en el año 2003 (MAPA, Varios años). El aumento de la superficie de cultivo de clementina y especialmente 'Clemenules', fue debido principalmente a la sensibilidad de mandarina 'Fortune' a *Alternaria alternata*, a las elevadas regalías solicitadas por las plantas de 'Nadorcott', a los problemas de polinización cruzada de los híbridos de mandarina con el grupo de las clementinas y a la mala calidad de las variedades tardías de mandarina. Este aumento de la superficie de cultivo de clementina ha originado una gran producción que está muy por encima de la demanda de los mercados y ha provocado el hundimiento de los precios de las clementinas y en consecuencia pérdidas económicas muy importantes para los productores. Se estima que sólo en la Comunidad Valenciana sería necesario reconvertir 25.000 hectáreas de clementinas para adaptar la producción a la demanda de los mercados y conseguir precios rentables para los agricultores.

Con la intención de paliar esta problemática, actualmente se está elaborando un plan de reconversión varietal a nivel nacional, en el que cada comunidad autónoma debe decidir cuales son sus prioridades y enfocar la reconversión varietal en función de sus objetivos y necesidades. En la Comunidad Valenciana, la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación, propuso al sector cítrico valenciano una reconversión de la estructura varietal enfocada hacia el cambio de variedades de mandarina de media estación por variedades de maduración tardía. El plan de reconversión varietal en la Comunidad Valenciana está basado en gran medida a partir de los híbridos triploides de maduración tardía, ForMur 96-081, ForKar 96-037 y ForEll 96-058, obtenidos por nuestro grupo (Navarro *et al.* 2005b). Éstos híbridos ampliarán la campaña de recolección de mandarina hasta finales de abril, evitando la concentración de la producción y además permitirán cultivar conjuntamente los híbridos triploides con cualquier otra variedad de mandarina sin problemas de polinización cruzada. Los nuevos híbridos triploides se han entregado recientemente a los viveristas para su multiplicación y está previsto que a partir del año 2009 el agricultor pueda disponer de los mismos.

7. MEJORA GENÉTICA DE LOS CÍTRICOS.

La mejora genética de los cítricos se dirige tanto a la obtención de nuevas variedades como a patrones. La mejora genética de patrones en España está orientada fundamentalmente a la producción de nuevos genotipos tolerantes a CTV, tolerancia a *Phytophthora* spp., adaptación a suelos con altos contenidos de caliza, producción de gran cantidad de semillas poliembriónicas, buen crecimiento en vivero, rápida entrada en producción y alta productividad y calidad del fruto de la variedad injertada.

La mejora genética de variedades tiene como finalidad la obtención de genotipos que aumenten la producción, mejoren la calidad de los frutos y aumenten el espectro de la época de recolección. Nuestra citricultura se basa en la producción de fruta de excelente calidad para consumo en fresco. Sin embargo, la competencia en los mercados internacionales está aumentando en los

últimos años, lo que nos debe obligar a producir una fruta cada vez de mayor calidad que se adapte mejor a las demandas de los consumidores.

Las características más importantes que debe reunir una variedad de cítricos para el consumo en fresco son (Navarro, 2005a):

- 1) Ausencia de semillas.
- 2) Época de maduración adecuada.
- 3) Tamaño relativamente grande, particularmente en mandarinos.
- 4) Facilidad de pelado.
- 5) Fácil separación de segmentos carpelares.
- 6) Color de corteza atractivo.
- 7) Sabor y textura agradables.
- 8) Elevada productividad.
- 9) Buena aptitud para la manipulación y el transporte.

7.1 Mejora genética clásica.

La práctica totalidad de las variedades de cítricos cultivadas proceden de la selección de mutaciones espontáneas que con relativa frecuencia se producen en los cítricos. Este es el origen de la gran mayoría de las variedades cultivadas de naranjas del grupo blancas y navel, de satsumas y clementinas. La inestabilidad genética de los cítricos favorece la aparición de nuevas mutaciones espontáneas, originadas probablemente por la acción de elementos transponibles (Bretó *et al.* 2003).

Desde finales del siglo XIX se han realizado programas de mejora genética en cítricos. El número de variedades cultivadas procedentes de programas de mejora genética han sido bajos (Navarro, 2005b). En estos programas se han utilizado diferentes metodologías como la inducción de mutantes y la hibridación sexual entre genotipos diploides.

7.1.1 Inducción de mutantes.

La mutagénesis ha sido una metodología empleada en cítricos para la obtención de nuevas variedades. La primera variedad de interés comercial obtenida por mutagénesis fue el pomelo `Star Ruby´. Se obtuvo al irradiar semillas del pomelo `Hudson´. Posteriormente se obtuvo otra variedad de pomelo con interés comercial, el pomelo `Rio Red´, obtenido al irradiar yemas del pomelo `Ruby Red´ (Hensz, 1971, 1985). También se han realizado ensayos de mutagénesis, sobre todo en mandarinos, en Israel (Vardi *et al.* 1996) y Sudáfrica (Froneman *et al.* 1996) donde emplean predominantemente rayos gamma. En Israel, Vardi *et al.* (1993a), iniciaron en 1995 un programa de mejora genética de mandarino basado en la irradiación con rayos gamma de yemas del tangor `Murcott´ y de los mandarinos `Orah´ y `Yafit´. Obtuvieron tres nuevas variedades con potencial interés debido a su reducida fertilidad denominadas `Mor´, `Or´ y `Orri´ (Vardi *et al.* 2000) derivadas del tangor `Murcott´, mandarino `Orah´ y mandarino `Or´ respectivamente. En Sudáfrica, Froneman *et al.* (1996) obtuvieron, a partir de la irradiación de varetas del mandarino `Nova´ con rayos gamma, la `Nova SL´

caracterizada por una baja fertilidad del polen y diferencias estructurales en los granos de polen. Asins *et al.* (2002) irradiaron ápices de clementina 'Clemenules'. Posteriormente mediante la técnica de microinjerto regeneraron plantas obteniendo una nueva variedad de clementina, 'Nulessin', que presenta una fertilidad reducida. Actualmente en el IVIA se está realizando un programa de irradiación de varetas del tangor 'Murcott' y de mandarino 'Moncada' con la finalidad de obtener genotipos estériles (Zaragoza, comunicación personal). Roose y Williams (2007) comenzaron en 1995 un programa de mejora genética de mandarino basado en la irradiación con rayos gamma de más de 2.000 yemas del tangor 'Nadorcott', a partir de las cuales seleccionaron una nueva variedad denominada 'Tango' caracterizada por el bajo porcentaje de semillas en los frutos (menos de 1 semilla por fruto).

7.1.2 Hibridación sexual clásica.

En los cítricos muchas variedades han sido obtenidas espontáneamente en semilleros realizados a partir de semillas obtenidas en hibridaciones no controladas o como consecuencia de mutaciones nucleares (chance seedlings). De este modo se han obtenido algunos genotipos de naranjo dulce como 'Hamlin', 'Trovita' y 'Olinda', algunos genotipos de mandarino como las satsumas, clementina 'Fina', 'Dancy', 'Ellendale', 'Malvasio', 'Pixie', 'Nadorcott', 'Murcott', 'Natsudaikai' y 'Temple', pomelo 'Flame', zamboas 'Hirado Buntan', 'Java Shaddock' y 'Djeroek Deleema Kopjor', los limones 'Eureka', 'Fino' y 'Verna' y la lima 'Tahití' (Saunt, 2000).

La hibridación sexual entre parentales diploides y la selección de individuos con características deseables ha posibilitado la obtención de nuevos genotipos con interés comercial. Algunos de los resultados de estos programas fueron los híbridos intergenéricos citrangeros (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) y citrumelos (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) obtenidos mediante polinización cruzada. Se intentó transmitir la resistencia al frío de *Fortunella* spp. y *P. trifoliata* a diferentes especies de *Citrus*. Aunque los híbridos mostraban mayor resistencia al frío, ninguno de ellos tuvo interés comercial por la baja calidad de la fruta. Sin embargo, algunos genotipos como el citrange 'Carrizo', citrange 'Troyer' y el citrumelo Swingle mostraron excelentes características como patrones (Savage y Gardner, 1965; Hutchison, 1974).

La hibridación sexual también ha permitido la obtención de híbridos interespecíficos que posteriormente han tenido impacto como variedades comerciales, tal es el caso de los híbridos tipo mandarino 'Nova' (Reece *et al.* 1964) y 'Fortune' (Furr, 1964) y más recientemente la mandarina 'Moncada' (Bono *et al.* 2005).

Los programas de mejora genética mediante hibridación sexual en especies leñosas necesitan mucho tiempo y espacio lo que dificulta enormemente su realización. Además, los cítricos poseen otras características que elevan la dificultad de los programas de mejora genética. Estas características son (Navarro, 2005a):

1. Biología reproductiva compleja. Muchos genotipos de interés presentan esterilidad parcial o total de polen y/o óvulos, por lo que no pueden usarse en programas de hibridación. Además, existen

casos de inter y autoincompatibilidad, lo que también limita la transmisión de caracteres deseables mediante hibridación sexual.

La embrionía adventicia es un mecanismo apomíctico muy extendido en cítricos. En estos casos la formación de embriones nucelares impide o restringe el desarrollo de los embriones zigóticos (Wakana *et al.* 1981), lo que dificulta la obtención de grandes poblaciones para seleccionar genotipos superiores. Además es necesario utilizar análisis moleculares para separar las plantas nucelares de las zigóticas. La consecuencia es que en la práctica sólo pueden usarse los escasos genotipos no apomícticos como parentales femeninos para la obtención de elevadas poblaciones de híbridos.

2. Los cítricos son altamente heterocigóticos (Ollitrault y Faure, 1992; Herrero *et al.* 1995) lo que implica una alta segregación en la descendencia, por lo que hay una baja probabilidad de obtener descendientes con las combinaciones genéticas deseadas.

3. Desconocimiento del modo de herencia de la mayoría de los caracteres agronómicos de interés, particularmente los relacionados con la calidad de la fruta.

4. Juvenilidad. Los cítricos tienen un largo periodo juvenil y la mayoría de las especies requieren 4 - 8 años para iniciar la floración y fructificación. Esto dificulta la evaluación de caracteres relacionados con el fruto y la posibilidad de obtener varias generaciones.

5. Escasez de marcadores moleculares relacionados con los principales caracteres de interés agronómico, lo que impide realizar una evaluación precoz de los híbridos para la mayoría de los caracteres.

6. Producción de semillas. La experiencia indica que la mayoría de híbridos de cítricos producen frutos con elevado número de semillas, incluso cuando los parentales no producen habitualmente semillas. Esto limita la mejora de variedades ya que los mercados rechazan los frutos con semillas.

Por todo ello, las técnicas biotecnológicas basadas en los métodos de manipulación del ADN y el cultivo de tejidos *in vitro* han creado grandes expectativas en la mejora genética de los cítricos, ya que permiten superar algunos de los problemas de la mejora genética clásica y ofrecen nuevas posibilidades que no podían abordarse hasta ahora.

7.2 La biotecnología en la mejora genética de los cítricos.

Las aproximaciones biotecnológicas utilizadas en la mejora de los cítricos son: 1) Variación somaclonal, 2) Hibridación somática, 3) Marcadores moleculares y Mapeo genético, 4) Genómica, 5) Transformación genética y 6) Manipulación del nivel de ploidía para la obtención de híbridos triploides.

7.2.1 Variación somaclonal.

La variación somaclonal en sentido estricto es la variación genética heredable que aparece en las células y plantas regeneradas como consecuencia del cultivo *in vitro*.

En cítricos ocurren mutaciones somáticas de forma natural. Empleando técnicas de cultivo *in vitro*, es posible regenerar somaclones que pueden mostrar características superiores a las variedades pre-existentes en aspectos relacionados con el aumento de la tolerancia a diferentes tipos de estrés y enfermedades y alteraciones deseables en la calidad de los frutos (Gmitter *et al.* 1992; Grosser *et al.* 2007). Deng *et al.* (1985) contaron el número de cromosomas de células de meristemas de diferentes genotipos de cítricos y encontraron entre el 2 y el 7 % de células meristemáticas con variaciones en el nivel de ploidía.

La variación somaclonal inducida por el propio cultivo *in vitro* es otra metodología que puede ser empleada en cítricos para la obtención de nuevos genotipos con características superiores. Grosser *et al.* (2002) observaron diferencias en plantas de naranjo dulce 'Hamlin' y 'Valencia' obtenidas a partir de tres vías distintas: 1) cultivo *in vitro* de entrenudos e inducción de organogénesis adventicia, 2) embriogénesis somática a partir de callos embriogénicos obtenidos por cultivo de óvulos, 3) protoplastos aislados de callos embriogénicos. Como controles utilizaron plantas nucelares de las dos variedades. Los somaclones mostraron diferencias respecto a los controles en la época de maduración, morfología y nivel de ploidía.

La variación somaclonal es un fenómeno no deseable en la conservación *in vitro* de bancos de germoplasma mientras que en especies como naranjo dulce y pomelo, en las que la obtención de nuevos genotipos por métodos tradicionales es difícil de abordar, es una característica deseable para inducir variabilidad (Grosser *et al.* 2007).

En 1994, nuestro grupo comenzó un trabajo experimental con diferentes genotipos de clementina basado en el cultivo de entrenudos *in vitro* en medios de cultivo con dosis elevadas de la citoquinina 6 - bencilaminopurina (6-BAP) y de la auxina ácido 2 - 4 diclorofenoxiacético (2-4 D). Se obtuvieron más de 400 plantas en las que, hasta el momento, no se han observado cambios a nivel fenológico en ninguno de los genotipos regenerados.

7.2.2 Hibridación somática.

La hibridación somática es una herramienta biotecnológica que supera algunas de las limitaciones de la hibridación sexual. Elimina las barreras sexuales, lo que permite emplear genotipos estériles y obtener híbridos entre genotipos sexualmente incompatibles. Así mismo posibilita la utilización de genotipos apomícticos, ya que en las hibridaciones sexuales únicamente pueden ser utilizados como fuente de polen. Además permite la mezcla y recombinación de los genomas citoplasmáticos, que son heredados vía materna en los híbridos sexuales. Por último también posibilita la transferencia de fragmentos de información genética de un parental donante a otro receptor, generando así híbridos somáticos asimétricos (Olivares-Fuster, 1998; Ollitrault *et al.* 2007a).

La hibridación somática se basa en la fusión de protoplastos, células vegetales desprovistas de pared celular, mediante agentes físicos, químicos y físico-químicos. Para ello se aíslan protoplastos procedentes de callo nucelar embriogénico y se fusionan con protoplastos de mesófilo de hoja, que no poseen capacidad embriogénica. Tras la fusión se generan células híbridas, heterocariontes, que tras un periodo de cultivo *in vitro* originan el híbrido somático. El primer híbrido

somático obtenido en una especie leñosa fue en cítricos, producido por Ohgawara *et al.* (1985), fusionando protoplastos de naranjo dulce y *P. trifoliata*.

La hibridación somática en cítricos permite obtener diferentes tipos de híbridos somáticos: simétricos, asimétricos y cíbridos.

Los híbridos somáticos simétricos suman los dos genomas nucleares completos de los parentales. Pueden ser empleados tanto para la mejora de patrones como de variedades. Mediante la fusión de protoplastos haploides y diploides se obtuvieron híbridos somáticos triploides (Kobayashi *et al.* 1997; Ollitrault *et al.* 2000), aunque el mayor problema para la obtención de estos híbridos es la dificultad en la obtención de plantas haploides. Sin embargo, la hibridación gametosomática es una técnica que permitiría salvar este obstáculo aunque en cítricos esta técnica no está perfeccionada. Los híbridos somáticos alotetraploides son genotipos caracterizados por una elevada diversidad genética, lo que les hace ser muy interesantes como parentales para la obtención de híbridos triploides (Oiyama *et al.* 1991a; Deng *et al.* 1996; Tusa *et al.* 1996).

Los híbridos somáticos asimétricos se obtienen al fusionar protoplastos intactos de un parental con protoplastos del otro parental tratados previamente con rayos gamma o con rayos X. Este tratamiento fragmenta el ADN y tras la fusión sólo un pequeño fragmento de ADN es incorporado al genoma del otro parental. Estos híbridos mantienen toda la información genética de un parental, tanto nuclear como citoplásmica, pero han incorporado un pequeño fragmento de ADN del otro parental. Esta técnica no ha sido todavía muy desarrollada en cítricos, aunque potencialmente tiene un gran interés ya que permitiría introgresar fragmentos cromosómicos de especies lejanas a otras más próximas y obtener plantas de *Citrus* resistentes a CTV al incorporar la resistencia a esta virosis mostrada por *P. trifoliata*. Este tipo de híbridos serían de gran interés para inducir variabilidad en especies de naranjo dulce y pomelo donde la diversidad genética es muy baja (Ollitrault *et al.* 2007a).

Los híbridos somáticos citoplásmicos o cíbridos, se obtienen generalmente mediante la fusión de protoplastos intactos de un parental con protoplastos del otro parental al que se le ha inactivado el núcleo empleando agentes físicos o químicos. En el caso de los cítricos, se obtienen cíbridos a partir de fusiones simétricas (Guo *et al.* 2004) y parece que la técnica de fusión quimioeléctrica favorece su formación (Oliveros-Fuster *et al.* 2005). La principal característica de los cíbridos es que mantienen las propiedades del parental que no ha sido modificado excepto para los caracteres cuya información se encuentra en el citoplasma del parental cuyo núcleo ha sido inactivado. El principal interés de los cíbridos de cítricos es la incorporación de la esterilidad masculina, codificada por genes citoplasmáticos, en especies diploides de interés con elevada capacidad polinizadora. En cítricos, Guo *et al.* (2004) obtuvieron cíbridos de diferentes genotipos de mandarina y zambo que potencialmente han incorporado la esterilidad masculina citoplasmática de las satsumas.

7.2.3 Mapeo genético y marcadores moleculares.

Un mapa genético es la descripción de la organización de los fragmentos de ADN en los cromosomas (orden y distancias), calculado a partir de las frecuencias de recombinación de éstos. Un mapa genético puede incluir tanto marcadores moleculares como genes, siempre que estos hayan

sido detectados por alterar o modificar el fenotipo. El interés del mapeo genético en cítricos como en otras especies es la identificación de marcadores moleculares ligados a genes de interés que permitan realizar una selección de aquellos individuos portadores del gen en cuestión sin necesidad de esperar a observar el fenotipo. El primer mapa genético publicado en cítricos fue el realizado por Torres *et al.* (1985) utilizando isoenzimas sobre una pequeña población de híbridos intergenéricos de *Citrus* y sobre una población de mayor tamaño de híbridos intragenéricos de *Citrus x Poncirus*.

Desde entonces se han producido nuevos marcadores moleculares que han permitido aumentar la densidad de los mapas genéticos (Liou, 1990; Durham *et al.* 1992; Jarrell *et al.* 1992; Cai *et al.* 1994; Sankar *et al.* 2001; Kijas *et al.* 1997; Simone *et al.* 1998; Ling *et al.* 1999; Roose *et al.* 2000; Chen *et al.* 2007). Los marcadores dominantes como los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) y ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) tienen un menor interés que los marcadores codominantes tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), SCARs (Sequence Characterised Amplified Region), CAPs (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), SSRs o microsatélites (Simple Sequence Repeats) y SNPs (Single-Nucleotide Polymorphisms), ya que permiten diferenciar individuos homocigotos de los heterocigotos y además permiten comparar resultados obtenidos en diferentes poblaciones. La aplicación de tecnologías basadas en la genómica han originado un elevado número de nuevos marcadores moleculares, como los SSRs derivados de ESTs (Expressed Sequence Tags) que actualmente permiten la elaboración de nuevos mapas genéticos más precisos (Talón y Gmitter, en prensa).

7.2.3.1 Microsatélites.

Los microsatélites son secuencias repetidas en tándem muy abundantes en genomas eucariotas. El número de repeticiones de estas secuencias presenta un alto nivel de polimorfismo y generalmente las secuencias flanqueantes al microsatélite están conservadas entre especies e incluso entre géneros (Morgante *et al.* 2002). Los marcadores SSRs (Tautz, 1989) están basados en la amplificación por PCR con cebadores específicos de las regiones flanqueantes del microsatélite y la separación según el tamaño, por electroforesis, de los fragmentos amplificados. Estos marcadores SSRs son codominantes, generalmente *monolocus* y con un alto nivel de polimorfismo. Numerosas genotecas han sido establecidas en muchas especies de plantas que permiten la obtención de marcadores tipo SSRs (Lanaud *et al.* 1999; Billotte *et al.* 2001; Bon *et al.* 2005; Risterucci *et al.* 2005). Una manera de desarrollar los marcadores SSRs es localizar directamente las secuencias de tipo microsatélite en las secuencias de los ESTs derivadas de bancos de ADNc. Esto se hizo en cebada (Thiel *et al.* 2003), trigo (Gao *et al.* 2004), arroz (La Rota *et al.* 2005), cítricos (Forment *et al.* 2005; Terol *et al.* 2007), caña de azúcar (Cordeiro *et al.* 2001) y vid (Scott *et al.* 2000). Se asume que estos marcadores SSRs permiten determinar la evolución molecular de los genes en los cuales se insertan. Mas recientemente la secuenciación sistemática de BACs (Bacterial Artificial Chromosome) o de BACends ha permitido la identificación de millares de secuencias microsatélites y el desarrollo de numerosos marcadores SSRs (Shulz *et al.* 2007; Cheung y Town, 2007). Puesto que los SSRs están

muy distribuidos por todo el genoma, se utilizan como marcadores genéticos en muchas plantas para analizar la diversidad interespecífica e intraespecífica (Plieske y Struss 2001; Cordeiro *et al.* 2003) y para mapeo genético (Lacape *et al.* 2003; Rittera *et al.* 2002; Wu y Huang, 2007).

En cítricos, el número de marcadores SSRs obtenidos de bancos genómicos publicados es bastante limitado (Kijas *et al.* 1997; Froelicher *et al.* 2008). Recientemente, usando recursos de las bases de datos del Genbank, Chen *et al.* (2006) publicaron la caracterización de 56 SSRs mapeables e identificados en 2.295 ESTs de cítricos. Luro *et al.* (2008) identificaron cerca de 1.500 secuencias microsatélites a partir de 11.000 unigenes identificados en librerías EST de clementina. La colaboración entre el IVIA y el CIRAD/INRA (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le développement e Institut Scientifique de Recherche Agronomique) está desarrollando más de 200 SSRs de este banco de ESTs (Luro *et al.* 2007). Diferentes grupos europeos, americanos y asiáticos están actualmente desarrollando este tipo de marcadores en cítricos.

Más recientemente Terol *et al.* (2008) han identificado 3.800 SSRs a partir de la secuenciación de BACends. El CIRAD y el IVIA están desarrollando nuevos marcadores de estas secuencias que permitirán unir los mapas físicos y genéticos. En cítricos los SSRs han sido utilizados para el análisis de la diversidad genética y la gestión del germoplasma (Luro *et al.* 2001; Corazza *et al.* 2002; Barkley *et al.* 2006), la caracterización de híbridos somáticos (Olivares-Fuster, 1998), la discriminación entre individuos zigóticos y nucelares (Ruiz *et al.* 2000), el control del origen de plantas obtenidas por ginogénesis inducida (Froelicher *et al.* 2007, Aleza *et al.* en prep.), la caracterización molecular de híbridos triploides (Olivares-Fuster, datos no publicados), análisis del origen de los gametos diploides de clementina que producen triploides en cruzamientos $2x \times 2x$ (Luro *et al.* 2004) y caracterización de quimeras periclinales (Zhang *et al.* 2007). Además, también son marcadores adecuados para establecer mapas genéticos (Kijas *et al.* 97; Ruiz y Asins, 2003; Chen *et al.* 2006; Matthews *et al.* 2007; Luro *et al.* 2007).

La Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) tiene el propósito de abordar la creación de bases de datos de perfiles moleculares de variedades que permitan identificarlas y diferenciarlas del resto de genotipos considerados. En este sentido, los marcadores microsatélites son una potente herramienta ya que son codominantes y por lo general son fáciles de evaluar, reproducibles y pueden mapearse sin dificultad. Además pueden analizarse con secuenciadores automáticos de ADN de alto rendimiento lo que permite analizar varios de ellos al mismo tiempo (UPOV, Directrices BMT, 2007). En cítricos, la utilización de marcadores microsatélites para la elaboración de bases de datos de perfiles moleculares que permitan identificar y distinguir las variedades ya existentes junto con las nuevas obtenciones es un aspecto de gran interés para los obtentores de las mismas, ya que permitirá disponer de una herramienta que pruebe la autenticidad varietal. En el Capítulo 6 se comentan ampliamente estas características.

7.2.4 Genómica.

La genómica ha tenido un importante auge en los últimos años como consecuencia de los avances en las técnicas de secuenciación y bioinformática. La secuenciación de BACs y librerías EST ha producido una gran cantidad de marcadores moleculares (CAPS, SSR, SNP) que actualmente están siendo utilizados en el mapeo genético de cítricos. Además también ha desempeñado un papel destacado en la creación de mapas físicos los cuales permiten disponer de forma ordenada y lineal la secuencia del genoma (Talón y Gmitter, en prensa).

La construcción de mapas físicos de cítricos ha experimentado un importante progreso en los últimos años (Terol *et al.* 2007a). La integración de los mapas físicos y genéticos es un aspecto de gran interés ya que proporcionará las herramientas esenciales para la investigación del genoma de los cítricos proporcionando el desarrollo de nuevos marcadores moleculares, la localización de EST (genómica funcional), y permitirá determinar la posición de forma eficaz de grandes fragmentos del genoma de los cítricos (Talón y Gmitter, en prensa).

El desarrollo de la genómica funcional ha permitido la generación de un elevado número de plataformas de microarrays principalmente en los cultivos con interés agronómico (Talón y Gmitter, en prensa). Shimada *et al.* (2005) construyeron la primera plataforma microarray de ADNc en cítricos a partir de 2.213 genes relacionados con el desarrollo del fruto. Desde entonces se han generado varias plataformas microarrays en cítricos. Forment *et al.* (2005) desarrollaron un microarray de ADNc de primera generación con 6.875 supuestos unigenes obtenidos a partir de una colección de 22.000 EST. Posteriormente se generó un microarray de segunda generación que abarcó 12.000 unigenes y ulteriormente produjeron la versión actual, un microarray que contiene más de 20.000 unigenes, basado en casi 90.000 secuencias de alta calidad generadas a partir de 52 genotecas de ADNc diferentes.

Uno de los principales objetivos de la genómica de cítricos es disponer de una secuencia de alta calidad del genoma de los cítricos. Para ello el Consorcio Internacional de Genómica de Cítricos (CIGC), actualmente presidido por F. G. Gmitter de la Universidad de Florida (EEUU), decidió en febrero de 2004 secuenciar el genoma del naranjo dulce diploide. Al principio de 2007 habían realizado una baja cobertura del genoma (1.2X) ya que encontraron grandes problemas en la ubicación (*assembling*) de los fragmentos secuenciados debido a la elevada heterocigosidad del naranjo dulce (Roose *et al.* 2007). Por ello, en enero de 2007, el CIGC decidió secuenciar el genoma de una planta haploide de cítricos para eliminar las dificultades asociadas a la ubicación de los fragmentos secuenciados encontrados en el genoma diploide altamente heterocigótico del naranjo dulce.

Se presentaron tres candidatos haploides de clementina, pertenecientes a un grupo de investigación Francés (Ollitrault *et al.* 1996a), Italiano (Germanà *et al.* 2005) y Español (Capítulo 1 del presente trabajo). El candidato haploide requerido debe de estar disponible libremente para la distribución internacional, estar libre de patógenos, presentar un crecimiento vegetativo robusto y que sea relativamente fácil de mantener. Los candidatos presentados fueron evaluados por diferentes laboratorios internacionales, verificando el número de cromosomas y comprobando la homocigosidad

con marcadores microsatélites distribuidos por todo el genoma además de analizarlos por lo menos con dos plataformas microarrays de cítricos para asegurar que no hay grandes deleciones u otros defectos citogenéticos. Finalmente se seleccionó el candidato haploide español. La obtención y la caracterización de esta planta haploide se presenta en el Capítulo 1.

7.2.5 Transformación genética.

La transformación genética permite la transferencia selectiva de un gen o unos pocos genes deseables a genotipos élite sin alterar su fondo genético. Además los genes que controlan los caracteres de mejora no tienen que proceder necesariamente de cítricos, sino que pueden ser aislados de otros organismos. Desde 1993, el equipo del Dr. Leandro Peña (IVIA) ha desarrollado sistemas eficaces de transformación genética en importantes especies del género *Citrus* (naranja dulce, naranja amarga, lima, limón, citrange, mandarino y *C. macrophylla*). Estos sistemas se basan en la selección de una cepa de *Agrobacterium* súper-transformante en cítricos, el establecimiento de sistemas de infección, cocultivo y selección apropiados, el uso de material vegetal en estado ontológico óptimo, la determinación de células aptas para ser transformadas, el uso apropiado de genes marcadores y la regeneración de plantas transgénicas mediante microinjerto (Peña *et al.* 2004, 2007).

Cervera *et al.* (1998) fueron el primer grupo en establecer un protocolo para la transformación de material vegetal adulto de una especie leñosa. Transformaron explantes de naranja dulce 'Pineapple' procedentes de árboles adultos. Este factor es muy importante, ya que el material transgénico regenerado no presenta características juveniles y permite reducir de forma drástica el tiempo necesario para la evaluación de caracteres relacionados con el fruto.

Algunos ejemplos de la transformación genética en cítricos han sido la introducción en naranja dulce de un gen aislado de tomate que produce una proteína antifúngica, para tratar de conseguir resistencia a *Phytophthora* spp. (Fagoaga *et al.* 2001), introducción de genes implicados en el metabolismo de giberelinas de citrange 'Carrizo' para tratar de modular el tamaño de las plantas y conseguir portainjertos semienanizantes (Fagoaga *et al.* 2003, 2007), introducción de genes de CTV en distintos huéspedes de cítricos para investigar la biología del virus y sus interacciones con el huésped y obtener así, resistencia a CTV (Domínguez *et al.* 2000; Ghorbel *et al.* 2000; Fagoaga *et al.* 2005, 2006), expresión constitutiva de los genes *leafy* y *apetala* de *Arabidopsis thaliana* para acortar el periodo de juvenilidad de los cítricos (Peña *et al.* 2001), y mejorar los protocolos de transformación en plantas adultas de clementino con el objetivo de introducir genes controlados por promotores específicos de óvulos que induzcan el aborto de las semillas en los frutos (Cervera *et al.* 2008).

7.2.6 Manipulación del nivel de ploidía para la obtención de híbridos triploides.

Las plantas triploides, a nivel evolutivo, generalmente han sido consideradas como plantas muertas, ya que originan gametos aneuploides con muy baja fertilidad. Sin embargo, las plantas triploides pueden producir con muy baja frecuencia gametos haploides, diploides o triploides, los

cuales pueden generar híbridos diploides, triploides y tetraploides (Otto y Whitton, 2000). En el caso de los cítricos, estudios realizados por Cameron y Frost (1968) demostraron que, durante la meiosis de diferentes genotipos triploides se formaban predominantemente asociaciones trivalentes, un gran número de asociaciones bivalentes y univalentes, así como la formación de microsporas extra en algunos genotipos. Estudios realizados en plantas triploides de `Oroblanco` (*C. grandis* x *C. paradisi*) y `LCNR46` (*C. limon* x *C. sinensis*) por Fatta del Bosco *et al.* (1992), mostraron el aborto de la megasporogénesis desde las primeras divisiones del saco embrionario hasta el estado de ovocélula fecundada. Por otra parte, el aborto en la formación de los granos de polen era muy bajo. Trabajos realizados por nuestro grupo (datos no publicados) en los que se realizaron 500 polinizaciones manuales controladas sobre clementina `Fina` con polen de `Oroblanco` y cuatro genotipos triploides, se recolectaron 118 frutos y se obtuvo una media de 0,025 semillas por fruto. Consecuentemente los híbridos triploides de cítricos son generalmente estériles aunque, en determinados casos y con frecuencias muy bajas, pueden producir frutos con muy pocas semillas e inducir la formación de semillas en frutos de otros genotipos. Por otra parte en cítricos la partenocarpia es un fenómeno común por lo que la formación de semillas no es necesaria para obtener buenas producciones.

Desde los años 70 se han obtenido híbridos triploides en cítricos pero la mayoría han tenido un reducido interés comercial, a excepción del limero `Tahití`. Éste es un híbrido triploide natural de origen desconocido y es el triploide de cítricos más consumido a nivel mundial, con una producción de más de un 1.000.000 de toneladas sólo en México (SAGARPA, 2004). Los híbridos `Oroblanco` y `Melogold` se obtuvieron en un cruzamiento entre una zamboa no apomíctica diploide como parental femenino y un pomelo apomíctico tetraploide como parental masculino (Soost y Cameron, 1980, 1985). El mandarino `Winola` se obtuvo en Israel de forma espontánea en un cruzamiento entre los parentales diploides mandarino `Wilking` y tangelo `Minneola` (Vardi *et al.* 1993b).

En 1978, Starrantino y Recupero (1981), del Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura di Acireale, Italia, iniciaron un programa de mejora genética de mandarino con la intención de obtener híbridos triploides mediante hibridaciones $2x \times 4x$. Los híbridos triploides `Tacle` (clementina `Monreal` x naranjo `Tarocco` tetraploide), `Clara` (clementina `Monreal` x naranjo `Tarocco` tetraploide), `Alcantara` (clementina `Oroval` x naranjo `Tarocco` tetraploide), `Mandared` (clementina `Nules` x naranjo `Tarocco` tetraploide), `Mandalate` (mandarino `Fortune` x mandarino `Avena` tetraploide) y `Lemox` ((limonero x `Pera del Commendatore`) x limonero `Doppio Lentini` tetraploide) han sido seleccionados y protegidos por su interés potencial como nuevas variedades (Russo *et al.* 2004).

En California, en 1973 en la Universidad de Riverside, realizaron una serie de hibridaciones manuales controladas entre diferentes genotipos diploides y tetraploides. En 2002, seleccionaron y patentaron los mandarinos de la serie TDE `Yosemite®`, `Tahoe®` y `Shasta Gold®`, obtenidos a partir de cruzamientos $4x \times 2x$ entre un parental femenino tetraploide, obtenido de forma casual en una hibridación $2x \times 4x$ entre el mandarino diploide `Temple` con el mandarino tetraploide `Dancy`, y el parental masculino diploide `Encore` (Williams y Roose, 2004).

En Japón, en 1999 en el Departamento de Citricultura de Okitsu, Yoshida *et al.* (2003) obtuvieron un kumquat triploide en una hibridación entre el kumquat `Naja Kinkan` diploide con el

kumquat `Ninpou Kinkan´ tetraploide. Posteriormente, Tokunaga *et al.* (2005) patentaron un híbrido triploide de *C. sudachi* (Tokushima 3x n^o1) obtenido en una hibridación 4x X 2x.

En España, desde 1995, nuestro grupo está realizando en el IVIA un amplio programa de obtención de híbridos triploides de mandarina mediante hibridaciones 2x X 2x, 2x X 4x y 4x X 2x (Navarro *et al.* 2002; Navarro *et al.* 2005b). Hasta la fecha se han obtenido más de 9.900 híbridos triploides que están en fase de evaluación. Recientemente se ha solicitado a la oficina española de variedades vegetales (OEVV) la inscripción en el registro de variedades comerciales de 14 híbridos triploides (tabla I.1) y se ha iniciado la propagación comercial de los triploides ForMur 96-081 (IVIA TRI-1) y ForKar 96-037 (IVIA TRI-2). Recientemente se ha entregado material vegetal de estos dos triploides a todos los viveristas para la producción de plántulas. Además dentro del contexto de colaboración entre la Agrupación de Viveristas de Agrios SA (AVASA) y el IVIA se han suministrado plantas del híbrido triploide ForEII 96-058 (AVASA PRI-43) para la multiplicación del mismo y entrega a todos sus viveros asociados.

Tabla I.1. Híbridos triploides de mandarina obtenidos en el IVIA.

Parental femenino	Parental masculino	Híbrido triploide
Mandarino `Fortune´ diploide	Tangor `Murcott´ diploide	ForMur 96-019
		ForMur 96-023
		ForMur 96-081
		ForMur 96-086
Mandarino `Fortune´ diploide	Tangor `Ellendale´ diploide	ForEII 96-023
		ForEII 96-058
		ForEII 96-060
Mandarino `Fortune´ diploide	?	For? 95-087
		For? 95-097
Mandarino `Fortune´ diploide	Mandarino `Kara´ diploide	ForKar 96-037
		ForKar 96-073
Mandarino `Fortune´ diploide	Mandarino `Común´ diploide	ForMco 96-086
Clementina `Willits Newcom´ diploide	?	Cwn? 95-001
Clementina `Hernandina´ diploide	Tangelo `Orlando´ tetraploide	HerOrIT 97-047

En cítricos la obtención de híbridos triploides se puede abordar mediante diferentes estrategias como la hibridación somática entre protoplastos haploides y diploides, cultivo de endospermos *in vitro* y mediante hibridación sexual entre parentales diploides y entre parentales diploides e interploides.

La hibridación somática mediante fusión de protoplastos haploides y diploides es una técnica desarrollada en los cítricos simultáneamente por Kobayashi *et al.* (1997) y Ollitrault *et al.* (2000). Esta técnica puede ser aplicada en genotipos apomícticos y no apomícticos si se dispone de callos embriogénicos haploides mientras que para la fusión de protoplastos haploides aislados de hoja con protoplastos diploides es necesario disponer de callos embriogénicos diploides obtenidos generalmente de genotipos apomícticos. La gran limitación de esta técnica es la dificultad en la obtención de plantas y/o callos haploides de cítricos. Esta limitación podría ser evitada mediante la hibridación gametosomática. En cítricos Deng *et al.* (1992) utilizaron por primera vez esta técnica y

regeneraron plantas quiméricas con 18 y 19 cromosomas. Esta técnica permite obtener híbridos somáticos triploides con toda la información genética nuclear del genotipo diploide sin segregación y recombinación. La segregación puede ocurrir a nivel del genoma citoplasmático, pudiéndose producir diferentes tipos de interacción núcleo citoplasma (Ollitrault *et al.* 2007a).

El cultivo de endospermos *in vitro* obtenidos a partir de hibridaciones sexuales entre parentales diploides es una técnica que permite superar las barreras originadas en la hibridación sexual como consecuencia de la poliembrionía nucelar. La obtención de plantas triploides mediante esta técnica en cítricos ha sido descrita por Gmitter *et al.* (1990) pero presenta un punto crítico y es la enorme dificultad en la regeneración de brotes o embriones a partir de callos obtenidos por el cultivo de endospermo *in vitro* (Jaskani *et al.* 1996). Las plantas triploides obtenidas mediante ésta tecnología presentan un alto nivel de homocigosidad (refiriéndose a los alelos duplicados para cada *locus*) y la segregación y recombinación ocurre tanto a nivel del parental femenino como del masculino (Ollitrault *et al.* 2008).

En los cítricos se pueden obtener híbridos triploides mediante hibridaciones entre parentales diploides debido a la producción de megagametófitos no reducidos (Esen y Soost, 1971a, 1973; Geraci *et al.* 1975). En este tipo de hibridación los parentales femeninos utilizados son genotipos no apomícticos y la producción de megagametófitos no reducidos es una característica que depende del genotipo utilizado como parental femenino (Esen y Soost, 1971a, 1973; Geraci *et al.* 1975). Cuando se utilizan genotipos apomícticos como parentales femeninos los embriones sexuales triploides se encuentran junto a los embriones diploides nucleares que impiden y restringen el desarrollo de aquellos, limitando el uso práctico de los genotipos apomícticos como parentales femeninos (Geraci *et al.* 1977; Wakana *et al.* 1981). Para evitar esta problemática, Geraci *et al.* (1977) propusieron aplicar la técnica del rescate y cultivo de embriones *in vitro* en frutos inmaduros, aunque la utilización de genotipos apomícticos en programas de obtención de híbridos triploides no ha tenido aplicación.

Luro *et al.* (2004) proponen que la formación de megagametófitos no reducidos en clementina es debido a una restitución de la segunda división meiótica (SDR) mientras que en naranjo dulce, Chen *et al.* (2008) proponen que el mecanismo implicado es una restitución de la primera división de la meiosis (FDR). Estos dos mecanismos genéticos implican que sólo una parte de la heterocigosidad materna se transmite al híbrido triploide y que el grado de heterocigosidad transmitida depende del número de entrecruzamientos que tengan lugar entre el centrómero y los *loci* considerados (Ollitrault *et al.* 2008).

La hibridación sexual entre parentales interploides ($2x \times 4x$ y $4x \times 2x$) es otra metodología que permite obtener híbridos triploides en cítricos (Cameron y Soost, 1968; Esen y Soost, 1971a, 1971b; Oiyama *et al.* 1981; Starrantino y Recupero, 1981; Navarro *et al.* 2002).

Sin embargo, la obtención de grandes poblaciones de híbridos triploides mediante hibridación sexual no se ha podido realizar hasta los últimos años por tres razones principales:

1. Los embriones triploides se encuentran en semillas parcialmente abortadas que raramente germinan en condiciones de invernadero o campo.
2. El análisis del nivel de ploidía por métodos histológicos es muy lento y poco eficaz.

3. La existencia de muy pocos genotipos tetraploides que puedan usarse como parentales en hibridaciones interploides.

La aplicación de técnicas biotecnológicas basadas en el cultivo *in vitro* y en la citometría de flujo han permitido solucionar estos problemas y establecer a gran escala programas de obtención de híbridos triploides. El rescate y cultivo de embriones es una técnica de cultivo *in vitro* mediante la cual los embriones triploides que se encuentran en el interior de semillas de pequeño tamaño, se aíslan y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, favoreciendo la germinación del embrión y su conversión a planta entera (Starrantino y Recupero, 1981; Ollitrault *et al.* 1996b; Navarro *et al.* 2002).

La citometría de flujo permite determinar el nivel de ploidía de forma rápida y precisa, lo que posibilita analizar un gran número de plantas en poco tiempo (Ollitrault y Michaux-Ferriere, 1992).

Los híbridos triploides de cítricos, dependiendo del tipo de hibridación, se encuentran en diferentes tipos de semillas. En las hibridaciones entre parentales diploides, Esen y Soost (1971a) describieron que en las semillas entre 1/3 y 1/6 más pequeñas que las normales se encontraban los embriones triploides. Los mismos autores, en otro trabajo publicado en el mismo año (1971b), describen la formación de semillas normales y semillas parcialmente desarrolladas en hibridaciones entre genotipos diploides con genotipos tetraploides. A partir de las semillas normales obtuvieron plantas triploides mientras que a partir de las semillas parcialmente desarrolladas no regeneraron plantas ya que los embriones contenidos en estas semillas no germinan en condiciones de invernadero. Sin embargo, Starrantino y Recupero (1981) aplicando la técnica de rescate y cultivo de embriones *in vitro* consiguieron regenerar plantas triploides a partir de este tipo de semillas. En hibridaciones $4x \times 2x$, Cameron y Burnett (1978) y Esen *et al.* (1978) realizaron una clasificación visual de las semillas obtenidas en función de su tamaño, pero no precisaron el nivel de ploidía de las plantas obtenidas a partir de cada tipo de semilla.

En la bibliografía hay una importante escasez de datos y referencias que establezcan comparaciones entre las hibridaciones $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ en las diferentes etapas del cultivo *in vitro* de los embriones originados así como en la eficiencia en la obtención de híbridos triploides en función del tipo de hibridación. En los Capítulos 4 y 5 se describen los diferentes factores que influyen en la obtención de híbridos triploides mediante hibridación sexual.

La obtención de plantas tetraploides se puede abordar mediante distintas técnicas. En los genotipos apomícticos se producen tetraploides espontáneos por duplicación de células de la nucela (Cameron y Frost, 1968). En consecuencia es posible obtener e identificar tetraploides espontáneos analizando por citometría de flujo elevado número de plantas procedentes de semillas. En el Capítulo 2 se describe detalladamente esta característica.

Gmitter y Ling (1991) obtuvieron plantas tetraploides de naranjo dulce y tangelo 'Orlando' mediante el cultivo de óvulos *in vitro* en presencia de colchicina. Wu y Mooney (2002) también obtuvieron plantas tetraploides del tangor 'Umatilla' mediante el cultivo de óvulos *in vitro* en presencia de colchicina. Este método es muy errático y en muchas ocasiones no proporciona los resultados esperados. No obstante, en nuestro laboratorio, se han obtenido tetraploides de dos genotipos de mandarina, 'Nova' y 'Salteñita', de naranjo dulce, 'Pineapple' y 'Washington Navel' y de pomelo 'Star Ruby' (Navarro *et al.* datos no publicados).

La hibridación somática proporciona una vía adecuada para la producción de parentales alotetraploides, de modo que puedan ser empleados en hibridaciones para la obtención de híbridos triploides. Existen ejemplos de triploides obtenidos a partir de hibridaciones sexuales entre genotipos diploides e híbridos somáticos alotetraploides. Se ha descrito el cruzamiento entre un clementino y un híbrido somático intergenérico obtenido al fusionar protoplastos de naranjo dulce con protoplastos de *P. trifoliata* (Ohgawara *et al.* 1985), y la posterior regeneración de triploides mediante el cultivo *in vitro* de los embriones inmaduros de las semillas abortadas (Oiyama *et al.* 1991a). Así mismo, se ha descrito la obtención de triploides mediante el rescate y cultivo de embriones *in vitro* a partir de hibridaciones sexuales entre tres especies de zamboa y una de mandarina (como parental femenino) con un híbrido somático tetraploide entre naranjo dulce y limón rugoso (Deng *et al.* 1995). En Italia se está desarrollando un programa de obtención de híbridos triploides de limonero mediante la hibridación sexual entre genotipos diploides con híbridos somáticos tetraploides (Tusa *et al.* 1996).

El tratamiento *in vivo* de yemas axilares con colchicina es otra técnica que se ha utilizado en cítricos para intentar obtener tetraploides (Barret, 1974, Oiyama y Okudai, 1986; Jaskani *et al.* 1996), pero la mayoría de plantas obtenidas son citoquimeras sin valor para la mejora. En el Capítulo 3 se comentan ampliamente estos métodos.

Objetivos

OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es mejorar y caracterizar los métodos de obtención de híbridos triploides de cítricos y está enmarcado dentro del programa de mejora genética de mandarino que está realizando nuestro grupo de trabajo dirigido por el Dr. L. Navarro en el IVIA. Para ello se plantean los siguientes objetivos generales: (i) obtener nuevos parentales para la obtención de híbridos triploides, (ii) comparar los diferentes métodos de obtención de plantas triploides mediante hibridación sexual y estudiar las implicaciones de los mismos en la biología reproductiva de los cítricos y (iii) la identificación con marcadores moleculares de híbridos triploides de mandarino seleccionados.

Este objetivo general se desarrolla en seis objetivos específicos, cada uno presentado en un capítulo del trabajo:

1. Obtención de plantas y/o callos haploides de clementina 'Clemenules' mediante ginogénesis *in situ* inducida por polen irradiado, que puedan ser utilizadas como fuente de protoplastos haploides para la producción de híbridos somáticos alotriploides mediante técnicas de hibridación somática.

2. Obtención de plantas tetraploides en diferentes genotipos apomícticos de mandarino, naranjo dulce y pomelo, que puedan ser utilizados como parentales masculinos en hibridaciones interploides $2x \times 4x$ para la obtención de híbridos triploides.

3. Obtención de plantas tetraploides de genotipos no apomícticos de mandarino que puedan ser utilizados como parentales masculinos y femeninos en hibridaciones interploides $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ mediante tratamientos con colchicina y orizalina de ápices caulinares y regeneración de plantas mediante la técnica de microinjerto *in vitro*.

4. Comparar los diferentes métodos de obtención de híbridos triploides de mandarino mediante hibridación sexual así como caracterizar los diferentes tipos de semillas que se originan en cada tipo de hibridación, determinar el nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de cada tipo de semilla y discutir las implicaciones de los diferentes tipos de hibridación a nivel de la diversidad genotípica teórica de las poblaciones triploides obtenidas.

5. Determinar el origen genético de las plantas regeneradas a partir de los embriones múltiples originados en hibridaciones entre parentales femeninos no apomícticos diploides y parentales masculinos tetraploides.

6. Establecer un perfil molecular mediante marcadores microsatélites de diferentes selecciones de híbridos triploides de mandarino.

Capítulo 1. Obtención de plantas haploides, dobles haploides y aneuploides de Citrus clementina Hort. ex Tan. Caracterización molecular, morfológica e histológica

CAPÍTULO 1. OBTENCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES, DOBLES HAPLOIDES Y ANEUPLOIDES DE CITRUS CLEMENTINA HORT. EX TAN. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, MORFOLÓGICA E HISTOLÓGICA.

1.1 INTRODUCCIÓN.

Las plantas haploides ($2n = x = 9$) de cítricos pueden ser utilizadas como parentales para la obtención de híbridos triploides mediante fusión de protoplastos (Kobayashi *et al.* 1997; Ollitrault *et al.* 2000). Esta técnica permite la obtención de híbridos triploides entre parentales apomícticos, estériles y/o sexualmente incompatibles.

Ollitrault *et al.* (2000) obtuvieron híbridos somáticos triploides al fusionar eléctricamente protoplastos aislados de dos callos haploides de clementina 'Fina' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) con protoplastos de callos diploides de ocho genotipos (mandarinos 'Común' (*C. deliciosa* Ten.), 'Kinnow' (*C. nobilis* x *C. deliciosa*) y 'Sunki' (*C. sunki* Hort. et Tan.), tangor 'Murcott' (*C. reticulata* x *C. sinensis*), naranjo dulce 'Shamouti' y 'Valencia Late' (*C. sinensis* (L.) Osb.), pomelo 'Star Ruby' (*C. paradisi* Macf.) y lima 'Mexicana' (*C. aurantifolia* Christm. Swing.) y con protoplastos aislados de mesófilo de hoja del kumquat 'Marumi' (*Fortunella* spp.). Los dos callos haploides fueron obtenidos mediante ginogénesis *in situ* inducida por polen irradiado (Ollitrault *et al.* 1996a) y los callos diploides a partir del cultivo de óvulos *in vitro*. Obtuvieron plantas triploides y tetraploides en todas las combinaciones, y además también obtuvieron un número reducido de plantas pentaploides. El análisis genético realizado con isoenzimas confirmó que todas las plantas obtenidas eran híbridos somáticos. Los autores sugirieron que la variabilidad en el nivel de ploidía de las plantas regeneradas pudo ser debido a la inestabilidad en el nivel de ploidía de los callos haploides.

Kobayashi *et al.* (1997) también obtuvieron híbridos triploides al fusionar eléctricamente protoplastos haploides aislados de hojas de clementino con protoplastos diploides procedentes de callos nucelares de satsuma y naranja dulce. Las plantas haploides fueron obtenidas por ginogénesis *in situ* al polinizar flores de clementina con granos de polen de un híbrido triploide japonés obtenido al polinizar *C. medioglobosa* Hort. ex Tan. diploide con *C. funadoko* Hort. ex Tan. tetraploide (Oiyama y Kobayashi, 1993). Regeneraron plantas en todas las combinaciones realizadas, obteniendo plantas diploides y triploides. El análisis genético realizado con marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) demostró que las plantas diploides fueron regeneradas a partir de protoplastos de callo no fusionados mientras que las plantas triploides eran híbridos somáticos.

La gran limitación de esta estrategia es el bajo rendimiento y la escasez y dificultad en la obtención de callos y/o plantas haploides que puedan ser utilizadas como material vegetal de partida para el aislamiento de protoplastos.

En los últimos años, el desarrollo de la genómica estructural ha creado un nuevo interés en la obtención de plantas haploides. La utilización de líneas totalmente homocigotas o líneas monoploides presenta una mayor ventaja para la realización de proyectos de secuenciación así como para el análisis del número de copias de genes candidatos.

La obtención de plantas haploides y dobles haploides a partir de embriogénesis gamética permite obtener en un solo paso líneas 100 % homocigotas, mientras que por métodos tradicionales, en especies leñosas, se necesitan muchas generaciones de retrocruzamientos, mucho tiempo y no se obtienen plantas totalmente homocigotas (Germanà, 2006). Además, las plantas haploides y dobles haploides son el material vegetal adecuado para realizar experimentos de mutagénesis y de transformación genética y juegan un papel muy importante en la integración de mapas genéticos y físicos, ya que aumenta la precisión en el etiquetado de genes candidatos (Forster *et al.* 2007).

Las especies comerciales de cítricos se caracterizan por una elevada heterocigosidad (Ollitrault y Faure, 1992; Herrero *et al.* 1995), lo que dificulta la fase de acoplamiento en los programas de secuenciación de grandes fragmentos del genoma. Esta dificultad se ha puesto de manifiesto recientemente en un trabajo de secuenciación (1.2X) del genoma de naranja dulce (Roose *et al.* 2007). El CIGC, decidió en 2007, realizar la secuenciación del genoma de una planta de cítricos totalmente homocigota. Considerando el largo periodo juvenil, y que en la mayoría de los casos la autoincompatibilidad hace prácticamente imposible la obtención de plantas 100 % homocigotas por métodos tradicionales, se decidió seleccionar una planta haploide de clementina, *Citrus clementina* Hort. ex Tan, debido a la existencia de un gran número de datos moleculares (Forment *et al.* 2005; Luro *et al.* 2007; Terol *et al.* 2007b) y diferentes plantas haploides obtenidas en Francia (Ollitrault *et al.* 1996a), Italia (Germanà *et al.* 2005) y España (el presente trabajo).

En cítricos la mayoría de los esfuerzos en la obtención de plantas haploides se ha realizado a partir del cultivo de anteras. Dira y Benbadis (1975) obtuvieron callo haploide de limonero (*C. limon* (L.) Burm F.). Hidaka *et al.* (1979) fueron los primeros en obtener plantas haploides y aneuploides de *Poncirus trifoliata* L. Raf. Posteriormente se obtuvieron plantas haploides de calamondin (*C. maduriensis* Lour.) (Chen *et al.* 1980), naranjo dulce (Hidaka y Kajiura, 1989), clementina y tangelo 'Mapo' (*C. deliciosa* x *C. paradisi*) (Germanà y Reforgiato-Recupero, 1997). Además, Deng *et al.* (1992) regeneraron por primera vez un doble haploide de un híbrido de *C. reticulata* 'Bendizao' x *C. ichangiensis* y posteriormente Germanà *et al.* (2000) obtuvieron plantas dobles haploides de clementina 'Clemenules'.

Mediante ginogénesis y posterior rescate y cultivo de embriones *in vitro* ha sido posible obtener plantas haploides de frutales como *Actinida deliciosa* (Pandey *et al.* 1990), *Malus domestica* (L.) Borkh (Zhang y Lespinasse, 1991) y *Pyrus comunis* (L.) (Bouvier *et al.* 1993). En cerezo (Höfer y Grafe, 2003) y kiwi (Pandey *et al.* 1990) se han obtenido plantas dobles haploides espontáneas por vía ginogenética.

En cítricos, también se han obtenido plantas haploides por vía ginogenética. En polinizaciones 2x X 2x, Esen y Soost (1971a) mencionan en su trabajo la obtención de una planta con 9 cromosomas en una hibridación entre clementina y tangelo 'Pearl' (*C. paradisi* x *C. reticulata*). Toolapong *et al.* (1996) obtuvieron una planta haploide espontánea de zamboa 'Banpeiyu' (*C. grandis* (L.) Osb.) en una hibridación entre dicha zamboa y el pomelo 'Ruby Red'. A partir de polinizaciones 2x X 3x, Oiyama y Kobayashi (1993), regeneraron plantas haploides de clementina y del tangor 'Lee' (*C. reticulata* x *C. sinensis*) al polinizarlas con un híbrido triploide japonés. Posteriormente, Germanà y Chiancone (2001) obtuvieron plantas haploides de clementina 'Clemenules' al polinizar pistilos

cultivados *in vitro* con el híbrido triploide 'Oroblanco' (*C. grandis* x *C. paradisi*). La polinización con polen irradiado ha sido otra técnica utilizada para la obtención de plantas haploides. Ollitrault *et al.* (1996a) polinizaron flores de clementina 'SRA 63' con polen irradiado de limonero 'Meyer' (*C. meyeri* Y. Tan.) y obtuvieron plantas y callos embriogénicos haploides. Posteriormente, Froelicher *et al.* (2007), utilizando la misma técnica, obtuvieron plantas haploides de clementina, mandarino 'Fortune' (*C. clementina* x *C. tangerina*) y tangor 'Ellendale' (*C. reticulata* x *C. sinensis*).

En este trabajo se presenta la obtención y el análisis genético de distintos genotipos haploides, un genotipo aneuploide y por primera vez un genotipo doble haploide de clementina 'Clemenules' obtenido a partir de la ginogénesis *in situ* inducida por polen irradiado. Además se presenta el primer genotipo haploide de clementina 'Clemenules' de crecimiento vigoroso y capaz de florecer, junto con un estudio histológico de la flor de dicho genotipo haploide comparado con la clementina 'Clemenules' diploide del Banco de Germoplasma del IVIA y una caracterización molecular del mismo. Este genotipo ha sido seleccionado por el CIGC para establecer la secuencia de referencia completa del genoma nuclear de cítricos.

1.2 MATERIAL Y MÉTODOS.

1.2.1 Material vegetal.

Se utilizó la clementina 'Clemenules' como parental femenino y el mandarino 'Fortune' como donante de polen por su compatibilidad con el grupo de las clementinas y su elevada capacidad polinizadora. Los dos genotipos utilizados pertenecen al Banco de Germoplasma del IVIA.

1.2.2 Obtención de polen e irradiación.

Se recolectaron flores de mandarino 'Fortune' en estado fenológico de preantésis. Las anteras se separaron del filamento estaminal con unas pinzas y posteriormente se introdujeron en un desecador con silicagel como agente desecante hasta que se observó la completa dehiscencia de las tecas de las anteras (24 - 48 h). En este estadio las anteras se irradiaron en las instalaciones de la empresa Aragamma (Ctra. Granollers a Cardedeu, km 3.5, Les Franqueses del Vallès, Barcelona) con rayos gamma a una dosis única de 500 Gy procedentes de una fuente de Cobalto 60.

1.2.3 Polinización y recolección de frutos.

Las polinizaciones se realizaron en mayo del año 2000 el mismo día de la irradiación, en las instalaciones cubiertas con malla antiinsectos de AVASA. Se polinizaron manualmente 350 flores de clementina 'Clemenules', colocando una antera irradiada en el estigma de cada flor. Los frutos se recolectaron cuando alcanzaron la madurez.

1.2.4 Extracción de semillas y rescate de embriones.

Las semillas (figura 1.1.a.) se recolectaron de los frutos maduros y posteriormente se esterilizaron superficialmente con hipoclorito sódico al 0,5 % de cloro activo durante 10 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada.

Los embriones (figura 1.1.b.) se extrajeron en condiciones asépticas con la ayuda de un microscopio estereoscópico y se cultivaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro en un medio que contenía las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 50 g/L de sacarosa, 500 mg/L de extracto de malta, vitaminas de Murashige y Tucker (1969) y 8 g/L de agar.

En los casos en los que el cultivo *in vitro* del embrión dio lugar a callos embriogénicos (figuras 1.1.c y 1.1.d), éstos se cultivaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro en un medio de cultivo compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 40 g/L de sacarosa, 500 mg/L de extracto de malta, 100 mg/L de myo-inositol, 1 mg/L de ácido nicotínico, 1 mg/L de piridoxina, 0,2 mg/L de tiamina y 1,8 g/L de gelrite. Los embriones que se obtuvieron a partir de estos callos embriogénicos se repicaron a un medio de cultivo compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 50 g/L de sacarosa, 500 mg/L de extracto de malta, vitaminas de Murashige y Tucker (1969), 100 mg/L de myo-inositol, 0,02 mg/L de ácido α -naftalenacético, 1 mg/L de ácido giberélico y 8 g/L de agar.

El cultivo se realizó en cámara de cultivo a temperatura constante de 27 °C con una iluminación de 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

1.2.5 Regeneración de plantas y trasplante a maceta.

Los embriones germinados no desarrollaron sistema radical o desarrollaron un sistema radical con raíces débiles y poco vigorosas, siendo inviable el trasplante directo a maceta, por lo cual para la regeneración de plantas se utilizó la técnica de microinjerto (Navarro y Juárez, 2007). Los brotes producidos por los embriones se microinjertaron sobre plántulas obtenidas por la germinación *in vitro* de semillas de citrange 'Troyer' (*C. sinensis* x *P. trifoliata*). Las semillas se pelaron eliminando los tegumentos y se esterilizaron superficialmente con una solución acuosa de hipoclorito sódico al 0,5 % (v/v) con 0,1 % (v/v) de Tween 20 durante 10 minutos y se lavaron cuatro veces con agua desionizada estéril para eliminar los restos de la solución esterilizante. Las semillas se sembraron en tubos de ensayo que contenían medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962) y agar al 1 % y se incubaron en oscuridad a 27 °C durante aproximadamente dos semanas. Cuando las plántulas tuvieron entre 3 - 5 cm de altura se sacaron del tubo de ensayo en condiciones asépticas y se cortó el extremo de la raíz, dejando 4 - 6 cm de la misma, se eliminaron los cotiledones y sus yemas axilares y se decapitaron dejando aproximadamente 1,5 cm de epicotilo. Posteriormente se realizó una incisión en forma de cuña sobre la que se insertó un pequeño brote, de aproximadamente 3 - 4 mm, obtenido a partir de los brotes producidos por la germinación de los embriones (figuras 1.1.e, 1.1.f, 1.1.g y 1.1.h).

En todos los casos las plantas microinjertadas se cultivaron en un medio líquido compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962), 0,2 mg/L de clorhidrato de tiamina, 1 mg/L de clorhidrato de piridoxina, 1 mg/L de ácido nicotínico y 75 g/L de sacarosa. Los cultivos se mantuvieron a temperatura constante de 27 °C, expuestos durante 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con una intensidad luminosa de 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las plantas obtenidas se trasplantaron a macetas que contenían un sustrato compuesto por una mezcla de tres partes de turba (negra/rubia, mezcla 1:1) por una parte de perlita y esterilizado por vapor de agua a 100 °C durante 1 h. Las macetas se introdujeron en bolsas de polietileno transparente que se cerraron y se colocaron en una zona sombreada del invernadero entre 18 - 25 °C, eliminándose la bolsa al cabo de 15 - 20 días.

1.2.6 Determinación del nivel de ploidía.

La determinación del nivel de ploidía se realizó mediante citometría de flujo. Cada muestra estaba constituida por un fragmento de hoja, de aproximadamente 0,5 cm², de una planta control de ploidía conocida (diploide o triploide) y por un fragmento de hoja, de las mismas dimensiones, de la planta problema. Para la determinación del nivel de ploidía de los callos embriogénicos, se tomaron dos tipos de muestras. Una muestra estaba formada por una porción de callo, sin hoja control, y la otra muestra estaba originada por una porción de callo junto a un fragmento de hoja de la planta control.

Cada muestra se troceó finamente con la ayuda de una cuchilla y unas gotas de tampón de extracción de núcleos (‘High resolution DNA kit type P, solution A; Partec®). A continuación se le añadió 1 mL del tampón de extracción de núcleos, se filtró la muestra a través de una malla de 35 μm y se añadió aproximadamente 5 veces el volumen que contenía la solución de extracción de núcleos con 4', 6-diamidino-2-fenil indol diclorhidrato (DAPI) (‘High solution DNA kit type P, solution B’; Partec®). Con 2 mL, aproximadamente, de la solución con los núcleos teñidos se procedió al análisis en el citómetro de flujo (Ploidy Analyzer, PA, Partec®), provisto de una lámpara de mercurio HBO 100W (Osram®) con emisión ultravioleta y filtros KG1 y BG38. El histograma de intensidad de fluorescencia obtenido se evaluó mediante el uso del programa informático DPAC v2.0, Partec®, incorporado en el propio citómetro. Para cada análisis este programa determina el número de núcleos analizados (particles), la posición relativa de los picos, el coeficiente de variación del análisis (CV %) y el índice de ploidía relativo (index) de las muestras analizadas (figuras 1.2, 1.3 y 1.4).

1.2.7 Análisis genético.

El análisis genético se realizó con marcadores microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats). La extracción del ADN genómico se realizó según Dellaporta y Hicks (1983). Se analizaron genéticamente las plantas obtenidas con los *loci* microsatélites heterocigóticos para clementina TAA 41, CAC 15 (Kijas *et al.* 1997), Ci03C08, Ci05A05 y Ci07C07 (Froelicher *et al.* 2008). Posteriormente se analizaron la clementina ‘Clemenules’ y el mandarino ‘Fortune’ junto a la planta haploide 5.1.2, la

planta diploide 5.2.1 y la planta aneuploide 2.4.1 con 35 nuevos *loci* microsatélites (tabla 1.1), descritos por Froelicher *et al.* (2008) y Luro *et al.* (2008), que presentan una amplia distribución en el mapa genético de clementina descrito por Luro *et al.* (2007) (figura 1.5).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador Termocycler ep gradient S de Eppendorf. El volumen final de reacción fue de 17 μ L, compuesta por 0,8 U de Taq polimerasa (NEED), tampón de reacción 750 mM Tris HCl (pH 9) 50 mM KCl 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,001 % BSA, 30 ng de ADN, 1,25 mM de cada dNTP premezclados, 5 mM de MgCl_2 y 5 μ M de cada pareja del cebador. El programa de PCR utilizado constaba de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de: 94 °C durante 1 min, 50 - 55 °C, dependiendo de la pareja de cebadores utilizada, durante 30 s y 72 °C durante 1 min. Extensión final a 72 °C durante 10 min. A cada producto de PCR se le añadió un volumen de 17 μ L de tampón de carga (98 % formamida, 10 mM EDTA, 0,25 % (p/v) azul de bromofenol, 0,25 % xylene cyanol). Las muestras fueron desnaturalizadas a 94 °C durante 10 minutos.

La separación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de acrilamida-bis acrilamida al 6 %, urea 7 M y tampón de electroforesis TBE 0,5X (Tris, ácido bórico y EDTA 0,5 M, pH 8) en cubetas DCode™ de Biorad. Las condiciones de electroforesis fueron 350 V, 90 mA y temperatura constante de 55 °C.

Los fragmentos amplificados se detectaron mediante tinción con plata según el protocolo descrito por Benbouza *et al.* (2006): 5 min en una solución de etanol al 10 % y ácido acético al 0,5 % a 4° C, 7 minutos en una solución de AgNO_3 al 0,15 % y formaldehído al 0,2 %, un lavado con agua destilada, 5 - 10 minutos en una solución de NaOH al 1,5 % y formaldehído al 0,15 % y para finalizar el proceso de tinción, 3 min en la solución inicial.

1.2.8 Conteo de cromosomas.

El conteo de los cromosomas se realizó según la metodología descrita por D'Hont *et al.* (1996) basada en la fijación del tejido, aislamiento de protoplastos y tinción con DAPI (High solution DNA kit type P, solution B'; Partec®). Se recolectaron ápices y pequeñas hojas procedentes de brotes vegetativos en crecimiento activo de la planta haploide 5.1.2, de la planta diploide 5.2.1 y de la planta aneuploide 2.4.1.1 establecidas en invernadero. El material vegetal se sumergió en una solución al 0,04 % de 8-hidroxiquinoleína durante 8 h (4 h a temperatura ambiente y 4 h a 4 °C). Posteriormente se fijó durante 48 h en una solución de etanol y ácido acético (3/1) y finalmente se depositó en una solución de etanol al 70 % a 4 °C. Para la obtención de protoplastos se lavaron dos veces los tejidos fijados con agua destilada durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se hidrolizó en ácido clorhídrico 0,25 N durante 10 min a temperatura ambiente, lavándose de nuevo con agua destilada durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente se introdujo durante 10 min en un tampón de pH 4,5 compuesto por citrato trisódico dihidratado al 0,29 %, ácido cítrico monohidratado al 0,21 % y cloruro de potasio al 0,56 %. A las muestras de hoja se les eliminó el nervio central y a continuación se trocearon en pequeños fragmentos de 1 - 4 mm para facilitar la acción de las enzimas. La solución enzimática estaba compuesta por celulasa Onozuka R-10 (Yakult

Honsha Co. Ltd., Japón) al 5 % y pectoliasa Y-23 (Seishin Pharmaceutical Ltd., Japón) al 1 % disueltas en el tampón descrito anteriormente. La digestión se realizó a 37° C durante 25 - 45 min, dependiendo de la muestra. A continuación se realizó un lavado con agua destilada para detener la acción de las enzimas. Las preparaciones para el conteo de los cromosomas se realizaron tomando ápices o fragmentos de hoja que se depositaron sobre un portaobjetos que contenía una gota de fijador (3/1 etanol - ácido acético). Posteriormente con ayuda de unas pequeñas pinzas se distribuyó la muestra por toda la superficie del portaobjetos. La tinción se realizó con DAPI, colocando una gota sobre el portaobjetos y cubriéndolo con un cubreobjetos. Las observaciones se realizaron con luz ultravioleta en un microscopio Nikon Eclipse E800.

1.2.9 Caracterización morfológica.

Se tomaron 30 hojas adultas de cada planta situadas en la zona intermedia de brotaciones de primavera. Se midió la superficie, anchura y longitud foliar. Las medidas se realizaron en un medidor de superficie foliar modelo Li-Cor 3100 C.

1.2.10 Caracterización histológica de anteras, ovarios, estilos y estigma de una planta haploide y diploide de clementina `Clemenules`.

Se tomaron 20 flores en estado fenológico de preantesis de clementina `Clemenules` diploide del Banco de Germoplasma y de la única planta haploide de clementina que floreció, el genotipo 5.1.2. De cada flor se fijaron por separado en FAA (formaldehído, ácido acético glacial y alcohol al 50 %) las anteras, ovarios, estilos y estigmas. Las muestras se incluyeron en parafina y se tiñeron con safranina y verde rápido según la metodología general descrita por Jensen (1962). Se analizaron veinte secciones, de la zona intermedia de cada órgano, de veinte órganos diferentes. Las observaciones se realizaron en un microscopio Nikon Eclipse E800.

En las anteras se midió, en un corte transversal de las mismas, las dimensiones máximas de anchura y altura, se contó el número de tecas que contenían sacos polínicos y el número de sacos polínicos con granos de polen. Se midió el diámetro de ovarios, estilos y estigmas realizando dos medidas perpendiculares y se contó el número de lóculos por ovario y el número de óvulos por sección histológica.

1.2.11 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) jerarquizado (genotipo jerarquizado a ploidía) para cada uno de los caracteres medidos, aplicando la transformación raíz cuadrada ($\sqrt{\cdot}$) para la variable área (cm^2). El modelo utilizado fue $x_{ijk} = \mu + P_i + (G)_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$, donde μ es la media general, P_i corresponde al nivel i -ésimo de ploidía, $G_{j(i)}$ es el genotipo j dentro del nivel i de ploidía y $\epsilon_{k(ij)}$ es la k -ésima medida correspondiente al genotipo j con $i = 1, \dots, 5$ y $j = 1, \dots, 4$. Posteriormente se compararon las medidas de interés ajustadas mediante la corrección de Bonferroni.

Se verificó la normalidad de las variables mediante la prueba de Kolmogorov y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía a todas las variables analizadas entre las anteras, ovarios, estilos y estigmas del genotipo haploide 5.1.2 y la clementina 'Clemenules' diploide. El modelo utilizado fue $x_{ij} = \mu + G_i + \varepsilon_{ij}$, donde μ es la media general, G_i corresponde al genotipo i -ésimo y $\varepsilon_{k(i)}$ a la medida j -ésima correspondiente al genotipo i con $i = 1, 2$.

1.3 RESULTADOS.

1.3.1 Obtención de frutos, semillas y rescate de embriones.

Se polinizaron 350 flores de clementina 'Clemenules' y cuajaron el 77 % obteniéndose un total de 270 frutos que contenían 1.744 semillas de aproximadamente 4 - 5 mm de longitud (figura 1.1.a), de las que el 2,9 % contenían embriones (figura 1.1.b). Se cultivaron un total de 51 embriones, de los cuales 13 evolucionaron en cultivo *in vitro*, bien mediante la germinación directa del embrión sin fase de callo o bien a través de la formación de callo embriogénico (figuras 1.1.c, 1.1.d, 1.1.e y 1.1.f). A partir de la germinación directa del embrión y posterior microinjerto *in vitro* de brotes se obtuvieron 9 plántulas. También se obtuvieron 4 callos embriogénicos (tabla 1.2) que produjeron un total de 96 embriones, de los cuales se regeneraron 16 plántulas mediante la técnica de microinjerto *in vitro*.

1.3.2 Nivel de ploidía.

De las 9 plántulas obtenidas a partir de la germinación directa de los embriones sin fase de callo, 8 fueron haploides (figura 1.2) y una fue diploide. El nivel de ploidía de 3 de los 4 callos obtenidos (tabla 1.2) fue haploide, mientras que uno fue aneuploide. Las 12 plantas obtenidas a partir de los callos haploides 2.3 y 7.3 fueron haploides. Del callo haploide 5.2.1 se regeneró 1 planta diploide (figura 1.3) mientras que del callo aneuploide 2.4 se regeneraron 3 plantas aneuploides (figura 1.4).

1.3.3 Trasplante a maceta.

De las 8 plantas haploides obtenidas a partir de la germinación directa del embrión sin fase de callo, 4 fueron establecidas en invernadero, mientras que las otras 4 murieron en la fase del trasplante. La planta diploide también murió en la fase de trasplante. 13 de las 16 plántulas obtenidas a partir de callo fueron aclimatadas en invernadero, 9 haploides, 3 aneuploides y 1 diploide.

1.3.4 Análisis genético.

Se analizaron genéticamente, con 5 *loci* microsatélites heterocigóticos para clementina, la clementina 'Clemenules' diploide del Banco del Germoplasma, el mandarino 'Fortune', 13 plantas haploides (9 procedentes de callo y 4 de la germinación directa de los embriones), 1 planta diploide y 3 plantas aneuploides procedentes de callo (tabla 1.1). Para cada *locus*, todas las plantas haploides presentaron un solo alelo. El mismo se observó en la planta diploide 5.2.1.

Todas las plantas obtenidas a partir de cada callo mostraron el mismo perfil para los 5 *loci*. Sin embargo, para los *loci* Ci03C08, CAC 15 y TAA 15 (figura 1.6) se observó una restitución de la heterocigosidad en las plantas aneuploides.

Posteriormente la planta haploide 5.1.2, la planta diploide 5.2.1 y la planta aneuploide 2.4.1.1, se analizaron con otros 35 marcadores microsatélites para precisar su origen y estructura genética.

La clementina 'Clemenules' es heterocigótica para todos los *loci* microsatélites utilizados excepto para Ci02G12 y Ci07A12. Para estos dos *loci*, junto con los *loci* TAA 15, TAA 41, Ci03C08, Ci05A05, Mest 132, Mest 402 y Mest 488 'Fortune' presenta un alelo específico que no tiene la clementina 'Clemenules' ni las plantas haploide, diploide y aneuploide analizadas (figura 1.7).

En la planta haploide 5.1.2 y la planta diploide 5.2.1, para todos los *loci* analizados, no se observó en ningún caso restitución de la heterocigosidad y siempre presentó un único alelo de clementina 'Clemenules', lo cual sugiere su origen ginogenético. En el caso de la planta diploide 5.2.1 obtenida a partir de un callo haploide, se puede concluir que es un doble haploide que se originó como consecuencia de una duplicación del número de cromosomas en la fase de callo. Sin embargo la planta aneuploide, obtenida también a partir de callo, presenta un porcentaje de heterocigosidad del 58,5 %.

1.3.5 Conteo de cromosomas.

El conteo de los cromosomas realizado según la técnica descrita por D'Hont *et al.* (1996) mostró que la planta haploide tiene 9 cromosomas ($2n = x = 9$), la planta doble haploide tiene 18 cromosomas ($2n = 2x = 18$) y la planta aneuploide tienen 22 cromosomas ($2n = 2x+4 = 22$) (figuras 1.8.a, 1.8.b y 1.8.c).

1.3.6 Caracterización morfológica.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las variables analizadas según los diferentes niveles de ploidía (tabla 1.3). Las hojas con mayor área foliar media, 25,9 cm², las presentó el genotipo doble haploide, seguido de la clementina 'Clemenules' diploide del Banco de Germoplasma y el genotipo aneuploide con 19,4 y 4,0 cm² respectivamente. Los genotipos haploides tuvieron valores más pequeños, oscilando entre 2,1 y 3,0 cm² dependiendo del genotipo.

El genotipo doble haploide se caracterizó por tener las hojas más anchas (5,3 cm) seguida de la clementina 'Clemenules' diploide del Banco de Germoplasma y del genotipo haploide 7.5 con 3,2 y 2,0 cm respectivamente.

Respecto a la longitud foliar media, la clementina 'Clemenules' tuvo el mayor valor medio, 10,3 cm, y a continuación le siguió el genotipo doble haploide con 7,2 cm. Los genotipos haploides presentaron una longitud foliar media que osciló entre 2,3 y 4,6 cm, siendo el máximo valor similar a la longitud foliar media del genotipo aneuploide (4,4 cm).

1.3.7 Caracterización histológica.

La estructura histológica de las anteras del genotipo haploide 5.1.2 no presenta diferencias respecto a la estructura histológica de las anteras de clementina 'Clemenules' (figura 1.9). Sin embargo sí se observan diferencias en la anchura, altura, porcentaje de tecas con sacos polínicos y porcentaje de tecas con granos de polen (tabla 1.4). Las anteras haploides fueron un 58 % más estrechas y un 64 % menos altas que las diploides. Las tecas de las anteras diploides siempre poseían dos sacos polínicos con granos de polen mientras que sólo en cuatro anteras haploides se observó la presencia de un saco polínico con granos de polen rudimentarios. En las anteras haploides se observó la presencia de granos de polen mal formados en el 4,7 % de los casos, mientras que todas las diploides contenían granos de polen bien desarrollados.

En todos los ovarios analizados del genotipo haploide se observó una discontinuidad en el eje central, en los cuales las hojas carpelares no estaban fusionadas con el eje central (figura 1.10). El diámetro de los ovarios haploides (tabla 1.5) fue aproximadamente un 50 % más pequeño que los diploides y ambos presentaban la misma morfología externa. Los ovarios haploides presentaron una media de 8 lóculos por ovario mientras que los diploides contenían 10 lóculos. Los ovarios haploides tenían aproximadamente la mitad de óvulos que los ovarios diploides. Se observó que para el mismo estadio fenológico los óvulos haploides presentaban un menor crecimiento que los diploides. Los óvulos diploides estaban totalmente desarrollados, mientras que en la mayoría de los haploides el tegumento interior y el tegumento exterior no rodeaban totalmente a la nucela (figura 1.10).

La estructura histológica de los estilos y estigmas haploides y diploides fue similar (figuras 1.11 y 1.12). Los estilos haploides fueron entre un 46 – 48 % más pequeños que los diploides y los estigmas haploides fueron aproximadamente un 40 % más pequeños que los diploides (tabla 1.6).

1.4 DISCUSIÓN.

1.4.1 Eficiencia de la ginogénesis *in situ* inducida por polen irradiado.

Con una dosis de irradiación de 500 Gy, todas las semillas que se obtuvieron fueron entre un 30 y un 40 % aproximadamente más pequeñas que las semillas normales de clementina y el 2,9 % de las mismas contenían embrión. En trabajos anteriores, Ollitrault *et al.* (1996a) y Froelicher *et al.* (2007) observaron que conforme aumenta la dosis de irradiación, de 150 a 900 Gy, el número de

semillas normales por fruto disminuye, obteniendo únicamente semillas pequeñas, de las cuales un porcentaje muy bajo contenían embrión (2 % a 300 y 600 Gy y 5 % a 900 Gy) (Ollitrault *et al.* 1996a). Resultados similares se han obtenido en manzano, demostrando con estudios histológicos que los embriones obtenidos al polinizar flores con polen irradiado abortan al cabo de dos meses y por lo tanto cesan su desarrollo (Zhang y Lespinasse, 1991). El aborto de las semillas puede explicarse como consecuencia de un desarrollo anormal del endospermo (Yang *et al.* 2004).

En este trabajo se han obtenido 8 plantas haploides mediante la germinación directa del embrión y a partir de callos embriogénicos también se han obtenido 12 plantas haploides, 1 planta doble haploide y 3 plantas aneuploides. Ollitrault *et al.* (1996a) obtuvieron 9 plántulas haploides de clementina 'Clemenules' por la germinación directa del embrión, aunque estas plantas murieron durante la fase de trasplante. También obtuvieron dos callos haploides embriogénicos a partir de los cuales regeneraron plantas haploides injertando los brotes producidos por los embriones en patrones de un año de edad en invernadero. Froelicher *et al.* (2007) obtuvieron 3 plantas haploides de clementina, una planta haploide de mandarina 'Fortune' y una planta haploide del tanger 'Ellendale' a partir de la germinación directa del embrión. Sin embargo no obtuvieron callos embriogénicos.

La obtención de plantas haploides a partir de la germinación directa del embrión sin la formación de una fase intermedia de callo, es una característica muy importante para los trabajos de secuenciación del genoma, ya que disminuye la probabilidad de obtener variantes somaclonales. En este contexto, la ginogénesis inducida por polen irradiado es más adecuada que la androgénesis, puesto que la regeneración de plantas haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras implica la formación de callo embriogénico (Deng *et al.* 1992; Germanà y Reforgiato-Recupero, 1997; Germanà *et al.* 2000; Germanà, 2007) los cuales son susceptibles de producir mayores tasas de variación somaclonal (Deng y Hao, 2000). Además, la obtención de plantas haploides vía androgénesis está muy influenciada por el genotipo (Germanà, 2007) lo que requiere el diseño de medios de cultivo específicos para cada genotipo.

El cultivo *in vitro* de anteras es una técnica en la que la obtención de dobles haploides (Deng *et al.* 1992; Germanà *et al.* 2000) es una característica frecuente en comparación con la ginogénesis *in situ* inducida por polen irradiado. Esto puede ser debido a que la regeneración de plantas se produce a partir de callos embriogénicos en los que la duplicación del número de cromosomas es un fenómeno frecuente (Deng y Hao, 2000).

1.4.2 Origen de las plantas obtenidas.

Se han obtenido plantas haploides ($2n = x = 9$), aneuploides ($2n = 2x+4 = 22$) y un doble haploide ($2n = 2x = 18$) de clementina 'Clemenules'.

El análisis realizado con los marcadores microsatélites confirma el origen ginogenético de las plantas obtenidas, ya que en ningún caso se ha observado la presencia de alelos específicos de 'Fortune'. En *Nicotiana* (Pandey y Phung, 1982) y en *Arabidopsis* (Yang *et al.* 2004) se ha demostrado la introgresión de pequeños fragmentos del genoma del parental masculino en las plantas regeneradas, al polinizar flores del parental femenino con polen irradiado.

Las plantas aneuploides obtenidas tienen una probabilidad muy baja de ser híbridos con mandarino 'Fortune'. Considerando los marcadores SSR esta probabilidad es de $0,5^9 = 0,0019$ ya que no presentan ninguno de los 9 alelos específicos de mandarino 'Fortune'. No proceden de la duplicación espontánea de los cromosomas, en la fase de callo, de un posible gameto aneuploide (de 11 cromosomas) ya que en la mayoría de los grandes grupos de ligamiento del mapa genético de clementina (Luro *et al.* 2007), por lo menos uno de los marcadores microsatélite heterocigótico para clementina 'Clemenules' lo es también para las plantas aneuploides. Tampoco procede de variación somaclonal a partir de tejido somático materno ya que en estos mismos grupos de ligamiento algunos marcadores heterocigóticos para clementina son homocigóticos para las plantas aneuploides. Por estos motivos, el origen genético propuesto para estas plantas aneuploides es que fueron regeneradas a partir de un callo aneuploide producido por un embrión originado a partir de un gameto no reducido aneuploide ($2n = 2x+4 = 22$) de clementina 'Clemenules'. La formación de gametos no reducidos en cítricos es un fenómeno conocido (Esen *et al.* 1979) bastante común en naranjo (O'Malley *et al.* 2007) y en mandarinas (Navarro *et al.* 2002). En clementina Luro *et al.* (2004) proponen que proceden de una restitución de la segunda división meiótica (SDR) que restituye solamente una parte de la heterocigosidad materna. Las anomalías en la meiosis que originan la formación de gametos no reducidos también son favorables para la formación de gametos aneuploides. Esen y Soost (1971a, 1972) ya obtuvieron plantas aneuploides en hibridaciones $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ y posteriormente Oiyama y Kobayashi (1993) también obtuvieron plantas aneuploides en hibridaciones $2x \times 3x$ aunque no determinaron el origen genético de las mismas.

Las plantas haploides han sido obtenidas a partir de gametos reducidos de clementina 'Clemenules' y han sido regeneradas como consecuencia de la germinación directa del embrión y a partir de callos embriogénicos producidos por embriones haploides.

En este trabajo se describe por primera vez la obtención de una planta doble haploide de clementina 'Clemenules' por ginogénesis *in situ* inducida por polen irradiado, confirmada mediante citometría de flujo, conteo de cromosomas y marcadores microsatélites. Ha sido originada probablemente a partir de un callo haploide embriogénico en el que se produjo una duplicación espontánea del número de cromosomas. Por androgénesis indirecta se han obtenido plantas dobles haploides (Deng *et al.* 1992; Germanà *et al.* 2000) y trihaploides (Germanà *et al.* 2005).

Ollitrault *et al.* (2000) utilizaron dos líneas celulares haploides de clementina para aislar y fusionar protoplastos con 11 genotipos diploides. Las plantas regeneradas mostraron niveles de ploidía muy variados (diploides, triploides, tetraploides y pentaploides) lo que indica una elevada inestabilidad en las líneas celulares haploides de clementina, confirmándose por citometría de flujo la presencia de células diploides y triploides en los callos. La duplicación del número de cromosomas en callos de clementina es una característica frecuente (Ollitrault *et al.* 2000), siendo probablemente el origen de los dobles haploides y trihaploides de clementina obtenidos hasta el momento. En cítricos también se han obtenido plantas dobles haploides a partir de la segregación de citoquimeras haploide-diploide obtenidas mediante el tratamiento *in vivo* de yemas axilares con colchicina de plantas haploides de zamboa (Yahata *et al.* 2005b).

1.4.3 Efecto del nivel de ploidía en las características morfológicas de las plantas regeneradas.

Se observó una gran variabilidad en la morfología y en el tamaño de las hojas de las plantas regeneradas en función del nivel de ploidía. También se observó variabilidad en las hojas entre las plantas haploides. Esto puede ser debido a que las plantas y callos regenerados han sido obtenidos a partir de sucesos meióticos independientes.

Todas las plantas haploides de clementina, obtenidas tanto por vía androgenética como ginogenética, presentaron un aspecto débil y crecimiento poco vigoroso (Oiyama y Kobayashi, 1993; Ollitrault *et al.* 1996a; Germanà *et al.* 2000; Froelicher *et al.* 2007) y generalmente las plantas murieron en invernadero o *in vitro*. Esto puede ser debido a la expresión de genes letales recesivos (Deng *et al.* 1992; Germanà y Chiancone, 2001). Sin embargo, en nuestro trabajo, hemos obtenido el genotipo haploide de clementina 5.1.2 que presenta un crecimiento más vigoroso que el resto de genotipos haploides, y además es capaz de producir flores.

La planta doble haploide de clementina 'Clemenules' (figura 1.13.a) obtenida presenta entrenudos cortos, elevada espinosidad, aspecto más robusto y crecimiento más vigoroso que la mayoría de los genotipos haploides. La duplicación del nivel de ploidía (de haploide a doble haploide) lleva consigo un aumento del área, longitud y anchura de las hojas. Los órganos florales de clementina 'Clemenules' haploide son más pequeños que los diploides. Los ovarios y los estilos haploides son, aproximadamente, un 50 % más pequeños que los diploides y los estigmas haploides son un 40 % más pequeños que los diploides. Romero-Aranda *et al.* (1996) en un estudio histológico comparativo de la estructura foliar de plantas diploides y autotetraploides de naranjo dulce 'Valencia' y limón 'Femminello' observaron que el aumento del nivel de ploidía tenía como consecuencia un incremento del volumen celular, siendo las hojas autotetraploides entre un 20 – 30 % más gruesas que las diploides. Resultados similares obtuvo Schwarz (2001) al comparar la estructura histológica de hojas, tallos y raíces de plantas diploides y tetraploides de citrange 'Carrizo'. En plantas de *Solanum phureja* con la misma estructura genética pero con diferentes niveles de ploidía (1x, 2x y 4x), el aumento progresivo del número de cromosomas lleva consigo el aumento progresivo del tamaño de los núcleos y de las células. Además las plantas 2x y 4x muestran un mayor desarrollo y vigor que las plantas 1x (Stupar *et al.* 2007).

En este trabajo hemos obtenido a partir de la germinación directa del embrión sin fase de callo el primer haploide de clementina 'Clemenules' de crecimiento relativamente vigoroso y que floreció al cabo de 4 años de su germinación (figuras 1.13.b, 1.13.c y 1.13.d). La planta ha sido propagada en invernadero en distintos portainjertos de cítricos y su cultivo no requiere cuidados especiales. También ha sido injertada en campo, cultivándose en las mismas condiciones que las variedades comerciales de cítricos. En *P. trifoliata* (Hidaka *et al.* 1979), mandarino 'Fortune' y tangor 'Ortanique' (Froelicher *et al.* 2007) las plantas haploides obtenidas presentaron un aspecto y crecimiento débil. En arándano (*Vaccinium* spp.) y en manzano las plantas haploides también presentaron un aspecto débil y escaso crecimiento (Dweikat y Lyrene, 1990; Zhang y Lespinasse, 1991).

Se ha intentado, sin éxito, utilizar esta planta haploide de clementina 'Clemenules' como parental masculino y femenino en hibridaciones con diferentes genotipos de mandarino. En las anteras de la planta haploide se ha observado con gran frecuencia la ausencia de sacos polínicos que contienen generalmente granos de polen rudimentarios. Yahata *et al.* (2005a) caracterizaron morfológicamente las flores de una zamboa haploide, la cual contiene un número de granos de polen significativamente menor que la diploide y con una baja viabilidad. Así mismo, en *Prunus persica* Batsch las flores haploides también contienen un menor número de granos de polen que las flores diploides (Pooler y Scorza, 1995).

En los ovarios de la planta haploide las hojas carpelares que forman cada lóculo no estaban fusionadas con el eje central, observándose una cavidad central hueca, con un desarrollo incompleto a diferencia de los diploides, cuyas hojas carpelares están fusionadas a lo largo del eje central formando una unidad. Esta característica podría explicar el hecho de que las flores haploides polinizadas con diferentes genotipos de cítricos no se desarrollasen y originasen frutos, debido a la anatomía de los ovarios haploides, que impide que los tubos polínicos de los granos de polen puedan alcanzar los óvulos. Además, también contribuiría a ello el menor número de óvulos por ovario en el genotipo haploide que en el diploide. Sin embargo (Yahata *et al.* 2005a) consiguieron obtener un híbrido entre el tangor 'Kiyomi' (*C. unshiu* x *C. sinensis*) como parental femenino y una zamboa haploide como parental masculino, pero consideran muy difícil el empleo de la zamboa haploide en análisis genético y como parental en programas de mejora ya que presenta óvulos estériles y granos de polen con muy baja fertilidad (Yahata *et al.* 2005a).

Las plantas aneuploides (figura 1.13.e) vegetan de forma muy similar a las plantas haploides, con aspecto y crecimiento débil (Hidaka *et al.* 1979). La viabilidad y vigor de las plantas aneuploides depende del tipo y número de cromosomas perdidos o ganados así como del nivel de ploidía final (Esen y Soost, 1972). En nuestro laboratorio hemos obtenido plantas aneuploides en hibridaciones $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$, algunas de las cuales vegetan normalmente y otras mueren *in vitro*, en el trasplante o en el invernadero (datos no publicados).

El CIGC decidió durante el Plant & Animal Genomes XV Conference, celebrado en el mes de enero de 2007 en San Diego (EEUU), secuenciar el genoma de la clementina. Debido a la dificultad en la obtención y cultivo de las plantas haploides de clementina, únicamente hubo tres plantas haploides candidatas a nivel mundial, pertenecientes a un grupo de investigación Francés (Ollitrault *et al.* 1996a), Italiano (Germanà *et al.* 2005) y Español (el presente trabajo). Estas plantas han sido caracterizadas citológicamente y analizadas genéticamente con numerosos marcadores microsatélites y microarrays por diferentes laboratorios de todo el mundo. Después de todos los análisis realizados, la planta haploide de clementina seleccionada para la secuenciación del genoma de los cítricos fue el genotipo 5.1.2 obtenido en este trabajo ya que fue regenerado a partir de la germinación directa del embrión sin fase de callo, el conteo de cromosomas demostró la presencia 9 cromosomas, el análisis genético realizado con marcadores microsatélites mostró la presencia de un solo alelo característico de los genotipos haploides, el análisis con microarrays confirmó la no existencia de deleciones en el genoma del genotipo haploide 5.1.2 y además vegeta vigorosamente.

1.5. CONCLUSIONES.

Se han obtenido plantas haploides ($2n = x = 9$), aneuploides ($2n = 2x+4 = 22$) y un doble haploide ($2n = 2x = 18$) de clementina 'Clemenules' mediante ginogénesis *in situ* inducida por polen irradiado de mandarino 'Fortune'.

Las plantas haploides han sido obtenidas a partir de gametos reducidos de clementina 'Clemenules' como consecuencia de la germinación directa del embrión y a partir de callos embriogénicos producidos por embriones haploides.

Se describe por primera vez la obtención de una planta doble haploide de clementina 'Clemenules' originada a partir de un callo haploide embriogénico en el que se produjo una duplicación espontánea del número de cromosomas.

Las plantas aneuploides obtenidas fueron regeneradas a partir de un callo aneuploide producido por un embrión originado a partir de un gameto no reducido aneuploide de clementina 'Clemenules'.

Los órganos florales de clementina 'Clemenules' haploide son más pequeños que los diploides. Los ovarios y los estilos haploides son, aproximadamente, un 50 % más pequeños que los diploides y los estigmas haploides son un 40 % más pequeños que los diploides.

Se ha obtenido el primer genotipo haploide de clementina 'Clemenules' de crecimiento vigoroso y que floreció al cabo de 4 años. Este genotipo haploide ha sido seleccionado por el Consorcio Internacional de Genómica de Cítricos para la secuenciación del genoma completo de los cítricos.

Tabla 1.1. Análisis genético de los parentales y una planta haploide, doble haploide y aneuploide de clementina `Clemenules` con marcadores microsatélites.

Locus	Grupo de ligamiento Luro et al. (2007)	Parentales				Haploide		D. haploide		Aneuploide	
		Clemenules		Fortune		5.1.2		5.2.1		2.4.1.1	
		a ₁	a ₂	a ₁	a ₂	a ₁	a ₂	a ₁	a ₂	a ₁	a ₂
CAC 15	4	150	159	150	159	150		159		150	159
CAC 23		245	250	245	250	245		250		245	250
TAA 1	6	160	165	160	165		165		165	160	165
TAA 15	1	184	188	188	200	184		188		184	188
TAA 41		148	154	137	148	148		154			154
Ci02A09		161	162	161	162		162		162	161	162
Ci02B07	8	162	164	162	164	162		162		162	164
Ci02E08	1	260	275	260	275	260		260		260	275
Ci02D04b	3	198	208	198	208		208	198		198	208
Ci02D09	4	229	237	229	237		237	229		229	237
Ci02F12	6	126	134	126		126		126		126	134
Ci02G02	2	113	123	113	123		123		123	113	
Ci02G12	9		250	220	250		250		250		250
Ci03C08		210	226	215	226		226	210		210	226
Ci03D12a	3	246	256		256	246			256	246	256
Ci05A05	5	146	154	146	164	146			154		154
Ci06B07	5	106	108	106	108		108	106		106	
Ci07C07	7	224	238	238		224			238		238
Ci07D06	3	155	175	155	175		175	155		155	175
Ci07A12	1	170		170	178	170		170		170	
Ci07E12	1	120	126	120	126	120			126		126
Mest 001		170	165	165		170		170		170	
Mest 015	9	184	188	184	188		188	184		184	188
Mest 056	1	155	165	155	165		165		165	155	165
Mest 086		130	140		140		140	130			140
Mest 088	1	134	138	134			138		138	134	
Mest 112	2	439	460	439			460	439		439	
Mest 123	6	268	296	268	296	268		268		268	296
Mest 131	2	160	170	160		160		160			170
Mest 132	2	225	250	225	230	225		225		225	250
Mest 154		105	108	105	108	105			108	105	108
Mest 246	1	266	272	266	272	266			272	266	
Mest 402		120	125	120	150	120			125	120	125
Mest 419		118	135		135	118			135	118	
Mest 431	1	260	270		270	260			270	260	270
Mest 458		215	225		225	215			225	215	225
Mest 473		216	224		224		224		224	216	224
Mest 488		136	146	146	156		146		146	136	146
Mest 506		164	168	164			168		168	164	
Mest 525		170	180	170	180	170			180		180

Los números escritos en cada celda indican el tamaño en nucleótidos (nt) de los dos alelos correspondientes a cada *locus* microsatélite.

Los números coloreados en rojo corresponden a alelos específicos de mandarina `Fortune`.

Tabla 1.2. Nivel de ploidía de los callos embriogénicos y de los embriones somáticos obtenidos a partir de la polinización de clementina 'Clemenules' con polen irradiado de mandarino 'Fortune'.

Callo	Ploidía	Nº de embriones obtenidos	Nº de embriones germinados	Nº de plantas obtenidas	Nº de plantas haploides	Nº de plantas diploides	Nº de plantas aneuploides	Plantas en invernadero
2.3	Haploide	10	10	10	10	0	0	8
2.4	Aneuploide	40	12	3	0	0	3	3
5.2.1	Haploide	44	10	1	0	1	0	1
7.3	Haploide	2	2	2	2	0	0	1

Tabla 1.3. Caracterización morfológica de hojas de diferentes plantas haploides, doble haploide, diploide y aneuploide de clementina 'Clemenules'.

Genotipo	Ploidía	Área foliar media (cm ²)	Anchura foliar media (cm)	Longitud foliar media (cm)
Clemenules	Diploide	19,4 ^c	3,3 ^e	10,3 ^e
2.4.1.1	Aneuploide	4,0 ^b	1,4 ^c	4,4 ^c
5.2.1	Doble haploide	25,9 ^d	5,3 ^f	7,2 ^d
2.3.6	Haploide	2,1 ^a	1,1 ^a	3,2 ^b
5.1.2	Haploide	3,0 ^{ab}	1,1 ^a	4,6 ^c
7.3.2	Haploide	2,6 ^a	1,2 ^{ab}	3,8 ^b
7.5	Haploide	2,9 ^a	2,0 ^d	2,3 ^a
9.2	Haploide	2,3 ^a	1,4 ^{bc}	2,5 ^a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significación inferior a 0,0001

Tabla 1.4. Medidas de secciones histológicas de anteras de una planta haploide y diploide de clementina 'Clemenules'.

Genotipo	Ploidía	Anteras			
		Anchura (µm)	Altura (µm)	% de tecas con sacos polínicos	% de tecas con granos de polen
Haploide 5.1.2	Haploide	324,9 ^a	181,4 ^a	23,8 ^a	4,7 ^a
Clemenules	Diploide	777,9 ^b	504,1 ^b	100 ^b	100 ^b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significación inferior a 0,0001

Tabla 1.5. Medidas de secciones histológicas de ovarios de una planta haploide y diploide de clementina 'Clemenules'.

Genotipo	Ploidía	Ovarios			
		Diámetro 1 (µm)	Diámetro 2 (µm)	Nº lóculos / ovario	Nº de óvulos / sección
Haploide 5.1.2	Haploide	705,1 ^a	699,3 ^a	8 ^a	6,6 ^a
Clemenules	Diploide	1.452,2 ^b	1.405,1 ^b	10 ^b	15,2 ^b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significación inferior a 0,0001

Tabla 1.6. Medidas de secciones histológicas de estilos y estigmas de una planta haploide y diploide de clementina 'Clemenules'.

Genotipo	Ploidía	Estilos		Estigmas	
		Diámetro 1 (µm)	Diámetro 2 (µm)	Diámetro 1 (µm)	Diámetro 2 (µm)
Haploide 5.1.2	Haploide	463,9 ^a	417,3 ^a	639,3 ^a	542,9 ^a
Clemenules	Diploide	975,5 ^b	900,7 ^b	1.618,7 ^b	1.374,1 ^b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significación inferior a 0,0001

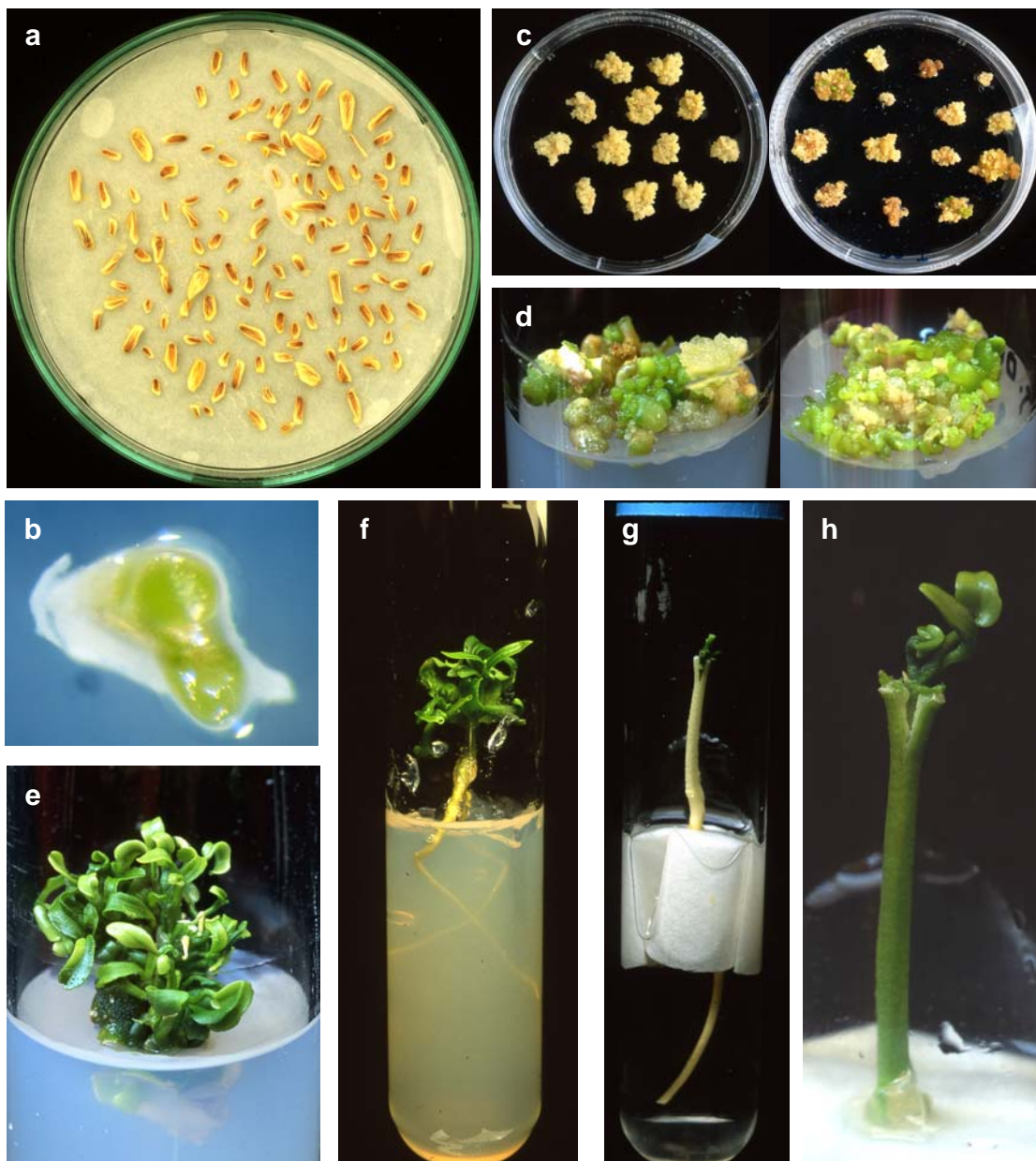


Figura 1.1. a. Semillas pequeñas obtenidas en los frutos de clementina ‘Clemenules’ originados a partir de la polinización de flores con polen irradiado de mandarino ‘Fortune’. b. Tipo de embrión contenido en las semillas. c. Callos embriogénicos originados a partir del cultivo de embriones *in vitro*. d. Proliferación de embriones obtenidos a partir de callo embriogénico. e. Brotes producidos por los embriones regenerados a partir de callo embriogénico. f. Plántula obtenida a partir de la germinación directa del embrión. g. Microinjerto *in vitro* de los brotes producidos por los embriones. h. Detalle del microinjerto de un brote haploide.

File: 24030
 16.04.07 08:38:04
 Total Count: 2008

Peak	Index	Mode	Mean	Area	Area%CV%
1	1.000	49	48.77	1254	62.45 5.64
2	3.090	150	150.73	443	22.06 1.82

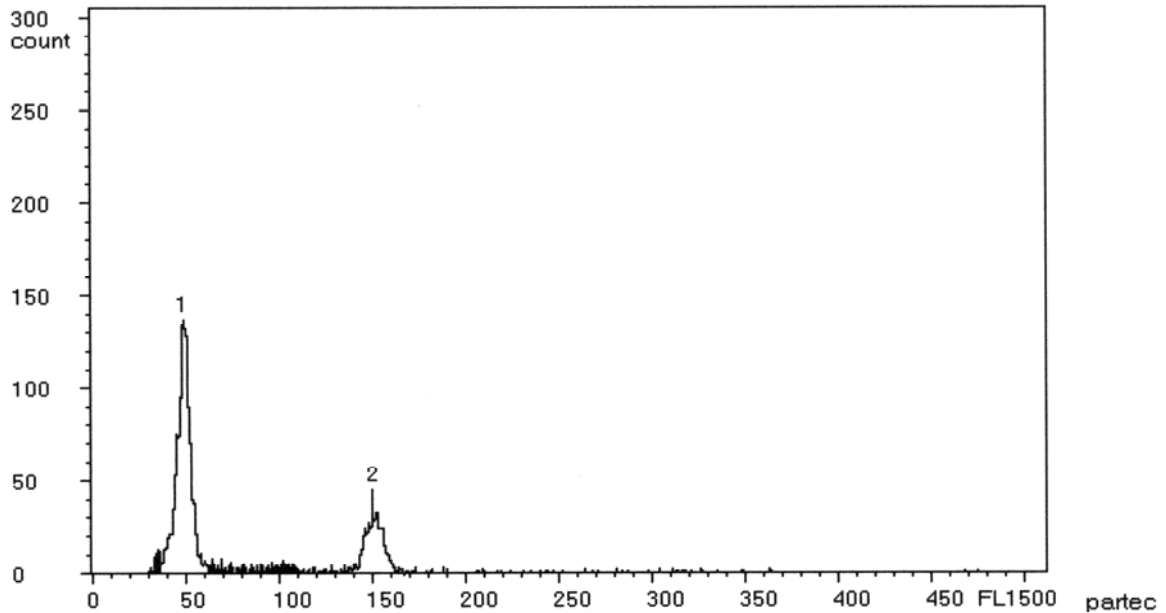


Figura 1.2. Histograma correspondiente al genotipo haploide 5.1.2 (pico 1) y a una planta triploide control (pico 2).

File: 24032
 16.04.07 08:53:29
 Total Count: 2016

Peak	Index	Mode	Mean	Area	Area%CV%
1	1.000	98	98.01	907	44.99 3.32
2	1.477	145	144.74	708	35.12 2.25

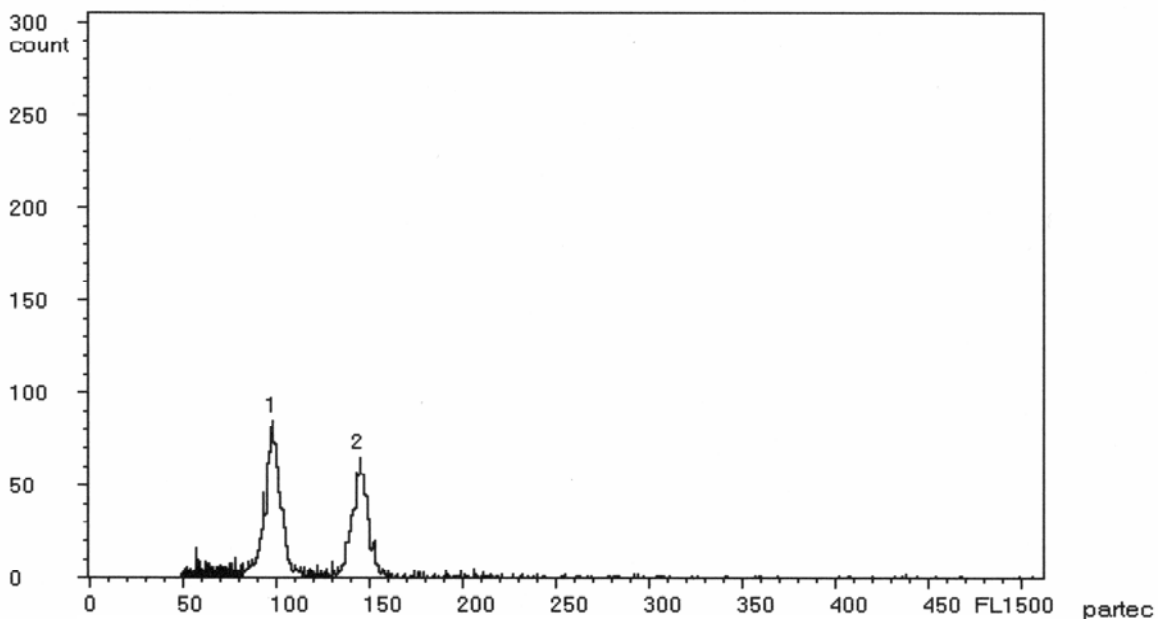


Figura 1.3. Histograma correspondiente al genotipo doble haploide 5.2.1 regenerado a partir del callo haploide 5.2.1 (pico 1) y a una planta triploide control (pico 2).

File: 24046
 16.04.07 10:19:38
 Total Count: 2009

Peak	Index	Mode	Mean	Area	Area%CV%
1	1.000	100	99.39	575	28.62 4.28
2	1.174	117	116.71	737	36.68 4.50
3	1.502	147	149.30	301	14.98 3.18

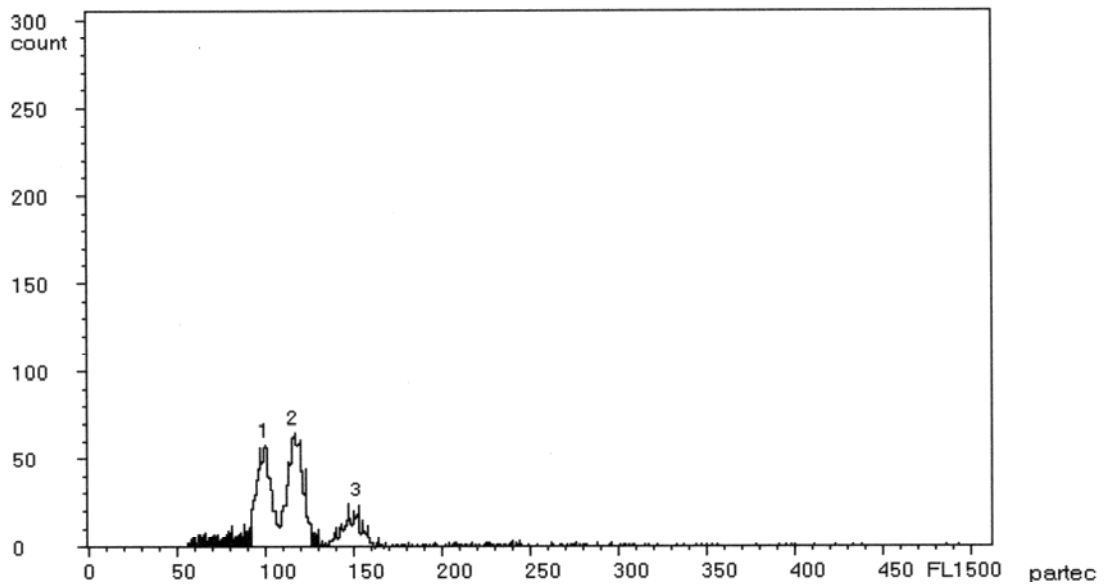


Figura 1.4. Histograma correspondiente a una planta control diploide (pico 1), genotipo aneuploide 2.4.1.1 regenerado a partir del callo aneuploide 2.4 (pico 2) y una planta control triploide (pico 3).

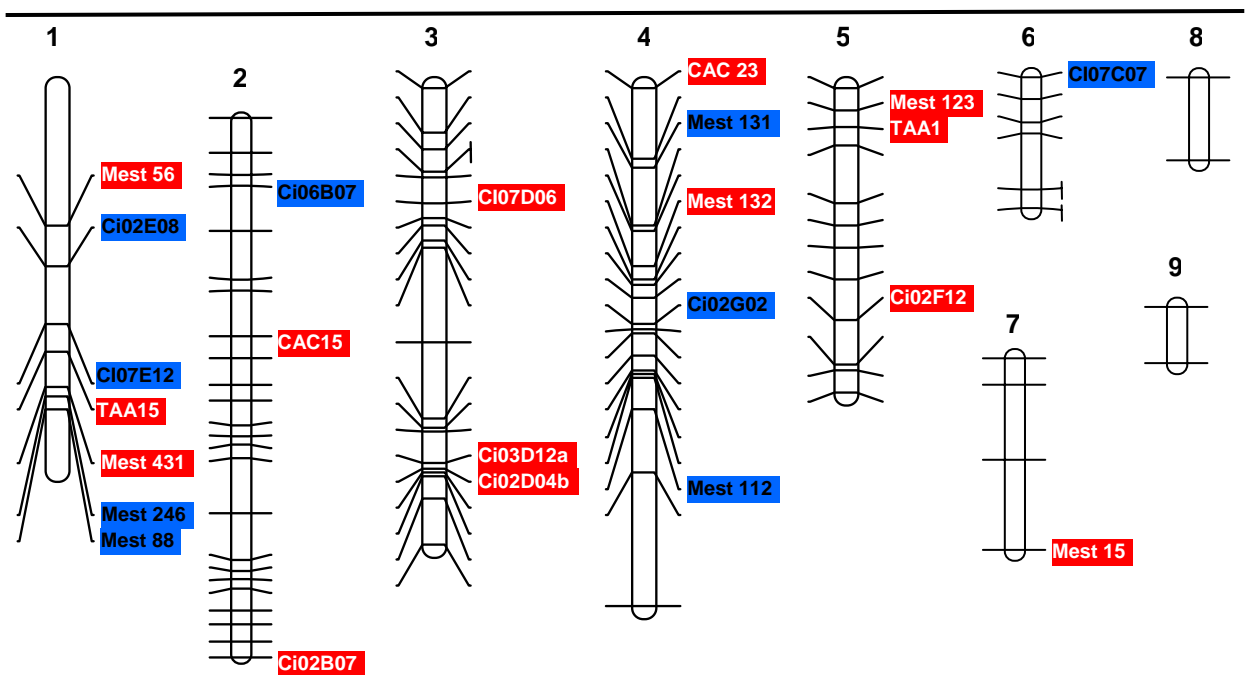


Figura 1.5. Posición en el mapa genético de clementina descrito por Luro *et al.* (2007) de los *loci* microsatélites utilizados en el análisis genético. En color rojo se indican los *loci* microsatélites heterocigóticos para la clementina 'Clemenules' y para la planta aneuploide 2.4.1.1, y en azul se indican los *loci* microsatélites heterocigóticos para clementina 'Clemenules' y homocigotos para la planta aneuploide 2.4.1.1.

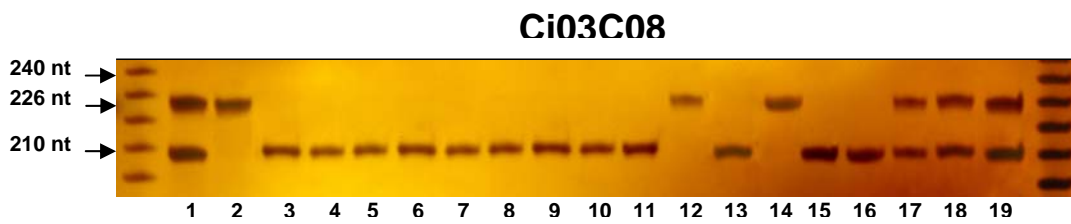


Figura 1.6. Análisis genético realizado con el *locus* microsatélite Ci03C08. (1) Clementina `Clemenules`. (2) Mandarino `Fortune`. (3) Haploide 1.1. (4 al 11) Haploides obtenidos del callo embriogénico 2.3. (12) Haploide 5.1.2. (13) Haploide 7.3.2. (14) Haploide 7.3.5. (15) Haploide 1.9.2. (16) Doble haploide 5.2.1. (17 al 19) Aneuploides obtenidos a partir del callo embriogénico 2.4.

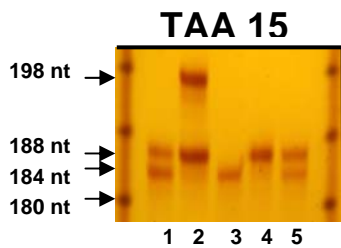


Figura 1.7. Análisis genético realizado con el *locus* microsatélite TAA 15 en los genotipos: (1) Clementina `Clemenules`, (2) Mandarino `Fortune`. (3) Haploide 5.1.2. (4) Doble haploide 5.2.1. (5) Aneuploide 2.4.1.1.

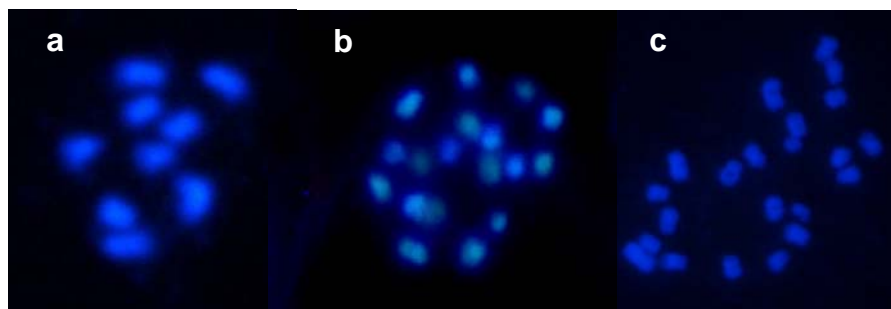


Figura 1.8. a. Metafase planta haploide 5.1.2. b. Metafase planta doble haploide 5.2.1. c. Metafase planta aneuploide 2.4.1.1.

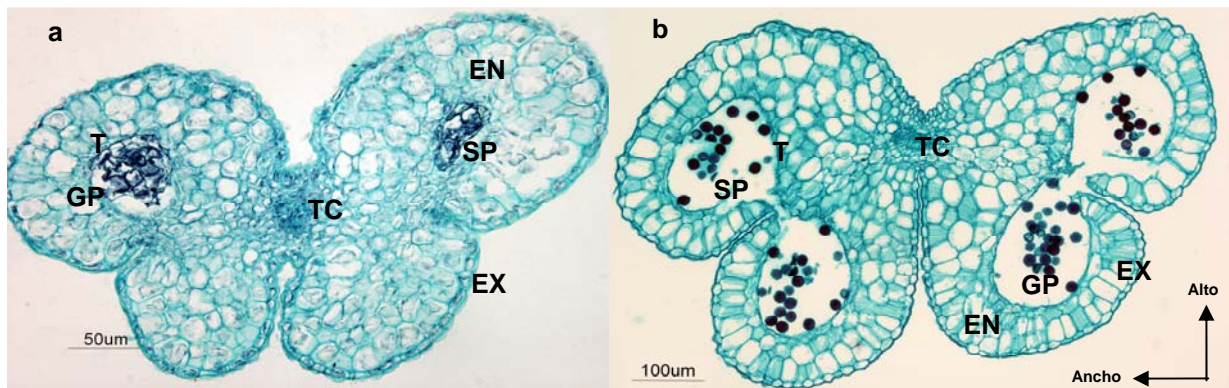


Figura 1.9. Secciones transversales de antera haploide (a) y diploide (b) de clementina `Clemenules`. SP sacos polínicos, T tapetum, TC tejido conectivo, GP granos de polen, EN endoteco, EX exoteco.

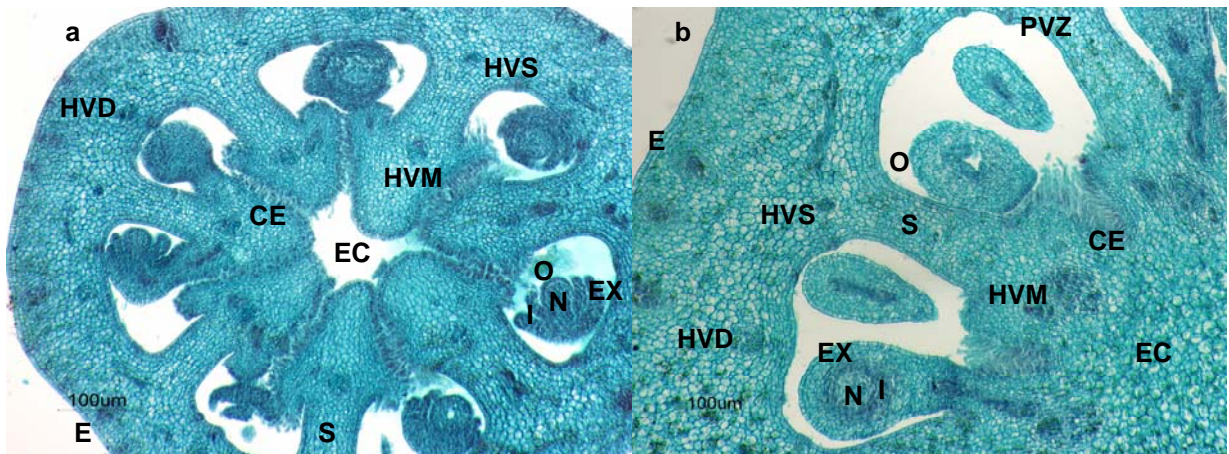


Figura 1.10. Secciones transversales de ovario haploide (a) y diploide (b) de clementina `Clemenules`. E epidermis, S septa, CE canal estilar, EC eje central, HVD haces vasculares dorsales, HVM haces vasculares marginales, HVS haces vasculares de las septas, PVZ primordios vesículas de zumo, O óvulo, EX tegumento exterior, I tegumento interior, N nucela.

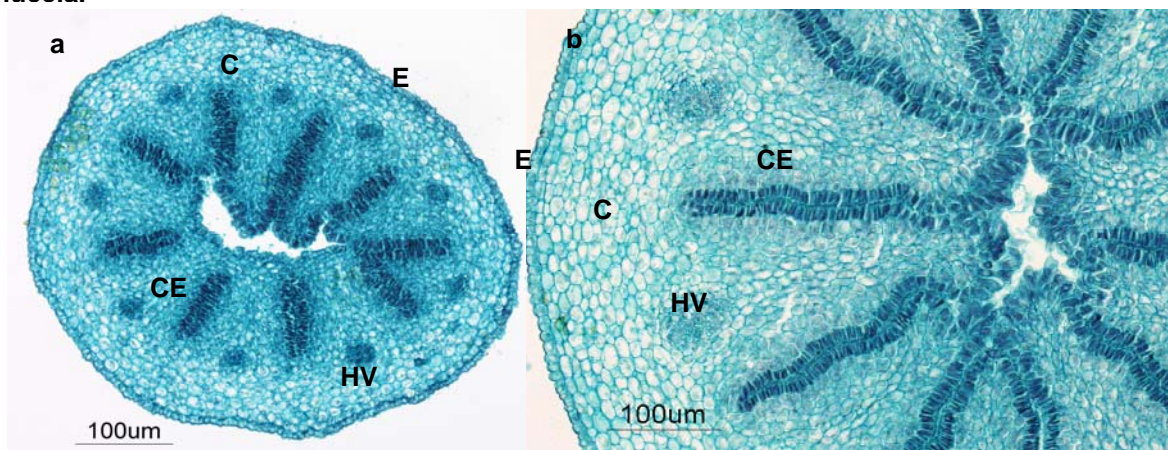


Figura 1.11. Secciones transversales de estilo haploide (a) y diploide (b) de `Clementina de Nules`. E epidermis, C cortex, CE canal estilar, HV haz vascular.

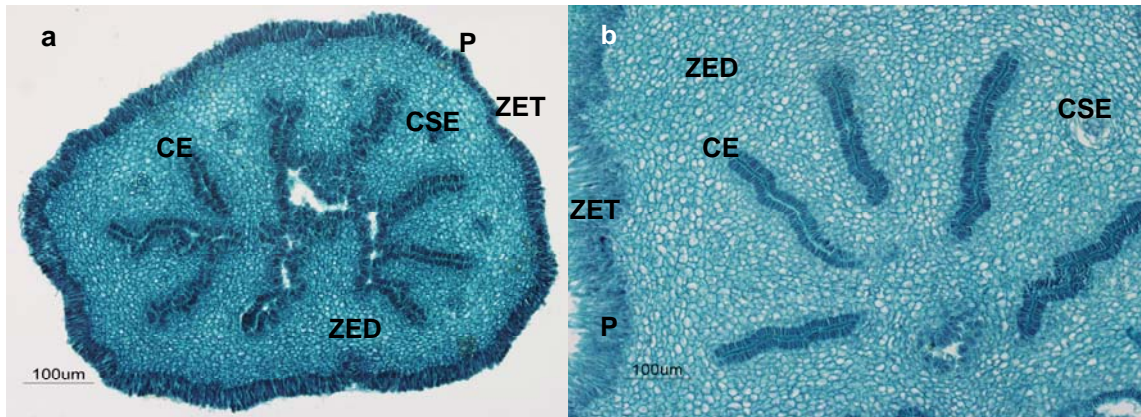


Figura 1.12. Secciones transversales de estigma haploide (a) y diploide (b) de clementina `Clemenules`. ZET zona estigmática, P papilas, ZED zona estigmatóide, CE canales estilares, CSE canales secreción estigmática.



Figura 1.13. a. Genotipo doble haploide 5.2.1 de clementina `Clemenules`. b. Genotipo haploide 5.1.2 de clementina `Clemenules`. c. Detalle floración planta haploide. d. Flor haploide y diploide de clementina `Clemenules`. e. Genotipo aneuploide 2.4.1.1 de clementina `Clemenules`.

***Capítulo 2. Obtención de tetraploides espontáneos en genotipos
apomícticos de cítricos***

CAPÍTULO 2. OBTENCIÓN DE TETRAPLOIDES ESPONTÁNEOS EN GENOTIPOS APOMÍCTICOS DE CÍTRICOS.

2.1 INTRODUCCIÓN.

Los genotipos diploides ($2n = 2x = 18$) son los más habituales en cítricos aunque se han inducido o encontrado ocasionalmente euploides y aneuploides. Las variaciones euploides más comunes son triploides y tetraploides (Lee, 1988).

En cítricos se pueden obtener plantas triploides mediante cruzamientos interploides entre parentales diploides y tetraploides y de forma espontánea en cruzamientos entre parentales diploides (Cameron y Frost, 1968).

La poliploidía es un mecanismo importante en la evolución eucariota y particularmente en las angiospermas (Grant, 1981; Soltis y Soltis, 1993; Wendel y Doyle, 2005). Muchas plantas han sido originadas por autopoliploidización (patata, alfalfa, etc.) o por aloploidización (maíz, soja, col, algodón y café). La poliploidización debe ser considerada como el mecanismo más común de especiación simpátrica (Otto y Whitton, 2000). En las plantas los mecanismos de poliploidización que pueden ocurrir son la duplicación del número de cromosomas y la formación de gametos funcionales $2n$. Harlan y de Wet (1971) demostraron que la duplicación espontánea del número de cromosomas es relativamente rara en la naturaleza mientras que la poliploidización producida por los gametos $2n$ parece mucho más frecuente (Bretagnolle y Thompson, 1995).

El número básico de cromosomas en los cítricos y géneros afines es $x = 9$ (Krug, 1943). Longley (1925) fue el primero en identificar un tetraploide natural en *Fortunella hindisii* Swing. La lima triploide 'Tahití' o 'Bearss' (*C. latifolia* Tan.), algunos genotipos tetraploides de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., *Clausena excavata* Burm. f. alotetraploide, *C. harmandiana* (Pierre) Guill. tetraploide y *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) Corrêa hexaploide son ejemplos de poliploides naturales pertenecientes a la subfamilia de las *Aurantioideae* (Ollitrault *et al.* 2008).

La duplicación del número de cromosomas ocurre con relativa frecuencia en genotipos apomícticos de cítricos. Lapin (1937) encontró plantas tetraploides en semilleros de ocho genotipos de *Citrus* (con una frecuencia que osciló entre 1 y 5,6 %) y *Poncirus* (frecuencia del 4 %). Cameron y Frost (1968) observaron que aproximadamente el 2,5 % de 3.600 plantas nucelares eran tetraploides. La duplicación del número de cromosomas en tejidos somáticos ha sido descrita por Raghuvanshi (1962). Iwamasa *et al.* (1988) sugieren que es debido a una competencia desfavorable entre las células diploides y tetraploides en el meristemo. La formación de semillas tetraploides completamente desarrolladas en hibridaciones $2x \times 4x$ ha sido descrita por diversos autores (Tachikawa *et al.* 1961; Cameron y Soost, 1969; Esen y Soost, 1971b). Esen y Soost (1971b) propusieron que se originan a partir de gametos no reducidos fertilizados por polen diploide. Sin embargo, finalmente parece ser que la mayoría de las líneas tetraploides naturales de cítricos han sido originadas a partir de plantas de semillero de genotipos apomícticos (Ollitrault *et al.* 2008).

En los genotipos apomícticos la poliembrionía es una característica de la biología reproductiva de los cítricos y la embrionía adventicia es el mecanismo que determina la apomixis

(Koltunow, 1993). De hecho, los embriones adventicios se originan a partir de una célula nucelar (Kobayashi *et al.* 1981) por lo que comúnmente son llamados embriones nucleares (Frost y Soost, 1968), de origen materno, y por tanto producen descendencias idénticas genéticamente a la planta madre. Cameron y Frost (1968) propusieron que la duplicación del número de cromosomas en células de tejido nucelar es el mecanismo implicado en el origen de las plantas tetraploides encontradas en los semilleros. Estas plantas tetraploides son homogéneas y fenotípicamente no muestran caracteres del parental masculino. En *C. volkameriana* Ten. & Pasq., Ollitrault y Jacquemond (1995) analizaron con cuatro isoenzimas plantas tetraploides y diploides. Los zimogramas no mostraron diferencias entre las plantas analizadas. En los genotipos no apomícticos este fenómeno no ocurre y por lo tanto no es posible obtener plantas tetraploides por esta vía. Los genotipos apomícticos tetraploides son utilizados principalmente como parentales masculinos para la obtención de híbridos, ya que cuando actúan como parentales femeninos, los embriones nucleares limitan o impiden el desarrollo de los embriones sexuales (Geraci *et al.* 1977; Starrantino, 1992), siendo muy difícil recuperar plantas híbridas.

Debido a ésta característica de la biología reproductiva de los cítricos, es posible obtener de una forma rápida y sencilla plantas tetraploides de cítricos que posteriormente puedan utilizarse como parentales masculinos en hibridaciones interploides.

En este trabajo se presenta la obtención de diferentes plantas tetraploides de mandarina, naranja y pomelo obtenidas a partir de semillas recolectadas de frutos maduros obtenidos por polinización abierta, determinación del nivel de ploidía por citometría de flujo y conteo de cromosomas y análisis genético mediante marcadores microsatélites.

2.2 MATERIAL Y MÉTODOS.

2.2.1 Material vegetal.

Se recolectaron semillas de frutos maduros de árboles del Banco de Germoplasma del IVIA de los genotipos apomícticos de cítricos descritos en la tabla 2.1, obtenidas por polinización abierta. La selección se realizó por el interés de estos genotipos, como parentales masculinos, para el proyecto de obtención de híbridos triploides realizado en el IVIA.

2.2.2 Semilleros.

Se sembraron entre 96 y 192 semillas en bandejas de 96 alvéolos, a razón de una semilla por alvéolo, en un sustrato compuesto por una mezcla de seis partes de turba (3 partes de turba rubia y 3 partes de turba negra) por una de perlita, en condiciones de invernadero con temperatura ambiente controlada (18 - 27 °C). La siembra se realizó inmediatamente después de la extracción de las semillas.

Se determinó el número de semillas germinadas, el número medio de plantas producidas por semilla germinada y el número de plantas diploides y tetraploides así como el número de plántulas de cada nivel de ploidía a partir de una semilla (tablas 2.2 y 2.3).

2.2.3 Análisis del nivel ploidía.

2.2.3.1 Citometría de flujo.

La determinación del nivel de ploidía se realizó mediante citometría de flujo según el protocolo descrito en el Capítulo 1, apartado 1.2.6.

Se tomó un fragmento de hoja de aproximadamente 0,5 cm² de cada planta entre 5 - 12 meses después de la siembra. Cada muestra estaba constituida por los fragmentos de hoja de todas las plántulas germinadas en cuatro alvéolos, teniendo así 24 muestras por bandeja. En las muestras donde se obtuvo un histograma en el que se observaba un pico constituido por células tetraploides se volvieron a analizar individualmente las plántulas de la muestra. Cada nueva muestra estaba constituida por un fragmento de hoja de una plántula problema y un control diploide.

2.2.3.2 Conteo de cromosomas.

Para confirmar el nivel de ploidía de las plantas tetraploides obtenidas, se seleccionó una planta tetraploide de cada genotipo. Se recolectaron ápices y pequeñas hojas de cada planta tetraploide seleccionada establecidas en invernadero. En primer lugar el material vegetal fue sumergido en una solución al 0,04 % de 8 - hidroxiquinoleina durante 8 h (4 h a temperatura ambiente y 4 h a 4 °C). Posteriormente se fijaron durante 48 h en una solución de etanol y ácido acético (3/1) y finalmente se introdujeron en una solución de etanol al 70 % a 4 °C, para su conservación. Las preparaciones para el conteo de los cromosomas se realizaron sumergiendo los ápices con una pequeña porción del brote en ácido clorhídrico 5 N durante 20 min para macerar el tejido. Posteriormente se lavaron con agua destilada. Se aisló el ápice con 2 - 3 primordios foliares y se depositó sobre un portaobjetos con una gota de DAPI, cubriéndolo con un cubre sobre el que se realizó el squash.

2.2.4 Análisis genético.

El análisis genético se realizó con marcadores microsatélites. Las plantas establecidas en invernadero junto con los parentales y una planta diploide de cada semillero se analizaron genéticamente con los *loci* microsatélites heterocigóticos para los parentales (tabla 2.4) descritos por Kijas *et al.* (1997), Froelicher *et al.* (2008) y Luro *et al.* (2008).

La extracción del ADN genómico fue realizada según Dellaporta y Hicks (1983).

La reacción de PCR utilizada, la desnaturalización de las muestras, las condiciones de electroforesis y la metodología de tinción son las mismas que las descritas en el Capítulo 1 apartado 1.2.7.

2.3 RESULTADOS.

2.3.1 Identificación de tetraploides espontáneos.

De todos los genotipos estudiados se identificaron plantas tetraploides (figura 2.1) ($2n = 4x = 36$), excepto de los mandarinos `Salteñita` y `Simeto`. La frecuencia de tetraploides encontrados varió en función del genotipo (tabla 2.2). El mandarino `Kinnow` fue el que produjo un mayor número de plántulas tetraploides, con una frecuencia del 9,7 %. A continuación el mandarino `Tardivo di Ciaculli` y el pomelo `Duncan` fueron los que presentaron mayor frecuencia de plántulas tetraploides.

El porcentaje de semillas que produjeron plántulas tetraploides osciló ampliamente en función del genotipo (tabla 2.2). El mayor porcentaje correspondió al mandarino `Kinnow` (14,1 %), seguido del mandarino `Tardivo di Ciaculli` (9,6 %) y del pomelo `Duncan` (6,4 %). En una misma semilla se encontraron plántulas con distintos niveles de ploidía (tabla 2.3).

Se han obtenido plántulas tetraploides a partir de semillas que mayoritariamente originan plántulas diploides y además lo más frecuente es que en las semillas que producen plántulas tetraploides sólo evolucione una plántula tetraploide asociada o no a otras plántulas diploides (tabla 2.3). Sin embargo, en el tangor `Murcott` y el mandarino `Tardivo di Ciaculli` han sido los únicos genotipos que en una misma semilla han originado dos plántulas tetraploides.

Además de las plántulas tetraploides se identificaron dos plántulas triploides (figura 2.2) ($2n = 3x = 27$), una de mandarino `Tardivo di Ciaculli` y otra de naranjo `Sanguinelli`.

El conteo de cromosomas de las plantas tetraploides seleccionadas de cada genotipo ha confirmado que todas las plantas tienen 36 cromosomas ($2n = 4x = 36$) (figura 2.3).

2.3.2 Análisis genético de las plantas obtenidas.

El análisis genético realizado con marcadores microsatélites muestra un elevado polimorfismo entre los parentales (figura 2.4). Los perfiles de las plantas obtenidas confirman que cada microsatélite amplifica únicamente un *locus*, por lo que la heterocigosidad de cada genotipo corresponde con los alelos obtenidos.

Considerando que todos los *loci* microsatélites utilizados son independientes, la probabilidad de detectar una plántula diploide zigótica originada por autofecundación es de $1-(1/2)^n$, donde n es el número de *loci* heterocigóticos para la planta madre. Además, esta probabilidad es la misma que necesitaríamos para detectar una planta doble diploide zigótica. En todos los genotipos analizados esta probabilidad es mayor del 0,99. En el caso de una planta zigótica obtenida por polinización cruzada, la probabilidad de diferenciar el genotipo zigótico de la planta madre es mayor que la

probabilidad mostrada en la tabla 2.4. Ninguna de las plantas tetraploides analizadas mostraron diferencias respecto a los parentales diploides para cada *locus* microsatélite.

2.4 DISCUSIÓN.

2.4.1 Origen y estructura genética de las plantas tetraploides.

Las plantas tetraploides de cítricos se pueden originar como consecuencia de una duplicación espontánea del número de cromosomas de células de tejido somático o zigótico o a partir de la fecundación de óvulos no reducidos con granos de polen diploides en polinizaciones $2x \times 2x$.

Todas las semillas sembradas se han obtenido por polinización abierta en árboles del Banco de Germoplasma del IVIA. En las proximidades de los árboles utilizados no hay plantas tetraploides que pudiesen actuar como polinizadores. En cítricos la producción de granos de polen no reducidos en genotipos diploides es extremadamente rara (Luro *et al.* 2004) por lo que la obtención de embriones zigóticos tetraploides a partir de la polinización entre genotipos diploides es prácticamente nula y además nunca han sido descritos en cítricos.

En cítricos se ha descrito la duplicación del número de cromosomas a partir de tejido somático (Raghuvanshi, 1962), lo cual implica la aparición de brotes y ramas quiméricas. Sin embargo, no se han descrito plantas tetraploides en cítricos regeneradas a partir de citoquimeras.

El análisis genético confirma claramente (probabilidad mayor del 99 %) que las plantas no se han originado a partir de una duplicación del número de cromosomas del embrión zigótico, puesto que todos los perfiles de los *loci* microsatélites heterocigóticos de las plantas tetraploides son iguales al de los parentales diploides. Esta característica también descarta que el origen de las plantas tetraploides sea por la fecundación de un óvulo no reducido con un grano de polen diploide. Con estos resultados podemos concluir que las plantas tetraploides se han originado por una duplicación del número de cromosomas a partir de células de tejido somático.

Cameron y Frost (1968) demostraron que el proceso de poliploidización ocurre a nivel de óvulo y no a nivel de las yemas de flor, ya que en este caso todas las plantas obtenidas en un mismo fruto presentarían el mismo nivel de ploidía. Nuestros resultados junto con los obtenidos por Hutchison y Barret (1981) y Schwarz (2001), reflejan que en una misma semilla podemos encontrar plantas diploides y tetraploides. Kobayashi *et al.* (1981) observaron que la formación de los embriones adventicios se producía a partir de células de la nucela en los genotipos apomícticos. Por todo ello, podemos concluir que las plantas tetraploides se originan por una duplicación del número de cromosomas de células individuales de la nucela, originando posteriormente embriones y éstos plantas tetraploides.

2.4.2 Frecuencia de plantas tetraploides en los semilleros.

La frecuencia de plantas tetraploides osciló entre 0 y 9,7 % dependiendo del genotipo. Barret y Hutchison (1978) sugieren en su trabajo que la frecuencia de producción de plantas tetraploides es

una característica genética de los genotipos apomícticos de cítricos y que está influenciada por las condiciones ambientales. Schwarz (2001) encontró diferencias en la frecuencia de producción de plantas tetraploides de diferentes patrones de cítricos originarios de distintas partes del mundo. Este trabajo sugiere que las bajas temperaturas favorecen los fenómenos de duplicación cromosómica en cítricos. El efecto del frío en la poliploidización parece ser un mecanismo general en plantas y animales (Ramsey y Schemske, 1998; Otto y Whitton, 2000)

Los índices de poliploidización en cítricos arriba descritos son elevados si se comparan con los descritos por Ramsey y Schemske (1998) en plantas en general, en los que la frecuencia de aparición de tetraploides es de 10^{-5} por individuo y generación. La embrionía adventicia es una condición necesaria, en genotipos apomícticos de cítricos, para la producción de plantas tetraploides y es muy probable que favorezca la producción de este tipo de plantas. En mango (*Mangifera indica* L.) también se ha observado la producción de plantas tetraploides a partir de semillas poliembriónicas (Galán-Saucó *et al.* 2001), aunque no está descrito el mecanismo implicado en este fenómeno.

La variabilidad en el nivel de ploidía ha desempeñado un papel importante en la creación de diversidad genética en las plantas (Stebbins, 1970; Masterson, 1994). Varios factores influyen en la producción y el establecimiento de poblaciones de plantas tetraploides. En las especies de reproducción sexual, la autofecundación es un factor importante así como los mecanismos que favorecen la transferencia de polen de plantas tetraploides a otras plantas tetraploides (Baack, 2005). La competencia favorable para los granos de polen $2x$ respecto a los x puede ser un elemento decisivo en el establecimiento de poblaciones tetraploides según lo demostrado en *Chamerion angustifolium* (Husband y Sabara, 2004). Por otra parte, la apomixis se considera generalmente como un mecanismo muy favorable para el mantenimiento del nivel de ploidía tetraploide (Schranz *et al.* 2005).

A pesar de los frecuentes sucesos de poliploidización en genotipos apomícticos de cítricos, los genotipos tetraploides han jugado un papel poco destacado en la evolución del germoplasma de los cítricos. Se ha demostrado que las células madre productoras de los granos de polen degeneran con mayor frecuencia en los genotipos tetraploides que en los diploides (Frost y Soost, 1968). Estos autores también observaron que durante la metafase I en los genotipos tetraploides se originaban asociaciones tetravalentes, trivalentes, bivalentes y univalentes. Como consecuencia, muchos genotipos tetraploides generalmente producen pocos granos de polen con una dotación cromosómica normal y además presentan una menor viabilidad que las líneas parentales diploides (Frost y Soost, 1968). Esta característica, junto con un menor vigor de las plantas tetraploides (Frost y Soost, 1968) podría favorecer una selección natural en contra de este tipo de plantas. Por otra parte la poliembriónía de muchos de los genotipos tetraploides limita enormemente su potencial evolutivo. Los genotipos tetraploides contribuirían principalmente como parentales masculinos en hibridaciones $2x \times 4x$, produciendo semillas triploides anormales que raramente germinan en condiciones normales. Además los genotipos tetraploides de cítricos se caracterizan por una menor producción y frutos de peor calidad (Cameron y Frost, 1968), ocasionando un aislamiento de las plantas tetraploides durante el proceso de domesticación de los cítricos.

2.5 CONCLUSIONES.

Las plantas tetraploides producidas en genotipos apomícticos diploides de cítricos se originan por una duplicación del número de cromosomas de células individuales de la nucela, las cuales posteriormente originan embriones y éstos plantas tetraploides.

Se han obtenido plantas tetraploides de origen nucelar de los genotipos diploides apomícticos de mandarino `Anana`, `Fairchild`, `Kara`, `Kinnow`, `Sunburst` y `Tardivo de Ciaculli`, tangelos `Mapo` y `Minneola`, tangors `Murcott`, `Nadorcott`, `Ortanique` y `Page`, naranjo `Sanguinelli` y pomelos `Duncan` y `Star Ruby`.

Estas plantas se han incorporado a la colección de genotipos apomícticos tetraploides del Banco de Germoplasma del IVIA para su utilización como parentales masculinos en el programa de obtención de híbridos triploides.

Tabla 2.1. Genotipos de cítricos utilizados para la obtención de plantas tetraploides

Nombre común	Nombre científico
Mandarino `Anana´	<i>C. reticulata</i> Blanco
Mandarino `Fairchild´	<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan. x (<i>C. paradisi</i> Macf. x <i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.)
Mandarino `Kara´	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc. x <i>C. nobilis</i> Lour.
Mandarino `Kinnow´	<i>C. nobilis</i> Lour. x <i>C. deliciosa</i> Ten.
Mandarino `Page´	(<i>C. paradisi</i> Macf. x <i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.) x <i>C. clementina</i> Hort. ex Tan.
Mandarino `Salteñita´	<i>C. deliciosa</i> Ten.
Mandarino `Simeto´	<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc. x <i>C. deliciosa</i> Ten.
Mandarino `Sunburst´	<i>C. reticulata</i> Blanco x <i>C. reticulata</i> Blanco.
Mandarino `Tardivo di Ciaculli´	<i>C. deliciosa</i> Ten.
Naranja `Sanguinelli´	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.
Pomelo `Duncan´	<i>C. paradisi</i> Macf.
Pomelo `Star Ruby´	<i>C. paradisi</i> Macf.
Tangelo `Mapo´	<i>C. deliciosa</i> Ten. x <i>C. paradisi</i> Macf.
Tangelo `Minneola´	<i>C. paradisi</i> Macf. x <i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.
Tangor `Nadorcott´	(<i>C. reticulata</i> Blanco x <i>C. sinensis</i> (L.) Osb.) x ?
Tangor `Murcott´	<i>C. reticulata</i> Blanco x <i>C. sinensis</i> (L.) Osb.
Tangor `Ortanique´	<i>C. reticulata</i> Blanco x <i>C. sinensis</i> (L.) Osb.

Tabla 2.2. Nivel de ploidía de la progenie de plantas diploides de diversos genotipos de cítricos.

	Genotipo																
	Anana	Duncan	Fairchild	Kara	Kinnow	Mapo	Minneola	Murcott	Nadorcott	Ortanique	Page	Salteñita	Sanguinelli	Simeto	Star Ruby	Sunburst	T. Ciaculli
Número semillas sembradas	96	96	192	136	96	96	192	192	96	144	192	96	96	96	96	192	96
Número se semillas germinadas	70	78	115	100	92	38	166	179	77	105	156	84	63	73	61	112	73
Nº de plántulas por semilla germinada	1,43	1,35	1,17	1,29	1,46	1,13	1,58	1,73	1,21	1,57	1,42	1,65	1,25	1,63	1,48	1,08	1,52
Número de plántulas analizadas	100	105	134	129	134	43	262	309	93	165	222	139	79	119	90	121	111
Número de plántulas 3x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Nº de semillas que produjeron plántulas 4x	4	5	1	2	13	2	3	8	2	4	1	0	2	0	1	2	6
Número de plántulas 4x	4	5	1	2	13	2	3	10	2	4	1	0	2	0	1	2	7
% de semillas que produjeron plántulas 4x	5,7	6,4	0,9	2,0	14,1	5,26	1,8	4,5	2,6	3,8	0,6	0,0	3,2	0,0	1,6	1,8	9,6
% de plántulas 4x sobre el total de plantas	4,0	4,8	0,8	1,6	9,7	4,7	1,2	3,2	2,2	2,4	0,5	0,0	2,5	0,0	1,1	1,7	6,3

Tabla 2.3. Nivel de ploidía de las plántulas procedentes de semillas de plantas diploides de diferentes genotipos de cítricos que dieron lugar a alguna plántula tetraploide.

Asociaciones*	Nº de semillas														
	Anana	Duncan	Fairchild	Kara	Kinnow	Mapo	Minneola	Murcott	Nadorcott	Ortanique	Sanguinelli	Star Ruby	Sunburst	Page	T. Ciaculli
1 plántula 4x	1	1	1	2	7	2	1	2	1	2	2	1	1	1	3
1 plántula 4x + 1 plántula 2x	3	4	0	0	5	0	2	2	1	1	0	0	1	0	2
1 plántula 4x + 2 plántulas 2x	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1 plántula 4x + 3 plántulas 2x	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1 plántula 4x + 4 plántulas 2x	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2 plántulas 4x	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1
Nº de semillas que produjeron plántulas 4x	4	5	1	2	13	2	3	8	2	4	2	1	2	1	6
Total plántulas 4x	4	5	1	2	13	2	3	10	2	4	2	1	2	1	7

*Las asociaciones indican el número de plántulas de cada nivel de ploidía a partir de una misma semilla

Tabla 2.4. Análisis genético con marcadores microsatélites de los parentales utilizados.

<i>Loci</i> microsatélites	Genotipos														
	Anana	Duncan	Fairchild	Kara	Kinnow	Mapo	Minneola	Murcott	Nadorcott	Ortanique	Page	Sanguinelli	Star Ruby	Sunburst	T. Ciaculli
CAC 15		134-160											134-160		
Ci01C06				134-148											
Ci01C07	238-254								238-278						
Ci02B07			164-170			164-172	164-172					164-170			164-170
Ci02D04b	190-200				194-226		208-226	194-226	196-226		208-226	194-226		196-208	194-226
Ci02D09					228-236						228-236				
Ci02F12			124-134	124-134	124-134		124-134	126-134		124-126		126-134		124-134	126-134
Ci02G02			114-124	114-124	114-124	108-124	102-124	114-124		114-124		114-124			
Ci02G12					250-260		236-250								
Ci03C08	208-220				200-220										
Ci03D12a	244-254				244-276		260-276		244-276		260-276	250-260		250-260	250-276
Ci03G05	202-228														
Ci04H06					208-214										
Ci05A05					154-164	146-164			154-164						
Ci06A05b	200-222														
Ci06A08	124-136	124-136		124-134		124-136	124-136	124-136				124-136	124-136	120-136	124-136
Ci06C06											135-158				
Ci07C07									226-238						
Ci07C09	240-256	240-256							240-256				240-256		
Ci07D06		166-186	166-186	186-196		178-186	186-196		186-196	166-186		166-186	166-186	186-196	178-186
Ci07E06		226-240								226-240			226-240		
Ci07E12			110-116					120-122						110-116	
Ci08C05	156-162	148-158												148-158	
Mest 15			176-184	176-186	176-190			176-190		176-190	176-190	176-186			190-196
Mest 56		136-170	136-142				136-148				136-148		136-170	136-148	
Mest 88										102-114					
Mest 123			246-266	256-266		250-276	250-276	246-256		250-276		250-276			250-276
Mest 132			244-264	244-250				240-264		228-240	240-264	248-264			240-248
Mest 192			220-230		220-240			220-240						220-230	
TAA 1						160-165									
TAA 15	174-186								186-200	162-200	186-188				
Nº de loci heterocigóticos	10	7	10	8	11	7	10	9	8	9	9	10	7	8	10
Probabilidad identificación zigótico.	0,999	0,992	0,999	0,996	0,9995	0,992	0,999	0,998	0,996	0,998	0,998	0,999	0,992	0,996	0,999

Los números escritos en cada celda indican el tamaño en nucleótidos (nt) de los dos alelos correspondientes a cada *locus* microsatélite. Las celdas vacías corresponden a aquellos genotipos y marcadores en los cuales no se ha realizado el análisis genético.

File: 2503

Peak	Index	Mode	Mean	Area	Area%	CV%
1	1.000	50	49.39	698	43.87	1.52
2	2.042	102	100.83	604	37.96	2.23

Total Count: 1591

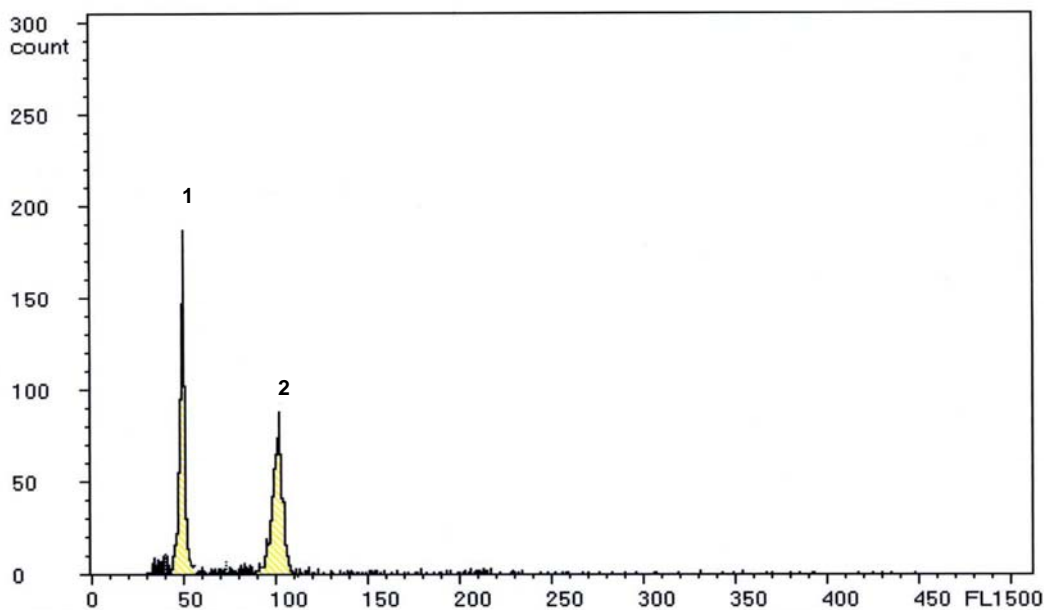


Figura 2.1 Histograma de una planta diploide control (pico 1) y de una plántula tetraploide de mandarino `Kinnow` (pico 2).

File: 2831

Peak	Index	Mode	Mean	Area	Area%	CV%
1	1.000	53	53.05	887	47.51	1.41
2	1.535	82	81.43	705	37.76	0.92

Total Count: 1867

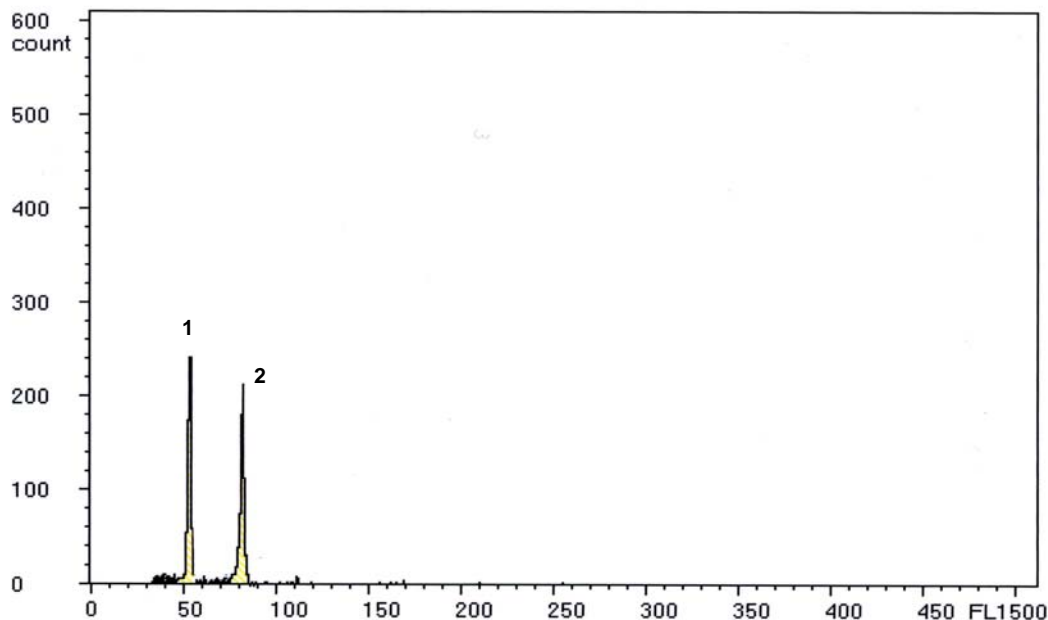


Figura 2.2 Histograma de una planta diploide control (pico 1) y de una plántula triploide de mandarino `Tardivo di Ciaculli` (pico 2).



Figura 2.3. Cromosomas correspondientes a una planta tetraploide ($2n = 4x = 36$) de tanger 'Murcott'.

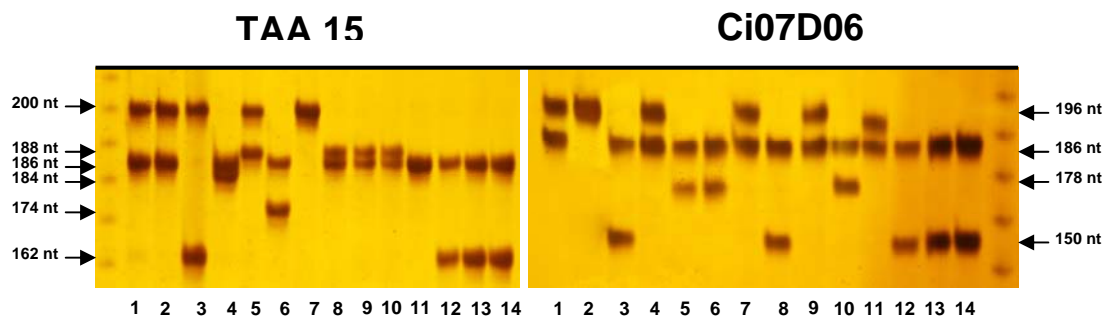


Figura 2.4 Variabilidad alélica correspondiente a los *loci* microsatélites TAA 15 y Ci07D06 de los genotipos diploides utilizados como fuente de semillas: 1 'Nadorcott', 2 'Murcott', 3 'Ortanique', 4 'Kara', 5 'T. Ciaculli', 6 'Anana', 7 'Kinnow', 8 'Fairchild', 9 'Sunburst', 10 'Mapo', 11 'Minneola', 12 'Sanguinelli', 13 'Duncan', 14 'Star Ruby'.

Capítulo 3. Obtención de plantas tetraploides de genotipos no apomícticos de mandarino mediante microinjerto in vitro de ápices caulinares tratados con colchicina y orizalina

CAPÍTULO 3. OBTENCIÓN DE PLANTAS TETRAPLOIDES DE GENOTIPOS NO APOMÍCTICOS DE MANDARINO MEDIANTE MICROINJERTO IN VITRO DE ÁPICES CAULINARES TRATADOS CON COLCHICINA Y ORIZALINA.

3.1 INTRODUCCIÓN.

La mayoría de las variedades triploides de cítricos seleccionadas hasta el momento han sido originadas a partir de hibridaciones $2x \times 2x$ (Navarro *et al.* 2006a) y $2x \times 4x$ en las que el parental masculino tetraploide ha sido obtenido espontáneamente en semilleros de genotipos apomícticos (Soost y Cameron 1980, 1985; Starrantino 1992; Yoshida *et al.* 2003; Russo *et al.* 2004). Mediante hibridaciones $4x \times 2x$ únicamente se han seleccionado los tres híbridos triploides de la serie TDE (Williams y Roose, 2004) y un híbrido triploide japonés (Tokunaga *et al.* 2005).

Los genotipos de cítricos son predominantemente apomícticos y en éstos los embriones nucelares limitan o impiden el desarrollo del embrión zigótico, por lo que no pueden ser utilizados como parentales femeninos en programas de hibridación para obtener poblaciones elevadas de híbridos (Wakana *et al.* 1981). Los genotipos no apomícticos se limitan a los cidros, las zamboas y algunos mandarinos, por lo que el número de parentales no apomícticos de mandarina que pueden emplearse en programas de mejora son escasos, limitando la variabilidad genética que puede utilizarse en los mismos (Grosser y Gmitter, 1990). En los genotipos no apomícticos la obtención de plantas tetraploides por duplicación espontánea del número de cromosomas de células de la nucela no sucede naturalmente y tampoco pueden obtenerse mediante la técnica de cultivo de óvulos *in vitro* en presencia de colchicina, ya que los óvulos de los genotipos no apomícticos no tienen capacidad embriogénica cuando se cultivan *in vitro*. Las plantas tetraploides obtenidas por estos métodos, a partir de genotipos apomícticos, son plantas con características juveniles. Los cítricos presentan un largo periodo juvenil y requieren entre 4 y 8 años para empezar a florecer y fructificar. Además, las plantas tetraploides tardan más en florecer y fructificar que las diploides (Cameron y Frost, 1968). Por ello es de gran utilidad la obtención de plantas tetraploides de genotipos no apomícticos a partir de material adulto que produzcan flores rápidamente para poder ser utilizarlas en cruzamientos sexuales para la obtención de híbridos triploides.

La colchicina es un alcaloide contenido en las semillas y en el tubérculo de *Colchicum autumnale* L. que tiene acción poliploidógena. Blakeslee y Avery (1937) fueron los primeros autores que utilizaron la colchicina para lograr poliploides en *Datura stramonium* L. y también en 17 géneros distintos de plantas, destacando *Nicotiana*, *Raphanus*, *Cucurbita*, *Zea* y *Allium*. La colchicina actúa inhibiendo la acción de las fibras del huso, ya que presenta una especial afinidad por una subunidad molecular de la tubulina, proteína constituyente de los microtúbulos que son los encargados de formar las fibras del huso. Esta acción evita la migración de las cromátidas hermanas de cada estructura cromosómica doble hacia los extremos opuestos de la célula, obteniendo células con el número de cromosomas duplicado (Griffiths *et al.* 1999). Los herbicidas del grupo de las dinitroanilinas como la orizalina y la trifluralina tienen potente actividad antimitótica. La orizalina se fija a la tubulina e inhibe

la polimerización de las fibras del huso (Morejohn *et al.* 1987). La orizalina ha sido utilizada en especies en las que la colchicina es fitotóxica.

La colchicina es el producto que más se ha utilizado en plantas con el objetivo de obtener poliploides y para ello se han utilizado tanto técnicas *in vivo* como técnicas basadas en el cultivo *in vitro*. Blakeslee y Avery (1938) utilizaron toda una gama de técnicas de aplicación de soluciones de colchicina *in vivo*, inmersión de semillas y brotes en soluciones de colchicina, introducción de las yemas apicales de los brotes en tubos con colchicina y agar al 0,8 %, recubrimiento de los brotes con una cuerda e introducción del extremo de la cuerda en una solución de colchicina que por capilaridad moja continuamente las yemas de los brotes, adición de gotas de una solución de colchicina sobre las yemas apicales y pulverización de la planta con una solución de colchicina. Las técnicas de cultivo *in vitro* se basan en el cultivo de diferentes tipos de explantes en medios de cultivo con colchicina e inducción de la regeneración de plantas vía organogénesis axilar. Los tipos de explantes más utilizados son pequeños brotes obtenidos por cultivo *in vitro* (Kadota y Niimi, 2002; Ganga y Chezhiyan, 2002; Nguyen *et al.* 2003; Gu *et al.* 2005; Stanys *et al.* 2006) aunque también se han utilizado ápices caulinares (Roy *et al.* 2001) o semillas (Liu *et al.* 2007). La orizalina ha sido menos utilizada que la colchicina en las plantas como agente poliploidizante y las técnicas de aplicación, tanto *in vivo* como *in vitro*, han sido muy similares a las aplicadas en la colchicina.

En cítricos pueden originarse quimeras sectoriales, periclinales y mericlinales (Cameron y Frost, 1968). Frost y Krug (1942) describieron la obtención de dos citoquimeras $2x - 4x$ a partir de una mutación espontánea en una rama de un híbrido de mandarino 'King' (*Citrus nobilis* Lour.) por mandarino 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tan.). En la primera citoquimera descrita el nivel de ploidía de las capas histogénicas LI, LII y LIII fue $2x$, $4x$ y $4x$ respectivamente, mientras que en la segunda citoquimera el nivel de ploidía de las capas histogénicas fue $2x$, $4x$ y $2x$ respectivamente. Barret (1974), mediante el recubrimiento de yemas axilares con apósitos de colchicina al 1 %, obtuvo un elevado número de citoquimeras $2x - 4x$, con modificaciones en el nivel de ploidía en todas las capas histogénicas y en todas las combinaciones posibles en 18 genotipos de cítricos. Además también obtuvo una citoquimera $2x - 8x$ ($2x - 8x - 8x$) en un híbrido de mandarino 'Temple' (*C. temple* Hort. ex Y. Tan.) por mandarino 'Ponkan' (*C. reticulata* Blanco). Posteriormente, Barret y Hutchison (1981) describieron una citoquimera $4x - 8x$ ($4x - 8x - 8x$) en una población de 7.781 plantas tetraploides de citrange 'Carrizo' de origen nucelar. Más recientemente, Yamamoto y Tominaga (2004) describieron la obtención espontánea de una quimera periclinal $x - 2x$ (haploide - diploide) de clementina y posteriormente Yahata *et al.* (2005b) obtuvieron quimeras $x - 2x$ y $2x - 4x$ a partir del tratamiento de yemas axilares con colchicina de un genotipo haploide de zamboa 'Banpeiyu' (*C. grandis* (L.) Osb.).

El método más antiguo utilizado para la obtención de plantas tetraploides en genotipos no apomícticos de cítricos es el tratamiento *in vivo* de yemas con colchicina (Barret 1974; Oiyama y Okudai 1986; Jaskani *et al.* 1996; Wakana *et al.* 2005). Sin embargo, la mayoría de los genotipos obtenidos son citoquimeras sin valor para la mejora. Además, los métodos empleados para determinar el nivel de ploidía se basaban en características morfológicas y métodos histológicos que no son capaces de discriminar adecuadamente entre un genotipo no quimérico y una citoquimera.

En este capítulo se describe la metodología del tratamiento de ápices caulinares con colchicina y orizalina así como la obtención de genotipos tetraploides no quiméricos. Se presenta una caracterización morfológica e histológica de genotipos diploides y tetraploides de clementina 'Clemenules' (*C. clementina* Hort. ex Tan.).

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS.

3.2.1 Material vegetal.

Se han utilizado los genotipos no apomícticos clementina 'Fina', 'Marisol' y 'Clemenules', mandarino 'Moncada' (*C. clementina* x (*C. unshiu* x *C. nobilis*)), mandarino 'Imperial' (*C. deliciosa* Ten.) y el tangor 'Ortanique' (*C. reticulata* x *C. sinensis*). También se han utilizado los genotipos tetraploides de clementina 'Clemenules' 8.5 y 8.10 obtenidos a partir del microinjerto *in vitro* de ápices caulinares y tratamiento con colchicina al cabo de 7 – 10 días de haber realizado el microinjerto. Todos los genotipos utilizados pertenecen al Banco de Germoplasma del IVIA.

3.2.2 Producción de brotes y aislamiento de los ápices.

Para la obtención de brotes se cultivaron *in vitro* varetas de los genotipos seleccionados. Las varetas se recolectaron de plantas cultivadas en invernadero, se eliminaron las hojas y se lavaron con agua y jabón. A continuación se desinfectaron por inmersión durante 10 min en una solución acuosa de hipoclorito sódico al 2 % (v/v) con 0,1 % (v/v) de Tween 20 y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril cuatro veces. Las varetas se cultivaron individualmente en tubos de ensayo de gran tamaño (3,5 cm de diámetro) que contenían un medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962) y agar al 1,2 % a temperatura constante de 32 °C y expuestas durante 16 horas al día a una iluminación de 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En estas condiciones las varetas produjeron brotes al cabo de 7 - 14 días.

Los brotes obtenidos se esterilizaron superficialmente con una solución acuosa de hipoclorito sódico al 0,25 % (v/v) con 0,1 % (v/v) de Tween 20 durante 5 min. En condiciones asépticas, se eliminaron los primordios foliares de mayor tamaño con ayuda de instrumentos de microdisección bajo un microscopio estereoscópico y se aisló el ápice caulinar compuesto por el meristemo apical y tres o cuatro primordios foliares, con un tamaño de 0,2 mm aproximadamente.

3.2.3 Tratamiento de los ápices.

Se utilizaron dos agentes poliploidizantes, colchicina y orizalina. A los ápices tratados con colchicina se les sometió a dos tipos de tratamiento: 1) Inmersión en condiciones asépticas en una solución de colchicina (Sigma®) esterilizada por filtración (filtros de 0,22 μm) con distintas concentraciones y tiempos de exposición (tabla 3.1), 2) Tratamiento de ápices previamente

microinjertados (tabla 3.2). En este caso, al cabo de 7 - 10 días de realizado el microinjerto se depositó una gota de una solución de colchicina, esterilizada por filtración, al 0,1 % (v/v) en la incisión del patrón donde se había situado el ápice microinjertado (figuras 3.1.a y 3.1.b).

El tratamiento de los ápices con orizalina (Supelco®) se realizó de la misma forma que con el segundo tratamiento de colchicina (tabla 3.3), utilizando una solución de orizalina al 0,1 %.

Como testigos se utilizaron los mismos tratamientos sustituyendo la colchicina y orizalina por agua estéril.

3.2.4 Microinjerto *in vitro* de ápices caulinares.

Para la realización del microinjerto se utilizó como patrón el citrange 'Troyer' (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), obtenido mediante germinación de semillas *in vitro*. Las semillas se pelaron eliminando los tegumentos y se esterilizaron superficialmente con una solución acuosa de hipoclorito sódico al 0,5 % (v/v) con 0,1 % (v/v) de Tween 20 durante 10 min y se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de la solución esterilizante. Las semillas se sembraron en tubos de ensayo que contenían medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962) y agar al 1 % y se incubaron en oscuridad a 27 °C durante dos semanas. Los patrones se sacaron del tubo de ensayo en condiciones asépticas y se decapitaron dejando aproximadamente 1,5 - 2 cm de epicotilo, se eliminaron los cotiledones y sus yemas axilares y se cortó el extremo de la raíz, dejando 4 - 6 cm de la misma. En el extremo del epicotilo decapitado se realizó una incisión en forma de ventana sobre la que se depositó el ápice aislado (figura 3.1.a).

En todos los casos las plantas microinjertadas se cultivaron en un medio líquido compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 0,2 mg/L de clorhidrato de tiamina, 1 mg/L de clorhidrato de piridoxina, 1 mg/L de ácido nicotínico y 75 g/L de sacarosa. Los cultivos se mantuvieron a temperatura constante de 27 °C expuestos a 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con una intensidad luminosa de 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.5 Trasplante.

Las plantas obtenidas se trasplantaron a macetas que contenían un sustrato compuesto por una mezcla de tres partes de turba (mezcla 1:1 de turba negra y turba rubia) por una parte de perlita y esterilizado por vapor de agua a 100 °C. Las macetas se introdujeron en bolsas de polietileno transparente que se cerraron y se colocaron en una zona sombreada del invernadero a 18 - 25 °C, eliminándose la bolsa al cabo de 15 - 20 días.

3.2.6 Determinación del nivel de ploidía.

La determinación del nivel de ploidía se realizó mediante citometría de flujo según la metodología descrita en el Capítulo 1, apartado 1.2.6. Se determinó el nivel de ploidía cuando las hojas de la primera brotación de las plantas regeneradas aclimatadas en el invernadero alcanzaron el

pleno desarrollo para evitar interferencias con la fase G2 del ciclo celular. En cada planta se identificaron las ramas y dentro de la rama se enumeraron todas las hojas. Las muestras estaban constituidas por un fragmento de aproximadamente 0,5 cm² de una hoja de ploidía desconocida junto con otro fragmento de hoja, de las mismas dimensiones, de una planta control diploide. En aquellas muestras en las que se obtuvieron histogramas mostrando dos picos, uno correspondiente a células diploides y otro a células tetraploides, se volvieron a analizar pero sin el control diploide. De esta forma es posible identificar sin confusión las hojas con perfiles diploides, tetraploides y mixoploides.

3.2.7 Análisis genético.

La extracción del ADN genómico se realizó según Dellaporta y Hicks (1983).

El análisis genético se realizó mediante marcadores microsátélites. Las plantas establecidas en invernadero junto con las plantas originales se analizaron genéticamente con 17 *loci* microsátélites heterocigóticos para clementina y mandarino 'Moncada' descritos por Kijas *et al.* (1997), Froelicher *et al.* (2008) y Luro *et al.* (2008) (tabla 3.4).

La reacción de PCR utilizada, la desnaturalización de las muestras, las condiciones de electroforesis y la metodología de tinción son las mismas que las descritas en el Capítulo 1 apartado 1.2.7.

3.2.8 Caracterización histológica de anteras, ovarios, estilos y estigmas de una planta diploide y dos plantas tetraploides de clementina 'Clemenules'.

Se tomaron 20 flores en estado fenológico de preantésis de clementina 'Clemenules' diploide y de los genotipos tetraploides 8.5 y 8.10 de clementina 'Clemenules' pertenecientes al Banco de Germoplasma del IVIA. De cada flor se fijaron por separado en FAA (formaldehído, ácido acético glacial, alcohol al 50 %), las anteras, ovarios, estilos y estigmas. Las muestras se incluyeron en parafina y se tiñeron con safranina y verde rápido según la metodología general descrita por Jensen (1962). Las observaciones se realizaron en un microscopio Nikon Eclipse E800.

3.2.9 Caracterización morfológica.

Se caracterizaron morfológicamente la clementina 'Clemenules' diploide del Banco de Germoplasma del IVIA. y dos genotipos tetraploides de clementina 'Clemenules' obtenidos a partir del tratamiento de ápices microinjertados con colchicina (genotipos 8.5 y 8.10). Para la caracterización morfológica de las hojas se midió la superficie, longitud, anchura e índice de color del haz según Jiménez-Cuesta *et al.* (1981). Las medidas se realizaron en un medidor de superficie foliar modelo Li-Cor 3100 C. Para la medición del color se utilizó un colorímetro Minolta CR, realizando tres mediciones por hoja y utilizando como dato la media de las tres. De cada planta se seleccionaron 30 hojas adultas situadas en la zona intermedia de los brotes de primavera, eliminando las hojas fuera de tipo.

Para evaluar la espinosidad, se tomaron 20 brotes de primavera en los que se contó el número de nudos, el número de nudos con espinas y se midió la longitud de dichas espinas.

3.2.10 Germinación de los granos de polen.

En dos años consecutivos, se recolectaron 20 flores, en estado fenológico de preantésis distribuidas por todo el árbol, de clementina 'Clemenules' diploide y de los genotipos 8.5 y 8.10 de clementina 'Clemenules' tetraploide. Las anteras se separaron del filamento estaminal con unas pinzas y posteriormente se introdujeron en un desecador con silicagel como agente desecante hasta que se observó la completa dehiscencia de las tecas (24 - 48 h). Los granos de polen se recolectaron de las anteras con ayuda de un pincel. Posteriormente, sobre un portaobjetos, se depositó una pequeña película de medio de cultivo compuesto por sacarosa al 20 % y agar al 1 %. Cuando el medio solidificó, al cabo de unos minutos, se sembró el polen de tal forma que quedara uniformemente repartido sobre el medio de cultivo. Los portaobjetos con el polen sembrado se introdujeron en placas de Petri de 9 cm con papel de filtro ligeramente húmedo, y se dejaron en la cámara de cultivo a temperatura constante de 27 °C en oscuridad.

La toma de datos se realizó al cabo de 24 h de haber sembrado el polen. Se consideró germinado el grano de polen cuando se observó el desarrollo del tubo polínico.

3.2.11 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía a todas las variables de hoja analizadas. El factor de clasificación tenía tres niveles: un genotipo diploide y dos genotipos tetraploides (8.5 y 8.10) de clementina 'Clemenules'. Se aplicó la transformación raíz cuadrada ($\sqrt{}$) para la variable área (cm²). El modelo utilizado fue: $x_{ij} = \mu + G_i + \varepsilon_{ij}$, donde μ es la media general, G_i corresponde al genotipo i -ésimo y ε_{ij} a la medida j -ésima correspondiente al genotipo i con $i = 1, \dots, 3$ y $j = 1, \dots, 30$.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.3.1 Efecto de la concentración, tiempo y modo de aplicación de la colchicina y orizalina sobre el desarrollo de los ápices. Determinación del nivel de ploidía.

En todas las experiencias realizadas se observó que el número de ápices desarrollados tratados con colchicina fue menor que sus respectivos controles, lo que indica un claro efecto negativo de la colchicina en el desarrollo de los mismos. Además conforme aumentaron los tiempos de exposición y las concentraciones, el número de microinjertos desarrollados disminuyó progresivamente (tabla 3.1). El porcentaje de microinjertos desarrollados obtenido al sumergir ápices de clementina 'Clemenules' en una solución de colchicina al 0,1 % durante 3 h fue del 37,5 % mientras que al 0,5 % durante 72 h fue del 0 %. La inmersión de ápices caulinares de clementina

‘Clemenules’ en una solución de colchicina al 0,1 % durante 3 h y posterior microinjerto *in vitro* de dichos ápices produjo la regeneración de plantas diploides (figura 3.2) en el 66,7 % de los casos, plantas mixoploides 2x - 4x (figura 3.3) en el 33,3 % y no se obtuvo ninguna planta tetraploide. El aumento del tiempo de inmersión y de las concentraciones de las soluciones de colchicina tampoco originó la obtención de plantas tetraploides, aunque sí que se obtuvieron plantas mixoploides 2x - 4x cuando la concentración de la solución de colchicina fue entre el 0,1 - 0,2 % y el tiempo de inmersión fue inferior o igual a 24 h.

Los porcentajes de microinjertos desarrollados obtenidos a partir de la aplicación directa de una solución de colchicina al 0,1 % al cabo de 7 - 10 días de haber realizado el microinjerto fue del 51,7 %, 47,7 %, 8,3 %, 4,2 % y 0 % en clementina ‘Fina’, clementina ‘Clemenules’, mandarina ‘Moncada’, mandarina ‘Imperial’ y tangor ‘Ellendale’ respectivamente (tabla 3.2). Este método permitió la obtención de plantas tetraploides de clementina ‘Clemenules’ (origen de los genotipos 8.5 y 8.10 de clementina ‘Clemenules’ tetraploide), clementina ‘Fina’ y mandarina ‘Moncada’ a partir de la brotación directa del ápice microinjertado (tabla 3.2 y figuras 3.4 y 3.5). El porcentaje de plantas tetraploides osciló entre el 40 % en mandarina ‘Moncada’, el 9,5 % en clementina ‘Clemenules’ y el 6,5 % en clementina ‘Fina’. Además, en los tres genotipos, también se regeneraron plantas mixoploides 2x – 4x, fluctuando entre el 20 %, el 9,5 % y el 22,5 % respectivamente. Sin embargo en mandarina ‘Imperial’ y tangor ‘Ellendale’ no se obtuvieron ni plantas mixoploides 2x – 4x ni plantas tetraploides, debido a una mayor sensibilidad de estos dos genotipos a la colchicina, ya que ninguno de los ápices tratados se desarrolló. Ganga y Chezhiyan (2002) y Stanys *et al.* (2006) en sus trabajos realizados en diferentes genotipos de *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach y *Musa* spp., respectivamente, también encontraron diferencias utilizando colchicina en la duplicación del número de cromosomas según el genotipo empleado.

En las experiencias donde los ápices fueron microinjertados y posteriormente se les aplicó una gota de colchicina sobre la incisión del injerto, se observó en algunos casos un necrosamiento de los ápices que finalmente provocó la muerte de los mismos (figura 3.6.a). También se pudo observar una hipertrofia en el crecimiento del patrón en la zona de injerto aunque en este caso no impedía el crecimiento del ápice (figura 3.6.b). Las hojas de los ápices que evolucionaron presentaban un aspecto más basto con formas muy abultadas y recurvadas (figuras 3.6.c y 3.6.d). No obstante, cuando estas plantas se trasplantaron a maceta, se desarrollaron con normalidad. Sin embargo en las plantas regeneradas mediante la inmersión de los ápices caulinares en una solución de colchicina no se observaron los síntomas descritos anteriormente ya que con esta metodología, la gota de colchicina no permanece tanto tiempo en contacto con los tejidos del patrón y por lo tanto no se producen dichos síntomas.

Comparando la influencia de la concentración, el tiempo de inmersión de los ápices en colchicina y la aplicación directa de una gota de colchicina sobre el ápice microinjertado (tablas 3.1 y 3.2), es evidente que la aplicación directa de colchicina sobre el ápice microinjertado es el mejor método para inducir la duplicación cromosómica a partir de la brotación directa del ápice microinjertado, ya que permitió la obtención de plantas tetraploides. Además, la inmersión de los

ápices en soluciones de colchicina es un método más laborioso e incomodo, pues resulta complicado rescatar los ápices de la solución de colchicina debido a su diminuto tamaño.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos con colchicina no permitieron establecer una relación directa entre los tratamientos y el número de plantas tetraploides obtenidas, se decidió ensayar la orizalina como agente poliploidizante y comprobar el efecto producido en los genotipos estudiados, para lo cual se realizaron experiencias comparando tratamientos con soluciones de colchicina y orizalina al 0,1 %, depositando una gota de estas soluciones sobre el ápice microinjertado al cabo de 7 - 10 días de realizado el microinjerto (tabla 3.3). El porcentaje de ápices desarrollados con orizalina (33,3 %) es mayor que el obtenido con colchicina (15 %), mientras que el porcentaje de plantas tetraploides obtenidas con colchicina, 33,3 % (3/9) es prácticamente el doble del obtenido con orizalina 15 % (3/20) (tabla 3.3). Además, con colchicina el 22,2 % (2/9) de las plantas regeneradas fueron mixoploides mientras que con orizalina fueron el 5 % (1/20).

Éste es el primer trabajo en cítricos en el que se describe la obtención de plantas tetraploides y mixoploides a partir de la aplicación de una gota de una solución de orizalina sobre el ápice microinjertado. Con los resultados obtenidos es evidente que la colchicina presentó un mayor efecto fitotóxico que la orizalina aunque permitió regenerar un mayor número de plantas tetraploides, por lo que la colchicina es mucho más eficiente que la orizalina, ya que es necesario analizar menos plantas para detectar una planta tetraploide. En los genotipos en los que no se obtuvo ninguna planta mixoploide ni tetraploide la reducción en la concentración de la solución de colchicina aplicada puede ser una vía a partir de la cual sea posible regenerar plantas tetraploides. Wu y Mooney (2002) observaron claras diferencias en el desarrollo de callos embriogénicos de diferentes genotipos de *Citrus* cultivados en medios de cultivo con colchicina y orizalina. La orizalina inhibía totalmente el desarrollo de los callos mientras que con la colchicina hubo una respuesta diferencial en función del genotipo. En *Rhododendron* (Väinölä, 2000) y *Alocasia* spp. (Nguyen *et al.* 2003) los mejores resultados fueron obtenidos utilizando la orizalina mientras que en *Miscanthus sinensis* (Petersen *et al.* 2003) los mejores resultados fueron obtenidos con colchicina.

Con los resultados obtenidos en las diferentes experiencias realizadas, el método seleccionado para inducir la duplicación del número de cromosomas en genotipos no apomícticos de mandarino es el microinjerto *in vitro* y posterior adición de una gota de una solución de colchicina al 0,1 % sobre el ápice transcurridos 7 - 10 días de haber realizado el microinjerto. Este método es el que se está aplicando de forma rutinaria en nuestro laboratorio para la obtención de plantas tetraploides de genotipos no apomícticos de cítricos.

3.3.2 Obtención de plantas tetraploides estables a partir de citoquimeras.

En este trabajo se han obtenido un total de 21 citoquimeras $2x - 4x$ en todas los genotipos de clementina ensayados y en mandarino 'Moncada' (tablas 3.1, 3.2 y 3.3), tanto con colchicina como con orizalina. Las citoquimeras obtenidas se han clasificado en 5 grupos diferentes: 1) citoquimeras con todas las hojas mostrando perfiles mixoploides ($2x - 4x$), 2) citoquimeras con hojas con perfiles mixoploides y hojas con perfiles tetraploides (figura 3.7), 3) citoquimeras con hojas con perfiles

mixoploides y hojas con perfiles diploides, 4) quimeras sectoriales con un sector de la planta mixoploide y otro sector tetraploide (figura 3.8) y 5) quimeras sectoriales con un sector mixoploide y otro sector diploide (figura 3.9). Para la obtención de plantas tetraploides enteras a partir de citoquimeras se utilizaron dos metodologías diferentes: 1) injertando en escudete con madera yemas axilares correspondientes a hojas con perfiles tetraploides y mixoploides y posterior selección de aquellos injertos que mostraban en todas las hojas histogramas con perfiles tetraploides y 2) a partir de la segregación de quimeras sectoriales, podando los sectores mixoploides y conservando el sector autotetraploide. Posteriormente se analizaron todas las hojas producidas en las nuevas brotaciones para confirmar el nivel de ploidía.

A partir de las citoquimeras del tipo 1 y 2 no se han podido regenerar plantas tetraploides mientras que a partir de los tipos 3, 4 y 5 sí que se han regenerado plantas tetraploides estables. En clementina `Fina` se han obtenido 2 plantas tetraploides a partir de 2 citoquimeras sectoriales del tipo 4 ($2x - 4x / 4x$) en las que se eliminó el sector mixoploide y se conservó únicamente el sector tetraploide (figura 3.8). Además, también se obtuvo una planta tetraploide a partir de una citoquimera del tipo 2 que presentaba un único brote con hojas con perfiles mixoploides y tetraploides (figura 3.7). Se injertaron en escudete con madera las yemas axilares correspondientes a las hojas con estos perfiles. Posteriormente se analizó el nivel de ploidía de los brotes obtenidos mediante citometría de flujo y se seleccionaron aquellos injertos que mostraban en todas las hojas histogramas con perfiles tetraploides.

Del mismo modo en clementina `Clemenules` se ha obtenido un genotipo tetraploide a partir de una quimera sectorial tipo 4 ($2x - 4x / 4x$) eliminando el sector mixoploide y conservando únicamente el sector tetraploide.

En clementina `Marisol` se ha obtenido un genotipo tetraploide a partir de una quimera sectorial tipo 5 ($2x - 4x / 2x$), obtenida al sumergir el ápice en una solución de colchicina al 0,1 % durante 3 horas. Se eliminó el sector diploide y se forzó la brotación de las yemas axilares del sector mixoploide. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo las hojas de los brotes desarrollados (figura 3.9), seleccionando únicamente la rama en la que todas sus hojas presentaban perfiles tetraploides.

Barret (1974) obtuvo un número elevado de citoquimeras (quimeras periclinales con modificaciones del nivel de ploidía en todas las capas histogénicas) en diferentes genotipos apomícticos y no apomícticos de cítricos. La determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas la realizó mediante la observación de parámetros morfológicos (espesor y color de las hojas, tamaño de los estomas, etc.) mientras que la determinación del nivel de ploidía de las capas histogénicas LI, LII y LIII de los ápices tratados con colchicina la realizó en base al tamaño relativo de las células. Esta metodología no es fiable ya que un aumento del tamaño celular no implica necesariamente que las plantas regeneradas a partir del desarrollo de dicho ápice sean plantas estables y con todas las células con el mismo número de cromosomas. Sin embargo, la citometría de flujo es una técnica potente e imprescindible para la determinación de un modo totalmente fiable del nivel de ploidía de las plantas regeneradas tratadas con colchicina u orizalina y además es un método rápido que en muy poco tiempo permite analizar todas las hojas de una planta con el fin de tener un

esquema completo del nivel de ploidía, diferenciando claramente citoquimeras de aquellas que no lo son.

Los resultados obtenidos demuestran que en cítricos es posible obtener plantas tetraploides a partir de citoquimeras $2x - 4x$. Las quimeras sectoriales, tanto $2x - 4x / 2x$ y $2x - 4x / 4x$, son el tipo de planta a partir del cual es posible obtener plantas tetraploides enteras de un modo más sencillo, ya que únicamente es necesario eliminar el sector mixoploide y conservar el sector tetraploide. Sin embargo a partir de citoquimeras con hojas con perfiles mixoploides y tetraploides también es posible regenerar plantas tetraploides pero requieren un poco más de trabajo, ya que es necesario identificar e injertar cada yema por separado mientras que en los tipos de citoquimeras anteriores no es necesario. En los trabajos realizados por Oiyama y Okudai (1986) y Jaskani *et al.* (1996) en diferentes genotipos de cítricos utilizando el tratamiento *in vivo* de yemas axilares con colchicina y determinación del nivel de ploidía mediante parámetros morfológicos y técnicas histológicas, no consiguieron obtener tetraploides, debido a que en la mayoría de los casos regeneraron citoquimeras. Resultados similares se han obtenido en peral japonés, *Pyrus pyrifolia* N. 'Hosui' por Kadota y Niimi (2002) cultivando *in vitro* ápices de 5 mm en un medio de cultivo con colchicina al 0,01 y 0,1 %, generando plantas tetraploides no quiméricas a partir de la segregación de los genotipos citoquiméricos. En lúpulo (*Humulus lupulus* L.), Roy *et al.* (2001) obtuvieron plantas mixoploides ($2x - 4x$) al cultivar *in vitro* ápices de 3 - 6 mm en medios de cultivo con diferentes concentraciones de colchicina (0,01 %, 0,05 %, 0,1 % y 0,5 %) y regeneraron plantas diploides, tetraploides y mixoploides ($2x - 4x$). Posteriormente a partir de segmentos de hojas de las plantas mixoploides indujeron la producción de callo organogénico a partir del cual, regeneraron plantas diploides, mixoploides y también tetraploides.

3.3.3 Análisis genético y estabilidad del nivel de ploidía.

Todas las plantas tetraploides regeneradas junto con los parentales se analizaron con los *loci* microsatélites heterocigóticos para clementina y mandarino 'Moncada' descritos en la tabla 3.4 y ubicados en los 5 grupos de ligamiento de los que se dispone más información, según el mapa genético descrito por Luro *et al.* (2007).

En todos los casos los perfiles deparados por los genotipos diploides respecto a los producidos por las plantas tetraploides no muestran ninguna diferencia en los *loci* microsatélites analizados (figura 3.10).

Adicionalmente se analizaron los genotipos tetraploides de clementina 'Clemenules' 8.5 y 8.10 junto con la clementina 'Clemenules' diploide con marcadores AFLPs por el Dr. Óscar Olivares-Fuster en el Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, EEUU. Los resultados obtenidos no presentan diferencias, para un nivel de confianza del 95 %, entre los dos genotipos tetraploides, ni entre estos y la clementina 'Clemenules' diploide (Olivares-Fuster, comunicación personal).

Los genotipos tetraploides obtenidos, tanto a partir de la brotación directa del ápice microinjertado como a partir de la segregación de citoquimeras, han sido analizados por citometría de

flujo para comprobar la estabilidad del nivel de ploidía durante dos años consecutivos. Todos los análisis efectuados indican que las plantas tetraploides obtenidas son estables y en ningún caso se han detectado perfiles diploides ni mixoploides. Adicionalmente, tanto los genotipos tetraploides obtenidos a partir de la brotación directa del ápice microinjertado tratado con colchicina como los genotipos tetraploides obtenidos a partir de la segregación de citoquimeras $2x - 4x$, se han utilizado como parentales femeninos en hibridaciones $4x \times 2x$ durante 5 años, lo cual ha permitido obtener más de 2.700 híbridos triploides. Estos datos indican que los genotipos tetraploides obtenidos producen megagametofitos diploides ($n = 2x = 18$) lo que confirma claramente la estabilidad en el número de cromosomas de los genotipos tetraploides.

3.3.4 Caracterización morfológica.

Las hojas de los genotipos tetraploides de clementina 'Clemenules' 8.5 y 8.10 no muestran entre ellas diferencias estadísticamente significativas en los caracteres analizados a excepción del espesor del limbo (tabla 3.5). Sin embargo, sí que son claramente diferentes de las hojas de clementina 'Clemenules' diploide. Presentan una mayor área foliar, son más largas, más anchas y el haz del limbo es de color verde más oscuro. Cameron y Frost (1968), Barret y Hutchinson (1978) y Khan *et al.* (1992) observaron en plantas tetraploides de origen nucelar que las hojas eran considerablemente más anchas, más gruesas y de color más oscuro que las de los genotipos diploides.

Romero-Aranda *et al.* (1996) realizaron un estudio de tejido foliar de plantas diploides y alotetraploides de naranjo dulce 'Valencia' obtenidas por fusión de protoplastos. Observaron que las células del parénquima lagunar de los individuos alotetraploides eran significativamente más grandes que las diploides. Schwarz (2001) hizo un estudio comparativo entre plantas diploides y tetraploides nucleares de citrange 'Carrizo'. Observó que el espesor del limbo y del nervio central de las hojas tetraploides era mayor que el de las diploides, así como el tamaño de sus células. Las plantas tetraploides tenían una capa de células en el parénquima en empalizada, mientras que las diploides tenían dos. Además, observó un mayor grosor tanto de las raíces como del tallo de las plantas tetraploides como consecuencia de un aumento del espesor de sus tejidos. La duplicación del número de cromosomas por acción de la colchicina en *Platanus acerifolia* (Ait.) Willd. (Liu *et al.* 2007), *Zizyphus jujuba* Mill. 'Zhanhua' (Gu *et al.* 2005), *Humulus lupulus* L. (Roy *et al.* 2001) y *Musa* spp. (Hamill *et al.* 1992) también produjo un aumento del área foliar y cambios en el color de las hojas.

A diferencia de la clementina 'Clemenules' diploide los genotipos tetraploides obtenidos tienen espinas (tabla 3.6). En el genotipo tetraploide 8.5 el 34,1 % de los nudos tienen espinas y en el genotipo tetraploide 8.10 el 69,7 % de los nudos presentan espinas, siendo además en este caso las espinas de mayor tamaño.

La espinosidad en los cítricos es un carácter complejo ya que influyen diversos factores como la juvenilidad, el genotipo, nivel de ploidía y el vigor de las plantas. Las plantas de cítricos obtenidas a partir de semilla se caracterizan por la presencia de espinas y la ausencia de flores. Generalmente con el transcurso de los años las plantas van envejeciendo, comienzan a producir flores, frutos y las

espinas desaparecen progresivamente. Sin embargo existen excepciones a esta norma general de los cítricos. Las clementinas son variedades de mandarino caracterizadas por la ausencia de espinas en la mayoría de los genotipos aunque la clementina `Marina`, mutación de clementina de origen desconocido, destaca por su elevado número y gran tamaño de las mismas. El microinjerto *in vitro* de ápices caulinares es una técnica que no induce la formación de espinas en los genotipos regenerados. Mediante esta técnica se han regenerado más de 60 genotipos de clementina existentes en el Banco del Germoplasma del IVIA y ninguno de ellos presenta espinas (Navarro, 1992).

La duplicación del número de cromosomas produce cambios en la espinosidad de las plantas. Cameron y Frost (1968) observaron que la presencia de espinas en las plantas tetraploides era mucho más patente y acusada, incluso en la fase de semillero, que en las plantas diploides. Barret (1974) también observó las mismas diferencias entre plantas diploides y plantas tetraploides obtenidas con colchicina. Sin embargo, no comparó los distintos genotipos tetraploides obtenidos entre si.

3.3.5 Caracterización histológica de anteras, ovarios, estilos y estigmas de una planta diploide y dos plantas tetraploides de clementina `Clemenules`.

Adicionalmente se realizó un estudio histológico de anteras, ovarios, estilos y estigmas de clementina `Clemenules` diploide y de los genotipos tetraploides 8.5 y 8.10 de clementina `Clemenules` (figura 3.12). No se observaron diferencias en la estructura histológica de la clementina `Clemenules` diploide respecto a los dos genotipos tetraploides de clementina `Clemenules`, ni entre estos dos. La única diferencia observada fue el mayor tamaño de las anteras, ovarios, estilos y estigmas tetraploides respecto a los diploides, siendo los órganos tetraploides entre un 10 y 30 % más grandes.

Esta caracterización histológica es la primera realizada entre anteras, ovarios, estilos y estigmas de una planta diploide y dos plantas tetraploides de clementina `Clemenules`. Romero-Aranda *et al.* (1996) y Schwarz (2001) realizaron estudios histológicos entre genotipos diploides y tetraploides de cítricos, en los que también observaron un aumento del tamaño en los órganos tetraploides respecto a los diploides.

3.3.6 Germinación de los granos de polen.

Se observó claramente que el mayor porcentaje de granos de polen germinados lo presentó la clementina `Clemenules` diploide con un 55,6 % (tabla 3.7) mientras que los genotipos tetraploides 8.5 y 8.10 presentaron un 0,3 y 38,3 % respectivamente (figuras 3.11.a, 3.11.b, 3.11.c y 3.11.d). Es de destacar las diferencias observadas en los porcentajes de germinación de los granos de polen entre los genotipos diploides y tetraploides pero sobre todo entre los dos genotipos tetraploides, ya que con un porcentaje de germinación de los granos de polen del 0,3 % la utilidad como parental masculino es prácticamente nula. El estudio histológico realizado entre los diferentes genotipos

diploides y tetraploides de clementina 'Clemenules' no ha permitido observar ninguna diferencia a nivel histológico que permita explicar las diferencias entre los dos genotipos tetraploides estudiados.

En cítricos se ha descrito que en los genotipos tetraploides se produce una degeneración, mucho más frecuente que en los genotipos diploides, de las células madre productoras de los granos de polen antes de la primera división reduccional de la meiosis (Frost y Soost, 1968). Estos autores observaron una gran variabilidad en la conjugación de los cromosomas homólogos durante la metafase 1, originándose tetravalentes, trivalentes, bivalentes y univalentes. Además también observaron que en el estado de tétradas, en los tetraploides, entre 1/2 y 1/3 de las tétradas observadas presentaban más de cuatro microsporas, generalmente entre 6 y 7. Como consecuencia, muchos de los genotipos tetraploides producen pocos granos de polen con una dotación cromosómica normal (Frost y Soost, 1968) y presentan una menor viabilidad que los genotipos parentales diploides. Sin embargo, los genotipos tetraploides mantienen una fertilidad suficiente como para poder ser utilizados como parentales en polinizaciones controladas.

Estudios recientes en alopoloides demuestran que la duplicación del genoma produce cambios en la expresión de los genes por efecto de la dosis génica, alteraciones en la regulación de los mismos y cambios genéticos y epigenéticos (Soltis y Soltis, 1995; Ramsey y Schemske, 2002; Osborn *et al.* 2003; Soltis *et al.* 2004; Adams y Wendel, 2005; Gaeta *et al.* 2007). La duplicación del número de cromosomas por acción de la colchicina podría ocasionar las diferencias observadas entre los dos genotipos tetraploides tanto a nivel de la espinosidad como de la germinación de los granos de polen aunque también podrían ser debidos como consecuencia de mutaciones inducidas por el efecto de la colchicina (Zaffar *et al.* 2004; Obute *et al.* 2007; Velu *et al.* 2008).

3.4 CONCLUSIONES.

El microinjerto *in vitro* de ápices caulinares tratados con colchicina es un método de obtención de plantas tetraploides laborioso, engorroso y poco reproducible, ya que no permite establecer relaciones entre los tratamientos y el número de plantas tetraploides obtenidas. No obstante a pesar de los inconvenientes es un procedimiento en el que soslayando los inconvenientes comentados, los resultados prácticos compensan las dificultades, debido a la gran importancia del material vegetal regenerado.

La aplicación directa de colchicina sobre el ápice microinjertado es el mejor método para inducir la duplicación cromosómica, ya que permite la obtención de plantas tetraploides, sin necesidad de recurrir a la segregación a partir de genotipos mixoploides.

La orizalina es un agente poliploidizante que permite obtener plantas tetraploides y mixoploides de clementina 'Clemenules'.

Se han obtenido plantas tetraploides de los genotipos clementina 'Fina', clementina 'Clemenules' y mandarino 'Moncada' mediante el tratamiento con colchicina de ápices microinjertados.

A partir de citoquimeras $2x - 4x$ es posible obtener plantas tetraploides estables. En las clementinas 'Fina', 'Marisol' y 'Clemenules' se han obtenido plantas tetraploides a partir de genotipos citoquiméricos obtenidos mediante tratamientos de ápices con colchicina.

Las plantas tetraploides obtenidas se han incorporado a la colección de genotipos tetraploides del Banco de Germoplasma del IVIA y se están utilizando como parentales femeninos en el programa de obtención de híbridos triploides desarrollado en el IVIA. Hasta el momento, han sido utilizados en más de 35 hibridaciones diferentes, produciendo más de 2.700 híbridos triploides.

Tabla 3.1. Influencia de la concentración y tiempo de inmersión en colchicina sobre el desarrollo de los ápices posteriormente microinjertados y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

Genotipo	Tratamiento		Nº de ápices microinjertados	Ápices desarrollados	Plantas 2x	Citoquimeras 2x-4x	Plantas 4x
	Concentración	Tiempo					
Clemenules	0,1%	3 h	40	15	10	5	0
Clemenules	0,1%	24 h	28	9	8	1	0
Clemenules	0,2%	24 h	20	4	3	1	0
Clemenules	0,3%	72 h	34	1	1	0	0
Clemenules	0,5%	72 h	29	0	0	0	0
Marisol	0,1%	3 h	65	15	14	1	0
Clemenules	Agua	3 h	24	14	14	0	0
Clemenules	Agua	24 h	15	12	12	0	0
Clemenules	Agua	72 h	30	8	8	0	0

Tabla 3.2. Efecto de la aplicación directa de una solución de colchicina sobre el desarrollo de ápices previamente microinjertados y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

Genotipo	Tratamiento	Nº de ápices microinjertados	Ápices desarrollados	Plantas 2x	Citoquimeras 2x - 4x	Plantas 4x
Clemenules	0,1%	44	21	17	2	2*
Clemenules	Agua	16	10	10	0	0
Fina	0,1%	60	31	22	7	2
Fina	Agua	20	15	15	0	0
Moncada	0,1%	60	5	2	1	2
Moncada	Agua	20	15	15	0	0
Imperial	0,1%	24	1	1	0	0
Ellendale	0,1%	33	0	0	0	0

Origen de los genotipos 8.5 y 8.10 de clementina 'Clemenules' tetraploide.

Tabla 3.3. Efecto de la aplicación directa de una solución de colchicina y orizalina sobre el desarrollo de ápices previamente microinjertados y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

Genotipo	Tratamiento	Nº de ápices microinjertados	Ápices desarrollados	Plantas 2x	Citoquimeras 2x - 4x	Plantas 4x
Clemenules	Colchicina 0,1%	60	9	4	2	3
Clemenules	Agua	20	13	13	0	0
Clemenules	Orizalina 0,1%	60	20	16	1	3
Clemenules	Agua	20	10	10	0	0

Tabla 3.4 Análisis genético con marcadores microsatélites de genotipos diploides y tetraploides de clementina y mandarino 'Moncada'.

<i>Locus</i>	Genotipo	
	Clementinas	Moncada
CAC 15	150-159	
TAA 1	160-165	
TAA 15	184-188	
Mest 15		172-200
Mest 56	155-165	
Mest 88	134-138	
Mest 112	439-460	439-460
Mest 123		252-268
Mest 132		238-250
Mest 458	215-225	
Ci02D04b		208-222
Ci02D09	229-237	
Ci02F12		126-134
Ci02G02		123-125
Ci05A05	146-154	
Ci06A08		124-136
Ci07D06	165-185	165-185

Los números escritos en cada celda indican el tamaño en nucleótidos (nt) de los dos alelos correspondientes a cada *locus* microsatélite.

Las celdas vacías corresponden a aquellos genotipos y marcadores en los cuales no se ha realizado el análisis genético.

Tabla 3.5 Caracterización morfológica de hojas de genotipos diploides y tetraploides de clementina 'Clemenules'.

Genotipo	Área media (cm²)	Longitud media (cm)	Anchura media (cm)	Espesor medio (mm)	Índice color medio
Clemenules 2x	14,0 ^a	2,7 ^a	11,3 ^a	1,9 ^a	-27,2 ^a
Clemenules 4x 8.5	18,2 ^b	3,2 ^a	11,6 ^b	2,5 ^b	-28,8 ^b
Clemenules 4x 8.10	17,8 ^b	3,2 ^a	12,0 ^b	2,7 ^c	-28,5 ^b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significación de 0,0002

Tabla 3.6 Caracterización morfológica de espinas de genotipos diploides y tetraploides de clementina `Clemenules`.

Genotipo	Nº de nudos contados	Nº de nudos con espinas	% de nudos con espinas	Longitud espinas media (mm)
Clemenules 2x	123	0	0,0	0,0
Clemenules 4x 8.5	127	43	34,1	1,9
Clemenules 4x 8.10	139	97	69,7	3,9

Tabla 3.7 Germinación *in vitro* de granos de polen de genotipos diploides y tetraploides de clementina `Clemenules`.

Genotipo	Nº de granos de polen contados	Nº de granos de polen germinados	% germinación
Clemenules 2x	1.948	1.083	55,6
Clemenules 4x 8.5	2.886	8	0,3
Clemenules 4x 8.10	2.015	772	38,3

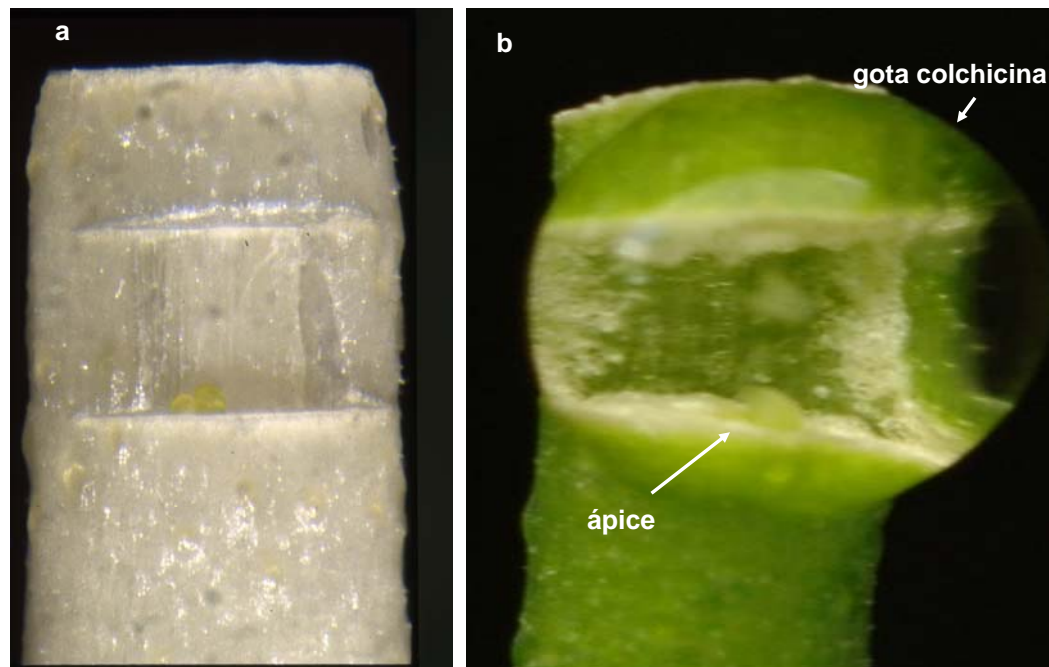


Figura 3.1. a. Incisión en el patrón en forma de ventana sobre la que se depositó el ápice. b. Gota de una solución de colchicina sobre la incisión del patrón donde se situó el ápice.

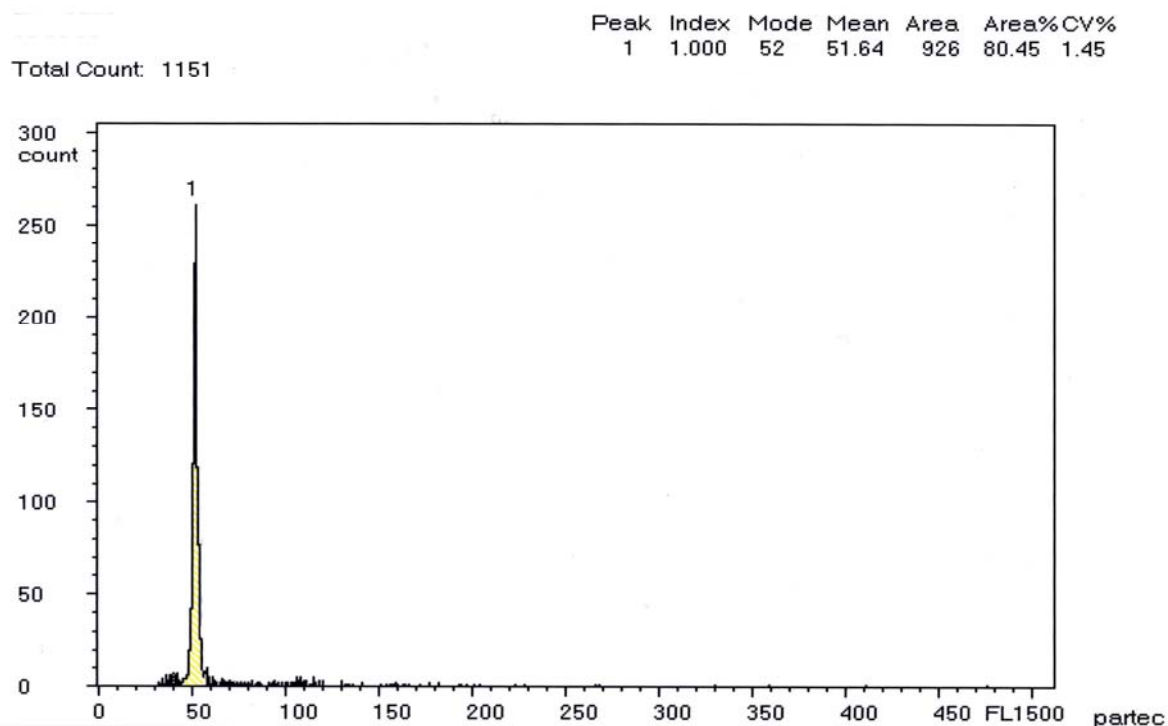


Figura 3.2. Histograma de una planta control diploide y de una plántula diploide de clementina 'Clemenules' obtenida tras el tratamiento de ápices con colchicina. El único pico indica que ambos materiales tienen el mismo nivel de ploidía.

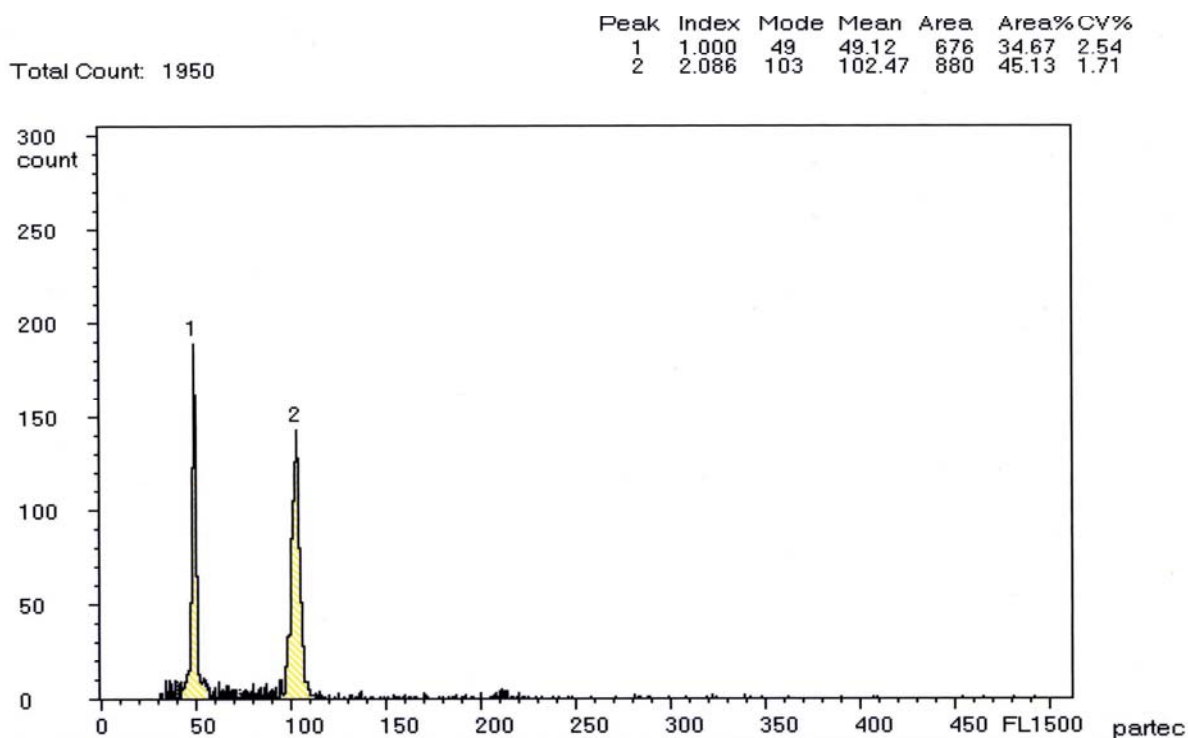


Figura 3.3. Histograma de una planta mixoploide (2x – 4x) mostrando células diploides (pico 1) y células tetraploides (pico 2) en la misma muestra sin control diploide.

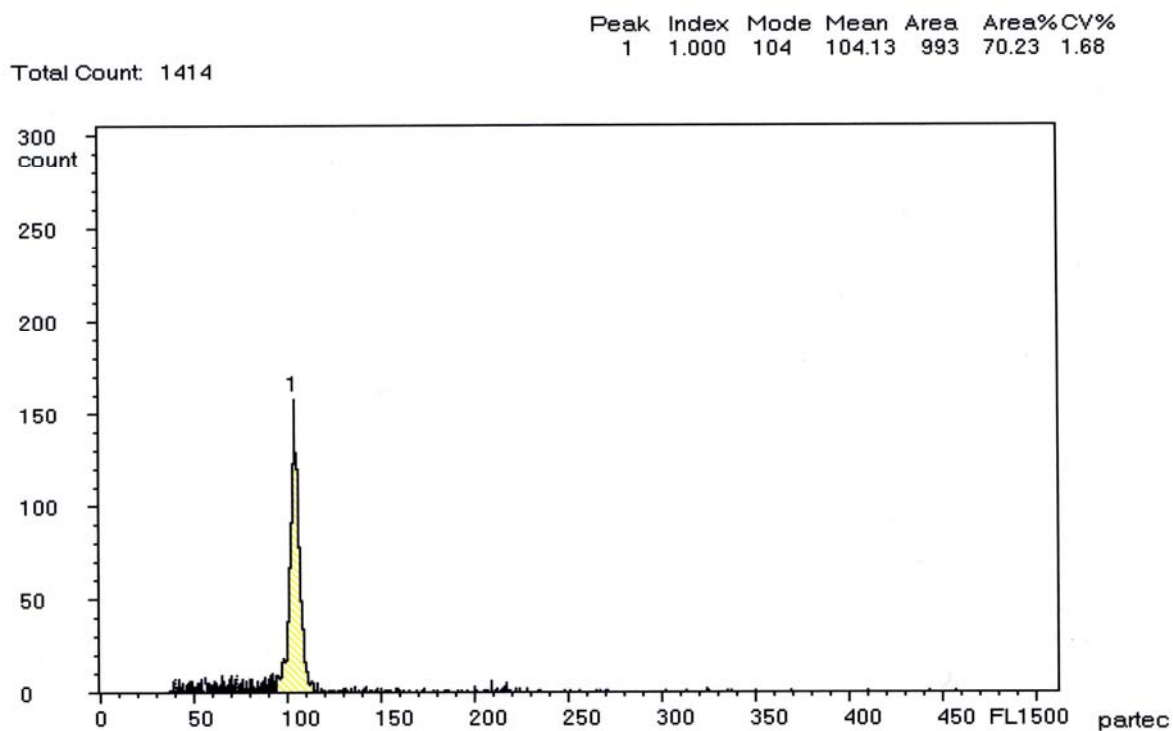


Figura 3.4. Histograma de una planta tetraploide de clementina `Fina` (pico 1) sin control diploide.

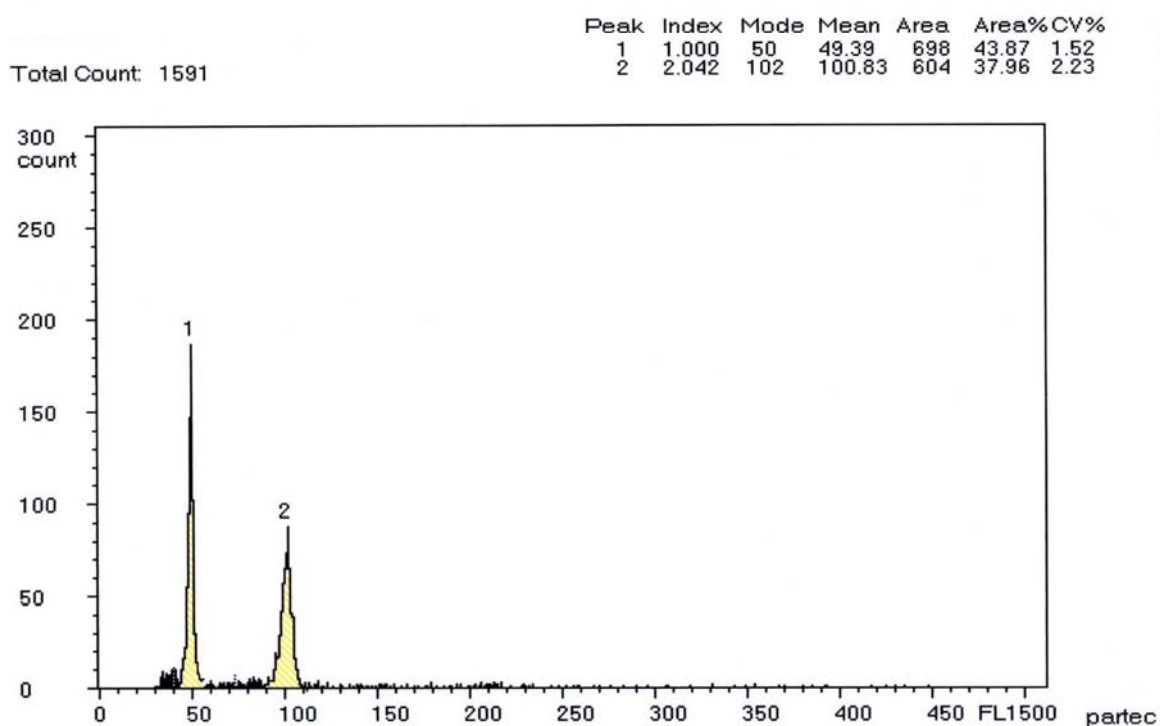


Figura 3.5. Histograma de una planta diploide control (pico 1) y de una plántula tetraploide de clementina `Fina` (pico 2).



Figura 3.6. a. Necrosamiento de los ápices. b. Abultamiento del patrón en la zona de injerto. c. Aspecto ápice desarrollado y no tratado con colchicina (control). d. Ápice tratado con colchicina de aspecto basto con hojas muy abultadas y recurvadas.

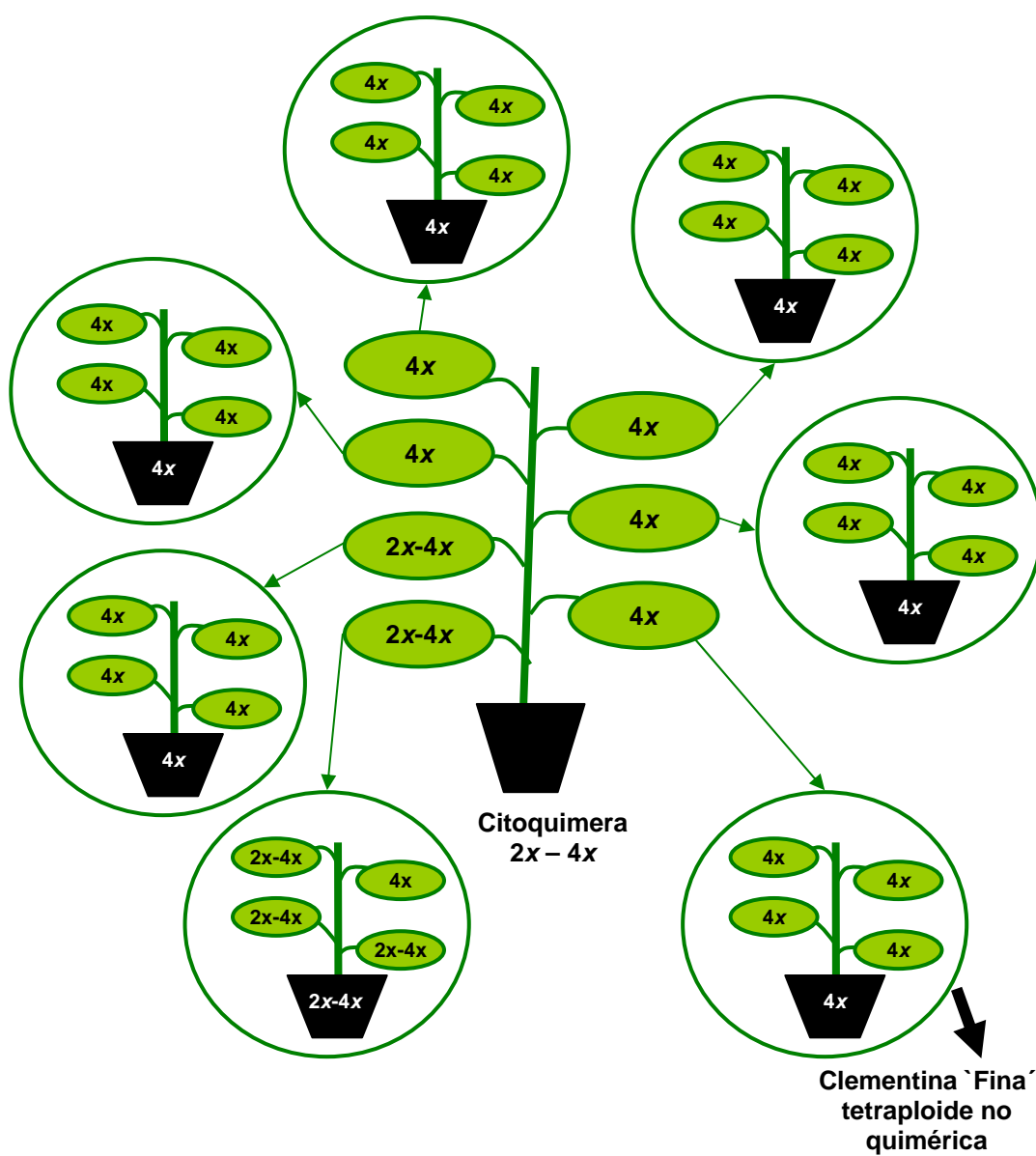


Figura 3.7. Esquema de segregación de clementina 'Fina' a partir de una citoquimera 2x - 4x.

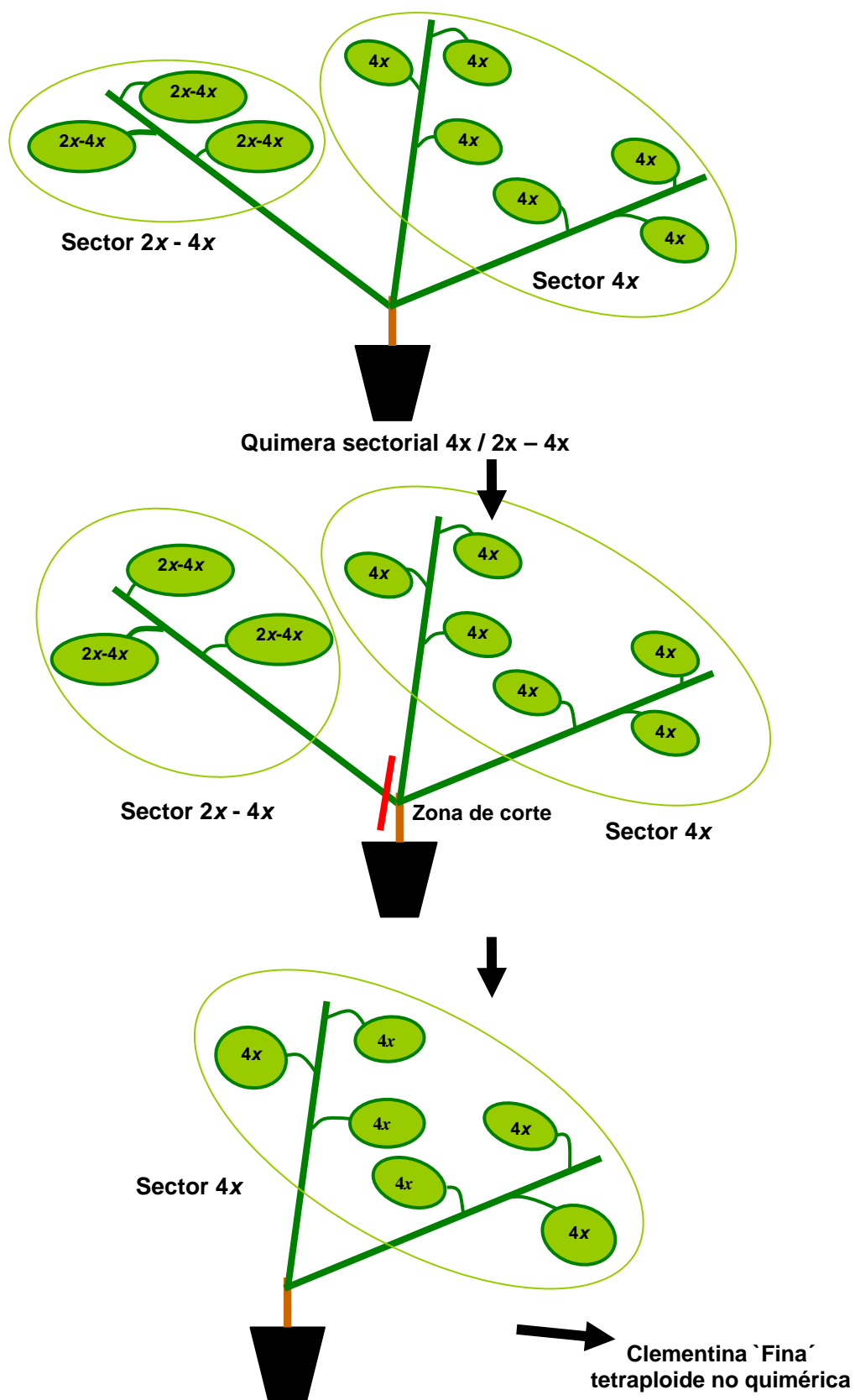


Figura 3.8. Esquema de segregación de clementina 'Fina' a partir de una quimera sectorial 4x / 2x - 4x.

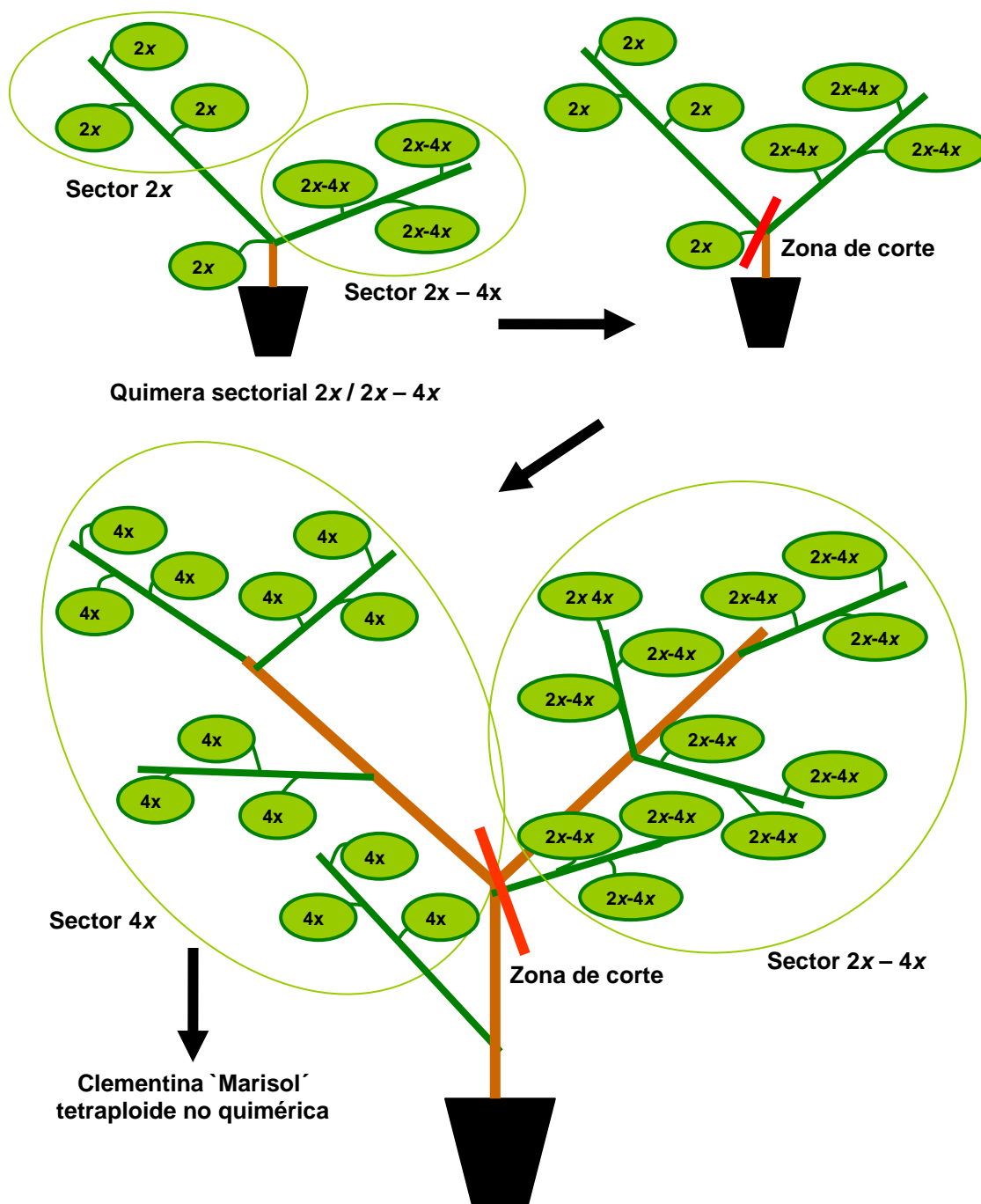


Figura 3.9. Esquema de segregación de clementina 'Marisol' a partir de una quimera sectorial 2x / 2x - 4x.

Ci02D09

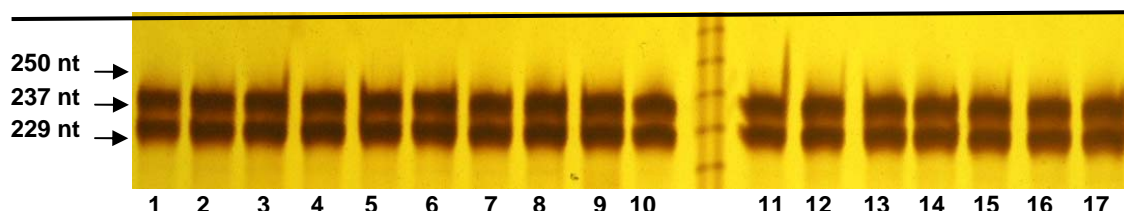


Figura 3.10. Alelos correspondientes al *locus* microsatélite Ci02D09 presentes en las clementinas diploides y tetraploides obtenidas a partir de los tratamientos de ápices caulinares con colchicina y orizalina. 1, 11 y 13 clementinas ‘Clemenules’, ‘Marisol’ y ‘Fina’ diploides respectivamente. 2, 3, 4, 5, 6 y 7 clementinas ‘Clemenules’ tetraploides obtenidas con colchicina. 8, 9 y 10 clementinas ‘Clemenules’ tetraploides obtenidas con orizalina. 12 clementina ‘Marisol’ tetraploide obtenida con colchicina. 14, 15, 16 y 17 clementinas ‘Fina’ tetraploides obtenidas con colchicina.

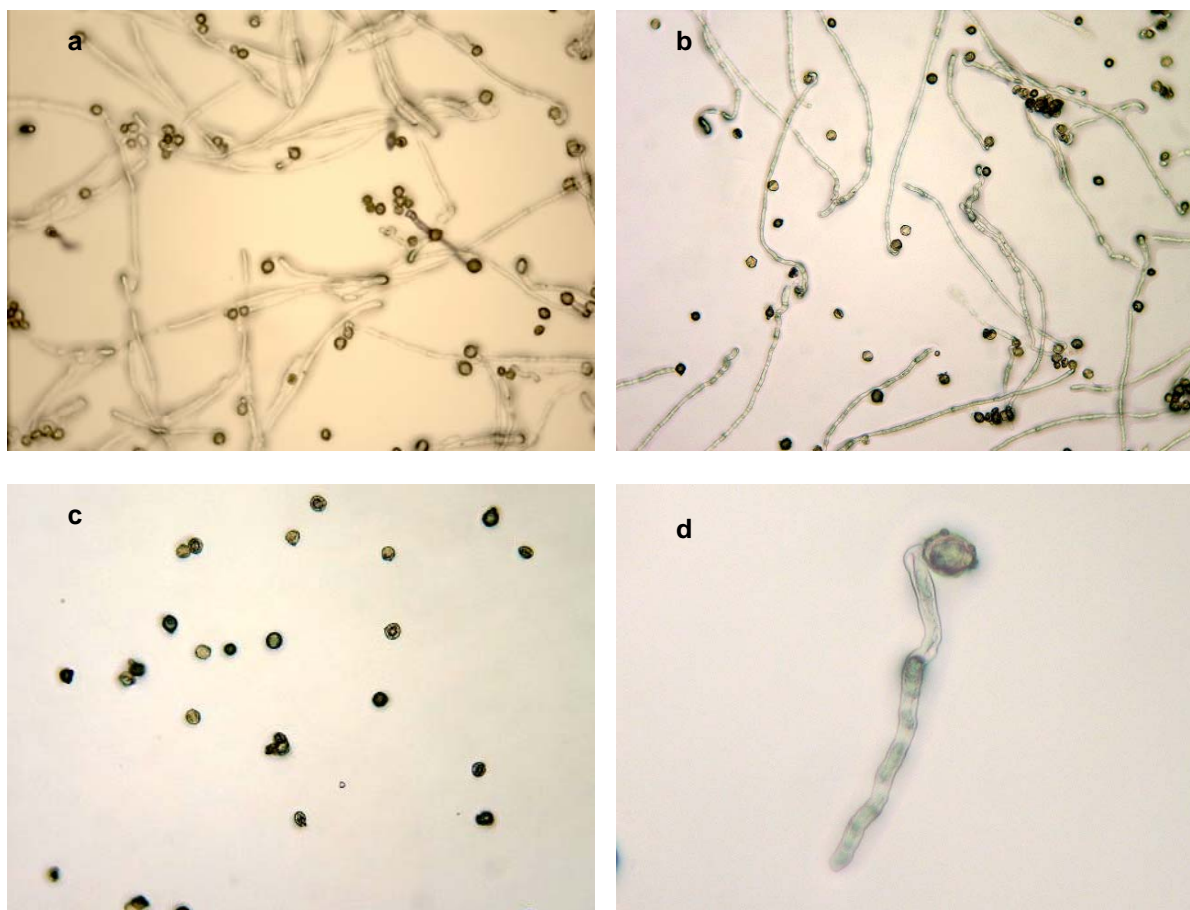


Figura 3.11. Germinación de los granos de polen *in vitro* de los genotipos: a. Clementina ‘Clemenules’ diploide. b. Genotipo 8.10 de clementina ‘Clemenules’ tetraploide. c. Genotipo 8.5 de clementina ‘Clemenules’ tetraploide. d. Detalle germinación grano de polen genotipo 8.10.

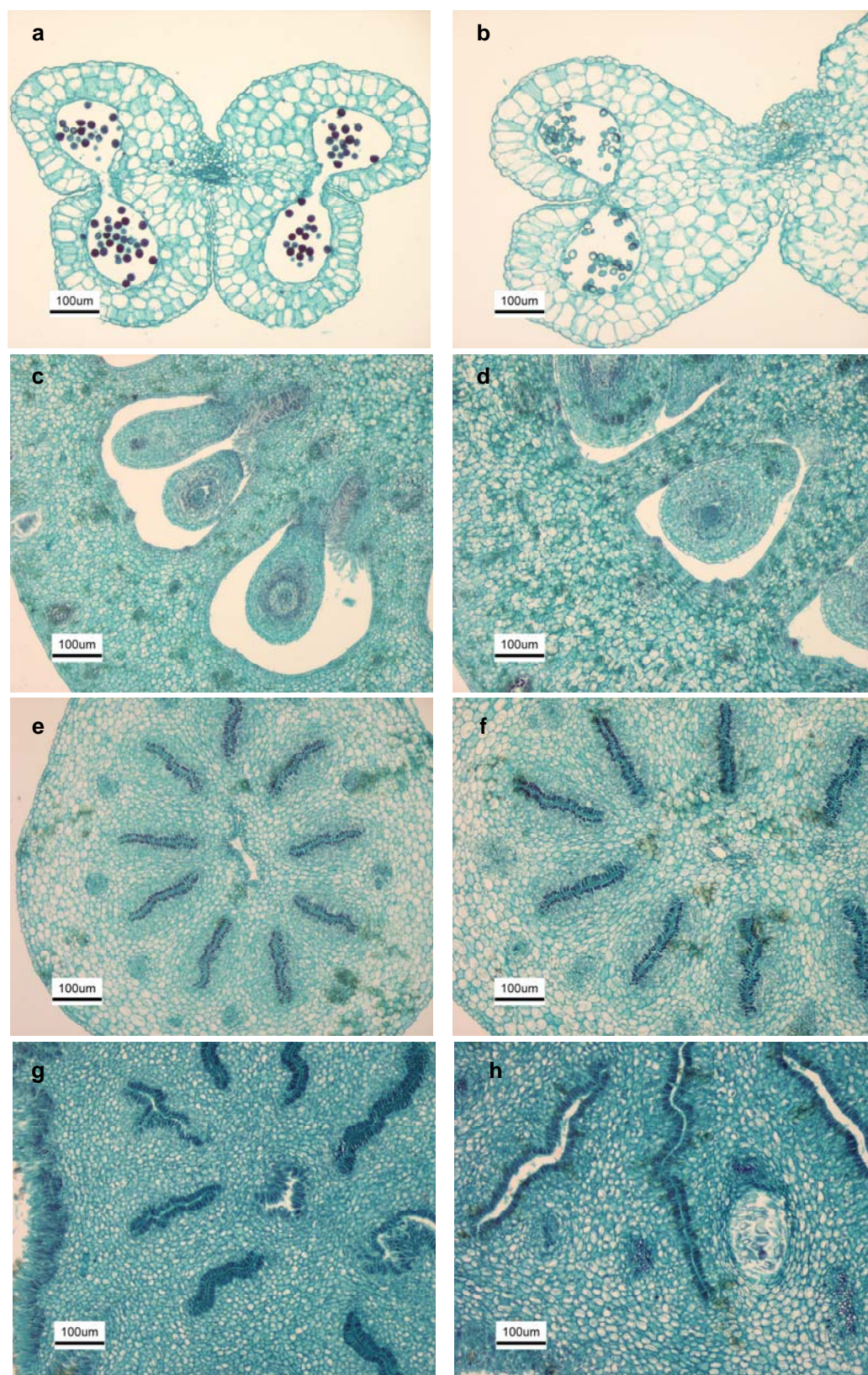


Figura 3.12. a. Antera 2x, b. antera 4x, c. ovario 2x, d. ovario 4x, e. estilo 2x, f. estilo 4x, g. estigma 2x y h. estigma 4x. Se observa claramente el mayor tamaño de los órganos florales tetraploides respecto a los diploides.

***Capítulo 4. Obtención de híbridos triploides de cítricos mediante
hibridación sexual entre parentales diploides y entre parentales
diploides y tetraploides***

CAPÍTULO 4. OBTENCIÓN DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES DE CÍTRICOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN SEXUAL ENTRE PARENTALES DIPLOIDES Y ENTRE PARENTALES DIPLOIDES Y TETRAPLOIDES.

4.1 INTRODUCCIÓN.

El 87 % de la producción de mandarina producida en España en las últimas 5 campañas se destina para el mercado del consumo en fresco (Intercitrus, 2008), el cual demanda fruta de elevada calidad. Una de las principales características exigida es la ausencia de semillas en los frutos. Las plantas triploides evolutivamente han sido consideradas como plantas muertas, ya que originan gametos aneuploides con muy baja fertilidad (Otto y Whitton, 2000). En los híbridos triploides de cítricos, durante la meiosis, se forman predominantemente asociaciones trivalentes, un elevado número de asociaciones bivalentes y univalentes (Cameron y Frost, 1968) así como el aborto de la megasporogénesis desde las primeras divisiones del saco embrionario hasta el estado de ovocélula fecundada (Fatta del Bosco *et al.* 1992). Por ello, los híbridos triploides de cítricos son generalmente estériles aunque, en determinados casos y con frecuencias muy bajas, pueden producir frutos con muy pocas semillas e inducir la formación de semillas en frutos de otros genotipos.

En cítricos se pueden obtener híbridos triploides mediante hibridaciones sexuales entre genotipos diploides, $2x \times 2x$, y entre genotipos diploides y tetraploides, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ (Cameron y Frost, 1968; Esen y Soost, 1971a; Esen y Soost, 1971b; Esen y Soost, 1973; Geraci *et al.* 1975; Cameron y Burnett, 1978; Esen *et al.* 1978; Oiyama *et al.* 1981; Starrantino y Recupero, 1981). En las hibridaciones entre parentales diploides es posible obtener híbridos triploides debido a la formación de megagametofitos no reducidos (Esen y Soost, 1971a; Esen y Soost, 1973; Geraci *et al.* 1975). En los genotipos apomícticos de cítricos, Geraci *et al.* (1977) y Wakana *et al.* (1981) observaron la presencia de embriones zigóticos triploides y embriones nucelares diploides en la misma semilla, lo cual limita la utilidad práctica de los genotipos apomícticos como parentales femeninos en hibridaciones sexuales.

En las hibridaciones entre parentales diploides, Esen y Soost (1971a) describieron la formación de semillas normales y semillas entre $1/3$ y $1/6$ más pequeñas que las normales. Estos mismos autores, en otro trabajo publicado en el mismo año (1971b), describieron la formación de semillas normales y semillas parcialmente desarrolladas en hibridaciones entre genotipos diploides con genotipos tetraploides. Posteriormente, Cameron y Burnett (1978) y Esen *et al.* (1978) describieron la formación de semillas normales, semillas normales de tamaño más pequeño y semillas parcialmente desarrolladas en las hibridaciones entre parentales femeninos tetraploides con parentales masculinos diploides. Los embriones triploides predominantemente se encontraban en las semillas parcialmente desarrolladas y en las semillas de pequeño tamaño que rara vez germinan en condiciones de invernadero (Cameron y Frost, 1968; Esen y Soost, 1971a; Esen y Soost, 1971b; Cameron y Burnett, 1978).

La determinación del nivel de ploidía por métodos histológicos es un proceso lento y poco eficiente cuando se trata de analizar gran número de plantas. La técnica de rescate y cultivo de

embriones *in vitro* junto con la citometría de flujo son dos técnicas indispensables para poder desarrollar amplios programas de obtención de híbridos triploides de cítricos, ya que permiten regenerar plantas a partir de los embriones contenidos en estos tipos de semillas y determinar el nivel de ploidía de las plantas regeneradas de forma rápida y precisa (Ollitrault y Michaux-Ferriere, 1992).

En la hibridaciones $2x \times 2x$ y $2x \times 4x$ la caracterización de los diferentes tipos de semillas que producen los híbridos triploides han sido descritas por diferentes autores (Esen y Soost, 1971a; Esen y Soost, 1971b; Esen y Soost, 1973; Geraci *et al.* 1975; Oiyama *et al.* 1981; Starrantino y Recuperero, 1981; Ollitrault *et al.* 1996b) mientras que en las hibridaciones $4x \times 2x$ hay una importante falta de información en los tipos de semillas producidas así como en el nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de cada tipo de semilla. Cameron y Burnett (1978) y Esen *et al.* (1978) en hibridaciones $4x \times 2x$ entre diferentes genotipos no apomícticos y apomícticos de cítricos realizaron una clasificación visual en función del tamaño de las semillas obtenidas. En la literatura científica hay una importante escasez de datos y referencias que establezcan comparaciones entre las diferentes etapas del cultivo *in vitro* de los embriones originados en las distintas hibridaciones así como en la eficiencia en la obtención de híbridos triploides en función del tipo de hibridación realizada. Cameron y Frost (1968) en hibridaciones $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ realizadas entre los años 1955 y 1962 en la Universidad de Riverside (California) con diferentes genotipos de mandarino, zamboa, orangelo (*C. sinensis* x *C. paradisi*) y limón observaron que en los cruzamientos $4x \times 2x$ se producía un número mayor de semillas completamente desarrolladas que en las hibridaciones $2x \times 4x$ pero sin embargo no llegaron a precisar el nivel de ploidía de las plantas obtenidas a partir de cada tipo de semilla.

En este capítulo se estudiarán las hibridaciones sexuales $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$, se analizarán los diferentes factores que influyen en cada tipo de hibridación, se describirán los distintos tipos de semillas originadas, se determinará el nivel de ploidía de las plantas regeneradas, influencia de los parentales en la obtención de híbridos triploides y se realizará un estudio comparativo entre los tres tipos de hibridaciones respecto a la eficiencia en la obtención de híbridos triploides, destacando las ventajas y los inconvenientes de cada una.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS.

4.2.1 Material vegetal.

Todos los genotipos utilizados en las hibridaciones pertenecen al Banco de Germoplasma del IVIA. Las hibridaciones se realizaron en diferentes años y forman parte del programa de obtención de híbridos triploides que está realizando nuestro grupo. Además, se realizaron algunas hibridaciones exclusivamente para determinar las clases y realizar las mediciones de las semillas producidas en cada tipo de hibridación.

A continuación se describe el material vegetal utilizado según el tipo de hibridación estudiado y objetivo.

4.2.1.1 Material vegetal utilizado para la descripción y caracterización de las semillas.

Para describir las clases de semillas producidas en los diferentes tipos de hibridaciones se utilizaron los cruzamientos entre clementina `Clemenules´ (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) por zamboa `Pink´ (*C. grandis* (L.) Osb.), clementina `Fina´ por mandarino `Común´ (*C. deliciosa* Ten.) tetraploide y clementina `Clemenules´ tetraploide por mandarino `Moncada´ diploide (*C. clementina* x (*C. unshiu* x *C. nobilis*)).

4.2.1.2 Hibridaciones 2x X 2x.

Se utilizaron como parentales femeninos los genotipos no apomícticos clementina `Clemenules´, clementina `Fina´ y mandarino `Fortune´ (*C. clementina* x *C. tangerina*). Como parentales masculinos se utilizaron los genotipos mandarino `Común´, mandarino `Kara´ (*C. unshiu* x *C. nobilis*), tangor `Murcott´ (*C. reticulata* x *C. sinensis*) y el naranjo dulce `Comuna´ (*C. sinensis* (L.) Osb.). Se realizaron las hibridaciones entre cada uno de los tres parentales femeninos con cada uno de los parentales masculinos mencionados anteriormente.

4.2.1.3 Hibridaciones 2x X 4x.

Se utilizaron como parentales femeninos los genotipos no apomícticos diploides clementina `Clemenules´, clementina `Fina´ y mandarino `Fortune´. Como parentales masculinos se utilizaron los genotipos tetraploides mandarino `Común´, mandarino `Nova´ (*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)), mandarino `Moncada´, tangelo `Orlando´ (*C. paradisi* x *C. tangerina*) y naranjo dulce `Pineapple´. Se realizaron las hibridaciones entre todos los parentales femeninos con todos los parentales masculinos descritos, a excepción del mandarino `Fortune´, que únicamente se polinizó con el tangelo `Orlando´ tetraploide.

4.2.1.4 Hibridaciones 4x X 2x.

Se utilizó como parental femenino el genotipo no apomíctico tetraploide clementina `Clemenules´ y se polinizó con los genotipos diploides mandarino `Común´, mandarino `Kara´, mandarino `Moncada´ y tangor `Murcott´.

4.2.2 Obtención de polen, polinización y recolección de frutos.

Se recolectaron flores de los parentales masculinos descritos anteriormente en estado fenológico de preantesis. Las anteras se separaron del filamento estaminal con unas pinzas y posteriormente se introdujeron en un desecador con silicagel como agente desecante hasta que se observó la completa dehiscencia de las tecas de las anteras (24 - 48 h).

Las polinizaciones se realizaron en los árboles del Banco de Germoplasma del IVIA y en las instalaciones cubiertas con malla antiinsectos de AVASA. Se polinizaron manualmente flores en estado fenológico de preantesis dispuestas en brotes campaneros. En las hibridaciones 2x X 2x, 2x X 4x y 4x X 2x se polinizaron 2.797, 1.180 y 238 flores respectivamente, colocando una antera con las tecas totalmente abiertas en el estigma de cada flor. Los frutos se recolectaron cuando alcanzaron la madurez.

Para caracterizar los tipos de semillas producidas en las diferentes hibridaciones, se polinizaron manualmente 50 flores de clementina `Clemenules´ con zamboa `Pink´ y 100 flores de clementina `Fina´ con mandarino `Común´ tetraploide. La clementina `Clemenules´ tetraploide se polinizó con flores de mandarino `Moncada´ mediante abejorros polinizadores (*Bombus terrestris*, Koppert® Natupol) en recintos individuales con malla antiinsectos.

4.2.3 Clasificación y caracterización de las semillas.

Las semillas se recolectaron de los frutos maduros y se clasificaron en función de su tamaño y desarrollo. Se distinguieron semillas completamente desarrolladas y semillas parcialmente desarrolladas (figuras 4.1.a, 4.1.b y 4.1.c). Se consideró semilla completamente desarrollada aquella semilla de aspecto normal, voluminosa, que no mostraba ninguna malformación y con los tegumentos perfectamente desarrollados y extendidos mientras que se consideró semilla parcialmente desarrollada aquella que no hubo completado totalmente su desarrollo, estando colapsada, arrugada y con el tegumento exterior hendido.

Para estimar el tamaño de las semillas se midió el área (mm^2). Para ello, se lavaron con agua destilada para eliminarles la melaza que las recubría y posteriormente se dejaron secar. A continuación se colocaron sobre un placa de Petri de 9 cm uniformemente distribuidas y evitando que las semillas se toquen unas con otras. La placa de Petri con las semillas se escaneó en un escáner modelo Epson Perfection 4870 Photo a una resolución de 150 pp. La imagen digitalizada se analizó con el software Matrox que permite realizar medidas precisas de forma automática.

4.2.4 Rescate y cultivo de embriones *in vitro*.

Las semillas se esterilizaron superficialmente con hipoclorito sódico al 0,5 % de cloro activo durante 10 min y se lavaron tres veces con agua destilada.

Los embriones se extrajeron en condiciones asépticas con la ayuda de un microscopio estereoscópico y se cultivaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro y en tubos de ensayo. Las placas de Petri contenían un medio de cultivo compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 50 g/L de sacarosa, 500 mg/L de extracto de malta, vitaminas de Murashige y Tucker (1969) y 8 g/L de agar, mientras que los tubos de ensayo contenían medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962) y agar al 1 %.

El cultivo se realizó en cámara de cultivo a temperatura constante de 27 °C con una iluminación de $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

4.2.5 Semillero.

Se realizó según la metodología descrita en el Capítulo 2, apartado 2.2.2.

4.2.6 Regeneración de plantas y trasplante a maceta.

Cuando los embriones cultivados en las placas de Petri desarrollaron una radícula de entre 1 - 2 cm de longitud aproximadamente, se repicaron a tubos de ensayo que contenían medio de elongación compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 50 g/L de sacarosa, vitaminas de Murashige y Tucker (1969) y 8 g/L de agar. Cuando las plántulas tuvieron como mínimo entre 2 - 3 hojas totalmente desarrolladas y un sistema radical profuso se trasplantaron a maceta.

Las macetas contenían un sustrato compuesto por una mezcla de tres partes de turba (mezcla 1:1 de turba negra y turba rubia) por una parte de perlita y esterilizado por vapor de agua a 100 °C durante 1 h. Las macetas se introdujeron en bolsas de polietileno transparente que se cerraron y se colocaron en una zona sombreada del invernadero a 18 - 25 °C, eliminándose la bolsa al cabo de 15 - 20 días.

4.2.7 Determinación del nivel de ploidía.

La determinación del nivel de ploidía se realizó mediante citometría de flujo, cuando las plántulas todavía estaban en los tubos de ensayo, siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1, apartado 1.2.6. Cada muestra estaba constituida por un fragmento de hoja, de aproximadamente 0,5 cm², de una planta control diploide y por un fragmento de hoja, de las mismas dimensiones, de la planta problema.

La eficiencia en la obtención de plantas triploides se estimó como el número de híbridos triploides obtenidos por 100 frutos.

4.3 RESULTADOS.

4.3.1 Clasificación y caracterización de las semillas obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x (clementina `Clemenules` por zamboa `Pink`), 2x X 4x (clementina `Fina` por mandarino `Común` tetraploide) y 4x X 2x (clementina `Clemenules` tetraploide por mandarino `Moncada`). Regeneración de plantas y nivel de ploidía.

El porcentaje de cuajado obtenido en la hibridación entre clementina `Clemenules` por zamboa `Pink` fue del 80 % mientras que en la hibridación entre clementina `Fina` por mandarino `Común` tetraploide fue del 49 %. De la hibridación entre clementina `Clemenules` tetraploide con mandarino `Moncada` se obtuvieron un total de 142 frutos de los que se utilizaron 50 para este estudio.

En la hibridación entre clementina 'Clemenules' por zamboa 'Pink' se obtuvieron un total de 299 semillas, 252 completamente desarrolladas y 47 parcialmente desarrolladas. En las semillas completamente desarrolladas se observaron claramente dos tipos (figura 4.1.a): 12 eran más pequeñas y las 240 restantes eran de mayor tamaño, denominándolas de aquí en adelante semillas normales. De éstas se seleccionaron al azar 96 semillas para medirlas según lo descrito en el apartado 4.2.3. El área de las semillas normales osciló entre 67 y 89 mm² mientras que el área de las semillas completamente desarrolladas pequeñas osciló entre 26 y 42 mm². Estos datos indican que las semillas pequeñas son entre un 52 y un 62 % más pequeñas que las semillas normales. El área de las semillas parcialmente desarrolladas osciló entre 39 y 73 mm². Estas semillas son entre un 18 y un 42 % más pequeñas que las semillas normales (tabla 4.1).

En la hibridación entre clementina 'Fina' por mandarina 'Común' tetraploide se obtuvieron un total de 114 semillas, 12 completamente desarrolladas (semillas normales) y 102 parcialmente desarrolladas (figura 4.1.b). El área de las semillas normales osciló entre 82 y 97 mm² mientras que el área de las semillas parcialmente desarrolladas osciló entre 21 y 50 mm². Las semillas parcialmente desarrolladas son entre un 49 y un 75 % más pequeñas que las semillas normales (tabla 4.2).

En la hibridación entre clementina 'Clemenules' tetraploide por mandarina 'Moncada' se obtuvieron un total de 142 semillas, 123 completamente desarrolladas y 19 parcialmente desarrolladas (figura 4.1.c). De las 123 semillas completamente desarrolladas 1 semilla destacó del resto por su mayor tamaño, mostrando un área de 69 mm² mientras que el resto de semillas completamente desarrolladas de menor tamaño presentaron un área que osciló entre 31 y 49 mm². Estos datos indican que las semillas pequeñas son un 42 % más pequeñas que las semillas normales. El área de las semillas parcialmente desarrolladas osciló entre 11 y 44 mm² lo que representó una disminución del área del 61 % respecto a la semilla normal (tabla 4.3).

En la hibridación entre clementina 'Clemenules' por zamboa 'Pink' se realizó un semillero con 96 semillas normales en condiciones de invernadero. Todas las semillas contenían embrión y todas las plantas analizadas fueron diploides. De las 12 semillas pequeñas obtenidas, se regeneraron 12 plantas, 3 diploides y 9 triploides. De las 47 semillas parcialmente desarrolladas, 13 semillas contenían embrión y a partir de ellos se regeneraron 5 plantas, todas diploides (tabla 4.1 y figuras 4.2.a y 4.2.b). En los trabajos sucesivos sólo se utilizaron las semillas pequeñas completamente desarrolladas ya que son las que contienen los embriones triploides.

En la hibridación entre clementina 'Fina' por mandarina 'Común' tetraploide, de las 12 semillas normales se regeneraron 5 plantas, 1 triploide y 4 tetraploides. De las 102 semillas parcialmente desarrolladas, 26 estaban abortadas y 76 contenían embrión, siendo todas las plantas regeneradas triploides (tabla 4.2 y figuras 4.2.b y 4.2.c).

En la hibridación entre clementina 'Clemenules' tetraploide por mandarina 'Moncada', a partir de la semilla completamente desarrollada obtenida se regeneró 1 planta triploide. De las 19 semillas parcialmente desarrolladas obtenidas, 10 estaban abortadas y 7 contenían embrión, obteniéndose de una de ellas una planta pentaploide (tabla 4.3 y figura 4.2.d). De las 122 semillas pequeñas obtenidas 120 contenían embrión, obteniéndose 116 plantas, 114 triploides y 2 pentaploides.

4.3.2 Hibridaciones 2x X 2x.

En las tablas 4.4 y 4.5 se muestran los datos y medias de cuajado, número de semillas pequeñas obtenidas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*, plantas regeneradas en las diferentes hibridaciones y su nivel de ploidía en función de los parentales femeninos y masculinos.

4.3.2.1 Cuajado y tipos de semillas.

El porcentaje de cuajado obtenido osciló entre un 36 % en mandarino `Fortune` por mandarino `Kara` y un 81 % entre clementina `Fina` con naranjo dulce `Comuna`.

En todas las hibridaciones 2x X 2x estudiadas, únicamente se seleccionaron las semillas pequeñas completamente desarrolladas (figura 4.3.a), descartando las semillas de tamaño normal, ya que en este tipo de semillas la frecuencia de obtención de plantas triploides es muy baja o prácticamente nula como se indica en el apartado 4.3.1 y por numerosos datos previos obtenidos en el laboratorio.

El número de semillas pequeñas obtenidas por 100 frutos osciló entre 7 con clementina `Clemenules` por mandarino `Kara` hasta 405 semillas con mandarino `Fortune` por tangor `Murcott`. El número medio de semillas pequeñas obtenidas por 100 frutos en clementina `Fina` con los cuatro parentales masculinos utilizados fue de 18, mientras que con clementina `Clemenules` y mandarino `Fortune` fue de 25 y 295 semillas respectivamente.

Cuando el mandarino `Común` se utilizó como parental masculino la media de semillas pequeñas obtenidas por 100 frutos fue de 152 semillas mientras que con mandarino `Kara` fue de 83.

4.3.2.2 Rescate y cultivo de embriones *in vitro*.

En todas las hibridaciones realizadas prácticamente todas las semillas contenían embrión y un único embrión por semilla (figura 4.3.a). El porcentaje de germinación osciló entre el 91 % en clementina `Clemenules` por mandarino `Común` y el 100 % obtenido en las hibridaciones entre clementina `Fina` por naranjo dulce `Comuna`, mandarinos `Común` y `Kara` y clementina `Clemenules` por mandarino `Kara` (figuras 4.3.b y 4.3.c).

El porcentaje de germinación medio obtenido para cada parental femenino y masculino, en todos los casos, siempre fue superior al 95 %.

4.3.2.3 Regeneración de plantas.

El número de plantas obtenidas a partir de las semillas pequeñas por 100 frutos osciló entre 7 semillas en clementina `Clemenules` por mandarino `Kara` y 371 semillas en la hibridación entre mandarino `Fortune` y mandarino `Común`.

Con las clementinas `Fina´ y `Clemenules´, se obtuvo de media entre 18 y 22 plantas por 100 frutos respectivamente, mientras que con mandarino `Fortune´ se obtuvo una media de 267 plantas (13 veces superior).

Con el parental masculino mandarino `Común´ se obtuvo una media de 139 plantas por 100 frutos al polinizar las clementinas mientras que con mandarino `Kara´ se alcanzó una media de 74 plantas.

El trasplante de las plantas obtenidas a partir de las semillas pequeñas producidas en las hibridaciones $2x \times 2x$ es un proceso en el cual el porcentaje de supervivencia es muy elevado en nuestras condiciones, y generalmente siempre superior al 90 % (Navarro *et al.* 2002) ya que las plantas obtenidas son generalmente robustas y vigorosas (figura 4.4.a).

4.3.2.4 Nivel de ploidía.

Las plantas obtenidas a partir de semillas completamente desarrolladas pequeñas presentaron niveles de ploidía diploides y triploides. De las 1.578 plantas obtenidas, 74 fueron diploides (4,7 %) y 1.504 triploides (95,3 %).

4.3.2.5 Eficiencia en la obtención de híbridos triploides.

En las hibridaciones en las que clementina `Fina´ fue utilizada como parental femenino, con mandarino `Kara´ la eficiencia obtenida fue de 7 triploides por 100 frutos mientras que con mandarino `Común´, tangor `Murcott´ y naranjo dulce `Comuna´ la eficiencia obtenida fue de 16, 16 y 18 triploides respectivamente. La eficiencia media obtenida con clementina `Fina´ como parental femenino fue de 14 triploides por 100 frutos.

En las hibridaciones en las que clementina `Clemenules´ fue utilizada como parental femenino la eficiencia obtenida con mandarino `Kara´, mandarino `Común´, tangor `Murcott´ y naranjo dulce `Comuna´ fue de 5, 22, 22 y 25 triploides por 100 frutos, respectivamente.

En las hibridaciones en las que mandarino `Fortune´ fue utilizado como parental femenino, la eficiencia osciló entre 201 triploides con mandarino `Kara´ y 363 triploides con mandarino `Común´. La eficiencia media obtenida con mandarino `Fortune´ como parental femenino fue de 260 triploides.

Cuando mandarino `Común´ actuó como parental masculino la media de híbridos triploides obtenidos por 100 frutos fue de 134, seguido con 95 por tangor `Murcott´, 90 con naranjo dulce `Comuna´ y 71 con mandarino `Kara´.

4.3.3 Hibridaciones $2x \times 4x$.

En las tablas de la 4.6 a la 4.11 se muestran los datos y medias de cuajado, número y tipos de semillas obtenidas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*, plantas regeneradas y su nivel de ploidía en función de cada cruzamiento y de los parentales femeninos y masculinos utilizados.

4.3.3.1 Cuajado y tipos de semillas.

El porcentaje de cuajado osciló entre el 57 % obtenido en las hibridaciones entre clementina `Fina` y `Clemenules` por naranjo dulce `Pineapple` tetraploide y mandarino `Fortune` por tangelo `Orlando` tetraploide mientras que el mayor porcentaje de cuajado se produjo en la hibridación entre clementina `Fina` por tangelo `Orlando` tetraploide (92 %).

En todas las hibridaciones 2x X 4x realizadas se obtuvieron dos tipos de semillas, semillas normales completamente desarrolladas y semillas parcialmente desarrolladas, como las descritas en el apartado 4.3.1.

El número de semillas parcialmente desarrolladas osciló entre 358 semillas por 100 frutos en la hibridación entre clementina `Fina` por naranjo dulce `Pineapple` y 1.695 semillas en la hibridación entre clementina `Clemenules` por mandarino `Común`. En las hibridaciones en las que clementina `Fina` fue utilizada como parental femenino la media de semillas parcialmente desarrolladas por 100 frutos fue de 789 semillas mientras que con clementina `Clemenules` la media obtenida fue de 1.114 semillas, ligeramente inferior a la obtenida entre mandarino `Fortune` por tangelo `Orlando` (1.132 semillas).

En las hibridaciones con mandarino `Común` se obtuvo de media el mayor número de semillas parcialmente desarrolladas por 100 frutos (1.451 semillas) mientras que con naranjo dulce `Pineapple` se obtuvo el menor número de semillas parcialmente desarrolladas por 100 frutos (441).

El número de semillas normales por 100 frutos osciló entre 22 en la hibridación entre clementina `Fina` por naranjo dulce `Pineapple` y 455 en la hibridación entre mandarino `Fortune` por tangelo `Orlando` tetraploide. En las hibridaciones en las que clementina `Fina` se utilizó como parental femenino la media de semillas normales por 100 frutos fue de 39 semillas mientras que con clementina `Clemenules` se obtuvo una media de 106 semillas.

Con el tangelo `Orlando` se obtuvieron de media 230 semillas normales por 100 frutos al polinizar las clementinas `Clemenules` y `Fina`, mientras que con el resto de parentales masculinos el número de semillas normales por 100 frutos osciló entre 50 semillas con mandarino `Moncada` y 76 semillas con mandarino `Nova`.

4.3.3.2 Rescate y cultivo de embriones *in vitro*.

Las semillas parcialmente desarrolladas eran de dos tipos: semillas abortadas, aquellas que no contenían embrión, y semillas que contenían uno o varios embriones en diferentes estados de desarrollo, desde globular a cotiledonario y de tamaño variable, desde imperceptibles macroscópicamente hasta embriones que medían más de 3 mm aproximadamente (figuras 4.5.a, 4.5.b y 4.5.c). Cuando hubo varios embriones, estos estaban muy compactados y en ocasiones envueltos por los restos del endospermo, lo cual hacía prácticamente imposible el poder individualizarlos y contarlos, por lo que la observación macroscópica no permitía discernir en muchos casos si la semilla contenía uno o varios embriones y en este caso cuantos embriones contenía. Además el aislamiento de estos tipos de embriones sin dañarlos es muy dificultoso, por lo que se

cultivaron *in vitro* todos juntos. Por este motivo, en la tabla 4.6, se calculó el porcentaje de germinación de los embriones contenidos en las semillas parcialmente desarrolladas considerando la germinación de al menos un embrión por semilla parcialmente desarrollada. Se consideró semilla monoembriónica aquella en la cual únicamente germinó un embrión y semilla poliembriónica aquella en la que germinó más de un embrión (figuras 4.5.d, 4.5.e y 4.5.f). Sin embargo, todas las semillas normales contenían un único embrión (figuras 4.5.g y 4.5.h).

El porcentaje de semillas parcialmente desarrolladas que contenían embriones osciló entre el 21 % en el cruce entre mandarina `Fortune` por tangelo `Orlando` y el 84 % obtenido en la hibridación entre clementina `Clemenules` por mandarina `Nova`. El porcentaje de germinación osciló entre el 48 % en el cruce entre clementina `Fina` por mandarina `Moncada` y el 86 % en la hibridación entre clementina `Clemenules` por mandarina `Moncada`.

El porcentaje de semillas monoembriónicas varió entre el 41 % en el cruce entre clementina `Clemenules` por mandarina `Común` y el 99 % en la hibridación entre mandarina `Fortune` por tangelo `Orlando`.

El número de embriones germinados por semilla poliembriónica osciló entre 1,4 en la hibridación entre clementina `Fina` por mandarina `Moncada` y 2,4 en la hibridación entre clementina `Fina` por tangelo `Orlando`.

En las semillas normales completamente desarrolladas obtenidas prácticamente todas las semillas contenían embrión y siempre albergaban un único embrión por semilla. El porcentaje de germinación de los embriones cultivados obtenidos en las diferentes hibridaciones siempre fue superior al 92 % excepto en las hibridaciones entre clementina `Clemenules` por mandarina `Moncada` (79 %, 11/14) y en la hibridación entre clementina `Fina` por mandarina `Común` (89 %, 8/9).

4.3.3.3 Regeneración de plantas.

En el Capítulo 5 se describe el análisis realizado con marcadores microsatélites en las plantas regeneradas a partir de una misma semilla parcialmente desarrollada. Los resultados obtenidos indican que todas estas plantas son híbridos e iguales entre sí. Por este motivo para realizar los cálculos del número de plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas en los casos en los que se obtuvo más de una planta por semilla, sólo se consideró una planta regenerada por semilla parcialmente desarrollada.

El número de plantas regeneradas a partir de semillas parcialmente desarrolladas por 100 frutos osciló entre 111 plantas por 100 frutos en la hibridación entre mandarina `Fortune` por tangelo `Orlando` y 827 plantas por 100 frutos en la hibridación entre clementina `Clemenules` por mandarina `Nova`.

El número de plantas obtenidas a partir de semillas normales completamente desarrolladas por 100 frutos osciló entre 21 plantas por 100 frutos en la hibridación entre clementina `Fina` por mandarina `Común` y 441 plantas por 100 frutos en la hibridación entre mandarina `Fortune` por tangelo `Orlando`.

El trasplante de las plantas obtenidas a partir de las semillas parcialmente desarrolladas requirió de mayores cuidados que el resto de plantas regeneradas en los otros tipos de hibridación y a partir de tipos de semillas diferentes. Estas plantas eran más frágiles y endebles que las regeneradas a partir de semillas normales por lo que durante la fase de trasplante debieron supervisarse con mayor atención (figuras 4.4.b y 4.4.c). Así mismo, el porcentaje de supervivencia de este tipo de plantas fue aproximadamente del 80 % en nuestras condiciones, mientras que el trasplante de las plantas obtenidas a partir de semillas normales completamente desarrolladas fue prácticamente del 100 % (Navarro *et al.* 2002).

4.3.3.4 Nivel de ploidía.

Las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas presentaron niveles de ploidía diploide, triploide, tetraploide y hexaploide (figuras 4.2.a, 4.2.b, 4.2.c y 4.6). De las 2.058 plantas obtenidas, 2.050 fueron triploides (99,6 %), 5 diploides (0,25 %), 2 hexaploides (0,1 %) y 1 tetraploide (0,05 %).

Las plantas obtenidas a partir de semillas normales completamente desarrolladas presentaron niveles de ploidía diploide, triploide y tetraploide. De las 896 plantas obtenidas, 244 fueron triploides (27 %), 335 diploides (37 %) y 321 tetraploides (36 %).

4.3.3.5 Eficiencia en la obtención de híbridos triploides.

La eficiencia en la obtención de híbridos triploides en hibridaciones 2x X 4x a partir de semillas parcialmente desarrolladas, considerando exclusivamente una planta regenerada por semilla poliembriónica, fluctuó entre 108 triploides en la hibridación entre mandarina `Fortune` por tangelo `Orlando` y 824 triploides en clementina `Clemenules` por mandarina `Nova`. Cuando la clementina `Fina` se utilizó como parental femenino, la media de plantas triploides obtenida fue de 171 triploides, con clementina `Clemenules` fue de 469 triploides y con mandarina `Fortune` fue de 108 triploides por 100 frutos. Con el parental masculino mandarina `Nova` se obtuvo una media de 507 triploides por 100 frutos, seguido del mandarina `Común` con 391 triploides por 100 frutos, 239 triploides por 100 frutos con tangelo `Orlando`, 224 triploides por 100 frutos con mandarina `Moncada` y 175 triploides por 100 frutos con naranja dulce `Pineapple`.

La eficiencia en la obtención de híbridos triploides a partir de semillas normales completamente desarrolladas osciló entre 7 triploides por 100 frutos en la hibridación entre clementina `Fina` por naranja dulce `Pineapple` y 66 triploides por 100 frutos en clementina `Clemenules` por tangelo `Orlando`. Cuando la clementina `Fina` se utilizó como parental femenino la media de plantas triploides obtenida por 100 frutos fue de 15 triploides, con clementina `Clemenules` fue de 43 triploides por 100 frutos y con mandarina `Fortune` fue de 48 triploides por 100 frutos. Con el parental masculino tangelo `Orlando` se obtuvo una media de 48 triploides por 100 frutos, seguido del mandarina `Nova` con 38 triploides por 100 frutos, 31 triploides por 100 frutos con mandarina

`Común`, 17 triploides por 100 frutos con naranjo dulce `Pineapple` y 11 triploides por 100 frutos con mandarina `Moncada`.

La eficiencia total se calculó como la suma de las eficiencias entre los triploides obtenidos por 100 frutos a partir de semillas parcialmente desarrolladas y los triploides obtenidos por 100 frutos a partir de semillas normales. La eficiencia varió entre 142 triploides por 100 frutos en la hibridación entre clementina `Fina` por naranjo dulce `Pineapple` y 885 triploides por 100 frutos en clementina `Clemenules` por mandarina `Nova`. Cuando la clementina `Fina` fue utilizada como parental femenino la media de plantas triploides obtenida por 100 frutos fue de 186 triploides, con clementina `Clemenules` fue de 513 triploides por 100 frutos y con mandarina `Fortune` fue de 157 triploides por 100 frutos. Con el parental masculino mandarina `Nova` se obtuvo una eficiencia media de 545 triploides por 100 frutos, seguido del mandarina `Común` con 422 triploides por 100 frutos, 352 triploides por 100 frutos con tangelo `Orlando`, 235 triploides por 100 frutos con mandarina `Moncada` y 192 triploides por 100 frutos con naranjo dulce `Pineapple`.

4.3.4 Hibridaciones 4x X 2x.

En las tablas de la 4.12 a la 4.14 se muestran los datos de cuajado, número y tipos de semillas obtenidas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*, plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones realizadas entre clementina `Clemenules` tetraploide con los parentales masculinos mandarinos `Kara`, `Común` y `Moncada` y el tangor `Murcott`.

4.3.4.1 Cuajado y tipos de semillas.

El porcentaje de cuajado obtenido osciló entre el 25 y el 47 % con mandarina `Kara` y mandarina `Común` respectivamente.

En las hibridaciones 4x X 2x se obtuvieron semillas normales completamente desarrolladas, semillas pequeñas completamente desarrolladas y semillas parcialmente desarrolladas (figura 4.7.a). En la hibridación con mandarina `Kara` se obtuvieron semillas de los tres tipos, con mandarina `Común` y mandarina `Kara` se obtuvieron semillas normales y semillas pequeñas y con mandarina `Moncada` se obtuvieron semillas pequeñas y semillas parcialmente desarrolladas.

4.3.4.2 Rescate, cultivo de embriones *in vitro* y regeneración de plantas.

Las semillas pequeñas completamente desarrolladas obtenidas en las diferentes hibridaciones contenían embrión y un único embrión por semilla. El porcentaje de germinación osciló entre el 94 % con mandarina `Kara` y el 100 % con mandarina `Moncada` (figuras 4.7.b y 4.7. c).

Con mandarina `Moncada` se obtuvo el mayor número de plantas a partir de semillas pequeñas por 100 frutos (860 plantas) mientras que con mandarina `Común` se obtuvo el menor número de plantas (267).

De las 18 semillas parcialmente desarrolladas obtenidas con mandarina `Kara`, 9 semillas contenían embrión (50 %), de los cuales germinaron 4 (44 %) y produjeron 3 plantas. Con mandarina `Moncada` de las 3 semillas parcialmente desarrolladas obtenidas ninguna contenía embrión.

Se obtuvieron 3, 1 y 2 semillas normales con mandarina `Kara`, mandarina `Común` y tangor `Murcott` respectivamente. Todas las semillas contenían embrión y todos los embriones germinaron, obteniéndose 3, 1 y 2 plantas, respectivamente.

El aspecto de las plantas obtenidas a partir de semillas pequeñas producidas en hibridaciones $4x \times 2x$ es muy similar a las plantas obtenidas en las hibridaciones $2x \times 2x$ así como los cuidados necesarios durante la fase de trasplante (figura 4.4.d). En nuestras condiciones el porcentaje de supervivencia de este tipo de plantas fue prácticamente igual al obtenido en las plantas regeneradas a partir de hibridaciones $2x \times 2x$ (Navarro *et al.*, datos no publicados).

4.3.4.3 Nivel de ploidía.

Las plantas obtenidas a partir de semillas pequeñas presentaron niveles de ploidía triploide, pentaploide y hexaploide. De las 358 plantas obtenidas, 352 fueron triploides (98,3 %), 3 pentaploides (0,85 %) y 3 hexaploides (0,85 %).

Las 3 plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas con mandarina `Kara` fueron triploides.

Con mandarina `Kara` se obtuvieron 3 plantas a partir de semillas normales y los niveles de ploidía fueron triploide, tetraploide y hexaploide. Con mandarina `Común` se obtuvo una planta tetraploide mientras que con el tangor `Murcott` se obtuvo una planta triploide y otra planta tetraploide.

4.3.4.4 Eficiencia en la obtención de híbridos triploides.

La eficiencia en la obtención de híbridos triploides en hibridaciones $4x \times 2x$ a partir de semillas pequeñas fluctuó entre 260 triploides por 100 frutos en la hibridación con mandarina `Común` y 850 triploides por 100 frutos con mandarina `Moncada`. Con el tangor `Murcott` el número de triploides por 100 frutos fue de 525 mientras que con mandarina `Kara` fue de 329 triploides.

La eficiencia en la obtención de híbridos triploides a partir de semillas parcialmente desarrolladas fluctuó entre 0 triploides por 100 frutos en las hibridaciones con mandarina `Común`, tangor `Murcott` y mandarina `Moncada` y 10 triploides con mandarina `Kara`.

La eficiencia en la obtención de híbridos triploides a partir de semillas normales osciló entre 0 triploides por 100 frutos en las hibridaciones con mandarina `Común` y mandarina `Moncada`, y 3 y 4 triploides por 100 frutos con mandarina `Kara` y tangor `Murcott`, respectivamente.

Calculando la eficiencia total en la obtención de híbridos triploides como la suma de los híbridos triploides obtenidos por 100 frutos a partir de semillas pequeñas, semillas parcialmente desarrolladas y semillas normales, con mandarina `Moncada` se obtuvo la mayor eficiencia con 850

triploides por 100 frutos, 529 triploides por 100 frutos con el tangor `Murcott`, 329 triploides por 100 frutos con mandarino `Kara` y 260 triploides por 100 frutos con mandarino `Común`.

4.3.5 Comparación en la eficiencia de obtención de híbridos triploides entre las hibridaciones 2x X 2x, 2x X 4x y 4x X 2x utilizando como parental femenino la clementina `Clemenules` diploide y tetraploide y como parental masculino el mandarino `Común` diploide y tetraploide.

En la tabla 4.15 se muestran los resultados correspondientes a la comparación entre los diferentes tipos de hibridación. Con el parental femenino clementina `Clemenules` y el parental masculino mandarino `Común` el número de semillas obtenidas por 100 frutos fue de 30, 1.780 y 307 semillas en los tipos de hibridación 2x X 2x, 2x X 4x y 4x X 2x respectivamente. El porcentaje de germinación de los embriones contenidos en las semillas obtenidas en la hibridación 2x X 2x fue del 91 %, mientras que en la hibridación 2x X 4x fue del 77 % y en la hibridación 4x X 2x fue del 96 %. El número de plantas obtenidas por 100 frutos osciló entre 25 plantas por 100 frutos en la hibridación 2x X 2x, 667 plantas en la hibridación 2x X 4x y 273 plantas por 100 frutos en la hibridación 4x X 2x. En la hibridación 2x X 2x el 90 % de las plantas obtenidas fueron triploides mientras que en las hibridaciones 2x X 4x y 4x X 2x el 95 % de las plantas obtenidas fueron triploides. Respecto al número de triploides obtenidos por 100 frutos, los resultados mostraron grandes diferencias según el tipo de hibridación. En la hibridación 2x X 2x se obtuvieron 22 triploides por 100 frutos, en la hibridación 4x X 2x se obtuvieron 260 triploides por 100 frutos mientras que el mayor resultado se obtuvo en la hibridación 2x X 4x, obteniéndose 633 triploides por 100 frutos.

4.4 DISCUSIÓN.

4.4.1 Hibridaciones 2x X 2x.

4.4.1.1 Producción de semillas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*.

Los resultados obtenidos en la hibridación entre clementina `Clemenules` por zamboa `Pink` coinciden con los obtenidos por Esen y Soost (1971a) ya que también obtuvieron semillas pequeñas completamente desarrolladas (42 % más pequeñas) que eran las que contenían los embriones triploides. Sin embargo estos autores no describieron en su trabajo la obtención de semillas parcialmente desarrolladas, aunque estas semillas no tienen ningún interés en la obtención de plantas triploides, ya que mayoritariamente están abortadas y cuando tienen embrión las plantas regeneradas a partir de ellas son diploides.

En las hibridaciones entre parentales diploides, Cameron y Frost (1968) y Esen y Soost (1971a), describieron la producción de híbridos triploides. Estos últimos autores polinizaron flores de los genotipos no apomícticos orangelo `Sukega` (*C. paradisi* x *C. sinensis*), mandarino `Temple` (*C. temple* Hort. ex Y. Tan.) y clementina con polen del tangelo `Pearl` (*C. paradisi* x *C. sinensis*). En

todas las hibridaciones realizadas, observaron la presencia de semillas normales completamente desarrolladas y semillas entre un 1/3 y 1/6 más pequeñas que las semillas normales. Estas semillas más pequeñas son las que contenían los embriones triploides. Estudios histológicos realizados por Esen y Soost (1971a; 1973; 1977) demostraron que las semillas pequeñas contenían embriones triploides y endospermos pentaploides, lo que confirma que los embriones triploides se originan a partir de la formación de megagametofitos no reducidos. Además, estos autores propusieron que la relación 3/5 entre el nivel de ploidía del embrión y del endospermo es la causa responsable de la reducción del tamaño de las semillas, ya que el endospermo pentaploide parece que presenta un crecimiento más lento o termina su desarrollo prematuramente. La formación de gametos no reducidos es un fenómeno común en especies del género *Lilium* (Zhou *et al.* 2008), *Solanum* (Peloquin *et al.* 2008), *Vaccinium* (Lyerene *et al.* 2003) y *Musa* spp. (Ortiz y Vuylsteke, 1995).

La obtención de híbridos triploides a partir de semillas pequeñas no es una característica exclusiva de los genotipos no apomícticos de cítricos. Geraci *et al.* (1975) obtuvieron plantas triploides en hibridaciones entre los genotipos apomícticos mandarino 'King' (*C. nobilis* Lour.) y los limoneros 'Eureka' y 'Lisbon' (*C. limon* (L.) Burm. F) con orangelo 'Sukega'. Posteriormente, Wakana *et al.* (1981) observaron en las semillas de pequeño tamaño obtenidas en las hibridaciones entre el tangor 'Ortanique' (*C. reticulata* x *C. sinensis*) por *C. hassaku* Hort. ex Tan. (probable híbrido entre zamboa por mandarino), la presencia de varios embriones diploides nucelares junto con un embrión triploide y endospermo pentaploide. Sin embargo, los embriones nucelares diploides mostraron un crecimiento vigoroso respecto al embrión triploide, lo que dificultaba enormemente el desarrollo de este último y por lo tanto la obtención de poblaciones elevadas de híbridos triploides.

El rescate y cultivo *in vitro* de los embriones contenidos en las semillas pequeñas es una técnica necesaria para la germinación de los mismos ya que en condiciones de invernadero este tipo de semillas normalmente no germinan. Navarro *et al.* (2002) cultivaron *in vitro* semillas pequeñas obtenidas en hibridaciones 2x X 2x y rescataron y cultivaron *in vitro* embriones contenidos en este tipo de semillas. El 84 % de los embriones cultivados germinaron mientras que únicamente el 42 % de las semillas cultivadas *in vitro* evolucionaron. Estos resultados demuestran claramente la necesidad de rescatar y cultivar *in vitro* los embriones contenidos en este tipo de semillas. Ollitrault *et al.* (1996b) cultivaron *in vitro* semillas pequeñas y semillas parcialmente desarrolladas obtenidas al polinizar los genotipos no apomícticos de clementina 'Caffin', 'Córscica 1', 'SRA 63', 'Hernandina' y 'MA3' con diferentes genotipos diploides como parentales masculinos. Solamente germinaron el 33 % de las semillas cultivadas mientras que los porcentajes de germinación de los embriones cultivados *in vitro* obtenidos en todas las hibridaciones estudiadas siempre fueron superiores al 92 %.

4.4.1.2 Obtención de híbridos triploides; origen y eficiencia.

En las hibridaciones realizadas entre las clementinas 'Clemenules' y 'Fina' y mandarino 'Fortune' con los parentales masculinos mandarino 'Común', mandarino 'Kara', tangor 'Murcott' y el naranjo dulce 'Comuna' se observa claramente que la frecuencia de obtención de híbridos triploides depende del parental femenino, siendo mucho más elevada cuando se utilizó mandarino 'Fortune'

(260 triploides por 100 frutos) que con las clementinas `Clemenules´ y `Fina´ (18 y 14 triploides por 100 frutos, respectivamente). Geraci *et al.* (1975) realizaron hibridaciones entre mandarino `Fortune´, mandarino `Temple´, mandarino `Wilking´, mandarino `King´, limonero `Eureka´, clementina, limonero `Lisbon´, naranjo dulce `Poorman´ y zamboa `CRC 2241´ con orangeló `Sukega´ obteniendo entre 600 y 0 híbridos triploides por 100 frutos. La formación de megagametofitos no reducidos es una característica intrínseca de cada genotipo, por lo que es necesario determinar la frecuencia de formación de gametos no reducidos antes de abordar programas de mejora genética a gran escala basados en la obtención de híbridos triploides a partir de hibridaciones $2x \times 2x$. Esta característica implica que en función de la frecuencia en la formación de gametos no reducidos, para cada genotipo será necesario realizar un número diferente de polinizaciones. Por ejemplo, con los datos obtenidos en las polinizaciones con las clementinas `Clemenules´ y `Fina´ y mandarino `Fortune´, para obtener 100 plantas triploides, con clementina `Clemenules´ y `Fina´ sería necesario realizar 556 y 715 polinizaciones respectivamente mientras que con mandarino `Fortune´ únicamente bastarían 39 flores polinizadas.

4.4.1.3 Consideraciones prácticas.

Los triploides obtenidos en las hibridaciones $2x \times 2x$ se encuentran en semillas entre un 46 - 66 % más pequeñas que las semillas normales, las cuales visualmente pueden ser identificadas fácilmente. Prácticamente todas las semillas pequeñas contienen embrión y un único embrión por semilla. El rescate y cultivo de embriones *in vitro* a partir de este tipo de semillas es un proceso sencillo en el cual prácticamente la totalidad de los embriones cultivados germinan y llegan a desarrollar una planta entera. El cultivo *in vitro* de los embriones obtenidos a partir de semillas pequeñas se realiza inicialmente en placas de Petri de 9 cm de diámetro y posteriormente, cuando la radícula se ha desarrollado como mínimo entre 1 y 2 cm se repican e identifican en tubos individuales que contienen medio de elongación. El nivel de ploidía de las plantas obtenidas a partir de semillas pequeñas fue triploide en más del 95 % de los casos.

La eficiencia en la obtención de híbridos triploides osciló entre 5 híbridos triploides por 100 frutos entre clementina `Clemenules´ por mandarino `Kara´ y 363 híbridos triploides entre mandarino `Fortune´ por mandarino `Común´.

El trasplante de las plantas regeneradas y su aclimatación a las condiciones de invernadero es una fase en la cual el porcentaje de supervivencia obtenido en la mayoría de los casos fue superior al 90 % (Navarro *et al.* 2002) ya que las plantas obtenidas eran robustas y de crecimiento vigoroso.

4.4.1.4 Estructura genética.

Luro *et al.* (2004) proponen que la restitución de la segunda división meiótica (SDR) es el mecanismo implicado en la formación de megagametofitos no reducidos en clementina, mientras que en naranjo dulce, Chen *et al.* (2008) proponen que el mecanismo genético implicado es la restitución de la primera división meiótica (FDR). La heterocigosidad materna transmitida a los híbridos triploides

varía entre los *loci* dependiendo de si se produce o no un entrecruzamiento entre el *locus* considerado y el centrómero. Cuando el mecanismo genético implicado es SDR la restitución de la heterocigosidad materna oscila entre 0 y 100 % mientras que con FDR, varía entre 100 y 50 % (Ollitrault *et al.* 2008), por ello el nivel de heterocigosidad transmitida en los gametos no reducidos a los híbridos triploides es mayor con FDR que con SDR. Esta característica de la biología reproductiva de los cítricos implica una estructura genética diferente de la población de híbridos triploides (figura 4.8). La variabilidad esperada en la progenie triploide cuando la formación de gametos no reducidos tiene lugar mediante FDR, es menor que la esperada con SDR, con lo cual, obtendremos descendencias más parecidas a los parentales femeninos con FDR y más variables con SDR (Ollitrault *et al.* 2008). Por lo tanto es de gran interés el conocimiento del mecanismo genético implicado en cada genotipo para el diseño de estrategias de mejora enfocadas a la obtención de genotipos con unos caracteres específicos. Así mismo, la elaboración de mapas genéticos saturados fiables permitirá seleccionar de una forma óptima marcadores moleculares informativos del tipo de mecanismo implicado en la restitución de la heterocigosidad, ya que si no se conoce su posición en el mapa no es posible distinguir si el mecanismo implicado es SDR o FDR para porcentajes de restitución de la heterocigosidad materna superiores al 50 % (figura 4.8).

4.4.2 Hibridaciones 2x X 4x.

4.4.2.1 Producción de semillas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*.

En las hibridaciones 2x X 4x se producen semillas parcialmente desarrolladas y semillas normales completamente desarrolladas. En las semillas parcialmente desarrolladas se distinguen semillas abortadas, semillas monoembriónicas y semillas poliembriónicas. Los embriones contenidos en estas semillas no son capaces de germinar en condiciones de invernadero por lo que es imprescindible recurrir a la técnica del rescate y cultivo de embriones *in vitro* para poder regenerar plantas (Starrantino y Recupero, 1981). La aplicación de esta técnica es crucial para poder desarrollar programas de mejora genética basados en la obtención de híbridos triploides a partir de hibridaciones 2x X 4x. En las semillas parcialmente desarrolladas poliembriónicas se desarrolla más de una planta por semilla. En el Capítulo 5 se demuestra con marcadores microsatélites que todas las plantas regeneradas a partir de una misma semilla son genéticamente iguales. Las semillas normales obtenidas en las diferentes hibridaciones contenían únicamente un embrión.

Considerando que las condiciones ambientales juegan un papel muy importante en la biología reproductiva de los cítricos (Luro *et al.* 2004, Navarro *et al.* datos no publicados), con los resultados obtenidos se observó un efecto diferencial sobre el número de semillas parcialmente desarrolladas según el parental femenino y también según el parental masculino. En la clementina `Clemenules´ se producen un mayor número de semillas parcialmente desarrolladas que en la clementina `Fina´. El mandarino `Común´ fue el parental masculino que más semillas parcialmente desarrolladas produjo en las clementinas, seguido del mandarino `Nova´, tangelo `Orlando´, mandarino `Moncada´ y naranjo dulce `Pineapple´. Oiyama *et al.* (1981) describieron el efecto de los parentales femeninos y

masculinos en la obtención de híbridos triploides a partir de hibridaciones $2x \times 4x$. Estos autores polinizaron los genotipos no apomícticos diploides tangor 'Ellendale' (*C. reticulata* x *C. sinensis*), 'Hassaku', 'Iyo' (*C. iyo* Hort. ex Tan.), 'Hyuganatsu' (*C. tamurana* Hort. ex Tan.), 'Naruto' (*C. medioglobosa* Hort. ex Tan.), mandarino 'Lee' (*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)) y clementina con polen de los genotipos tetraploides 'Kawano Natsudaidai', 'Funadoko' (*C. funadoko* Hort. ex Tan.) y naranja dulce 'Parson Brown'. De los 7 genotipos utilizados, con clementina obtuvieron el menor número de semillas parcialmente desarrolladas mientras que con 'Naruto' obtuvieron los valores más elevados. Respecto a los parentales masculinos, con 'Funadoko' obtuvieron el menor número de semillas mientras que con el naranja dulce 'Parson Brown' consiguieron los mejores resultados.

Respecto a los resultados obtenidos en el número de semillas normales completamente desarrolladas también se observó un efecto de los parentales. En clementina 'Clemenules' se originó un mayor número de semillas normales que en clementina 'Fina'. El efecto del parental masculino sobre el número de semillas normales fue también claro. Con el tangelo 'Orlando' se obtuvo el mayor número de semillas, con mandarino 'Nova' y mandarino 'Común' los resultados fueron similares aunque más elevados que los obtenidos con naranja dulce 'Pineapple' y mandarino 'Moncada'. Oiyama *et al.* (1981) también observaron un efecto claro de los parentales en la obtención de híbridos triploides. 'Hyuganatsu' presentó el mayor número de semillas normales mientras que con la clementina obtuvieron el menor número de semillas. Respecto a los parentales masculinos también observaron diferencias en función del genotipo. Con naranja dulce 'Parson Brown' y 'Funadoko' el número de semillas obtenido fue el más elevado mientras que con 'Natsudaidai' fue bastante más bajo.

4.4.2.2 Obtención de híbridos triploides; origen y eficiencia.

Prácticamente todas las plantas regeneradas a partir de semillas parcialmente desarrolladas fueron triploides, 2.050 triploides de 2.058 plantas analizadas (99,6 %). Además también se obtuvieron 5 plantas diploides (0,24 %), 1 planta tetraploide (0,05 %) y dos plantas hexaploides (0,1 %). Starrantino y Recupero (1981) analizaron por métodos citológicos 300 plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas originadas en hibridaciones entre los genotipos diploides zamboa 'Reinking', clementina 'Monreal' y el híbrido 52-36B-69 (*C. limon* x *C. grandis*) con los parentales masculinos tetraploides pomelo 'Marsh' (*C. paradisi* Macf.), los naranjos dulces 'Tarocco', 'Sanguinello Moscato' y 'Ovaletto Sanguigno'. De las 300 plantas analizadas, únicamente pudieron determinar el nivel de ploidía de 211 triploides mientras que de las 89 restantes no precisaron el número de cromosomas.

Esen y Soost (1971b; 1977) demostraron que las plantas triploides obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas producidas en hibridaciones $2x \times 4x$ se originaban como consecuencia de la fusión de un gameto haploide del parental femenino ($n = x = 9$) con un gameto diploide del parental masculino ($n = 2x = 18$) y que el nivel de ploidía del endospermo era tetraploide. También concluyeron diciendo que la relación $3/4$ entre el nivel de ploidía del embrión y del

endospermo era la causa por la cual no se producía el completo desarrollo de la semilla, debido a una incompatibilidad entre ambos, originando un desarrollo anormal o una degeneración prematura del endospermo.

Según los resultados obtenidos, a partir de las semillas normales se pueden obtener plantas diploides, triploides y tetraploides, variando el porcentaje de las mismas según la hibridación realizada. Esen y Soost (1971b) determinaron que entre el 92 y el 99 % de semillas con relación 3/4 entre el nivel de ploidía del embrión y del endospermo, degeneraban durante la embriogénesis, lo que implica que un pequeño porcentaje de semillas con la relación 3/4 continuaban su desarrollo, siendo probablemente el origen genético de las plantas triploides obtenidas a partir de las semillas normales. Otra hipótesis menos probable, sería que se originarían como consecuencia de la fusión de un gameto no reducido del parental femenino con un gameto haploide del parental masculino, obteniéndose un embrión triploide y un endospermo pentaploide. La relación 3/5 entre el nivel de ploidía del embrión y del endospermo, en las hibridaciones $2x \times 2x$ y $4x \times 2x$, conlleva la reducción del tamaño de la semilla, característica que no se dio en estas semillas. Esta hipótesis podría verificarse mediante estudios genéticos con marcadores moleculares.

En las hibridaciones $2x \times 4x$ la obtención de híbridos triploides varió dependiendo de los parentales utilizados. Entre las dos clementinas utilizadas como parental femenino se observó que con clementina 'Clemenules' la obtención de híbridos triploides fue mayor que con clementina 'Fina', tanto a partir de semillas parcialmente desarrolladas como de semillas normales. Dependiendo de los parentales masculinos utilizados, la obtención de híbridos triploides también varió, observándose un efecto del parental masculino. Los resultados obtenidos indican que con mandarino 'Nova' la obtención de híbridos triploides por 100 frutos, a partir de semillas parcialmente desarrolladas y semillas normales, es más elevada que con el resto de parentales masculinos (545 triploides por 100 frutos), seguida del mandarino 'Común' (422 triploides por 100 frutos), tangelo 'Orlando' (352 triploides por 100 frutos), mandarino 'Moncada' (235 triploides por 100 frutos) y naranjo dulce 'Pineapple' (192 triploides por 100 frutos). Estos resultados revelan que la obtención de híbridos triploides a partir de polinizaciones $2x \times 4x$ depende en gran medida de la compatibilidad existente entre los diferentes parentales, como también describieron Esen y Soost (1971b) y Oiyama *et al.* (1981) en sus respectivos trabajos.

4.4.2.3 Origen de las plantas no triploides.

Esen y Soost (1971b; 1977) también obtuvieron plantas hexaploides al polinizar el orangelo 'Sukega' con los naranjos dulces 'Paperrind' y otro de nombre desconocido, refiriéndose a él como Sweet y pomelo 'Hall'. Mediante métodos citológicos comprobaron que el endospermo era decaploide, por lo que propusieron que estas plantas se originaron a partir de la fusión de un doble gameto no reducido del orangelo 'Sukega' ($n = 4x = 36$) con un gameto diploide de los parentales masculinos ($n = 2x = 18$). Oiyama y Kobayashi (1991b) también obtuvieron plantas hexaploides al polinizar flores de 'Miyauchi lokan' (*C. iyo* Tan.) diploides con polen tetraploide de 'Funadoko' y

naranja dulce 'Trovia'. Estos autores proponen como mecanismo genético implicado en la formación de plantas hexaploides en hibridaciones $2x \times 4x$ el mismo que el descrito por Esen y Soost (1971b).

Las plantas diploides obtenidas en las semillas normales probablemente se originaron como consecuencia de polinizaciones con polen extraño o por la fusión de un gameto haploide del parental femenino con un gameto monoploide del parental masculino. Dentro del programa de mejora genética que está realizando nuestro grupo, algunas hibridaciones $2x \times 4x$ han sido realizadas en las instalaciones cubiertas con malla antiinsectos de AVASA evitando así la presencia de insectos polinizadores. A partir de semillas normales obtenidas en hibridaciones $2x \times 4x$ hemos obtenido plantas diploides, lo que reafirma la posibilidad de que en los genotipos tetraploides de cítricos se originen con cierta frecuencia gametos monoploides. No obstante es necesario realizar estudios adicionales que nos permitan determinar el origen genético de este tipo de plantas.

Esen y Soost (1971b) y Oiyama *et al.* (1981) no obtuvieron plantas diploides en las hibridaciones realizadas, aunque Frost y Soost (1968) demostraron que en la metafase I de los genotipos tetraploides de cítricos hay una elevada variabilidad de asociaciones entre los diferentes cromosomas, pudiéndose observar tetravalentes, trivalentes, bivalentes y univalentes, lo que podría explicar la obtención de estas plantas diploides. Esen y Soost (1971b) propusieron que las plantas tetraploides obtenidas eran el resultado de la fusión de un megagametofito no reducido ($n = 2x = 18$) con un gameto diploide ($n = 2x = 18$) del parental masculino. El nivel de ploidía del endospermo producido en estas semillas fue hexaploide. Nuestros resultados confirman que, en función del parental femenino, hay una buena relación entre el porcentaje de plantas triploides obtenidas en hibridaciones $2x \times 2x$ y el porcentaje de plantas tetraploides obtenidas en hibridaciones $2x \times 4x$. Estos genotipos tetraploides, cuando pierdan las características juveniles, pueden ser utilizados como parentales para la obtención de híbridos triploides y podrían resultar muy interesantes ya que aumentarían la variabilidad genética (Tusa *et al.* 1996).

Los híbridos triploides 'Yosemite', 'Tahoe' y 'Shasta Gold' han sido obtenidos a partir de cruzamientos $4x \times 2x$ entre un parental femenino tetraploide, obtenido de forma casual en una hibridación $2x \times 4x$ entre el mandarino diploide 'Temple' con el mandarino tetraploide 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tan.), y el parental masculino diploide 'Encore' (Williams y Roose, 2004). La obtención de plantas tetraploides en hibridaciones $2x \times 4x$ también se ha observado en especies de los géneros *Vitis* (DeLong *et al.* 2007) y *Prunus* (Hauck *et al.* 2002).

4.4.2.4 Consideraciones prácticas.

En las hibridaciones $2x \times 4x$ la obtención de híbridos triploides implica en primer lugar la obtención de genotipos tetraploides de cítricos que puedan ser utilizados como parentales masculinos. En estas hibridaciones se obtienen un elevado número de semillas parcialmente desarrolladas junto con semillas normales completamente desarrolladas que contienen un único embrión. Sin embargo en las semillas parcialmente desarrolladas se observó la presencia de semillas abortadas, semillas parcialmente desarrolladas monoembriónicas y semillas parcialmente desarrolladas poliembriónicas en todas las hibridaciones estudiadas. Los embriones contenidos en el

interior de las semillas parcialmente desarrolladas estaban envueltos por los restos del endospermo, muy compactados entre ellos y localizados en la zona micropilar del saco embrionario. El aislamiento y cultivo *in vitro* de estos embriones es una técnica difícil que requiere de una mayor destreza manual para poder aislarlos sin causarles ningún daño y mayor tiempo para el aislamiento. El cultivo *in vitro* de estas agrupaciones de embriones supone posteriormente un mayor trabajo en la individualización e identificación de los diferentes embriones germinados. Al igual que ocurre con los embriones obtenidos en las hibridaciones 2x X 2x, también es necesario repicarlos a medio de elongación. Sin embargo los embriones contenidos en el interior de las semillas normales pueden cultivarse directamente en tubo en un medio de cultivo más sencillo que el utilizado anteriormente, lo que supone un importante ahorro de tiempo durante esta etapa.

Las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas producidas en hibridaciones 2x X 4x necesitan, por su aspecto más delicado y frágil, un mayor cuidado y dedicación durante la fase de trasplante mientras que el resto de plantas obtenidas en hibridaciones y tipos de semillas diferentes son más robustas y no es necesario un especial cuidado durante la fase de trasplante.

El nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir de semillas parcialmente desarrolladas fue en el 99,6 % de los casos triploide mientras que a partir de semillas normales el 27 % fueron triploides. La eficiencia en la obtención de híbridos triploides osciló entre 153 híbridos triploides por 100 frutos entre clementina `Fina` por mandarino `Moncada` y 885 triploides entre clementina `Clemenules` por mandarino `Nova` considerando semillas normales y semillas parcialmente desarrolladas.

Como hemos visto anteriormente en este tipo de hibridación se obtienen plantas tetraploides que pueden ser utilizadas como parentales masculinos y también como parentales femeninos, seleccionando aquellos genotipos que produzcan semillas monoembriónicas. Esta alternativa implica esperar a que estos genotipos produzcan frutos lo que representa como mínimo entre 5 y 7 años.

4.4.2.5 Estructura genética.

En los genotipos tetraploides la formación de los gametos es compleja. Depende del emparejamiento preferencial de los cromosomas homólogos, lo cual define la frecuencia en la formación de asociaciones bivalentes o multivalentes, de la frecuencia de entrecruzamiento entre el *locus* considerado y el centrómero y el tipo de segregación del centrómero y de la frecuencia de la doble reducción en el caso de la formación de tetravalentes (Ollitrault *et al.* 2008). Si consideramos un genotipo autotetraploide, como es el caso de los genotipos tetraploides utilizados como parentales masculinos, ya que han sido obtenidos por la duplicación espontánea del número de cromosomas a partir de células de la nucela, la transmisión de la heterocigosidad a la progenie triploide es función de: (i) el emparejamiento preferencial de los cromosomas homólogos del genotipo autotetraploide y (ii) de la distancia del *locus* considerado al centrómero. Si existe un emparejamiento preferencial total entre los cromosomas homólogos duplicados, originándose continuamente asociaciones bivalentes y una segregación disómica, se produciría una transmisión del 100 % de la heterocigosidad del parental

tetraploide. En cambio, la restitución de la heterocigosidad de este parental sería del 66 % no teniendo en cuenta la presencia de entrecruzamientos en un emparejamiento aleatorio entre cromosomas homólogos (segregación tetrasómica), mientras que en el caso de la formación de asociaciones tetravalentes, la predicción de la restitución de la heterocigosidad del parental tetraploide sería muy complicada (Ollitrault *et al.* 2008). Por ello, es de gran importancia realizar estudios genéticos que permitan aclarar todos estos aspectos relacionados con la biología reproductiva de los cítricos.

La estructura genética de una población de híbridos triploides obtenidos a partir de hibridaciones $2x \times 4x$ en la cual se produce de un modo sistemático la formación de asociaciones bivalentes con un emparejamiento preferencial entre los cromosomas homólogos y por lo tanto una transmisión del 100 % de la heterocigosidad del parental tetraploide, los híbridos triploides presentarían teóricamente poca variabilidad mientras que si la formación de asociaciones bivalentes es aleatoria, se obtendrían híbridos con restitución del 66 % de la heterocigosidad del parental tetraploide (figura 4.8). Los fenotipos de los híbridos triploides obtenidos a partir de hibridaciones $2x \times 4x$ son, en la mayoría de los casos, muy similares al parental masculino. Frost y Soost (1968) observaron una gran variabilidad en la conjugación de los cromosomas homólogos durante la metafase 1, originándose tetravalentes, trivalentes, bivalentes y univalentes. La observación de asociaciones tetravalentes permitiría suponer que probablemente se produzca una segregación tetrasómica, aunque es necesario realizar trabajos adicionales que permitan determinar el mecanismo genético implicado.

4.4.3 Hibridaciones $4x \times 2x$.

4.4.3.1 Producción de semillas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*.

En las hibridaciones $4x \times 2x$ se obtuvieron semillas normales completamente desarrolladas, semillas pequeñas completamente desarrolladas y semillas parcialmente desarrolladas. Esen *et al.* (1978) también describieron la obtención de semillas pequeñas completamente desarrolladas y semillas normales completamente desarrolladas en hibridaciones $4x \times 2x$. La media de semillas pequeñas completamente desarrolladas por 100 frutos obtenida en las cuatro hibridaciones estudiadas (532 semillas) fue mucho más elevada que la obtenida con las semillas normales (7 semillas) y que la obtenida con las semillas parcialmente desarrolladas (22 semillas).

4.4.3.2 Obtención de híbridos triploides; origen y eficiencia.

En los tres tipos de semillas descritos anteriormente se han obtenido plantas triploides con frecuencias muy diferentes. El 98,6 % de las plantas triploides se obtuvieron a partir de las semillas pequeñas completamente desarrolladas, el 0,8 % a partir de semillas parcialmente desarrolladas y el 0,6 % restante en las semillas normales. A partir de las semillas pequeñas completamente desarrolladas se han obtenido plantas triploides (98,4 %), pentaploides (0,8 %) y hexaploides (0,8 %).

Esen *et al.* (1978) propusieron que las plantas triploides obtenidas a partir de semillas pequeñas completamente desarrolladas producidas en las hibridaciones $4x \times 2x$ se originaban como consecuencia de la fusión de un gameto diploide del parental femenino ($n = 2x = 18$) con un gameto haploide del parental masculino ($n = x = 9$) junto con la formación de un endospermo pentaploide. La relación 3/5 entre el nivel de ploidía del embrión y del endospermo es la causa probable por la cual se origina el reducido tamaño de la semilla debido a una desfase entre el desarrollo del embrión y del endospermo, como también ocurre en la hibridaciones $2x \times 2x$. Esen *et al.* (1978) también describieron la obtención de una planta pentaploide en hibridaciones $4x \times 2x$ pero no precisan su estructura genética. Probablemente el origen genético de estas plantas es la formación de un gameto no reducido del parental femenino ($n = 4x = 36$) que se fusiona con un gameto haploide ($n = x = 9$) del parental masculino, lo cual supondría la formación de un endospermo nonaploide. En este trabajo hemos hecho la primera descripción de la obtención de plantas hexaploides en hibridaciones $4x \times 2x$. Una hipótesis que podría explicar el origen genético de estas plantas es que se hayan originado como consecuencia de la fusión de un gameto no reducido del parental femenino ($n = 4x = 36$) con un gameto no reducido del parental masculino ($n = 2x = 18$) o que se haya producido una duplicación del stock cromosómico del embrión inicial. En cítricos la producción de granos de polen no reducidos en genotipos diploides es extremadamente rara (Luro *et al.* 2004) y además nunca ha sido descrita en cítricos, por lo que sería la primera vez que se daría este fenómeno.

Los resultados obtenidos en las diferentes hibridaciones estudiadas indican claramente que el parental masculino presenta un destacado efecto en la obtención de plantas triploides. El mayor número de híbridos triploides por 100 frutos, considerando los tres tipos de semillas producidas, se obtuvo con mandarino 'Moncada' (850 triploides) seguido del tangor 'Murcott' (529 triploides), mandarino 'Kara' (342 triploides) y mandarino 'Común' (260 triploides). Estos resultados son coherentes con el hecho de que en las polinizaciones entre diferentes genotipos diploides de cítricos, en función de los parentales utilizados, el número de semillas recolectadas por fruto no es constante, encontrándose grandes diferencias en función de los parentales implicados. Cameron y Burnett (1978) y Esen *et al.* (1978) también encontraron diferencias en la obtención de híbridos triploides en función de los parentales masculinos utilizados.

4.4.3.3 Origen de las plantas no triploides.

En las semillas normales completamente desarrolladas se han obtenido plantas triploides, tetraploides y hexaploides. El origen genético de las plantas triploides y hexaploides, probablemente, sea el mismo que el de las plantas triploides y hexaploides obtenidas a partir de semillas completamente desarrolladas de tamaño más pequeño, ya que la clasificación de las semillas se realizó en función del tamaño y éste no es carácter constante. Esen *et al.* (1978) también obtuvieron una planta tetraploide en hibridaciones $4x \times 2x$, aunque no determinaron el origen genético de la misma. Una hipótesis que podría explicar el origen genético de estas plantas es que se hayan originado como consecuencia de la fusión de un gameto diploide del parental femenino ($n = 2x = 18$) con un gameto no reducido del parental masculino ($n = 2x = 18$). Este hecho supondría de nuevo la

descripción de la producción de granos de polen no reducidos en genotipos diploides de cítricos. Aunque estos trabajos no están incluidos en los objetivos de esta tesis, los poliploides obtenidos en las diferentes hibridaciones están siendo actualmente analizados con marcadores moleculares para precisar su origen genético.

4.4.3.4 Consideraciones generales.

La obtención de triploides a partir de hibridaciones $4x \times 2x$ implica la obtención de genotipos tetraploides no apomícticos para lo cual se necesita la puesta a punto de técnicas que permitan la obtención de este tipo de plantas. En las hibridaciones $4x \times 2x$ se produjeron tres tipos de semillas, semillas normales completamente desarrolladas, semillas pequeñas completamente desarrolladas y semillas parcialmente desarrolladas; sin embargo el número de semillas pequeñas completamente desarrolladas fue mucho más elevado. A nivel práctico, debido a la gran cantidad de semillas pequeñas completamente desarrolladas que se producen en este tipo de hibridación, únicamente es necesario identificar, aislar y cultivar *in vitro* los embriones contenidos en este tipo de semillas. Las semillas pequeñas obtenidas en hibridaciones $4x \times 2x$ contenían embrión y un único embrión por semilla. El rescate y cultivo de embriones *in vitro* a partir de este tipo de semillas fue un proceso sencillo en el cual prácticamente la totalidad de los embriones cultivados germinaron y llegaron a producir plantas enteras. El cultivo *in vitro* de los embriones obtenidos a partir de semillas pequeñas se realizó directamente en tubos, ahorrando tiempo y trabajo al no tener que realizar el repicado intermedio descrito en el cultivo *in vitro* de los embriones obtenidos en las hibridaciones anteriores. El nivel de ploidía de las plantas obtenidas a partir de semillas pequeñas fue en más del 98,3 % de los casos triploide.

4.4.3.5 Estructura genética.

La estructura genética teórica de las poblaciones triploides obtenidas a partir de hibridaciones $4x \times 2x$ es la misma que la originada en las hibridaciones $2x \times 4x$.

4.4.4 Comparación entre las hibridaciones $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ respecto a la eficiencia en la obtención de híbridos triploides de cítricos.

En cítricos se pueden obtener híbridos triploides mediante hibridaciones $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$. Éste es el primer trabajo descrito en cítricos en el cual se realiza una comparación entre los diferentes tipos de hibridaciones $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ con los mismos parentales. La comparación entre los diferentes tipos de hibridación mostró que la mayor eficiencia en la obtención de híbridos triploides se produjo en la hibridación $2x \times 4x$. En la hibridación $2x \times 4x$ entre clementina 'Clemenules' y mandarino 'Común' el número total de semillas producidas por 100 frutos fue un 83 % superior al obtenido en la hibridación $4x \times 2x$.

En las hibridaciones $2x \times 2x$ y $4x \times 2x$ prácticamente todas las semillas obtenidas contenían embrión mientras que en las semillas obtenidas en la hibridación $2x \times 4x$ el 30 % estaban abortadas. En las hibridaciones $2x \times 2x$ y $4x \times 2x$ el porcentaje de germinación de los embriones siempre fue superior al 90 % mientras que en la hibridación $2x \times 4x$ este porcentaje fue más bajo (77 %). El número de embriones germinados que llegaron a originar una planta entera también varió dependiendo del tipo de hibridación. En las hibridaciones entre $2x \times 2x$ y $4x \times 2x$, el 93 % y el 100 % de los embriones germinados llegaron a converger a planta entera mientras que en la hibridación $2x \times 4x$ el 69 % de los embriones llegaron a producir planta entera.

En las hibridaciones $2x \times 2x$ el 90 % de las plantas obtenidas eran triploides, mientras que en las hibridaciones $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ el 95 % de las plantas obtenidas eran triploides.

La eficiencia en la obtención de híbridos triploides en hibridaciones $2x \times 2x$ osciló entre 5 y 363 híbridos triploides, en hibridaciones $2x \times 4x$ entre 153 y 885 y en hibridaciones $4x \times 2x$ entre 260 y 850 híbridos triploides. El parental femenino en las hibridaciones $2x \times 2x$ fue el factor más importante que definía la eficiencia en la obtención de híbridos triploides mientras que en las hibridaciones $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ los dos parentales presentaban una fuerte influencia.

A nivel práctico en las hibridaciones $2x \times 2x$ la obtención de elevadas poblaciones de híbridos triploides implica la realización de un gran número de polinizaciones. Sin embargo a nivel de laboratorio, el rescate y cultivo de embriones *in vitro* es un trabajo mucho más rápido y sencillo comparado con el que es necesario realizar en las semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones $2x \times 4x$. En las hibridaciones $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ la obtención de elevadas poblaciones de híbridos triploides no requiere la polinización de un número elevado de flores, pero a nivel de laboratorio, el trabajo de rescate y cultivo de embriones *in vitro* en las hibridaciones $4x \times 2x$ es muy similar al de las polinizaciones $2x \times 2x$.

Independientemente de la eficiencia obtenida en cada tipo de hibridación se pueden obtener elevadas poblaciones de híbridos triploides a partir de hibridaciones $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$, aunque cada una requiere de una planificación previa detallada que permita cumplir los objetivos propuestos. Las eficiencias obtenidas en las hibridaciones $2x \times 2x$ son menores que las obtenidas en el resto de hibridaciones. Sin embargo mediante hibridaciones $2x \times 2x$ es posible obtener elevadas poblaciones de híbridos triploides ya que, en este caso, es necesario aumentar el número de polinizaciones que permitan obtener y recolectar semillas de tamaño pequeño. La utilización de abejorros polinizadores es una técnica utilizada en cítricos y puesta a punto por Y. Froelicher (datos no publicados) que permite obtener un elevado número de plantas triploides mediante hibridaciones $2x \times 2x$.

La variabilidad de las poblaciones triploides puede ser más o menos amplia dependiendo del tipo de hibridación a partir de la cual se han obtenido y del mecanismo genético implicado. Esta característica es de gran importancia a la hora de diseñar un programa de mejora genética basado en la obtención de híbridos triploides. Si el objetivo es obtener híbridos triploides muy parecidos a un determinado genotipo, las hibridaciones $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$, en las que los parentales tetraploides segreguen según una herencia disómica, y las hibridaciones $2x \times 2x$ cuando el mecanismo implicado en la formación de megagametófitos no reducidos es FDR, serían las estrategias adecuadas. Si lo

que queremos obtener son genotipos que produzcan un nuevo tipo de frutos diferenciados al de los parentales, realizando hibridaciones $2x \times 2x$ con parentales femeninos en los cuales el mecanismo implicado en la formación de megagametófitos no reducidos sea SDR e hibridaciones $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ en las cuales los parentales tetraploides segreguen según la herencia tetrasómica, serían las estrategias más adecuadas.

En el programa de obtención de híbridos triploides que estamos realizando en el IVIA desde 1995, actualmente se han obtenido 9.989 híbridos triploides de los cuales 4.025 han sido obtenidos mediante hibridaciones $2x \times 2x$, 3.200 mediante hibridaciones $2x \times 4x$ y 2.764 a partir de hibridaciones $4x \times 2x$. Se han preseleccionado 99 híbridos triploides obtenidos a partir de hibridaciones $2x \times 2x$ y $2x \times 4x$ por su elevada calidad organoléptica de los cuales 14 han sido registrados en la Oficina Española de Variedades Vegetales (OEVV). Tres de ellos, IVIA TRI 1 (ForMur 96-081), IVIA TRI 2 (ForKar 96-037) y AVASA Pri 43 (ForEII 96-058), recientemente han sido entregados a los viveristas para su multiplicación y está previsto que en el año 2009 los agricultores puedan disponer de plantas.

En las fases iniciales de los programas de mejora genética basados en la obtención de híbridos triploides de cítricos la inexistencia de material vegetal tetraploide implica necesariamente la realización de hibridaciones $2x \times 2x$. La obtención y creación de nuevos genotipos tetraploides propios permitiría realizar hibridaciones $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ y ampliar así el tipo de híbridos triploides originados ya que muy pocos laboratorios a nivel mundial disponen de material vegetal tetraploide que permita realizar estas hibridaciones y además el intercambio de germoplasma tetraploide entre laboratorios es una práctica nada frecuente por lo que cada laboratorio debe de producirse su propio material vegetal.

4.5 CONCLUSIONES GENERALES.

Hibridaciones $2x \times 2x$.

Se producen tres tipos de semillas: semillas normales, semillas pequeñas y semillas parcialmente desarrolladas. Las semillas pequeñas presentan un tamaño un 56 % menor que las semillas normales.

Las plantas obtenidas a partir de semillas normales y semillas parcialmente desarrolladas son generalmente diploides mientras que las plantas obtenidas a partir de semillas pequeñas son predominantemente triploides.

La frecuencia en la producción de megagametófitos no reducidos es una característica intrínseca del parental femenino. Mandarino 'Fortune' presentó una elevada frecuencia en la producción de híbridos triploides muy superior a la obtenida con las clementinas 'Clemenules' y 'Fina'.

Hibridaciones $2x \times 4x$.

Se originan dos tipos de semillas: semillas normales y semillas parcialmente desarrolladas. Las semillas parcialmente desarrolladas presentan un tamaño un 61 % más pequeño que las semillas

normales. En las semillas parcialmente desarrolladas podemos diferenciar semillas abortadas, semillas monoembrionicas y semillas poliembrionicas.

Las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas son prácticamente en todos los casos triploides aunque también podemos encontrar algunas plantas diploides, tetraploides y hexaploides mientras que las plantas obtenidas a partir de semillas normales pueden ser diploides, triploides y tetraploides.

La obtención de híbridos triploides varió dependiendo de los parentales utilizados. Entre las dos clementinas utilizadas como parental femenino se observó que con clementina `Clemenules´ la obtención de híbridos triploides fue mayor que con clementina `Fina´, tanto a partir de semillas parcialmente desarrolladas como de semillas normales. Dependiendo de los parentales masculinos utilizados, la obtención de híbridos triploides también varió, observándose un efecto del parental masculino. Los resultados obtenidos indicaban que con mandarino `Nova´ la obtención de híbridos triploides por 100 frutos, a partir de semillas parcialmente desarrolladas y semillas normales, fue más elevada que con el resto de parentales masculinos, seguida del mandarino `Común´, tangelo `Orlando´, mandarino `Moncada´ y naranjo dulce `Pineapple´.

Hibridaciones 4x X 2x.

Se producen tres tipos de semillas: semillas normales, semillas pequeñas y semillas parcialmente desarrolladas. Las semillas pequeñas poseen un tamaño un 42 % menor que las semillas normales.

Las plantas obtenidas a partir de semillas pequeñas son prácticamente en todos los casos triploides aunque también se pueden obtener algunas plantas pentaploides y hexaploides. El nivel de ploidía de las plantas obtenidas a partir de semillas normales pueden ser triploides, tetraploides y hexaploides mientras que las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas pueden ser plantas triploides y pentaploides.

En las hibridaciones 4x X 2x el parental masculino presentó un destacado efecto en la obtención de plantas triploides. El mayor número de híbridos triploides por 100 frutos se obtuvo de mayor a menor con mandarino `Moncada´ seguido del tanger `Murcott´, mandarino `Kara´ y mandarino `Común´.

Eficiencia en la obtención de híbridos triploides según el tipo de hibridación.

Fue más elevada en las hibridaciones 2x X 4x y 4x X 2x que en las hibridaciones 2x X 2x. En hibridaciones 2x X 4x entre clementina `Clemenules´ y mandarino `Común´ se obtuvo un mayor número de híbridos triploides por 100 frutos que en la hibridación 4x X 2x.

Tabla 4.1. Tipos y medidas de las semillas obtenidas en la hibridación entre clementina 'Clemenules' por zamboa 'Pink'. Número y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

Tipos de semillas	Nº de semillas	Área media (mm ²)	Plantas obtenidas	Nivel de ploidía	
				2x	3x
Normales	96	78±11	96	96	0
Pequeñas	12	34±8	12	3	9
Parcialmente desarrolladas	47	56±17	5	5	0

Tabla 4.2. Tipos y medidas de las semillas obtenidas en la hibridación entre clementina 'Fina' por mandarino 'Común' tetraploide. Número y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

Tipos de semillas	Nº de semillas	Área media (mm ²)	Plantas obtenidas	Nivel de ploidía		
				2x	3x	4x
Normales	12	89±8	5	0	1	4
Parcialmente desarrolladas	102	35±15	76	0	76	0

Tabla 4.3. Tipos y medidas de las semillas obtenidas en la hibridación entre clementina 'Clemenules' tetraploide por mandarino 'Moncada'. Número y nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

Tipos de semillas	Nº de semillas	Área media (mm ²)	Plantas obtenidas	Nivel de ploidía	
				3x	5x
Normales	1	69	1	1	0
Pequeñas	122	40±9	116	114	2
Parcialmente desarrolladas	19	27±17	1	0	1

Tabla 4.4. Datos de cuajado, número de semillas pequeñas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*, plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x.

Parental femenino	Parental masculino	Flores polinizadas	Frutos obtenidos		Semillas pequeñas obtenidas		Embriones			Plantas obtenidas		Nivel de ploidía				Triploides por 100 frutos
			Nº	% cuajado	Nº	Por 100 frutos	Cultivados	Germinados	% germinación	Nº	Por 100 frutos	Diploide		Triploide		
												Nº	%	Nº	%	
Fina	Comuna	150	122	81	28	23	28	28	100	28	23	6	21	22	79	18
Fina	Kara	200	121	61	10	8	10	10	100	10	8	2	20	8	80	7
Fina	M. Común	350	247	71	50	20	50	50	100	50	20	11	22	39	78	16
Fina	Murcott	200	134	67	30	22	28	27	96	26	19	5	19	21	81	16
Clemenules	Comuna	200	158	79	56	35	54	50	93	48	30	8	17	40	83	25
Clemenules	Kara	250	134	54	9	7	9	9	100	9	7	3	33	6	67	5
Clemenules	M. Común	100	77	77	23	30	21	19	91	19	25	2	11	17	90	22
Clemenules	Murcott	200	143	72	41	29	41	40	98	38	27	6	16	32	82	22
Fortune	Comuna	150	96	64	249	259	243	236	97	227	237	8	4	219	97	228
Fortune	Kara	200	72	36	169	235	157	154	98	149	207	4	3	145	97	201
Fortune	M. Común	350	177	51	716	405	693	676	98	657	371	15	2	642	98	363
Fortune	Murcott	297	126	42.4	355	282	326	319	98	317	252	4	1.3	313	98	248

Tabla 4.5. Medias de los datos de cuajado, número de semillas pequeñas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*, plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x en función de los parentales femeninos y masculinos.

Parentales	% cuajado	Semillas obtenidas por 100 frutos	% germinación embriones	Nº total de plantas obtenidas	Plantas obtenidas por 100 frutos	Plantas diploides	% diploides	Plantas triploides	% triploides	Triploides obtenidos por 100 frutos
Fina ^a	70	18	99	114	18	24	21	90	79	14
Clemenules ^a	70	25	95	114	22	19	17	95	83	18
Fortune ^a	48	295	98	1.350	267	31	2	1.319	98	260
Comuna ^b	75	106	97	303	97	22	7	281	93	90
Kara ^b	50	83	99	168	74	9	5	159	95	71
M. Común ^b	66	152	96	726	139	28	4	698	96	134
Murcott ^b	60	111	97	381	99	15	4	366	96	95

a. Datos medios obtenidos al polinizarlos con los parentales masculinos naranjo dulce `Comuna`, mandarino `Kara`, mandarino `Común` y tangor `Murcott`.

b. Datos medios obtenidos al polinizar los parentales femeninos clementina `Fina`, clementina `Clemenules` y mandarino `Fortune`.

Tabla 4.6. Datos de cuajado, número de semillas parcialmente desarrolladas, rescate y cultivo de embriones *in vitro* y plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x.

Parental femenino	Parental masculino tetraploide	Flores polinizadas	Frutos obtenidos		Semillas obtenidas		Semillas con embriones ^a		Semillas en las que no germinó ningún embrión	% germinación ^b	Semillas monoembrionicas ^c		Semillas poliembrionicas ^d		Nº total embriones germinados	Embriones germinados por semilla poliembriónica
			Nº	% cuajado	Nº	Por 100 frutos	Nº	%			Nº	%	Nº	%		
Fina	M. Común	50	39	78	471	1.208	291	62	126	57	91	55	74	45	200	1,5
Clemenules	M. Común	45	39	87	661	1.695	455	69	107	77	143	41	205	59	546	2,0
Fina	Nova	150	107	71	613	573	450	73	118	74	243	73	89	27	423	2,0
Clemenules	Nova	50	33	66	538	1.630	451	84	124	73	243	74	84	26	412	2,0
Fina	Orlando	50	46	92	499	1.085	213	43	33	85	110	61	70	39	278	2,4
Clemenules	Orlando	200	128	64	1.361	1.063	1.123	83	314	72	514	64	295	37	1.092	2,0
Fortune	Orlando	150	85	57	962	1.132	202	21	94	54	107	99	1	1	108	1,0
Fina	Pineapple	150	85	57	304	358	180	59	35	81	82	57	63	43	225	2,3
Clemenules	Pineapple	185	105	57	550	524	368	67	90	76	191	69	87	31	371	2,1
Fina	Moncada	100	74	74	533	720	391	73	205	48	83	45	103	55	126	1,4
Clemenules	Moncada	50	35	70	230	657	175	76	24	86	101	69	45	31	130	2,1

a. Los embriones contenidos en el interior de las semillas parcialmente desarrolladas es difícil el poder contarlos e individualizarlos ya que están muy compactados y en ocasiones envueltos por los restos del endospermo, por lo que la observación macroscópica no permitía discernir en muchos casos si la semilla contenía uno o varios embriones. Por ello todos los embriones contenidos en una misma semilla se cultivaron juntos.

b. El porcentaje de germinación de los embriones contenidos en las semillas parcialmente desarrolladas se calculó considerando exclusivamente la germinación de un embrión por semilla parcialmente desarrollada.

c. Se consideró semilla monoembrionica aquella en la cual únicamente germinó un embrión.

d. Se consideró semilla poliembriónica aquella en la cual germinó más de un embrión.

Tabla 4.7. Medias de los datos de cuajado, número de semillas parcialmente desarrolladas y rescate y cultivo de embriones *in vitro* obtenidos en las hibridaciones 2x X 4x en función de los parentales femeninos y masculinos.

Parentales	% cuajado	Semillas obtenidas por 100 frutos	% semillas con embriones	% germinación embriones	% semillas monoembrionicas	% semillas poliembriónicas	Embriones germinados por semilla poliembriónica
Fina ^a	74	789	62	69	58	42	1,9
Clemenules ^a	69	1.114	76	77	63	37	2,0
Fortune ^a	57	1.132	21	54	99	1	1,0
M. Común ^b	82	1.451	65	67	48	52	1,8
Nova ^b	69	1.102	79	73	74	26	2,0
Orlando ^b	71	1.093	49	70	75	25	1,8
Pineapple ^b	57	441	63	78	63	37	2,2
Moncada ^b	72	689	75	67	57	43	1,8

a. Datos medios obtenidos al polinizarlos con los parentales masculinos mandarino `Común`, mandarino `Nova`, tangelo `Orlando`, naranja dulce `Pineapple` y mandarino `Moncada`.

b. Datos medios obtenidos al polinizar los parentales femeninos clementina `Fina`, clementina `Clemenules` y mandarino `Fortune`.

Tabla 4.8. Número de semillas normales completamente desarrolladas, rescate y cultivo de embriones *in vitro* y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x.

Parental femenino	Parental masculino	Frutos obtenidos	Semillas normales obtenidas		Embriones			Plantas obtenidas		Nivel de ploidía						Triploides por 100 frutos
			Nº	Por 100 frutos	Cultivados	Germinados	% germinación	Nº	Por 100 frutos	Diploide		Triploide		Tetraploide		
										Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Fina	M. Común	39	9	23	9	8	89	8	21	0	0	4	50	4	50	10
Clemenules	M. Común	39	33	85	33	29	100	29	85	0	0	20	69	13	45	51
Fina	Nova	107	42	39	41	41	100	41	38	21	51	16	39	4	10	15
Clemenules	Nova	33	37	112	37	35	96	35	106	0	0	20	57	15	43	61
Fina	Orlando	46	24	52	24	24	100	24	52	0	0	14	58	10	42	30
Clemenules	Orlando	128	235	184	219	203	93	203	159	71	35	84	41	48	24	66
Fortune	Orlando	85	387	455	387	375	97	375	441	172	46	41	11	162	43	48
Fina	Pineapple	85	19	22	18	18	100	18	21	5	28	6	33	7	39	7
Clemenules	Pineapple	105	114	109	114	109	96	109	104	63	58	28	26	18	17	27
Fina	Moncada	74	44	60	44	43	98	43	58	3	7	7	16	33	77	10
Clemenules	Moncada	35	14	40	14	11	79	11	31	0	0	4	36	7	64	11

Tabla 4.9. Número de semillas normales completamente desarrolladas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*, plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en hibridaciones 2x X 4x en función de los parentales femeninos y masculinos.

Parentales	Semillas obtenidas por 100 frutos	% germinación embriones	Nº total de plantas obtenidas	Plantas obtenidas por 100 frutos	Plantas diploides	% diploides	Plantas triploides	% triploides	Plantas tetraploides	% tetraploides	Triploides por 100 frutos
Fina ^a	39	97	134	38	29	22	47	35	58	43	15
Clemenules ^a	106	93	387	97	134	35	156	40	101	26	43
Fortune ^a	455	97	375	441	172	46	41	11	162	43	48
M. Común ^b	54	95	37	53	0	0.0	24	65	17	46	31
Nova ^b	76	98	76	72	21	28	36	47	19	25	38
Orlando ^b	230	97	602	217	243	40	139	23	220	37	48
Pineapple ^b	66	98	127	63	68	54	34	27	25	20	17
Moncada ^b	50	88	54	45	3	6	11	20	40	74	11

a. Datos medios obtenidos al polinizarlos con los parentales masculinos mandarino `Común`, mandarino `Nova`, tangelo `Orlando`, naranjo dulce `Pineapple` y mandarino `Moncada`.

b. Datos medios obtenidos al polinizar los parentales femeninos clementina `Fina`, clementina `Clemenules` y mandarino `Fortune`.

Tabla 4.10. Nivel de ploidía de las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas producidas en las hibridaciones 2x X 4x.

Parental femenino diploide	Parental masculino tetraploide	Total plantas obtenidas ^a	Plantas obtenidas por 100 frutos	Plantas triploides	Plantas diploides	Otros niveles de ploidía	% plantas triploides	% plantas diploides	% otros niveles de ploidía	Triploides por 100 frutos
Fina	M. Común	78	200	78	0	0	100	0,0	0,0	200
Clemenules	M. Común	227	582	227	0	0	100	0,0	0,0	582
Fina	Nova	204	191	203	1	0	100	0,5	0,0	190
Clemenules	Nova	273	827	272	0	1 (6x)	100	0,0	0,4	824
Fina	Orlando	87	189	86	1	0	99	1,1	0,0	187
Clemenules	Orlando	540	422	539	1	0	100	0,2	0,0	421
Fortune	Orlando	94	111	92	1	1 (4x)	98	1,1	1,1	108
Fina	Pineapple	115	135	115	0	0	100	0,0	0,0	135
Clemenules	Pineapple	227	216	225	1	1 (6x)	99	0,4	0,4	214
Fina	Moncada	106	143	106	0	0	100	0,0	0,0	143
Clemenules	Moncada	107	306	107	0	0	100	0,0	0,0	306

a. Los resultados obtenidos con marcadores moleculares indican que todas las plantas regeneradas a partir de una misma semilla son híbridos e iguales genéticamente. Por este motivo para realizar los cálculos del número de plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas se consideró únicamente una planta regenerada por semilla parcialmente desarrollada.

Tabla 4.11. Medias de los datos del número de plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x a partir de semillas parcialmente desarrolladas en función de los parentales femeninos y masculinos.

Parentales	Total plantas obtenidas	Plantas obtenidas por 100 frutos	Plantas triploides	% plantas triploides	Plantas diploides	% plantas diploides	Plantas tetraploides	% plantas tetraploides	Plantas hexaploides	% plantas hexaploides	Triploides por 100 frutos
Fina ^a	590	172	588	100	2	0,34	0	0,0	0	0,00	171
Clemenules ^a	1.374	471	1.370	100	2	0,15	0	0,0	2	0,15	469
Fortune ^a	94	111	92	98	1	1,06	1	1,1	0	0,00	108
M. Común ^b	305	391	305	100	0	0,00	0	0,0	0	0,00	391
Nova ^b	477	509	475	100	1	0,21	0	0,0	1	0,21	507
Orlando ^b	721	241	717	99	3	0,42	1	0,1	0	0,00	239
Pineapple ^b	342	176	340	99	1	0,29	0	0,0	1	0,29	175
Moncada ^b	213	225	213	100	0	0,00	0	0,0	0	0,00	224

a. Datos medios obtenidos al polinizarlos con los parentales masculinos mandarino `Común`, mandarino `Nova`, tangelo `Orlando`, naranjo dulce `Pineapple` y mandarino `Moncada`.

b. Datos medios obtenidos al polinizar los parentales femeninos clementina `Fina`, clementina `Clemenules` y mandarino `Fortune`.

Tabla 4.12. Datos de cuajado, número de semillas pequeñas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*, plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 4x X 2x.

Parental femenino	Parental masculino	Flores polinizadas	Frutos obtenidos		Semillas pequeñas obtenidas		Embriones			Plantas obtenidas		Nivel de ploidía						Triploides por 100 frutos
			Nº	% cuajado	Nº	Por 100 frutos	Cultivados	Germinados	% germinación	Nº	Por 100 frutos	Triploide		Pentaploide		Hexaploide		
												Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Clemenules	Kara	126	31	25	117	377	117	110	94	103	332	102	99	1	1,0	0	0,0	329
Clemenules	M. Común	32	15	47	45	300	45	43	96	40	267	39	98	0	0,0	1	2,5	260
Clemenules	Murcott	80	24	30	135	563	135	132	98	129	538	126	98	1	0,8	2	1,6	525
Clemenules	Moncada	25	10	40	89	890	89	89	100	86	860	85	99	1	1,2	0	0,0	850

Tabla 4.13. Datos de cuajado, número de semillas parcialmente desarrolladas, rescate y cultivo de embriones *in vitro*, plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 4x X 2x.

Parental femenino	Parental masculino	Semillas obtenidas		Embriones			Plantas obtenidas		Nivel de ploidía						Triploides por 100 frutos
		Nº	Por 100 frutos	Cultivados	Germinados	% germinación	Nº	Por 100 frutos	Triploide		Pentaploide		Hexaploide		
									Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Clemenules	Kara	18	58	9	4	44	3	10	3	100	0	0	0	0	10
Clemenules	M. Común	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0
Clemenules	Murcott	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0
Clemenules	Moncada	3	30	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0

Tabla 4.14. Número de semillas normales, rescate y cultivo de embriones *in vitro*, plantas regeneradas y nivel de ploidía de las plantas obtenidas en las hibridaciones 4x X 2x.

Parental femenino	Parental masculino	Semillas obtenidas		Embriones			Plantas obtenidas		Nivel de ploidía						Triploides por 100 frutos
		Nº	Por 100 frutos	Cultivados	Germinados	% germinación	Nº	Por 100 frutos	Triploide		Tetraploide		Hexaploide		
									Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Clemenules	Kara	3	13	3	3	100	3	10	1	33	1	33	1	33	3
Clemenules	M. Común	1	7	1	1	100	1	7	0	0	1	100	0	0	0
Clemenules	Murcott	2	8	2	2	100	2	8	1	50	1	50	0	0	4
Clemenules	Moncada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 4.15. Comparación en la eficiencia de obtención de híbridos triploides entre los diferentes tipos de hibridación 2x X 2x, 2x X 4x y 4x X 2x utilizando como parental femenino la clementina `Clemenules´ diploide y tetraploide y como parental masculino el mandarino `Común´ diploide y tetraploide.

Parental femenino	Parental masculino	Flores polinizadas	Frutos obtenidos		Semillas obtenidas		Embriones			Plantas obtenidas		Nivel de ploidía						Triploides por 100 frutos
			Nº	% cuajado	Nº	Por 100 frutos	Cultivados	Germinados	% germinación	Nº	Por 100 frutos	Triplorde		Nº de plantas con otros niveles de ploidía				
												Nº	%	2x	4x	5x	6x	
Clemenules 2x	M. Común 2x	100	77	77	23	30	21	19	91	19	25	17	90	2	0	0	0	22
Clemenules 2x	M. Común 4x	45	39	87	694	1.780	488	377	77	260	667	247	95	0	13	0	0	633
Clemenules 4x	M. Común 2x	32	15	47	46	307	46	44	96	41	273	39	95	0	1	0	1	260



Figura 4.1. a. Tipos de semillas obtenidas en la hibridación entre clementina `Clemenules` por zamboa `Pink`. a.1) Semillas completamente desarrolladas normales, a.2) semillas parcialmente desarrolladas, a.3) semillas completamente desarrolladas pequeñas. b. Semillas obtenidas en la hibridación entre clementina `Fina` por mandarina `Común` tetraploide. b.1) Semillas completamente desarrolladas normales, b.2) semillas parcialmente desarrolladas. c. Semillas obtenidas en la hibridación entre clementina `Clemenules` tetraploide por mandarina `Moncada`. c.1) Semilla completamente desarrollada normal, c.2) semillas parcialmente desarrolladas y c.3) semillas completamente desarrolladas de pequeño tamaño.

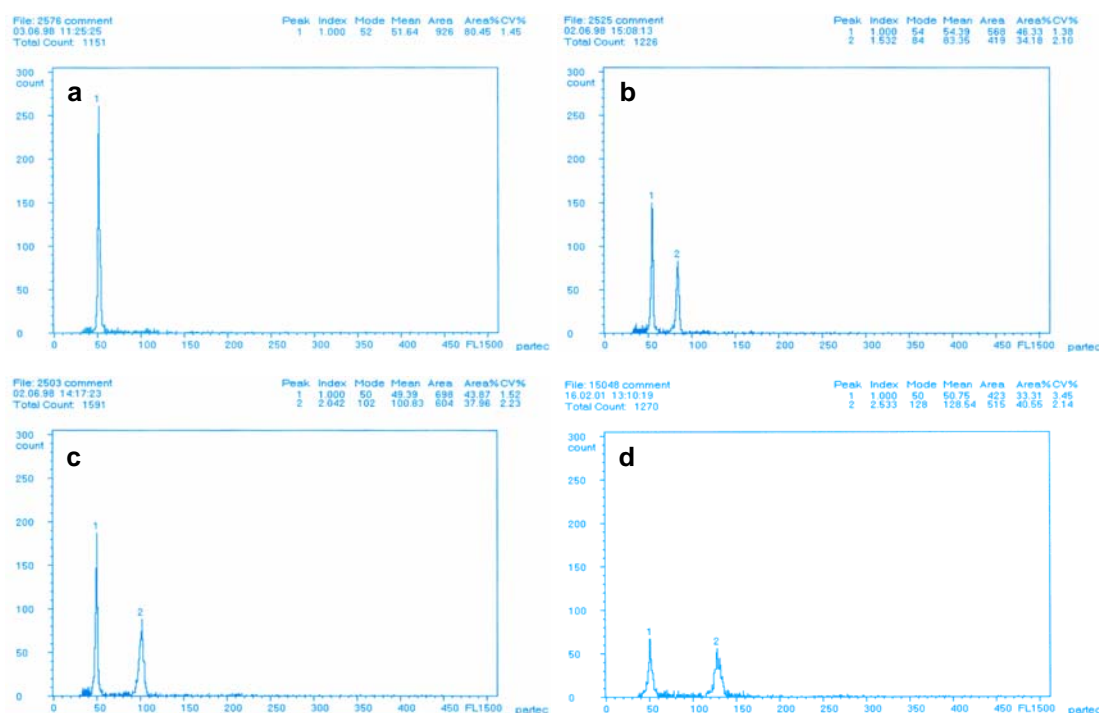


Figura 4.2. a. Histograma correspondiente a una planta diploide junto con un control diploide (pico1). b. Histograma correspondiente a una planta control diploide (pico 1) y a una planta triploide (pico 2). c. Histograma correspondiente a una planta control diploide (pico 1) y a una planta tetraploide (pico 2). d. Histograma correspondiente a una planta control diploide (pico 1) y a una planta pentaploide (pico 2).

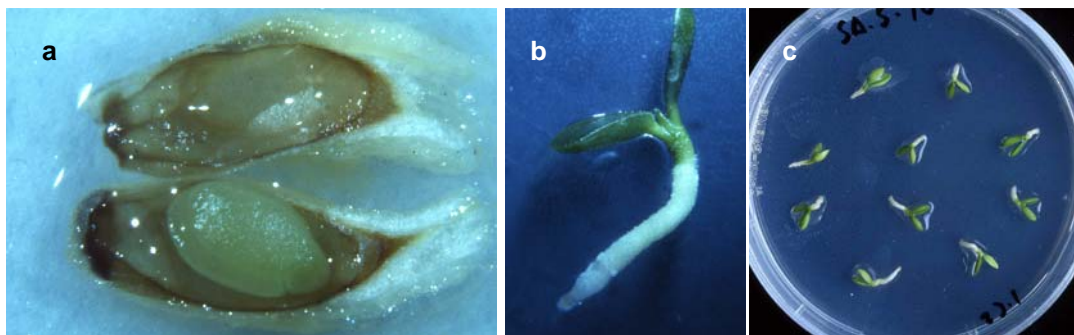


Figura 4.3. a. Semilla pequeña completamente desarrolladas de mandarina 'Fortune' con un embrión. b. Detalle germinación embrión rescatado de una semilla pequeña de mandarina 'Fortune' y cultivado en placa de Petri. c. Embriones germinados de mandarina 'Fortune' cultivados en placa de Petri.

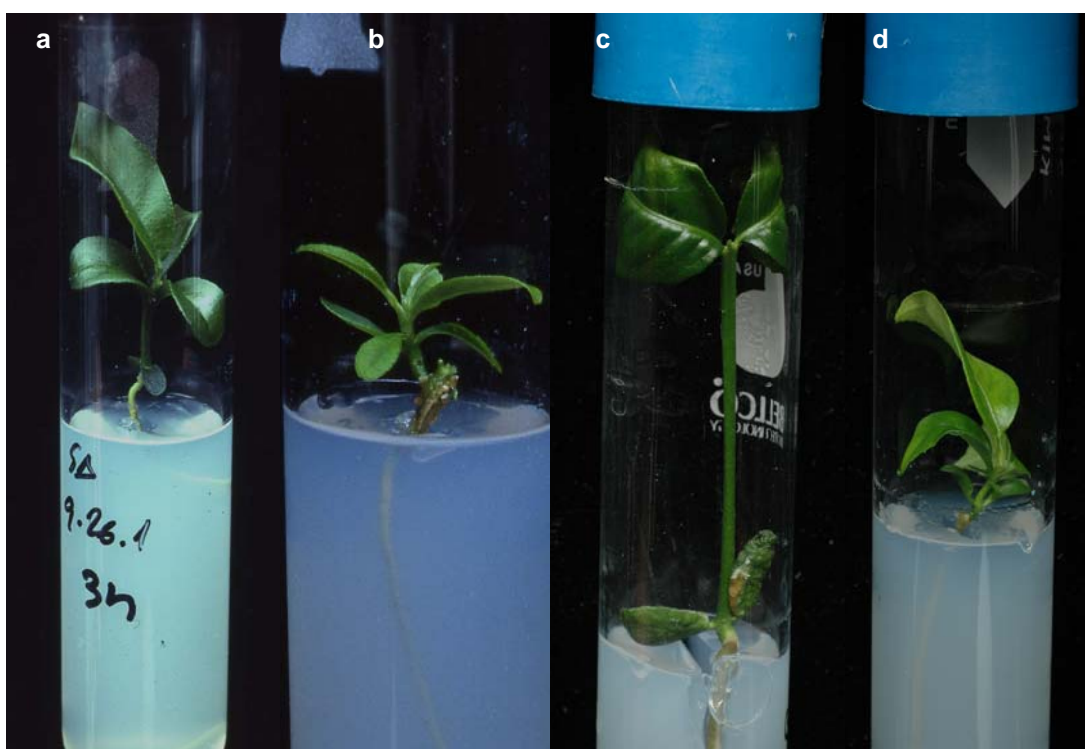


Figura 4.4. a. Planta triploide obtenida a partir de semillas pequeñas producidas en hibridaciones $2x \times 2x$. b. Planta triploide obtenida a partir de una semilla parcialmente desarrollada originada en una hibridación $2x \times 4x$. c. Planta triploide obtenida a partir de una semilla normal producida en una hibridación $2x \times 4x$. d. Planta triploide obtenida a partir de una semilla pequeña originada en una hibridación $4x \times 2x$.

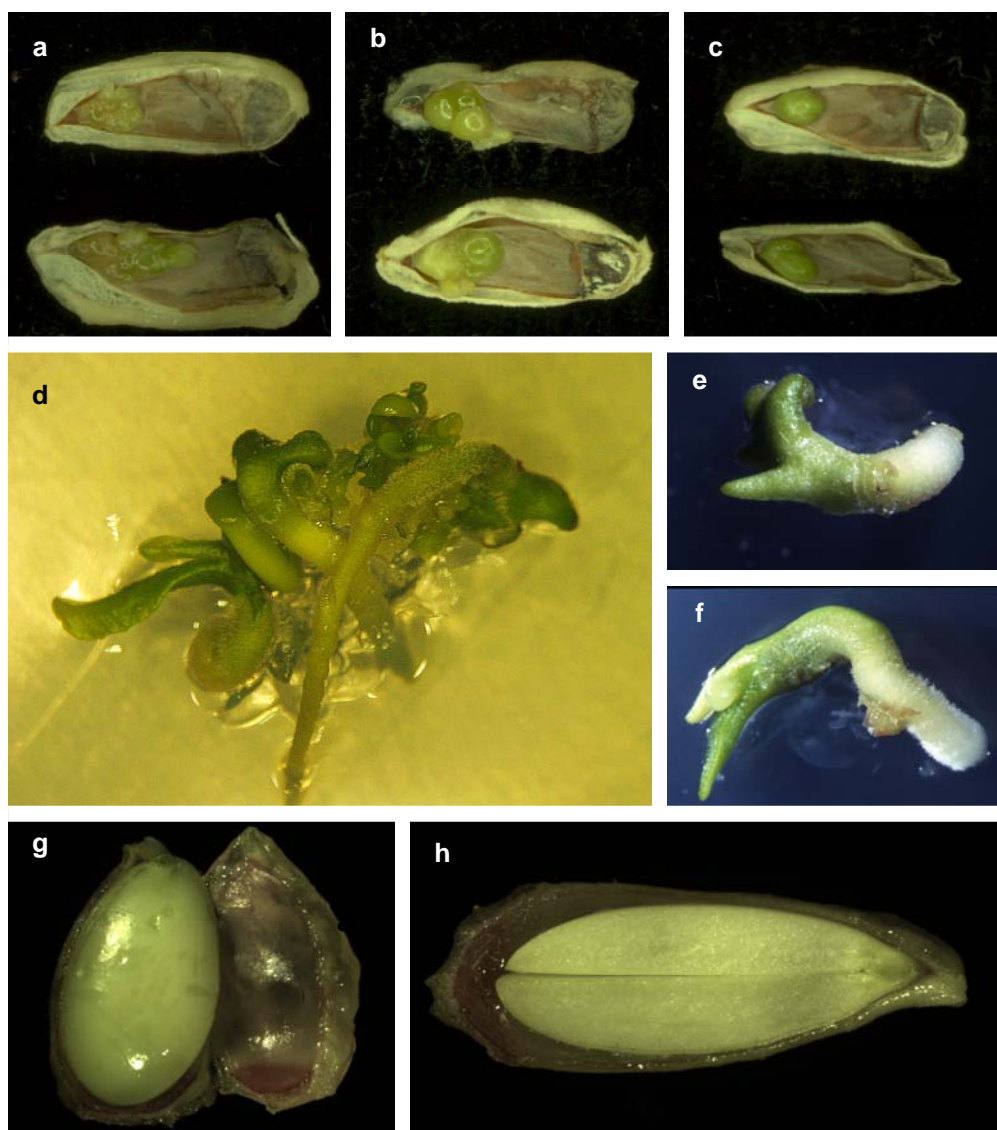


Figura 4.5. a – b. Semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x en las que se puede observar la presencia de varios embriones de tamaño variable englobados por los restos del endospermo. c. Semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en hibridaciones 2x X 4x en las que se observa macroscópicamente un embrión. d. Germinación de los numerosos embriones contenidos en las semillas parcialmente desarrolladas poliembriónicas. e – f. Embriones germinados contenidos en semillas parcialmente desarrolladas monoembriónicas. g – h. Semillas normales obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x en las cuales se observa un único embrión por semilla.

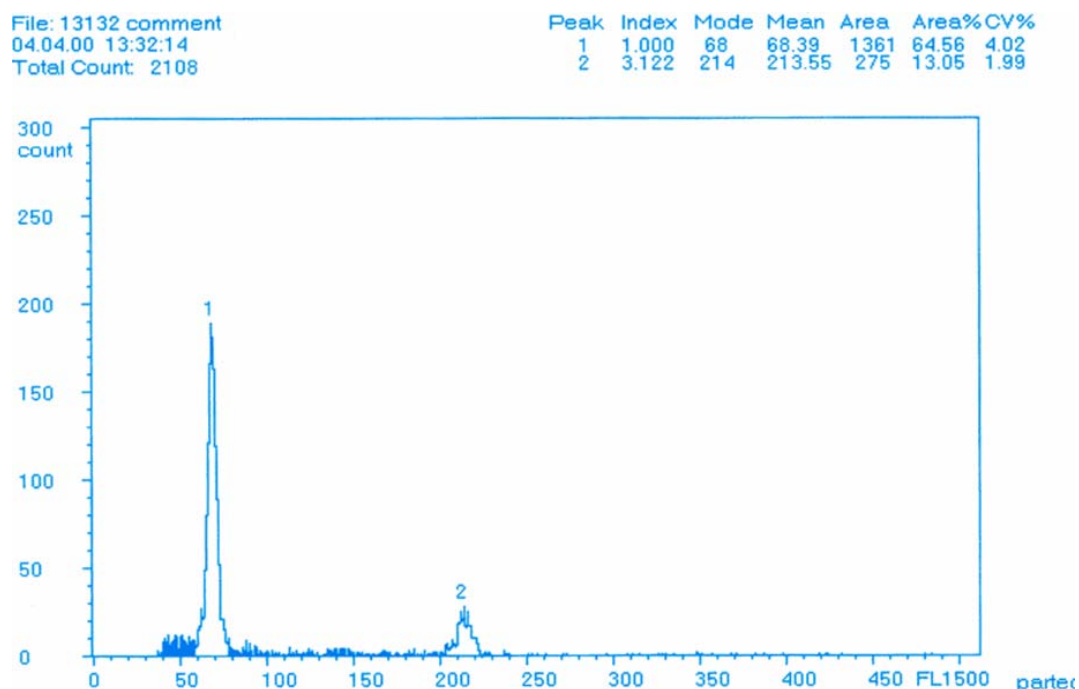


Figura 4.6. Histograma correspondiente a una planta control diploide (pico 1) y a una planta hexaploide (pico 2).

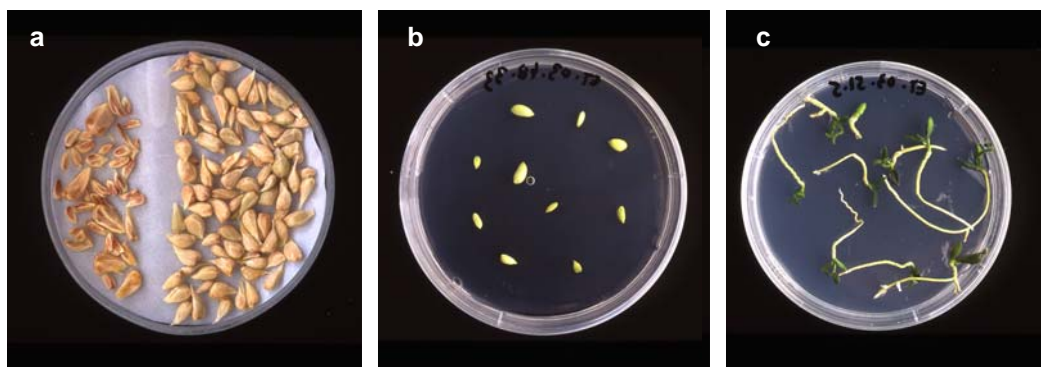


Figura 4.7. a. Izquierda, semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en hibridaciones $4x \times 2x$. Derecha, semillas pequeñas completamente desarrolladas obtenidas en hibridaciones $4x \times 2x$. b - c. Cultivo *in vitro* de embriones en placa de Petri aislados de semillas pequeñas obtenidas en hibridaciones $4x \times 2x$ en los que se observa la germinación de los embriones.

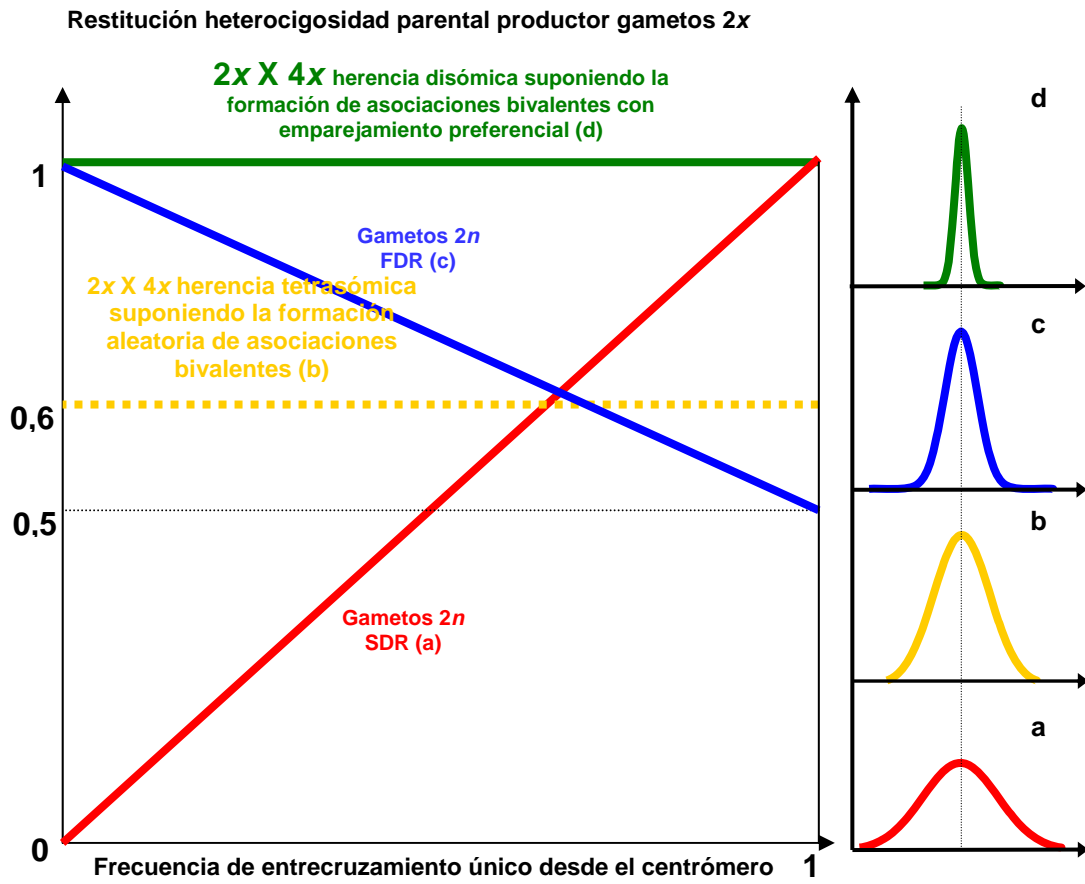


Figura 4.8. Restitución de la heterocigosidad del parental productor de gametos 2x (Ollitrault *et al.* 2008).

Capítulo 5. Poliembrionía in vivo e in vitro en genotipos no apomícticos de cítricos; origen e implicación en la obtención de híbridos triploides

CAPÍTULO 5. POLIEMBRIONÍA IN VIVO E IN VITRO EN GENOTIPOS NO APOMÍCTICOS DE CÍTRICOS; ORIGEN E IMPLICACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES.

5.1 INTRODUCCIÓN.

La apomixis es un modo de reproducción asexual a través de la formación de semillas, frecuentemente mencionada como agamospermia (Savidan, 2000; Grimanelli *et al.* 2001; Bicknell y Koltunow, 2004). Están descritos tres mecanismos apomícticos diferentes, aposporia, diplosporia y embrionía adventicia. Los cítricos son plantas modelo para el estudio de la embrionía adventicia (Koltunow, 1993), proceso en el cual a partir de células de la nucela se producen embriones adventicios, también llamados embriones nucelares, que son idénticos genéticamente a la planta madre (Kobayashi *et al.* 1981; Koltunow, 1993). La mayoría de los genotipos de cítricos son apomícticos a excepción de los cidros, zamboas, clementinos y algunos mandarinos. Las semillas de los genotipos apomícticos de cítricos contienen un embrión de origen sexual y uno o varios embriones nucelares mientras que las semillas de los genotipos no apomícticos de cítricos contienen un único embrión de origen sexual y tradicionalmente se les denomina genotipos poliembriónicos o genotipos monoembriónicos, respectivamente. En casos excepcionales, los genotipos no apomícticos pueden producir más de un embrión sexual por semilla. Cameron y Garber (1968) a partir de una hibridación entre clementina (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) y *Poncirus trifoliata* (L.) Raf encontraron 11 semillas que produjeron 2 plántulas trifoliadas por semilla y 1 semilla que produjo 3 plántulas trifoliadas. Basándose en una caracterización morfológica exhaustiva, llegaron a la conclusión de que todas las plantas obtenidas en una misma semilla eran idénticas genéticamente. Ozsan (1964), citado por Cameron y Garber (1968), observó ocasionalmente en cortes histológicos de semillas de clementina, al cabo de 4 meses de haber realizado la polinización, la presencia de un embrión dominante de gran tamaño, ocupando el mayor espacio dentro del saco embrionario y varios embriones de menor tamaño alrededor del mismo. Bacchi (1943) propuso una hipótesis sobre el origen genético de los diferentes embriones sexuales producidos en una misma semilla según la cual éstos se originarían como consecuencia de la presencia de dos o más sacos embrionarios en el mismo óvulo o por la fisión de la ovocélula fecundada. Por otra parte, en las hibridaciones entre parentales femeninos no apomícticos diploides con parentales masculinos tetraploides, en las semillas parcialmente desarrolladas se originan múltiples embriones capaces de germinar y producir plantas (Capítulo anterior). Oiyama y Kobayashi (1990) polinizaron flores de los genotipos no apomícticos clementina y Miyauchi Iyokan (*C. iyo* Hort. ex Tan.) con polen de 'Kawano Natsudaidai' tetraploide (*C. natsudaidai* Hayata) observando la presencia de pequeñas masas de embriones cerca del micropilo en algunas semillas parcialmente desarrolladas. El origen genético de los diferentes embriones producidos en las semillas de los genotipos no apomícticos es una característica no conocida.

El cultivo de nucelas *in vitro* es una técnica utilizada en cítricos para la obtención de plantas nucelares libres de virus (Rangan *et al.* 1968), ya que en cítricos la gran mayoría de los patógenos no se transmiten a través del proceso de embriogénesis (Weathers y Calavan, 1959; Roistacher, 1979).

Mediante esta técnica se han regenerado varias plantas a partir de una misma nucela en distintos genotipos no apomícticos de cítricos (Rangan *et al.* 1968; Esan, 1973; Navarro *et al.* 1985). Para realizar esta técnica, los autores utilizaron semillas recolectadas al cabo de 100 - 120 días de haber realizado la polinización. A las semillas obtenidas, se les eliminaron los tegumentos y el embrión zigótico claramente desarrollado, sin dañar la nucela. El cultivo de la nucela *in vitro* originó numerosos embriones que los autores consideraron nucelares y se propuso dicha técnica como válida para la obtención de plantas libres de virus de genotipos no apomícticos de cítricos, ya que suponían que las plantas eran idénticas a la planta madre. Sin embargo, el posterior análisis detallado de las plantas producidas por cada nucela indicó que todas las plantas regeneradas a partir de la misma nucela eran iguales entre sí pero distintas entre las plantas regeneradas de nucelas diferentes y de la planta original, tanto fenotípicamente como con marcadores isoenzimáticos (Navarro *et al.* 1985). Los autores no comprobaron las características de las plantas obtenidas por el cultivo *in vitro* de la nucela con las que hubiesen regenerado a partir del embrión zigótico, ya que éste fue eliminado durante el proceso, por lo que no pudieron determinar el origen genético de las plantas producidas por el cultivo de nucelas *in vitro*. Con el fin de aclarar si el origen de los embriones múltiples producidos en los genotipos no apomícticos de cítricos son específicos de las hibridaciones $2x \times 4x$ o es un fenómeno intrínseco de la biología reproductiva de los cítricos, se realizaron diferentes trabajos experimentales en nuestro laboratorio en los cuales se investigó el origen genético de las plantas obtenidas a partir de las semillas parcialmente desarrollada poliembriónicas producidas en hibridaciones $2x \times 4x$ y también se analizó el origen genético de las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* de diferentes genotipos no apomícticos.

En este trabajo se precisa el origen genético de las plantas regeneradas a partir de semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en hibridaciones $2x \times 4x$ así como el origen genético de las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* de genotipos no apomícticos de cítricos. Además se determina un nuevo mecanismo de la biología reproductiva de los genotipos no apomícticos de cítricos.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS.

5.2.1 Hibridaciones $2x \times 4x$.

5.2.1.1 Material vegetal.

Se utilizaron como parentales femeninos los genotipos no apomícticos de clementina 'Bruno', 'Fina', 'Hernandina', 'Clemenules' y 'Tomatera'. Como parentales masculinos tetraploides se utilizaron los genotipos mandarino 'Nova' (*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)), tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* x *C. tangerina*) y naranjo dulce 'Pineapple' (*C. sinensis* (L.) Osb.). Las hibridaciones utilizadas forman parte del programa de obtención de híbridos triploides que está realizando nuestro grupo. Todos los genotipos utilizados pertenecen al Banco de Germoplasma del IVIA.

5.2.1.2 Obtención de polen.

Para la obtención del polen se siguió la metodología descrita en el Capítulo 4, apartado 4.2.2.

5.2.1.3 Polinizaciones 2x X 4x.

Se polinizaron manualmente flores siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 4, apartado 4.2.2. Con mandarino `Nova` tetraploide se polinizaron 25 flores de clementina `Clemenules`, 50 flores de clementina `Fina` y 80 flores de clementina `Hernandina`. Con naranjo `Pineapple` tetraploide se polinizaron 100 y 150 flores de clementina `Bruno` y `Tomatera` respectivamente y con tangelo `Orlando` tetraploide se polinizaron 50 flores de clementina `Fina` y 100 flores de clementina `Clemenules`. Los frutos se recolectaron cuando alcanzaron la madurez.

5.2.1.4 Extracción de semillas, rescate y cultivo de embriones *in vitro* obtenidos en las hibridaciones 2x X 4x.

La metodología empleada para la extracción de las semillas de los frutos maduros y el rescate y cultivo de embriones *in vitro* es la misma que la descrita en el Capítulo 4, apartado 4.2.4.

5.2.2 Hibridaciones 2x X 2x.

5.2.2.1 Material vegetal.

Se utilizaron como parentales femeninos los genotipos no apomícticos clementina `Clemenules` y mandarino `Fortune` (*C. clementina* x *C. tangerina*). Como parental masculino se utilizó el *P. trifoliata* `Benecke`. Todos los genotipos utilizados pertenecen al Banco de Germoplasma del IVIA.

5.2.2.2 Obtención de polen.

Para la obtención del polen se siguió la metodología descrita en el Capítulo 4, apartado 4.2.2.

5.2.2.3 Polinizaciones 2x X 2x.

Las polinizaciones se realizaron siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 4, apartado 4.2.2. Se polinizaron 106 flores de clementina `Clemenules` y 100 flores de mandarino `Fortune` con polen de *P. trifoliata* `Benecke`. Los frutos se recolectaron a los 100 días de haber realizado la polinización.

5.2.2.4 Extracción de semillas y cultivo de nucelas *in vitro* obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x.

Los frutos se esterilizaron individualmente con hipoclorito sódico no diluido (100 g/L de cloro activo) durante 5 - 10 min. Posteriormente se sumergieron en etanol al 96 % y se flamearon. A continuación con ayuda de un bisturí de hoja ancha, se cortaron transversalmente y con ayuda de unas pequeñas pinzas, en condiciones asépticas, se extrajeron las semillas del interior de los frutos. A las semillas obtenidas se les eliminó el tegumento exterior e interior sin dañar la nucela (figuras 5.1.a, 5.1.b y 5.1.c). Posteriormente se realizó una incisión transversal en la nucela y se extrajo el embrión zigótico contenido en su interior (figura 5.1.d).

Las nucelas aisladas se cultivaron con la zona de la chalaza en contacto con el medio de cultivo, quedando la zona del micropilo alejada del mismo. El medio de cultivo estaba compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 50 g/L de sacarosa, 500 mg/L de extracto de malta, vitaminas de Murasighe y Tucker (1969) y 8 g/L de agar. El cultivo se realizó en cámara de cultivo con una iluminación de $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Los embriones zigóticos extraídos de las semillas se cultivaron en un medio de cultivo compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 50 g/L de sacarosa, 500 mg/L de extracto de malta, vitaminas de Murasighe y Tucker (1969), 100 mg/L de myo-inositol, 0,02 mg/L de ácido α -naftalenacético, 1 mg/L de ácido giberélico y 8 g/L de agar.

Los embriones obtenidos por el cultivo *in vitro* de nucelas se repicaron a placas de Petri de 6 cm de diámetro que contenían el mismo medio de cultivo que el utilizado en el cultivo *in vitro* de nucelas.

Los callos embriogénicos obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de nucelas, se cultivaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro en un medio de cultivo compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 40 g/L de sacarosa, 500 mg/L de extracto de malta, 100 mg/L de myo-inositol, 1 mg/L de ácido nicotínico, 1 mg/L de piridoxina, 0,2 mg/L de tiamina y 1,8 g/L de gelrite.

5.2.3 Determinación del nivel de ploidía.

La determinación del nivel de ploidía de las plantas obtenidas se realizó mediante citometría de flujo según la metodología descrita en el Capítulo 1, apartado 1.2.6. Cada muestra estaba constituida por un fragmento de hoja de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ de cada planta regenerada establecida en invernadero y un fragmento de hoja, de las mismas dimensiones, de un planta control diploide.

5.2.4 Análisis genético.

El análisis genético se realizó con marcadores microsatélites. Las plantas obtenidas se analizaron con 28 *loci* microsatélites heterocigóticos para los parentales descritos por Kijas *et al.* (1997), Froelicher *et al.* (2008) y Luro *et al.* (2008).

La extracción del ADN genómico fue realizada según Dellaporta y Hicks (1983). La reacción de PCR utilizada, la desnaturalización de las muestras, las condiciones de electroforesis y la metodología de tinción son las descritas en el Capítulo 1 apartado 1.2.7.

5.2.5 Estudio histológico.

El estudio histológico de las muestras se realizó según la metodología descrita en el Capítulo 1, apartado 1.2.10.

Las muestras estaban constituidas por óvulos y semillas obtenidas en las polinizaciones entre clementina 'Clemenules' por *P. trifoliata* 'Benecke' extraídas de frutos recolectados con una frecuencia semanal a partir de la fecha de la polinización.

5.3 RESULTADOS.

5.3.1 Hibridaciones 2x X 4x.

5.3.1.1 Obtención de frutos y semillas.

El porcentaje de cuajado osciló entre el 40 % obtenido en el cruce entre clementina 'Tomatera' y naranjo 'Pineapple' tetraploide y el 92 % obtenido en el cruce entre clementina 'Fina' y tangelo 'Orlando' tetraploide (tabla 5.1).

En todas las hibridaciones se obtuvieron semillas normales completamente desarrolladas y semillas que no habían completado totalmente su desarrollo, arrugadas, colapsadas y entre un 35 – 55 % más pequeñas (figura 5.2.a).

El número de semillas normales obtenido osciló entre 0,18 semillas por fruto en el cruce entre clementina 'Fina' y mandarino 'Nova' tetraploide hasta 2,1 semillas por fruto en la hibridación clementina 'Clemenules' por tangelo 'Orlando' tetraploide (tabla 5.1). Sin embargo, el número de semillas parcialmente desarrolladas obtenido en todas las hibridaciones fue más elevado que el de semillas normales, oscilando entre 3,4 semillas por fruto en el cruce entre clementina 'Tomatera' por naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide y 9,9 semillas por fruto en la hibridación entre clementina 'Fina' por tangelo 'Orlando' tetraploide (tabla 5.1).

5.3.1.2 Rescate y cultivo de embriones *in vitro*.

En las semillas parcialmente desarrolladas se obtuvieron en todas las hibridaciones semillas abortadas y semillas que contenían uno o varios embriones (figuras 5.2.a, 5.2.b y 5.2.c), en estadios desde globular hasta cotiledonario y de tamaño variable (macroscópicamente algunos embriones eran tan sumamente pequeños que era muy complicado el poder identificarlos en cambio otros alcanzaron un tamaño de aproximadamente 3 mm). Cuando había varios embriones, estos estaban muy compactados y en ocasiones envueltos por los restos del endospermo, lo cual hizo prácticamente

imposible el poder individualizarlos y contarlos, por lo que la observación macroscópica no permitía discernir en muchos casos si la semilla contenía uno o varios embriones. Además el aislamiento de estos tipos de embriones sin dañarlos fue muy dificultoso, por lo que se cultivaron *in vitro* todos juntos. Por este motivo en la tabla 5.2, se consideró semilla monoembrionica aquella en la cual únicamente germinó un embrión y semilla poliembrionica aquella en la cual germinó más de un embrión (figuras 5.2.d y 5.2.e). El menor porcentaje de semillas poliembrionicas fue del 10,7 % en el cruce entre clementina 'Hernandina' por mandarina 'Nova' tetraploide mientras que la hibridación en la que se obtuvo un mayor porcentaje de semillas poliembrionicas fue entre clementina 'Tomatera' por naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide, con un 42,4 %.

En las hibridaciones entre clementina 'Clemenules' por mandarina 'Nova' tetraploide y clementina 'Bruno' por naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide el número de embriones germinados por semilla poliembrionica fue el menor obtenido, 1,9, mientras que el mayor número de embriones germinados por semilla, 2,5, fue obtenido en la hibridación entre clementina 'Tomatera' con naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide (tabla 5.2).

5.3.1.3 Nivel de ploidía.

El nivel de ploidía de todas las plantas obtenidas a partir de las semillas parcialmente desarrolladas fue triploide.

5.3.1.4 Análisis genético.

Se analizaron con marcadores microsatélites los parentales y 46 plantas triploides, obtenidas a partir de la germinación de los embriones múltiples contenidos en el interior de las semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las diferentes hibridaciones 2x X 4x. De las hibridaciones estudiadas se establecieron diferentes grupos de plantas constituidos cada uno por plantas obtenidas en las diferentes hibridaciones y regeneradas a partir de la germinación de los embriones contenidos en una misma semilla parcialmente desarrollada. Los grupos analizados fueron los siguientes: grupos 1.a y 1.b formados por 4 plantas pertenecientes a la hibridación entre clementina 'Fina' por mandarina 'Nova' tetraploide; grupo 2, 4 plantas obtenidas en la hibridación entre clementina 'Hernandina' por mandarina 'Nova' tetraploide; grupos 3.a y 3.b, constituidos por dos plantas cada uno, obtenidas en la hibridación entre clementina 'Clemenules' por mandarina 'Nova' tetraploide; grupos 4.a y 4.b, formados por 3 y 4 plantas respectivamente obtenidas en la hibridación entre clementina 'Fina' por tangelo 'Orlando' tetraploide; grupos 5.a y 5.b, compuestos por 4 y 2 plantas respectivamente obtenidas en la hibridación entre clementina 'Clemenules' por tangelo 'Orlando' tetraploide; grupos 7.a y 7.b, formados por 6 y 4 plantas respectivamente obtenidas en la hibridación entre clementina 'Tomatera' por naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide y los grupos 7.a y 7.b constituidos por 3 y 4 plantas respectivamente obtenidas en la hibridación entre clementina 'Bruno' por naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide.

En cítricos, los marcadores microsatélites permiten distinguir fácilmente especies diferentes e híbridos obtenidos a partir de éstas, pero no son capaces de distinguir entre variedades que se originaron por mutaciones espontáneas, como es el caso de los diferentes genotipos de clementinas. Por ello, con los *loci* microsatélites utilizados los perfiles obtenidos para los distintos genotipos de clementina usados como parentales femeninos en las hibridaciones estudiadas fueron idénticos y como consecuencia, de aquí en adelante, en el texto se hará referencia a todos ellos con el nombre genérico de clementinas.

Las 16 plantas triploides seleccionadas de los cruzamientos entre las clementinas y el mandarino `Nova´ tetraploide junto con los parentales se analizaron con 6 *loci* microsatélites (tabla 5.3). Todas las plantas triploides obtenidas a partir de una misma semilla mostraron el mismo patrón de bandas y además con los 6 *loci* utilizados fue posible diferenciar todos los grupos estudiados. A título de ejemplo, con el *locus* Ci05A05 los parentales fueron heterocigóticos mostrando las clementinas dos alelos de 146 y 154 nt mientras que el mandarino `Nova´ tetraploide presentó dos alelos de 154 y 160 nt. El grupo 1.a mostró un patrón de bandas constituido por dos alelos de 154 nt y 160 nt. El alelo de 154 nt procede de las clementinas, aunque también podría haber otro alelo de 154 nt de mandarino `Nova´ tetraploide procedente de un gameto heterocigótico 154 - 160 nt. El alelo de 160 nt procede del mandarino `Nova´ tetraploide. Los grupos 1.b y 2 presentaron el mismo perfil, constituido por un alelo de 154 nt, procedente del mandarino `Nova´ tetraploide, y otro alelo de 146 nt, originario de las clementinas. Los grupos 3.a y 3.b presentaron una única banda de 154 nt constituida conjuntamente por un alelo de las clementinas y del mandarino `Nova´ tetraploide.

Las 13 plantas triploides seleccionadas de los cruzamientos entre clementina y tangelo `Orlando´ tetraploide junto con los parentales se analizaron con 7 *loci* microsatélites. Todas las plantas triploides obtenidas a partir de una misma semilla mostraron los mismos perfiles y además con los *loci* empleados fue posible diferenciar todos los grupos estudiados (tabla 5.4). Como ejemplo, en la figura 5.3 se presenta el patrón de bandas obtenido al analizar con el *locus* microsatélite Ci02B07 los parentales y los grupos de plantas 4.a, 4.b, 5.a y 5.b. Las clementinas mostraron dos alelos de 162 y 164 nt mientras que el tangelo `Orlando´ tetraploide también presentó dos alelos de 160 y 170 nt. Los grupos 4.a y 5.b mostraron el mismo perfil constituido por dos alelos de 160 y 170 nt procedentes del tangelo `Orlando´ tetraploide y un alelo de 162 nt perteneciente a las clementinas. Los grupos 4.b y 5.a presentaron el mismo perfil, constituido por un alelo de 160 nt procedente del tangelo `Orlando´ tetraploide y un alelo de 164 nt de las clementinas.

Las 17 plantas triploides seleccionadas de los cruzamientos entre clementina y naranjo dulce `Pineapple´ tetraploide junto con los parentales fueron analizadas con 7 *loci* microsatélites. Todas las plantas triploides obtenidas a partir de una misma semilla mostraron los mismos perfiles y además con los *loci* utilizados fue posible diferenciar todos los grupos estudiados (tabla 5.5). Como ejemplo, para el *locus* microsatélite Ci01C06 las clementinas presentaron un perfil heterocigótico con dos alelos de 134 y 164 nt mientras que el naranjo dulce `Pineapple´ tetraploide también mostró un perfil heterocigótico con dos alelos de 134 y 160 nt. Los grupos 6.a y 7.a presentaron un perfil constituido por 3 alelos de 134, 160 y 164 nt, pertenecientes los dos primeros a un gameto heterocigótico de naranjo dulce `Pineapple´ tetraploide y el último a las clementinas. Los grupos 6.b y 7.b mostraron el

mismo perfil, con un alelo de 134 nt perteneciente a las clementinas y un alelo de 160 nt correspondiente al naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide.

5.3.2 Hibridaciones 2x X 2x.

5.3.2.1 Obtención de frutos y semillas.

En las hibridaciones entre clementina 'Clemenules' y mandarino 'Fortune' por *P. trifoliata* 'Benecke' se obtuvieron 91 frutos (86 % de cuajado) y 43 frutos (43 % de cuajado) respectivamente (tabla 5.6). Las semillas obtenidas eran normales (figura 5.1.a). En la hibridación entre clementina 'Clemenules' y *P. trifoliata* 'Benecke' se utilizaron 49 frutos que contenían 550 semillas (11,2 semillas por fruto) mientras que en la hibridación entre mandarino 'Fortune' por *P. trifoliata* 'Benecke' se utilizaron 19 frutos que contenían 175 semillas (9,2 semillas por fruto).

5.3.2.2 Cultivo de nucelas *in vitro* y rescate y cultivo de embriones *in vitro*.

El cultivo de nucelas *in vitro* produjo la formación de embriones y callo. Los embriones obtenidos se originaron inicialmente por un proceso de embriogénesis directa y posteriormente, por un proceso de embriogénesis adventicia, se produjo la proliferación de los mismos. Los callos obtenidos directamente a partir del cultivo de nucelas *in vitro* produjeron embriones, pero no se regeneró ninguna planta a partir de los mismos (figuras 5.4.a a 5.4.k).

5.3.2.2.1 Hibridación entre clementina 'Clemenules' y *P. trifoliata* 'Benecke'.

Se cultivaron 550 nucelas de las cuales 98 (17,8 %) evolucionaron en cultivo *in vitro*. De las 98 nucelas evolucionadas 97 (99 %) produjeron embriones mientras que una produjo tanto embriones como callo. Se obtuvieron un total de 422 embriones de los cuales se regeneraron 327 plantas, todas con hojas trifoliadas (tabla 5.7 y figura 5.4.l).

De las 550 semillas obtenidas, 529 (96,1 %) contenían únicamente un embrión de tamaño variable entre 1/2 y 1/5 el tamaño de la semilla, en 13 semillas (2,4 %) no se observó, a nivel macroscópico, la presencia de ningún embrión y en 8 semillas (1,5 %) se observó la presencia de más de un embrión. En una nucela se aislaron del interior de la misma hasta 4 embriones en fase globular (tabla 5.8). Paralelamente se cultivaron *in vitro* 537 embriones extraídos del interior de las semillas, de los cuales 74 (13,8 %) evolucionaron y originaron plantas con hojas trifoliadas (tabla 5.9).

5.3.2.2.2 Hibridación entre mandarino 'Fortune' y *P. trifoliata* 'Benecke'.

Se cultivaron 175 nucelas de las cuales 27 (15,4 %) evolucionaron en cultivo *in vitro*. De las 27 nucelas evolucionadas 22 (81,5 %) produjeron embriones mientras que 5 (18,5 %) originaron tanto

embriones como callo. Se obtuvieron un total de 131 embriones de los cuales se regeneraron 93 plantas con hojas trifoliadas (tabla 5.7).

De las 175 semillas obtenidas, 151 semillas (86,3 %) contenían únicamente un embrión de tamaño variable entre 1/4 y 3/4 el tamaño de la semilla, en 24 semillas (13,7 %) no se observó, a nivel macroscópico, la presencia de ningún embrión y en ninguna semilla se observó la presencia de más de un embrión (tabla 5.8). Así mismo, se cultivaron *in vitro* 151 embriones extraídos del interior de las nucelas, de los cuales 22 (14,6 %) evolucionaron y originaron plantas con hojas trifoliadas (tabla 5.9).

5.3.2.3 Nivel de ploidía.

De las 263 plantas analizadas de la hibridación entre clementina 'Clemenules' por *P. trifoliata* 'Benecke', 260 plantas fueron diploides (98,9 %) mientras que 3 plantas (1,1 %) fueron triploides (tabla 5.10). De las 66 plantas obtenidas de la hibridación entre clementina 'Clemenules' por *P. trifoliata* 'Benecke' a partir de la germinación del embrión aislado del interior de la nucela, 65 fueron diploides (98,5 %) y 1 fue triploide (1,5 %) (tabla 5.11). Las 3 plantas triploides regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* y la planta triploide obtenida a partir de la germinación del embrión aislado del interior de la nucela, pertenecían a la misma semilla.

De las 65 plantas analizadas de la hibridación entre mandarino 'Fortune' por *P. trifoliata* 'Benecke', 54 plantas fueron diploides (83,1 %) mientras que 11 plantas (16,9 %) fueron triploides (tabla 5.10). De las 21 plantas obtenidas de la hibridación entre mandarino 'Fortune' por *P. trifoliata* 'Benecke' a partir de la germinación del embrión aislado del interior de la nucela, 18 fueron diploides (85,7 %) y 3 fueron triploides (14,3 %) (tabla 5.11). Las 11 plantas triploides regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* se obtuvieron a partir de 3 nucelas diferentes, siendo el nivel de ploidía de los 3 embriones aislados del interior de las mismas también triploide.

5.3.2.4 Análisis genético.

Se analizaron genéticamente 53 plantas diploides obtenidas en la hibridación entre clementina 'Clemenules' y *P. trifoliata* 'Benecke' junto con los parentales. Las plantas analizadas pertenecían a 9 grupos diferentes y cada grupo estaba compuesto por la planta obtenida a partir de la germinación del embrión zigótico aislado del interior de la semilla y por las plantas regeneradas por el cultivo *in vitro* de la nucela de la misma semilla. De los 9 grupos, 8 estaban constituidos por la planta obtenida a partir del embrión zigótico y por 4 plantas, seleccionadas al azar, de las regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de la nucela, mientras que el grupo número 8 estaba constituido por todas las plantas regeneradas, 12 en total, a partir del cultivo *in vitro* de la nucela y del embrión zigótico original. El *P. trifoliata* 'Benecke' se caracteriza por tener hojas trifoliadas. Este carácter está controlado por un *locus* dominante, por lo que fue utilizado como marcador morfológico para confirmar que todas las plantas obtenidas eran híbridas. Todas las plantas analizadas tenían las hojas trifoliadas.

Las 53 plantas seleccionadas y los parentales se analizaron con 5 *loci* microsatélites, mostrando todas las plantas pertenecientes al mismo grupo perfiles idénticos (tabla 5.12). Además

con los *loci* utilizados es posible diferenciar prácticamente todos los grupos estudiados. Como ejemplo, para el *locus* microsatélite Mest 419 clementina 'Clemenules' mostró un perfil heterocigótico con dos alelos de 108 y 120 nt mientras que *P. trifoliata* 'Benecke' presentó únicamente un alelo de 102 nt (figura 5.5). Los grupos de plantas 1, 4, 5, 8 y 9 presentaron un alelo de 108 nt perteneciente a clementina 'Clemenules' y el alelo de 102 nt de *P. trifoliata* 'Benecke'. El resto de grupos mostraron un alelo de 120 nt de clementina 'Clemenules' y el alelo de 102 nt de *P. trifoliata* 'Benecke'. Los resultados obtenidos con los *loci* Mest 132 y Ci03C08 se pueden explicar mediante la hipótesis de la presencia de un alelo nulo en *P. trifoliata* 'Benecke'.

De la hibridación entre mandarino 'Fortune' por *P. trifoliata* 'Benecke' se analizaron con 10 *loci* microsatélites 22 plantas diploides correspondientes a 4 grupos diferentes junto con los parentales. Todas las plantas analizadas produjeron hojas trifoliadas. Cada grupo estaba constituido por 10, 5, 4 y 3 plantas, incluyendo en cada grupo la planta obtenida a partir de la germinación del embrión zigótico aislado del interior de la semilla y las plantas regeneradas como consecuencia del cultivo *in vitro* de la nucela. Todas las plantas analizadas pertenecientes a cada grupo presentaron el mismo patrón de bandas (tabla 5.13). Además con los *loci* utilizados es posible diferenciar todos los grupos estudiados. A modo de ejemplo, con el *locus* microsatélite TAA 41 mandarino 'Fortune' presentó un perfil heterocigótico con dos alelos de 138 y 146 nt mientras que el *P. trifoliata* 'Benecke' también mostró un perfil heterocigótico con dos alelos de 142 y 148 nt. Los grupos 1, 3 y 4 presentaron el mismo perfil constituido por dos alelos de 142 y 146 nt pertenecientes a *P. trifoliata* 'Benecke' y mandarino 'Fortune' respectivamente, mientras que el segundo grupo presentó un perfil con dos alelos de 146 y 148 nt correspondientes a mandarino 'Fortune' y *P. trifoliata* 'Benecke', respectivamente.

También se analizaron genéticamente 18 plantas triploides pertenecientes a 4 grupos de plantas diferentes con los *loci* microsatélites descritos en la tabla 5.14. Todas las plantas analizadas presentaban hojas trifoliadas. El primer grupo estaba constituido por 4 plantas obtenidas a partir de la hibridación entre clementina 'Clemenules' por *P. trifoliata* 'Benecke' y los 3 grupos restantes estaban constituidos por 7, 4 y 3 plantas respectivamente, obtenidas en la hibridación entre mandarino 'Fortune' y *P. trifoliata* 'Benecke'. Las 18 plantas triploides y los parentales se analizaron con 10 *loci* microsatélites, mostrando todas las plantas pertenecientes al mismo grupo perfiles idénticos y hojas trifoliadas (tabla 5.14). Con los *loci* microsatélites utilizados se diferencian todos los grupos estudiados. A título de ejemplo en la figura 5.6, con el *locus* microsatélite Ci05A05, la clementina 'Clemenules' presentó un perfil heterocigótico con dos alelos de 146 y 154 nt, mandarino 'Fortune' mostró un perfil heterocigótico con dos alelos de 146 nt, también presente en la clementina 'Clemenules', y 166 nt, mientras que el *P. trifoliata* 'Benecke' presentó un perfil heterocigótico con dos bandas de 155 nt, presente en la clementina 'Clemenules', y 159 nt. Todas las plantas analizadas pertenecientes a cada grupo presentaron el mismo patrón de bandas. El primer grupo procedió de la hibridación entre clementina 'Clemenules' y *P. trifoliata* 'Benecke', mostrando un perfil constituido por tres alelos, los alelos de 146 y 154 nt procedieron de un gameto no reducido de clementina 'Clemenules' y el alelo de 159 nt pertenece a *P. trifoliata* 'Benecke'. El resto de grupos analizados procedieron de la hibridación entre mandarino 'Fortune' por *P. trifoliata* 'Benecke'. Todos

los grupos presentaron el mismo patrón de bandas, constituido por dos alelos de 146 y 166 nt correspondientes a un gameto no reducido de mandarina 'Fortune' y un alelo de 155 nt procedente de *P. trifoliata* 'Benecke'.

5.3.2.5 Histología.

Se realizaron cortes histológicos longitudinales de 27 semillas obtenidas a partir de la polinización entre clementina 'Clemenules' por *P. trifoliata* 'Benecke'. En todas las semillas se advirtió la presencia de un único embrión excepto en una semilla (figura 5.7) en la que se observó la presencia de un embrión dominante y a su alrededor 2 o 3 embriones menos desarrollados, pegados a la nucela, en la región micropilar de la semilla.

5.4 DISCUSIÓN.

La embrionía adventicia es el mecanismo apomíctico característico de los cítricos (Koltunow, 1993). Las semillas de los genotipos apomícticos contienen un embrión de origen sexual y uno o varios embriones adventicios, y se las denomina semillas poliembriónicas, mientras que en los genotipos no apomícticos las semillas contienen un embrión sexual, y se las denomina semillas monoembriónicas, aunque en casos aislados se ha descrito la producción ocasional de semillas con varios embriones de origen sexual en genotipos no apomícticos (Cameron y Garber, 1968).

5.4.1 Origen de los embriones múltiples producidos en las semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x y su implicación en los programas de mejora genética.

Los resultados obtenidos indican que en las semillas parcialmente desarrolladas en el 64,5 % de los casos germina más de un embrión por semilla y el análisis genético realizado con los marcadores microsatélites en las plantas triploides seleccionadas de las distintas hibridaciones 2x X 4x realizadas, demuestra que todas las plantas obtenidas a partir de las semillas parcialmente desarrolladas son híbridos. En éstos se observó claramente la segregación de los alelos correspondientes a los parentales. Además todos los híbridos triploides obtenidos a partir de una misma semilla mostraron el mismo patrón de bandas para todos los *loci* microsatélites utilizados, lo que significa que para esos *loci* no hay diferencias a nivel molecular y que probablemente la poliembriónía se origina como consecuencia de la fisión del embrión zigótico original. Oiyama y Kobayashi (1990) obtuvieron indicios similares analizando con isoenzimas plantas procedentes de semillas parcialmente desarrolladas obtenidas al cruzar el genotipo monoembriónico 'Miyauchi Iyokan' y una clementina con el genotipo tetraploide 'Kawano Natshudaidai'.

Esen y Soost (1977) mediante métodos citológicos determinaron el nivel de ploidía de los embriones y endospermos contenidos en las semillas parcialmente desarrolladas obtenidas al polinizar los genotipos no apomícticos diploides orangelo 'Sukega' (*C. sinensis* x *C. paradisi*),

mandarino 'Temple' (*C. temple* Hort. ex Y. Tan.), clementina y zamboa 'CRC 2240' (*C. grandis* (L.) Osb.) con polen de naranjo dulce 'Paperrind' tetraploide (*C. sinensis* (L.) Osb.) y un genotipo tetraploide de naranjo dulce de origen desconocido. Llegaron a la conclusión de que el embrión era triploide y estaba originado por la fusión de un gameto haploide del parental femenino ($n = x = 9$) con un gameto haploide ($n = 2x = 18$) del parental masculino y por lo tanto el nivel de ploidía del endospermo era tetraploide. El motivo por el cual se produce el cese del desarrollo de la semilla es debido probablemente a una incompatibilidad entre el desarrollo del embrión y el endospermo, como consecuencia de la relación entre el nivel de ploidía del embrión y del endospermo (3/4) que degenera rápidamente. Esta característica parece específica de las hibridaciones entre parentales femeninos diploides y parentales masculinos tetraploides, ya que no ocurre en hibridaciones entre parentales diploides y en hibridaciones entre parentales femeninos tetraploides y parentales masculinos diploides (Capítulo anterior). Además, en la bibliografía no se han encontrado referencias que describan esta característica en hibridaciones $2x \times 2x$ y $4x \times 2x$.

Los resultados obtenidos tienen importantes implicaciones en programas de mejora genética basados en la obtención de híbridos triploides mediante hibridaciones entre parentales femeninos diploides y parentales masculinos tetraploides, ya que se ha demostrado que todas las plantas regeneradas a partir de una misma semilla parcialmente desarrollada son iguales genéticamente. Por ello, durante las etapas de rescate y cultivo de embriones *in vitro*, a partir de los múltiples embriones contenidos en el interior de las semillas, únicamente es necesario regenerar una planta por semilla. Esta característica tiene un enorme valor práctico ya que durante el cultivo *in vitro* de los embriones no es necesario estar continuamente repicando los diferentes embriones germinados por semilla, reduciéndose significativamente el trabajo durante esta etapa y en etapas ulteriores, pero sobre todo, es importante destacar el gran ahorro de trabajo y costo que supone la no evaluación a nivel de campo y laboratorio de las diferentes híbridos obtenidos a partir de una misma semilla.

Al principio del programa de obtención de híbridos triploides que nuestro grupo realiza en el IVIA desde 1995, en las hibridaciones $2x \times 4x$, antes de disponer de la información obtenida en este trabajo, se regeneraban todas las plantas producidas en una misma semilla parcialmente desarrollada, lo que supuso el injerto y la evaluación en campo de más de 450 genotipos triploides repetidos. Estos genotipos ocupaban una superficie de un poco más de 4 hanegadas, considerando los marcos de plantación intensivos (4 x 2 m) empleados en las parcelas experimentales del IVIA destinadas a la evaluación de híbridos triploides. Además son necesarios aproximadamente 10 años para evaluar un híbrido lo que representa importantes necesidades de personal. Por otra parte, desde el punto de vista comercial, esta característica es de gran trascendencia para evitar que en los convenios establecidos con diferentes empresas privadas en los cuales se establecen un número determinado de genotipos, a cambio no reciban menos de los pactados debido a que algunos de ellos estén repetidos por ser regenerados a partir de los múltiples embriones contenidos en las semillas parcialmente desarrolladas.

En la actualidad a partir de las semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones $2x \times 4x$ únicamente se está regenerando una planta por semilla lo que implica una

disminución del tiempo empleado en el repicado de los embriones germinados *in vitro* así como la duplicación de genotipos en campo y posterior evaluación de los mismos.

5.4.2 Origen de los diferentes embriones producidos por el cultivo de nucelas *in vitro* aisladas de semillas obtenidas en hibridaciones 2x X 2x y su implicación en el saneamiento de genotipos no apomícticos de cítricos.

El análisis genético realizado con los marcadores microsatélites en las plantas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* del embrión aislado del interior de la semilla y del cultivo *in vitro* de la nucela, mostraron el mismo patrón de bandas, tanto en las plantas diploides como en las plantas triploides para todos los *loci* microsatélites utilizados y además los perfiles obtenidos eran diferentes al de la planta madre. Por ello podemos concluir que todas las plantas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de la nucela no son plantas de origen nucelar sino que son plantas híbridas. Todas las plantas regeneradas a partir de una misma nucela mostraron perfiles idénticos y sin embargo produjeron perfiles claramente diferentes a los presentados por otros grupos de plantas regeneradas a partir de nucelas distintas. Estos resultados demuestran claramente que las suposiciones formuladas por Rangan *et al.* (1968), Esan (1973) y Navarro *et al.* (1985) respecto al origen nucelar de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* de nucelas de genotipos no apomícticos de cítricos no eran ciertas.

Rangan *et al.* (1968) realizaron cultivos de nucelas *in vitro* de semillas extraídas de frutos de los genotipos no apomícticos zamboa 'Pong Yau' (*C. grandis* (L.) Osb.), limonero 'Ponderosa' (*C. pyriformis* Hassk.) y mandarino 'Temple' obtenidos por polinización abierta. Los autores no cultivaron *in vitro* el embrión zigótico original. Regeneraron plantas de todos los genotipos y llegaron a la conclusión, apoyados en métodos histológicos, de que las plantas obtenidas procedían de embriones regenerados a partir de tejido nucelar y por lo tanto idénticas a la planta madre, basándose exclusivamente en la hipótesis incorrecta de que a partir del cultivo de nucelas *in vitro* todas las plantas regeneradas debían de ser nucleares. Posteriormente Esan (1973) realizó cultivos de nucelas *in vitro* de varios genotipos apomícticos y de 12 genotipos no apomícticos de *Citrus* y géneros afines y regeneró plantas de prácticamente todos ellos. Estas plantas fueron injertadas en campo y al cabo de varios años observaron que fenotípicamente eran muy diferentes a la planta madre (C.N. Roistacher, comunicación personal). Adicionalmente, Navarro *et al.* (1985) cultivaron *in vitro* nucelas de 8 genotipos de clementina polinizadas con polen de naranjo dulce 'Comuna' (*C. sinensis* (L.) Osb.). Las plantas regeneradas mostraron fenotipos y perfiles isoenzimáticos muy variables. El análisis detallado de las plantas producidas por cada nucela indicó que eran iguales entre si, pero distintas de la planta original y distintas a las regeneradas en nucelas diferentes, tanto fenotípicamente como con marcadores isoenzimáticos. Los autores no determinaron el origen de las plantas producidas por el cultivo de nucelas *in vitro*. Todos estos datos apoyan y ratifican los resultados obtenidos en este capítulo y además permiten corregir las afirmaciones realizadas por estos autores.

Realmente lo que sucedió en estos trabajos es que después de eliminar el embrión zigótico, al cultivar las nucelas *in vitro*, evolucionaron proembriones o embriones en un estado inicial de desarrollo que estaban presentes en la región micropilar de la nucela y que probablemente se

originaron como consecuencia de la fisión del embrión zigótico original. Todos estos autores regeneraron plantas híbridas, pero como no cultivaron los embriones zigóticos no pudieron comparar, a nivel morfológico y con marcadores isoenzimáticos, las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* de nucelas y por la germinación del embrión zigótico. Además los autores no utilizaron un marcador morfológico dominante, como el carácter hojas trifoliadas del *P. trifoliata*, lo que les hubiera permitido identificar rápidamente el origen genético de las plantas regeneradas. Con los resultados obtenidos en este trabajo, es posible decir que las células nucelares de los genotipos no apomícticos de cítricos no tienen capacidad embriogénica mientras que en los genotipos apomícticos ocurre lo contrario, ya que mediante la técnica de cultivo de óvulos *in vitro* es posible regenerar plantas nucelares de los genotipos apomícticos de cítricos (Navarro *et al.* 1979).

Rangan *et al.* (1968) y Soost y Cameron (1975) recomendaban la técnica del cultivo *in vitro* de nucelas de genotipos no apomícticos para la obtención de plantas nucelares libres de virus. Esta recomendación es totalmente falsa, como demuestran los resultados obtenidos en este capítulo, por lo que no es una técnica válida para la obtención de plantas genéticamente iguales para los genotipos no apomícticos de cítricos. Afortunadamente esta técnica no llegó a utilizarse con fines aplicados debido a la puesta a punto de la técnica del microinjerto *in vitro* de ápices caulinares (Navarro *et al.* 1975).

5.4.3 Biología reproductiva de los genotipos no apomícticos de cítricos.

Los resultados obtenidos indican que en los genotipos no apomícticos de cítricos, lo que aparentemente sucede es que una vez se ha producido la fecundación, en algún momento del desarrollo de la ovocélula fecundada, se produce una fisión del embrión zigótico original originándose la formación de nuevos proembriones idénticos genéticamente, tanto a nivel diploide como triploide. Probablemente el embrión zigótico original adquiere dominancia y por algún mecanismo desconocido impide el crecimiento del resto, de forma que en las semillas de los genotipos no apomícticos de cítricos sólo se observa normalmente un embrión que se desarrolla más que el resto. También podría ocurrir que alguno de los proembriones originados adquiriera dominancia y comience a desarrollarse más que los demás. Esta circunstancia permite suponer que cuando se realizó el cultivo *in vitro* de las nucelas la eliminación del embrión zigótico del interior de la misma permite que el resto de embriones menos desarrollados, en condiciones de cultivo *in vitro*, puedan desarrollarse hasta converger a plantas enteras. La competencia entre embriones también se ha descrito en los genotipos apomícticos de cítricos, donde el embrión zigótico se desarrolla más lentamente que los embriones de origen nucelar que estorban y dificultan el desarrollo del embrión zigótico (Koltunow, 1993). En una semilla poliembriónica de cítricos podemos encontrar diferencias en el desarrollo de los embriones nucelares, motivadas por diferencias temporales en el inicio de la embriogénesis o por una competencia por los nutrientes disponibles (Wakana y Uemoto, 1987; 1988). Esta competencia podría originarse entre el embrión zigótico original y el resto de embriones originados en los genotipos no apomícticos de cítricos, resultando uno dominante lo cual explicaría la evolución de un único embrión.

En nuestro trabajo hemos demostrado que este mecanismo se produce tanto *in vivo* como *in vitro* mediante dos procedimientos distintos que impiden el desarrollo del embrión dominante. El primer método consistió en la eliminación del embrión zigótico dominante por medios mecánicos y cultivo *in vitro* de la nucela, lo que permite que el resto de embriones puedan evolucionar hasta llegar a originar plantas enteras y el segundo método empleado está basado en las hibridaciones $2x \times 4x$. En este tipo de hibridaciones la relación entre el nivel de ploidía del embrión y del endospermo ($3/4$), genera una incompatibilidad entre ambos o produce un desarrollo anormal del endospermo lo que provoca un cese en el desarrollo de los embriones (Esen y Soost, 1977). Estas condiciones no son las óptimas para favorecer el desarrollo de los embriones en el interior de la semilla, por lo que ninguno de ellos adquiere dominancia sobre el resto y continúan su desarrollo hasta que se produce la degeneración del endospermo.

Este mecanismo es característico de la biología reproductiva de los genotipos no apomícticos de cítricos y no ha sido descrito anteriormente ni en cítricos ni, hasta donde nosotros sabemos, en otras especies vegetales.

En este trabajo se precisa el origen genético de las plantas regeneradas a partir de semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en hibridaciones $2x \times 4x$ así como el origen genético de las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* de genotipos no apomícticos de cítricos. Además se determina un nuevo mecanismo de la biología reproductiva de los genotipos no apomícticos de cítricos.

5.5 CONCLUSIONES.

Las semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones $2x \times 4x$ pueden estar abortadas, contener un único embrión o contener más de un embrión por semilla. El análisis genético realizado con marcadores microsatélites demuestra que todas las plantas obtenidas a partir de una semilla parcialmente desarrollada son híbridas e iguales genéticamente para los *loci* microsatélites analizados. Esta característica implica que en los programas de mejora genética basados en hibridaciones entre parentales diploides y tetraploides únicamente es necesario regenerar una planta por semilla parcialmente desarrollada.

El cultivo de nucelas *in vitro* de genotipos no apomícticos de cítricos no permite regenerar plantas de origen nucelar. El análisis genético con marcadores microsatélites de las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* y de la germinación del embrión zigótico contenido en el interior de las semillas demuestra que todas las plantas son de origen sexual y que se originaron como consecuencia de un proceso de embriogénesis secundaria a partir del embrión zigótico original.

La técnica del cultivo *in vitro* de nucelas no es una técnica válida para obtener plantas libres de virus de los genotipos no apomícticos de cítricos ya que todas las plantas regeneradas son híbridos.

La biología reproductiva de los genotipos no apomícticos de cítricos es mucho más compleja de lo que se suponía hasta el momento. Aparentemente parece suceder que una vez se ha producido la fecundación, en algún momento del proceso de desarrollo de la ovocélula fecundada, se produce

una fisión del embrión zigótico original originándose la formación de nuevos proembriones idénticos genéticamente. Probablemente el embrión zigótico original adquiere dominancia y comienza a desarrollarse más que el resto o también podría ocurrir que alguno de los proembriones originados adquiriera dominancia y comience a desarrollarse más que los otros. Este mecanismo no ha sido descrito en cítricos ni en otras especies vegetales y es un mecanismo característico de la biología reproductiva de los genotipos no apomícticos de cítricos.

Tabla 5.1. Cuajado, número y tipos de semillas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x.

Parental femenino diploide	Parental masculino tetraploide	Flores polinizadas	Frutos obtenidos	Semillas normales	Semillas parcialmente desarrolladas
Fina	Nova	50	39	7	242
Clemenules	Nova	25	13	5	124
Hernandina	Nova	80	38	15	218
Bruno	Pineapple	100	65	47	282
Tomatera	Pineapple	150	60	14	204
Fina	T.Orlando	50	46	24	499
Clemenules	T.Orlando	100	75	159	742

Tabla 5.2. Cultivo *in vitro* de los embriones producidos en las semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones entre parentales diploides y tetraploides.

Parental femenino diploide	Parental masculino tetraploide	Semillas obtenidas	Semillas con embriones	Semillas en las que no germinó ningún embrión	Semillas monoemb. ^a	Semillas poliemb. ^b	Nº total de embriones germinados	Embriones germinados / semilla poliembriónica
Fina	Nova	242	181	53	95	33	162	2,0
Clemenules	Nova	124	98	9	71	18	105	1,9
Hernandina	Nova	218	122	62	47	13	74	2,1
Bruno	Pineapple	282	82	12	46	24	92	1,9
Tomatera	Pineapple	204	184	22	84	78	276	2,5
Fina	Orlando	499	213	33	110	70	278	2,4
Clemenules	Orlando	742	510	90	221	199	632	2,1

a. Se consideró semilla monoembriónica aquella en la cual únicamente germinó un embrión.

b. Se consideró semilla poliembriónica aquella en la cual germinó más de un embrión.

Tabla 5.3. Análisis genético de las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas en hibridaciones 2x X 4x entre las clementinas `Clemenules`, `Fina` y `Hernandina` con mandarino `Nova` tetraploide.

<i>Locus</i>	Clementina	Nova 4x	Grupo 1.a	Grupo 1.b	Grupo 2	Grupo 3.a	Grupo 3.b
TAA 15		200		200	200	200	
	188		188				188
	184	184	184	184	184	184	184
TAA 41	154					154	
	146	146	146	146	146	146	146
		138	138				
Ci05A05		160	160				
	154	154	154	154	154	154	154
	146			146	146		
Ci01C07	278	278	278	278	278	278	278
	241			241		241	
Ci02B07		170		170	170		
	164	164	164	164	164	164	164
	162		162			162	162
Ci06A05b		216	216	216	216		216
	202					202	
	176	176	176	176	176	176	176

El número de cada celda corresponde al tamaño de cada alelo en nucleótidos (nt).

Grupo 1.a y 1.b. Triploides obtenidos a partir de una semilla parcialmente desarrollada producida en la hibridación entre clementina `Fina` por mandarino `Nova` tetraploide. Las letras a y b indican semillas diferentes.

Grupo 2. Triploides obtenidos a partir de una semilla parcialmente desarrollada producida en la hibridación entre clementina `Hernandina` por mandarino `Nova` tetraploide.

Grupo 3.a y 3.b. Triploides obtenidos a partir de una semilla parcialmente desarrollada producida en la hibridación entre clementina `Clemenules` por mandarino `Nova` tetraploide. Las letras a y b indican semillas diferentes.

Tabla 5.4. Análisis genético de las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas en hibridaciones 2x X 4x entre las clementinas `Clemenules` y `Fina` con tangelo `Orlando` tetraploide.

<i>Locus</i>	Clementina	Orlando 4x	Grupo 4.a	Grupo 4.b	Grupo 5.a	Grupo 5.b
Ci01C07	278	278	278		278	278
		258	258	258	258	258
	241			241	241	241
Ci01C06	164		164		164	
	134	134	134	134	134	134
		131	131	131		131
Ci07C07	238		238			
	224			224	224	224
		220	220	220	220	220
Ci01D10	239		239	239		239
	234	234	234	234	234	234
Ci02B07		170	170			171
	164			164	164	
	162		162			162
		160	160	160	160	160
Ci05A05		160	160	160	160	160
	154	154	154		154	154
	146			146	146	146
Ci07D10	156			156	156	
	154		154	154	154	154
		152	152	152		152

El número de cada celda corresponde al tamaño de cada alelo en nucleótidos (nt).

Grupo 4.a y 4.b. Triploides obtenidos a partir de una semilla parcialmente desarrollada producida en la hibridación entre clementina `Fina` por tangelo `Orlando` tetraploide. Las letras a y b indican semillas diferentes.

Grupo 5.a y 5.b. Triploides obtenidos a partir de una semilla parcialmente desarrollada producida en la hibridación entre clementina `Clemenules` por tangelo `Orlando` tetraploide. Las letras a y b indican semillas diferentes.

Tabla 5.5. Análisis genético de las plantas obtenidas a partir de semillas parcialmente desarrolladas en hibridaciones 2x X 4x entre las clementinas 'Bruno' y 'Tomatera' con naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide.

Locus	Clementina	Pineapple 4x	Grupo 6.a	Grupo 6.b	Grupo 7.a	Grupo 7.b
Ci01C06	164		164		164	
		160	160	160	160	160
	134	134	134	134	134	134
TAA 41	154	154	154	154	154	154
	146			146	146	
		138	138		138	138
CAC 15	159	159	159	159	159	159
	150			150		150
Ci07C07	238					
	224	224	224	224	224	224
Ci02B07	164	164	164	164	164	164
	162					
		160	160	160	160	160
Ci02F07		172		172	172	172
	162	162	162	162	162	162
Ci05A05		164	164		164	164
	154	154	154	154	154	154
	146		146	146	146	

El número de cada celda corresponde al tamaño de cada alelo en nucleótidos (nt).

Grupos 6.a y 6.b. Triploides obtenidos a partir de una semilla parcialmente desarrollada producida en la hibridación entre clementina 'Tomatera' por naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide. Las letras a y b indican semillas diferentes.

Grupos 7.a y 7.b. Triploides obtenidos a partir de una semilla parcialmente desarrollada producida en la hibridación entre clementina 'Bruno' por naranjo dulce 'Pineapple' tetraploide. Las letras a y b indican semillas diferentes.

Tabla 5.6. Cuajado y número de semillas obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x.

Parental femenino	Parental masculino	Flores polinizadas	Frutos obtenidos	Frutos utilizados	Semillas obtenidas
Clemenules	Benecke	106	91	49	550
Fortune	Benecke	100	43	19	175

Tabla 5.7. Número de nucelas evolucionadas en cultivo *in vitro* y número de embriones y plantas obtenidas.

Parental femenino	Parental masculino	Nucelas cultivadas	Nucelas evolucionadas	Embriones obtenidos	Plantas obtenidas
Clemenules	Benecke	550	98	422	327
Fortune	Benecke	175	27	131	93

Tabla 5.8. Número de embriones contenidos en las semillas obtenidas en las hibridaciones 2x X 2x.

Parental femenino	Parental masculino	Semillas cultivadas	Semillas con embrión	Semillas con embrión macroscópicamente no visible	Semillas con más de un embrión
Clemenules	Benecke	550	537	13	8
Fortune	Benecke	175	151	24	0

Tabla 5.9. Cultivo *in vitro* de los embriones aislados de las semillas originadas en las polinizaciones entre parentales diploides.

Parental femenino	Parental masculino	Embriones cultivados	Embriones germinados	Plantas obtenidas
Clemenules	Benecke	537	74	74
Fortune	Benecke	151	22	22

Tabla 5.10. Nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro*.

Parental femenino	Parental masculino	Plantas analizadas	Plantas diploides	Plantas triploides	% plantas diploides	% plantas triploides
Clemenules	Benecke	263	260	3	98,9	1,1
Fortune	Benecke	65	54	11	83,1	16,9

Tabla 5.11. Nivel de ploidía de las plantas obtenidas a partir de la germinación de los embriones aislados de las semillas cultivadas *in vitro* obtenidas en hibridaciones 2x X 2x.

Parental femenino	Parental masculino	Plantas analizadas	Plantas diploides	Plantas triploides	% plantas diploides	% plantas triploides
Clemenules	Benecke	66	65	1	98,5	1,5
Fortune	Benecke	21	18	3	85,7	14,3

Tabla 5.12. Análisis genético de las plantas diploides regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* obtenidas en la hibridación entre clementina 'Clemenules' por *P. trifoliata* 'Benecke'.

Locus	Grupo																			
	Parentales		1		2		3		4		5		6		7		8		9	
	Clemenules	Benecke	Zig ^a	Nuc ^b	Zig	Nuc	Zig	Nuc	Zig	Nuc	Zig	Nuc	Zig	Nuc	Zig	Nuc	Zig	Nuc	Zig	Nuc
Mest 1	172						172	172	172	172	172	172	172	172	172	172			172	172
	168	168	168	168	168	168	168	168			168	168	168	168	168	168	168	168		
		150	150	150	150	150			150	150							150	150	150	150
Mest 132	275		275	275					275	275	275	275							275	275
	236				236	236	236	236					236	236	236	236	236	236		
		240 / 0*							240	240							240	240	240	240
Mest 419	120				120	120	120	120					120	120	120	120				
	108		108	108					108	108	108	108					108	108	108	108
		102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102
Ci03C08	226		226	226	226	226	226	226					226	226			226	226		
		216 / 0*	216	216	216	216			216	216							216	216		
	210								210	210	210	210			210	210			210	210
Ci07C07	238				238	238	238	238					238	238					238	238
	224		224	224					224	224	224	224			224	224	224	224		
		200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

Cada grupo estaba constituido por la planta regenerada a partir de la germinación del embrión zigótico contenido en el interior de la semilla y de las plantas regeneradas por cultivo de nucelas *in vitro*.

a. Zig. Planta regenerada a partir de la germinación del embrión zigótico aislado del interior de la semilla.

b. Nuc. Plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de nucelas.

*. Presencia de un alelo nulo en los loci microsatélites Mest 132 y Ci03C08 para *P. trifoliata* 'Benecke'.

El número de cada celda corresponde al tamaño de cada alelo en nucleótidos (nt).

Tabla 5.13. Análisis genético de las plantas diploides regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* obtenidas en la hibridación entre mandarino 'Fortune' por *P. trifoliata* 'Benecke'.

Locus	Grupo									
	Parentales		1		2		3		4	
	Fortune	Benecke	Zig ^a	Nuc ^b	Zig	Nuc	Zig	Nuc	Zig	Nuc
Mest 15	188		188	188	188	188	188	188		
	184	184	184	184			184	184	184	184
		180			180	180				
Mest 56		144	144	144	144	144	144	144	144	144
	140		140	140					140	140
	136				136	136	136	136		
Mest 123	296				296	296				
	268		268	268			268	268	268	268
		244	244	244	244	244	244	244	244	244
		236								
Mest 132	242		242	242	242	242			242	242
	236						236	236		
		240 / 0*			240	240	240	240	240	
Mest 488	140								140	140
	130		130	130	130	130	130	130		
		120	120	120	120	120	120	120	120	120
Mest 525	184									
		178	178	178	178	178	178	178	178	178
	172		172	172	172	172	172	172	172	172
Ci02D04b	206		206	206	206	206	206	206	206	206
		194	194	194	194	194	194	194	194	194
Ci05A05	166				166	166				
		159	159	159			159	159	159	159
		155			155	155				
	146		146	146			146	146	146	146
Ci02G12		260	260	260	260	260			260	260
		258					258	258		
	250		250	250	250	250	250	250	250	250
TAA 41		148			148	148				
	146		146	146	146	146	146	146	146	146
		142	142	142			142	142	142	142
	138									

Cada grupo estaba constituido por la planta regenerada a partir de la germinación del embrión zigótico contenido en el interior de la semilla y de las plantas regeneradas por cultivo de nucelas *in vitro*.

a. Zig. Planta regenerada a partir de la germinación del embrión zigótico aislado del interior de la semilla.

b. Nuc. Plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de nucelas.

*. Presencia de un alelo nulo en el locus microsatélite Mest 132 para *P. trifoliata* 'Benecke'.

El número de cada celda corresponde al tamaño de cada alelo en nucleótidos (nt).

Tabla 5.14. Análisis genético de las plantas triploides regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* obtenidas en las hibridaciones entre clementina 'Clemenules' y mandarino 'Fortune' con *P. trifoliata* 'Benecke'.

Locus	Grupo										
	Parentales			1		2		3		4	
	Clemenules	Fortune	Benecke	Zig ^a	Nuc ^b	Zig	Nuc	Zig	Nuc	Zig	Nuc
Mest 15	188	188		188	188	188	188	188	188	188	188
	184	184	184	184	184	184	184	184	184	184	184
			180								
Mest 56			144	144	144	144	144	144	144	144	144
	140	140		140	140	140	140	140	140	140	140
	136	136		136	136	136	136	136	136	136	136
Mest 123	296	296		296	296	296	296	296	296	296	296
	268	268		268	268	268	268	268	268	268	268
			244	244	244					244	244
			236			236	236	236	236		
Mest 132	260			260	260						
		242				242	242	242	242		
	236	236		236	236			236	236	236	236
			240 / 0*	240	240					240	240
Mest 488		140				140	140	140	140	140	140
	130	130		130	130						
	126			126	126						
			120	120	120	120	120	120	120	120	120
Mest 525		184				184	184			184	184
	180			180	180						
			178	178	178	178	178	178	178	178	178
	172	172		172	172	172	172	172	172	172	172
Ci02D04b	206	206		206	206	206	206	206	206	206	206
	200										
			194	194	194	194	194	194	194	194	194
Ci05A05		166				166	166	166	166	166	166
			159	159	159						
			155			155	155	155	155	155	155
	154			154	154						
	146	146		146	146	146	146	146	146	146	146
Ci02G12			260							260	260
	258		258	258	258	258	258	258	258		
	250	250		250	250	250	250	250	250	250	250
TAA 41	152			152	152						
			148			148	148	148	148	148	148
	146	146		146	146	146	146	146	146	146	146
			142	142	142						
		138				138	138			138	138

Cada grupo estaba constituido por la planta regenerada a partir de la germinación del embrión zigótico contenido en el interior de la semilla y de las plantas regeneradas por cultivo de nucelas *in vitro*.

a. Zig. Planta regenerada a partir de la germinación del embrión zigótico aislado del interior de la semilla.

b. Nuc. Plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de nucelas.

*. Presencia de un alelo nulo en el locus microsatélite Mest 132 para *P. trifoliata* 'Benecke'.

El número de cada celda corresponde al tamaño de cada alelo en nucleótidos (nt).



Figura 5.1. a. Estado de desarrollo de la semilla utilizada para el cultivo de nucelas *in vitro* extraída de frutos recolectados a los 100 días de haber realizado la polinización. b. Semilla a la que se le han eliminado parcialmente los tegumentos observándose la nucela con el embrión zigótico en su interior. c. Nucela a la que se le han eliminado totalmente los tegumentos y en la que se puede observar la incisión realizada para extraer el embrión zigótico. d. Embrión zigótico extraído de la nucela.

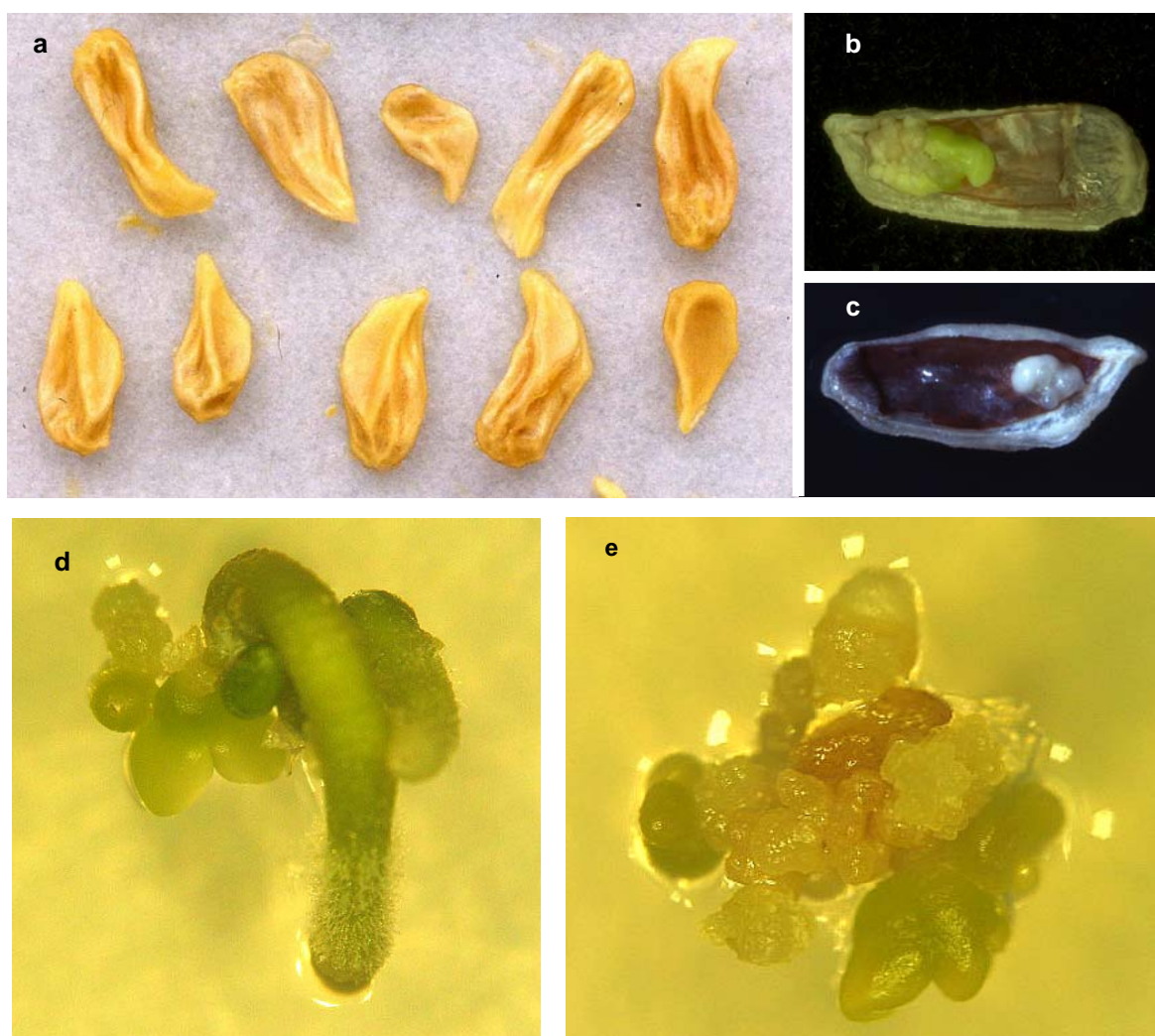


Figura 5.2. a. Semillas parcialmente desarrolladas obtenidas en las hibridaciones 2x X 4x. b – c. Múltiples embriones contenidos en el interior de las semillas parcialmente desarrolladas. d – e. Múltiples embriones germinados a partir de una semilla parcialmente desarrollada.

Ci02B07

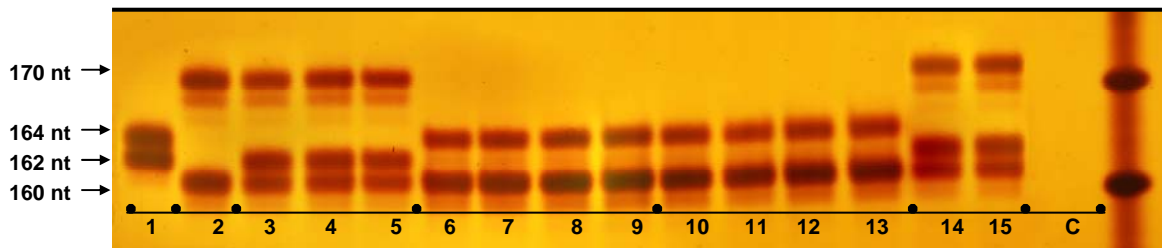


Figura 5.3. Análisis genético con el *locus* microsatélite Ci02B07 y el ADN genómico de los genotipos: 1 clementina ‘Clemenules’, 2 tangelo ‘Orlando’ tetraploide, 3, 4 y 5 híbridos triploides obtenidos en una semilla parcialmente desarrollada de la hibridación entre clementina ‘Fina’ por tangelo ‘Orlando’ tetraploide, 6, 7, 8 y 9 híbridos triploides obtenidos en una semilla parcialmente desarrollada de la hibridación entre clementina ‘Fina’ por tangelo ‘Orlando’ tetraploide, 10, 11, 12 y 13 híbridos triploides obtenidos en una semilla parcialmente desarrollada de la hibridación entre clementina ‘Clemenules’ por tangelo ‘Orlando’ tetraploide, 14 y 15 híbridos triploides obtenidos en una semilla parcialmente desarrollada de la hibridación entre clementina ‘Clemenules’ por tangelo ‘Orlando’ tetraploide, C control negativo PCR.

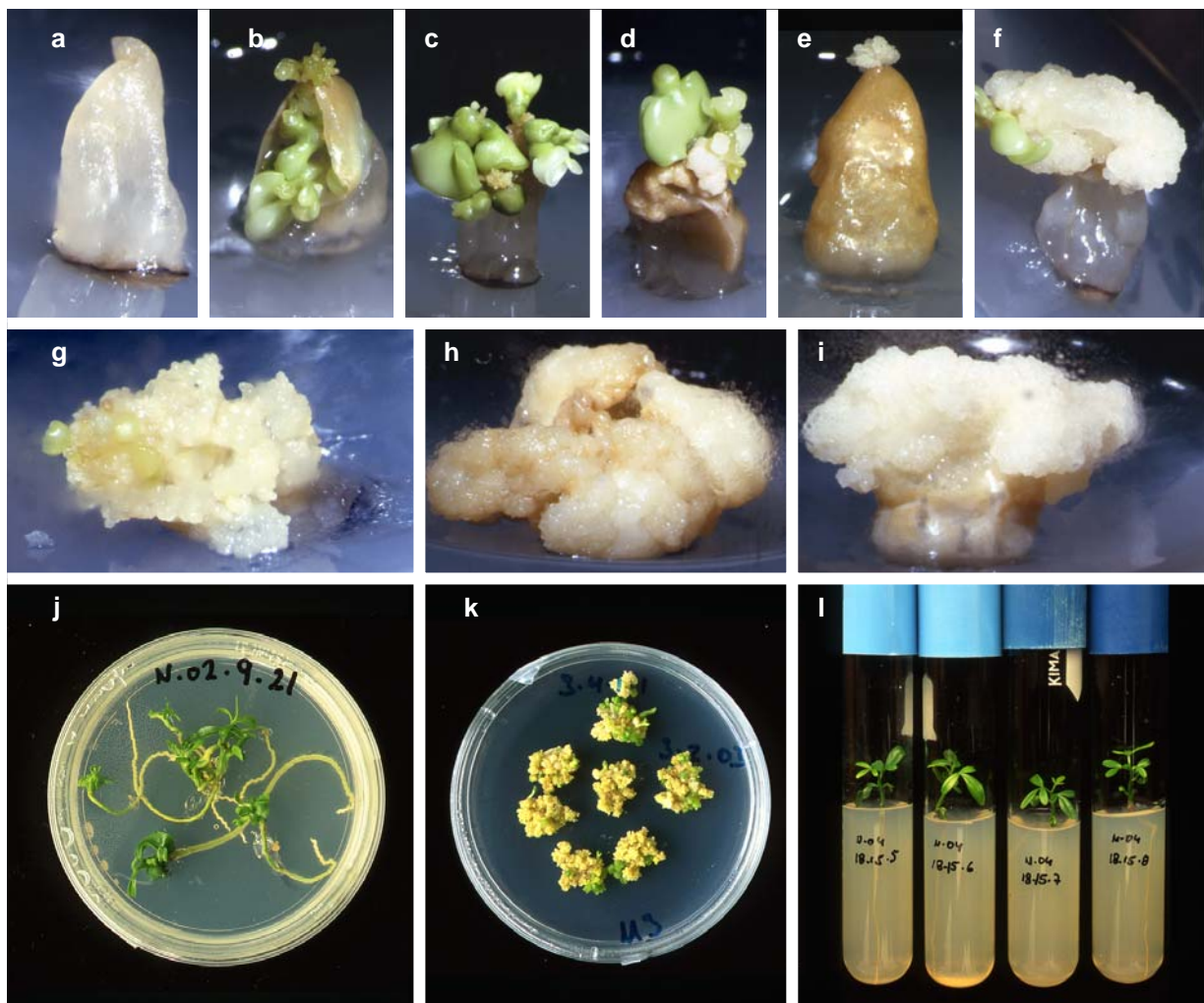


Figura 5.4. a – e. Nucelas cultivadas *in vitro* en las cuales se observa la producción de embriones en la región micropilar de la misma. f – i. Nucelas cultivadas *in vitro* en las cuales se observa la producción de callo embriogénico en la región micropilar de la misma. j. Germinación de los embriones obtenidos a partir del cultivo de nucelas *in vitro*. k. Callo embriogénico obtenido a partir del cultivo de nucelas *in vitro*. l. Híbridos regenerados de clementina ‘Clemenules’ por *P. trifoliata* ‘Benecke’ en los cuales se puede observar las hojas trifoliadas características de *Poncirus*.

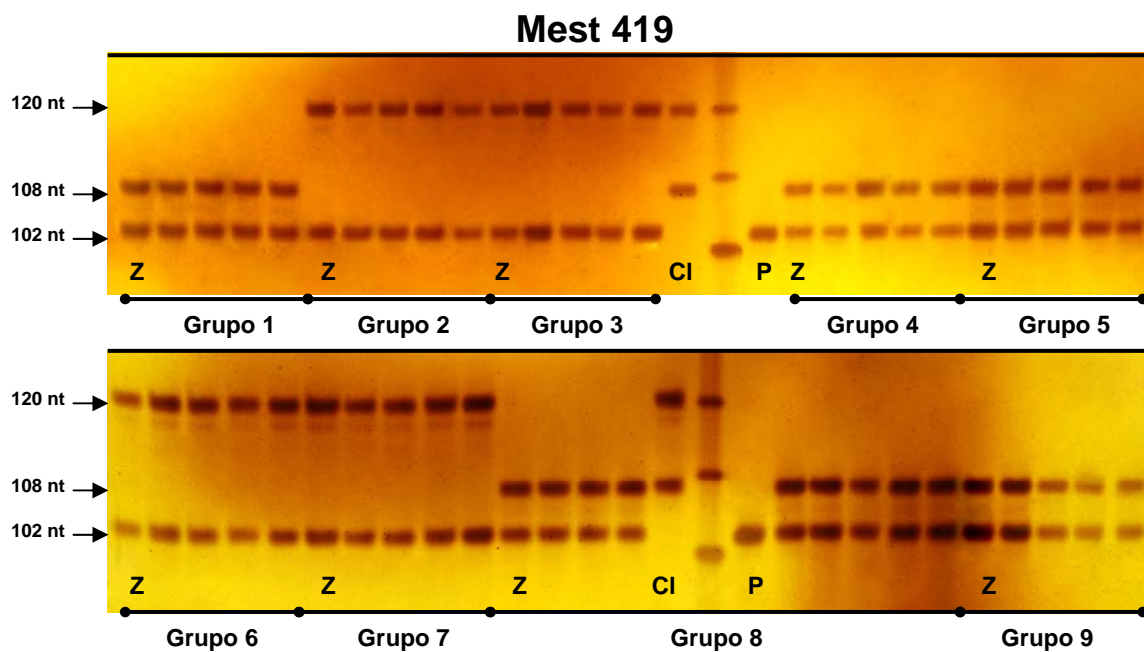


Figura 5.5. Análisis genético de las plantas diploides regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* y de la germinación del embrión zigótico contenido en el interior de la semilla obtenidas en la hibridación entre clementina 'Clemenules' por *P. trifoliata* 'Benecke'. Cada número corresponde a un grupo de plantas. Z. Planta obtenida a partir del embrión zigótico. Las carreras no señaladas corresponden a las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro*. Cl. Clementina 'Clemenules'. P. *P. trifoliata* 'Benecke'.

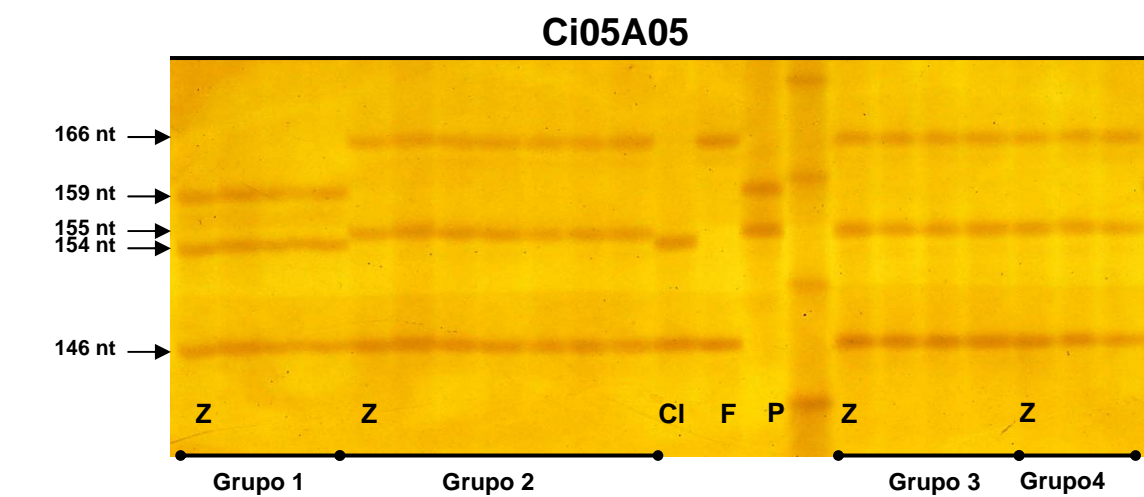


Figura 5.6. Análisis genético de las plantas triploides regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de nucelas y de la germinación del embrión zigótico aislado del interior de la misma obtenidas en las hibridaciones entre clementina 'Clemenules' y mandarino 'Fortune' por *P. trifoliata* 'Benecke'. Cada número corresponde a un grupo de plantas. El grupo 1 corresponde a la hibridación entre Clementina 'Clemenules' por *P. trifoliata* 'Benecke' y los grupos 2, 3 y 4 a la hibridación entre mandarino 'Fortune' por *P. trifoliata* 'Benecke'. Z. Planta obtenida a partir del embrión zigótico. Las carreras no señaladas corresponden a las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro*. Cl. Clementina 'Clemenules'. F. Mandarino 'Fortune'. P. *P. trifoliata* 'Benecke'.



Figura 5.7. Corte histológico de una semilla obtenida en una polinización entre clementina `Clemenules´ por *P. trifoliata* `Benecke´ fijada al cabo de 80 días de haber realizado la polinización. Te. tegumento exterior, Ti. tegumento interior, n. nucela, Ed. embrión dominante y Es. embriones secundarios.

Capítulo 6. Identificación varietal de híbridos triploides de cítricos mediante marcadores microsatélites

CAPÍTULO 6. IDENTIFICACIÓN VARIETAL DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES DE CÍTRICOS MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES.

6.1 INTRODUCCIÓN.

En la Oficina Española de Variedades Vegetales (OEVV) coexisten dos instituciones jurídicas íntimamente relacionadas, el Registro de Variedades Comerciales y el Registro de Variedades Protegidas. Estos dos Registros de Variedades conforman un sistema por el que se reconocen derechos de propiedad y permisos de comercio, y se armonizan los derechos de los obtentores, los productores, los agricultores y los consumidores (MAPA, 2008). Para que una variedad sea inscrita en el Registros de Variedades Comerciales debe de ser distinta, estable y uniforme en comparación con las variedades de la colección de referencia, mientras que para inscribirla en el Registro de Variedades Protegidas, además debe de ser nueva. En el ámbito de la Unión Europea, en Angers (Francia), se encuentra la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (OCVV) cuya función es similar a su homóloga en España pero a nivel europeo.

Se considera que una variedad es distinta cuando es posible diferenciarla claramente de cualquier otra variedad cuya existencia sea notoria. Se considera uniforme cuando presenta una uniformidad suficiente en la expresión de las características de la misma incluidas en el examen de su carácter distintivo así como de aquellas que se utilicen en la descripción de la variedad. Se considerará estable cuando la expresión de las características de la misma incluidas en el examen de su carácter distintivo así como aquellas que se utilizan en la descripción de la variedad, no sufre alteración alguna tras una propagación reiterada o, cuando se dé un ciclo de propagación particular, al final de dichos ciclos. Para que una variedad se considere nueva, es preciso que, en la fecha de presentación de la solicitud los componentes de la variedad o el material cosechado de dicha variedad no hayan sido vendidos o cedidos a terceros por el obtentor para fines de explotación de la variedad.

Los exámenes técnicos de identificación realizados para la determinación de las características de distinción, homogeneidad, estabilidad y novedad se realizan siguiendo los protocolos establecidos por la OEVV para cada especie o en el caso de que no existiera mediante la aplicación de los caracteres recogidos en descriptores internacionales de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). En el caso de los mandarinos el descriptor utilizado es el correspondiente a la UPOV, documento CPVO-TP/201/1. Estos descriptores se basan exclusivamente en parámetros morfológicos y no incluyen parámetros obtenidos mediante técnicas bioquímicas y moleculares. Actualmente la UPOV está considerando la posibilidad de usar marcadores moleculares en el examen de distinción, uniformidad y estabilidad.

La UPOV, en sus "Directrices para los perfiles de ADN: selección de marcadores moleculares y creación de base de datos" de 17 de agosto de 2007 tiene el propósito de abordar la creación de bases de datos de perfiles moleculares de variedades en laboratorios diferentes y mediante el empleo de tecnologías diferentes. Ello demanda una elevada calidad de los marcadores moleculares y exige que los datos obtenidos puedan reproducirse en distintas situaciones con equipos y reactivos

químicos posiblemente diferentes. Los criterios más importantes para seleccionar una metodología de marcadores moleculares son: reproducibilidad, poder de discriminación, capacidad de ser repetidos en el tiempo, posibilidad de creación de bases de datos y accesibilidad a la metodología. Estos criterios limitan los tipos de técnicas moleculares que se pueden utilizar. Los marcadores microsatélites y los SNP son técnicas que cumplen los requisitos antes mencionados y además son adecuadas para la definición de los perfiles de ADN de las variedades vegetales. También pueden ser analizadas con secuenciadores automáticos de ADN de electroforesis capilar que permiten analizar varios *locus* microsatélites o SNP al mismo tiempo (multiplexión). Así mismo, los marcadores moleculares CAPS y SCAR posiblemente también pueden satisfacer los criterios de codominancia y reproducibilidad mencionados anteriormente, pero su empleo en la definición de los perfiles de ADN de las variedades vegetales no se ha explorado todavía (UPOV, Directrices BMT, 2007).

En este trabajo se estudia la eficiencia de los marcadores de tipo SSR analizados en un secuenciador capilar para la distinción varietal de 14 genotipos de híbridos triploides seleccionados y registrados en la OEVV.

6.2 MATERIAL Y MÉTODOS.

6.2.1 Material vegetal.

Todos los genotipos utilizados pertenecen al banco de Germoplasma del IVIA. Se han utilizado los parentales y los híbridos triploides descritos a continuación:

1. Mandarino `Fortune´ (*Citrus. clementina* x *C. tangerina*).
2. Tangor `Ellendale´ (*C. reticulata* x *C. sinensis*).
3. Tangor `Murcott´ (*C. reticulata* x *C. sinensis*).
4. Mandarino `Kara´ (*C. unshiu* x *C. nobilis*).
5. Mandarino `Común´ (*C. deliciosa* Ten.).
6. Clementinas `Willits - Newcom´ y `Hernandina´ (*C. clementina* Hort. ex Tan.).
7. Tangelo `Orlando´ tetraploide (*C. paradisi* x *C. tangerina*).
8. ForEII 96-023 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)). Híbrido triploide de mandarino `Fortune´ diploide por tangor `Ellendale´ diploide obtenido en 1996, seleccionado en la campaña 2002 - 2003 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en enero de 2008 (Navarro *et al.* 2008c).
9. ForEII 96-058 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)). Híbrido triploide de mandarino `Fortune´ diploide por tangor `Ellendale´ diploide obtenido en 1996, seleccionado en la campaña 2001 - 2002 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en mayo de 2007 (Navarro *et al.* 2007a).
10. ForEII 96-060 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)). Híbrido triploide de mandarino `Fortune´ diploide por tangor `Ellendale´ diploide obtenido en 1996, seleccionado en la campaña 2003 - 2004 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en marzo de 2008 (Navarro *et al.* 2008e).

11. ForMur 96-019 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)). Híbrido triploide de mandarino `Fortune` diploide por tangor `Murcott` diploide obtenido en 1996, seleccionado en la campaña 2002 - 2003 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en enero de 2008 (Navarro *et al.* 2008a).

12. ForMur 96-023 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)). Híbrido triploide de mandarino `Fortune` diploide por tangor `Murcott` diploide obtenido en 1996, seleccionado en la campaña 2004 - 2005 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en enero de 2008 (Navarro *et al.* 2008b).

13. ForMur 96-081 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)). Híbrido triploide de mandarino `Fortune` diploide por tangor `Murcott` diploide obtenido en 1996, seleccionado en la campaña 2003 - 2004 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en junio de 2006 (Navarro *et al.* 2006b).

14. ForMur 96-086 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)). Híbrido triploide de mandarino `Fortune` diploide por tangor `Murcott` diploide obtenido en 1996, seleccionado en la campaña 2001 - 2002 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en octubre de 2007 (Navarro *et al.* 2007g).

15. ForKar 96-037 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x (*C. unshiu* x *C. nobilis*)). Híbrido triploide de mandarino `Fortune` diploide por mandarino `Kara` diploide obtenido en 1996, seleccionado en la campaña 2003 - 2004 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en junio de 2006 (Navarro *et al.* 2006c).

16. ForKar 96-073 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x (*C. unshiu* x *C. nobilis*)). Híbrido triploide de mandarino `Fortune` diploide por mandarino `Kara` diploide obtenido en 1996, seleccionado en la campaña 2003 - 2004 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en octubre de 2007 (Navarro *et al.* 2007e).

17. ForMco 96-082 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x *C. deliciosa*). Híbrido triploide de mandarino `Fortune` diploide por mandarino `Común` diploide obtenido en 1996, seleccionado en la campaña 2002 2003 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en octubre de 2007 (Navarro *et al.* 2007f).

18. For? 95-087 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x ?). Híbrido triploide de mandarino `Fortune` diploide obtenido en 1995 por polinización abierta en las fases iniciales del programa en la puesta a punto de la metodología de cultivo *in vitro* utilizada para la obtención de híbridos triploides. Seleccionado en la campaña 2001 - 2002 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en octubre de 2007 (Navarro *et al.* 2007c).

19. For? 95-097 ((*C. clementina* x *C. tangerina*) x ?). Híbrido triploide de mandarino `Fortune` diploide obtenido en 1995 por polinización abierta en las fases iniciales del programa en la puesta a punto de la metodología de cultivo *in vitro* utilizada para la obtención de híbridos triploides. Seleccionado en la campaña 2002 - 2003 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en octubre de 2007 (Navarro *et al.* 2007d).

20. Cwn? 95-001 (*C. clementina* x ?). Híbrido triploide de clementina `Willits Newcom` diploide obtenido en 1995 por polinización abierta en las fases iniciales del programa en la puesta a punto de

la metodología de cultivo *in vitro* utilizada para la obtención de híbridos triploides. Seleccionado en la campaña 2001 - 2002 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en agosto de 2007 (Navarro *et al.* 2007b).

21. HerOrIT 97-047 (*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)). Híbrido triploide de clementina 'Hernandina' diploide por tangelo 'Orlando' tetraploide obtenido en 1997, seleccionado en la campaña 2004 - 2005 y presentado al Registro de Variedades Protegidas en enero de 2008 (Navarro *et al.* 2008d).

6.2.2 Análisis genético.

La extracción del ADN genómico se realizó según Dellaporta y Hicks (1983). Los híbridos triploides junto con los parentales se analizaron genéticamente con 15 *loci* microsatélites heterocigóticos para clementina y mandarino 'Fortune' (Kijas *et al.* 1997; Froelicher *et al.* 2008; Luro *et al.* 2008). Los *loci* microsatélites utilizados se encuentran distribuidos en los 6 grupos de ligamiento más saturados según el mapa genético descrito por Luro *et al.* (2007).

El análisis genético se realizó en un Analizador Genético Automático CEQ™ 800 de Beckam Coulter mediante electroforesis capilar inducida por un láser de fluorescencia (EC – LIF) que permite una resolución de una base en fragmentos de 500 nt. El Analizador Genético consta de dos fuentes láseres de diodos de 650 y 750 nm que excitan cuatro dideoxi terminadores – fluorescentes, generando electroferogramas en los que se pueden observar picos definidos en el eje de abscisas por el tiempo, en minutos, en el cual el fragmento de ADN fue detectado y en el eje de ordenadas por la intensidad de fluorescencia del mismo. Los electroferogramas obtenidos son analizados con el software GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System que determina el tamaño, la altura y el área correspondiente a cada fragmento analizado y permite identificar los alelos correspondientes a cada *locus* microsatélite.

El análisis de los *loci* microsatélites en el Analizador Genético Automático CEQ™ 800 requiere una reacción de PCR, en la cual, el cebador directo incorpora un fluoróforo marcado con fluorescencia mientras que el cebador reverso queda intacto. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Termocycler ep gradient S de Eppendorf, en un volumen final de 15 µL. Cada reacción estaba compuesta por tampón de reacción 750 mM Tris HCl (pH 9) 50 mM KCl 200 mM (NH₄)₂SO₄ 0,001 % BSA, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP premezclados, 0,2 µM de cada cebador, 0,8 unidades de Taq polimerasa (Fermentas) y 10 ng de ADN.

Se utilizó el programa de PCR descrito en el Capítulo 1 apartado 1.2.7. El producto de PCR obtenido se diluyó 40 X, 80 X y 160 X, en SLS (GenomeLab™ Sample Loading Solution), para el Dye 2, Dye 3 y Dye 4 respectivamente. El marcador de tamaño molecular utilizado fue el GenomeLab™ DNA Size Standard Kit 400. Las condiciones de electroforesis empleadas fueron: desnaturalización a 90 °C durante 2 min, voltaje de inyección 2,0 Kv durante 30 s, voltaje de separación 6,0 Kv durante 35 min a temperatura constante de 50 °C, correspondientes al método fragment 3 incorporado por el aparato. El tampón de electroforesis utilizado fue el GenomeLab™ Separation Buffer.

6.2.3 Determinación de la dosis alélica.

En genotipos diploides la amplificación mediante PCR de los diferentes alelos correspondientes a un *locus* microsatélite no tienen la misma eficiencia por lo que para poder determinar la dosis alélica en genotipos triploides es necesario realizar una corrección relativa respecto al área de los picos del parental femenino. Se calculó la dosis alélica utilizando los datos de área de cada pico correspondientes a los alelos del *locus* microsatélite considerado. La dosis alélica se determinó mediante la aplicación de la fórmula 1, siendo D_{1b} la dosis del alelo 1 en la muestra b, D_{2b} la dosis del alelo 2 en la muestra b, A_{1b} el área del pico del alelo 1 en la muestra b, A_{2b} el área del pico del alelo 2 en la muestra b, A_{2a} el área del pico del alelo 2 en la muestra a y A_{1a} el área del pico del alelo 1 en la muestra a. La muestra a se refiere al genotipo diploide utilizado como parental femenino.

$$\frac{D_{1b}}{D_{2b}} = \frac{A_{1b}}{A_{2b}} \times \frac{A_{2a}}{A_{1a}}$$

Fórmula 1.

6.2.4 Clasificación de los genotipos en función de sus disimilaridades genéticas.

Las distancias genéticas se calcularon sin considerar las dosis alélicas y considerándolas. Cuando no se consideró la dosis alélica, se construyó una matriz de disimilaridad aplicando el coeficiente de disimilaridad de Dice (formula 2), siendo, a el número de bandas comunes en ambos genotipos; b el número de bandas presentes en el genotipo i y ausentes en el genotipo j; c el número de bandas ausentes en el genotipo i y presentes en el genotipo j.

$$d(i,j) = \frac{b + c}{2a + b + c}$$

Fórmula 2.

Posteriormente, se construyó un dendrograma mediante el método Weighted Neighbor Joining, donde se representan gráficamente las distancias genéticas entre todos los genotipos.

Cuando se consideraron las dosis alélicas, se construyó una matriz de disimilaridad considerando las variables continuas y calculando la distancia euclídea (formula 3) siendo k el número de *loci* microsatélites utilizados, x_{ik} el valor para el *locus* K del genotipo i y x_{jk} el valor del genotipo j para el *locus* K.

$$d(i, j) = \sqrt{\sum_1^k (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

Fórmula 3.

El dendrograma se construyó de la misma forma que el descrito anteriormente.

Todos estos cálculos fueron realizados con el programa informático DARwin V.5.0.155, (Perrier *et al.* 2003; Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006).

6.2.5 Determinación de la heterocigosidad parental, coeficiente de diversidad de Nei, poder de discriminación y restitución de la heterocigosidad materna.

La heterocigosidad materna se determinó en mandarino 'Fortune' y la heterocigosidad paterna se calculó en los mandarinos 'Común' y 'Kara' y en los tangors 'Murcott' y 'Ellendale'. La heterocigosidad paterna (H_p) se determinó como el cociente entre el número de parentales heterocigóticos para el *locus* considerado y el número de parentales.

La diversidad genética se calculó mediante el coeficiente de la diversidad de Nei y Li (1973) (fórmula 4). H_t es la diversidad total en donde x_i es la frecuencia del alelo i en la población paterna y n es el número de alelos para el *locus* considerado. En este caso, H_s representa la diversidad intragenotípica y es la mitad de la heterocigosidad.

$$D_{st} = H_t - H_s$$

$$H_t = 1 - \sum_{i=1}^n x_i^2$$

$$H_s = \frac{1}{2} H_p$$

Fórmula 4.

El poder de discriminación se calculó como el número de genotipos producidos por un determinado *locus* dividido entre el número de individuos considerados.

El porcentaje de restitución de la heterocigosidad materna se calculó, en los híbridos triploides de mandarino 'Fortune' con parental masculino conocido, como el cociente entre el número de genotipos con heterocigosidad materna y el número de individuos considerados.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.3.1 Estimación de la dosis alélica.

Teóricamente la determinación de la dosis alélica permite distinguir genotipos triploides que no sería posible diferenciar en geles de acrilamida puntuando por presencia o ausencia de banda. Si realizamos un análisis genético con *loci* microsatélites independientes considerando la dosis alélica, el poder de discriminación teórico es mucho más elevado que si no se considera la dosis alélica (tabla 6.1). Como ejemplo, a partir de 10 *loci* microsatélites heterocigóticos para el parental productor de gametos no reducidos que comparta un alelo de cada *locus* microsatélite con el parental productor de gametos reducidos, considerando la dosis alélica, teóricamente se podrían identificar 6^{10} (60.466.176) genotipos diferentes mientras que sin considerar la dosis se distinguirían 5^{10} (9.765.625), es decir el poder de discriminación aumentaría 6 veces.

La determinación de la dosis alélica de una forma precisa requiere la realización de reacciones de PCR que no produzcan artefactos ni amplificaciones inespecíficas que dificulten la

interpretación de los resultados. En la tabla 6.2 se muestran el área y altura de los picos correspondientes a los alelos específicos del *locus* microsatélite Ci02D09 obtenidos al analizar genéticamente los parentales e híbridos triploides en dos reacciones de PCR independientes. Estos resultados confirman que el tamaño de los alelos y las proporciones obtenidas para el área y altura entre los diferentes picos correspondientes a los alelos del *locus* Ci02D09 se mantienen constantes entre dos reacciones de PCR diferentes, lo que permite utilizar el analizador genético como una herramienta válida para poder estimar las dosis alélicas de híbridos triploides de cítricos. Además el analizador es capaz de generar electroferogramas en los cuales es muy fácil diferenciar, sin lugar a dudas, las dosis correspondientes a los diferentes alelos (figura 6.1). Chen *et al.* (2008) analizando con marcadores microsatélites híbridos triploides de *C. sinensis* x *P. trifoliata* con un cromatógrafo ABI (Applied Biosystems) también determinaron la dosis alélica de los híbridos triploides en función de la altura de los picos obtenidos en cada alelo.

6.3.2. Identificación varietal.

Los resultados obtenidos para cada *locus* microsatélite se muestran en las tablas 6.3.a y 6.3.b. El número de alelos obtenidos en los 15 *loci* microsatélites analizados fue de 58, oscilando entre 2 en los *loci* Ci05A04 y Mest 431 y 6 en el *locus* Ci08C05. Se demuestra claramente que todos los genotipos analizados son híbridos en los que se puede observar la segregación de los alelos correspondientes a los parentales para cada *locus* microsatélite y la dosis de cada alelo en los híbridos triploides analizados.

Se comparó la capacidad de discriminación de los *loci* microsatélites considerando y sin considerar la dosis alélica. Como ejemplo, para el *locus* Mest 123 sin considerar la dosis alélica es posible diferenciar 5 grupos mientras que considerando la dosis alélica se distinguieron 8 grupos (figuras 6.2 y 6.3). El número mínimo de marcadores microsatélites necesario para poder diferenciar todos los genotipos considerando la dosis alélica es de 3, *loci* Ci08C05, Ci06B07 y Ci07F11, mientras que, si no se considera la dosis por lo menos es necesario analizar un *locus* microsatélite más para poder diferenciar todos los genotipos (figuras 6.4 y 6.5). Por lo tanto, la determinación de la dosis alélica aumenta la capacidad de discriminación de los marcadores microsatélites la cual permite realizar estudios genéticos más precisos de genotipos triploides de cítricos.

Los parámetros principales que afectan a la eficiencia en el poder de discriminación de cada marcador microsatélite son: (i) heterocigosidad de los parentales que permita distinguir entre familias diferentes, (ii) la diversidad interparental que presenta una fuerte contribución en la diferenciación entre familias y (iii) el porcentaje de restitución de la heterocigosidad materna (asociada con la posición del *locus* considerado respecto al centrómero en caso de hibridaciones 2x X 2x). Este último parámetro afecta negativamente en la diferenciación entre familias si el valor obtenido es demasiado alto.

En la tabla 6.4 se muestran los resultados obtenidos sobre la heterocigosidad de los parentales, coeficiente de la diversidad genética de Nei, poder de discriminación considerando la dosis alélica y porcentaje de restitución de la heterocigosidad de los diferentes híbridos triploides de

mandarino `Fortune` con los parentales masculinos mandarino `Común`, mandarino `Kara` y de los tangors `Ellendale` y `Murcott`. De los 15 *loci* microsatélites utilizados, todos excepto los *loci* Mest 458, Ci02D04b y Mest 431 fueron heterocigóticos para mandarino `Fortune`. Los *loci* que presentaron una mayor heterocigosidad paterna fueron TAA 15 y Mest 15 mientras que el *locus* Ci05A04 presentó el menor valor (0,25). El poder de discriminación osciló entre el 17 y el 58 %. El número reducido de híbridos analizados no permite hacer un análisis fino de las relaciones entre los diferentes parámetros. Así mismo, se puede observar que los valores mas pequeños de restitución de la heterocigosidad, obtenidos en los *loci* microsatélites Ci07D06 y Ci08C05, están asociados con los valores máximos de poder de discriminación mientras que el *locus* que presentó una restitución completa de la heterocigosidad materna (Ci06A12) produce una discriminación varietal baja como también ocurre en los *loci* Ci05A05 y Mest 431 homocigóticos para mandarino `Fortune`. Por lo tanto, en la selección de marcadores microsatélites para la identificación varietal en familias de híbridos triploides obtenidos por hibridaciones 2x X 2x es necesario considerar la heterocigosidad materna y la posición del *locus* microsatélite respecto al centrómero.

En los híbridos triploides analizados, los *loci* TAA15, Ci08C05 y Ci07D06 fueron los que mostraron un mayor poder de discriminación, por lo que son *loci* muy interesantes para la identificación varietal.

La UPOV en sus directrices "Directrices para los perfiles de ADN: selección de marcadores moleculares y creación de una base de datos" establece los criterios generales que deben reunir los marcadores moleculares para poder elaborar bases de datos de referencia. Estas directrices establecen que los marcadores deben poseer un nivel de polimorfismo alto, repetibilidad y reproducibilidad entre laboratorios diferentes, distribución conocida de los marcadores en el genoma y evitar, en la medida de lo posible, la presencia de alelos nulos. Los resultados obtenidos en el análisis genético realizado con los 15 *loci* microsatélites cumplen con los requisitos generales propuestos por la UPOV. Estos marcadores presentan un nivel alto de polimorfismo oscilando entre 2 y 6 alelos por *locus* microsatélite considerando un grupo muy reducido de parentales de mandarino. Los datos obtenidos son repetibles y reproducibles como se demuestra en los resultados generados a partir de dos reacciones de PCR independientes para el *locus* microsatélite Ci02D09 y también son reproducibles entre diferentes laboratorios ya que en el Institut National de Reserche Agronomique de San Giuliano, Córcega, disponen del mismo secuenciador que nosotros y los resultados obtenidos allí son iguales a los obtenidos aquí (Ollitrault, comunicación personal). El último criterio propuesto por la UPOV es la ausencia de alelos nulos en los marcadores. En ninguno de los *loci* microsatélites utilizados se observó la presencia de alelos nulos en los genotipos analizados. Por lo tanto, los marcadores microsatélites analizados con un secuenciador automático de electroforesis capilar son una herramienta válida para la elaboración de bases de datos de referencia que permitan caracterizar e identificar los diferentes híbridos de cítricos existentes así como aquellos de nueva creación. En nuestro grupo, se está realizando una extensa base de datos con perfiles moleculares en genotipos triploides de cítricos así como en las diferentes accesiones del banco de Germoplasma del IVIA.

La identificación varietal permitiría defender los derechos del obtentor ante posibles fraudes y establecer un sistema de trazabilidad desde la recolección de los frutos de un determinado híbrido

hasta los puntos de venta y garantizar que el producto final de venta al público realmente es el genotipo correspondiente. Además es una herramienta muy útil en los programas de certificación ya que permite detectar la propagación clandestina de un determinado genotipo y evitar los posibles errores o confusiones en la identificación de un genotipo en el vivero.

Actualmente los marcadores microsatélites están siendo utilizados como una prueba pericial con valor legal en la defensa de los derechos del obtentor (Navarro, comunicación personal).

6.3.3 Estructuración global.

El análisis genético realizado permite diferenciar todos los genotipos entre sí, considerando y sin considerar la dosis alélica, excepto en el caso de las clementinas `Hernandina` y `Willits-Newcom` (figuras 6.6 y 6.7).

En los híbridos triploides obtenidos a partir de hibridaciones entre mandarino `Fortune` por tangor `Murcott`, tangor `Ellendale`, mandarino `Kara` y mandarino `Común` aparecen agrupaciones relacionadas con los parentales masculinos bastante claras en los dendogramas obtenidos, lo que testimonia la importancia de la diversidad interparental en la diferenciación entre familias. Esta agrupación nos da información sobre el origen potencial de un híbrido obtenido a partir de hibridaciones no controladas. De los dos híbridos triploides obtenidos con mandarino `Fortune` como parental femenino y parental masculino desconocido, For? 95-087 y For? 95-097, los resultados obtenidos indican que muy probablemente el híbrido triploide For? 95-097 fue originado como consecuencia de la polinización de una flor de mandarino `Fortune` con polen de mandarino `Común` mientras que el parental masculino del híbrido triploide For? 95-087 debió de ser otro genotipo, ya que la segregación de los alelos correspondientes a los *loci* Ci08C05, TAA 15, Mest 458, Mest 123, Mest 15 y Ci07F11 no coinciden con los alelos específicos de mandarino `Común`.

En la agrupación de los híbridos triploides de mandarino `Fortune` de una misma familia en relación con el parental masculino (figuras 6.8.a, 6.8.b y 6.8.c) se observa claramente que las distancias genéticas de los diferentes híbridos triploides de mandarino `Fortune` por tangor `Murcott`, tangor `Ellendale` y mandarino `Kara` son menores en todos los casos respecto al mandarino `Fortune` que respecto a los parentales masculinos. Esta característica permite intuir que los híbridos triploides presentan, como es lógico, distancias genéticas y probablemente fenotípicas menores hacia el parental productor de gametos diploides que respecto al parental productor de gametos haploides. Así mismo, nuestro grupo está realizando estudios genéticos más profundos y detallados que permitan precisar las estructuras genéticas y fenotípicas de las progenies de híbridos triploides obtenidos a partir de hibridaciones $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$.

Las clementinas son un grupo de variedades de mandarino que se originaron como consecuencia de mutaciones espontáneas. Bretó *et al.* (2003) proponen que los elementos transponibles pueden desempeñar un papel importante como fuente de variación en los cítricos y especialmente en las clementinas. El desarrollo de marcadores moleculares asociados a elementos transponibles (IRAP, Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism y REMAP, Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) podría ser más adecuado (Asins *et al.* 1999; Bernet y Asins,

2003). Otra estrategia puede ser la identificación de SNP que permitiría el desarrollo de marcadores muy fiables.

6.4 CONCLUSIONES.

Los marcadores microsatélites permiten diferenciar todos los genotipos triploides analizados y la determinación de la dosis alélica aumenta la capacidad de discriminación de los mismos lo que permite aplicar un menor número de marcadores para poder identificar diferentes híbridos triploides de mandarino. Estos marcadores cumplen con las directrices de la UPOV y son muy eficientes en la distinción de híbridos triploides de cítricos.

Tabla 6.1. Diferencias teóricas en la capacidad de discriminación máxima suponiendo 10 loci microsatélites independientes considerando y sin considerar la dosis alélica.

Parental productor de gametos reducidos	Parental productor de gametos no reducidos			
	Locus heterocigótico		Locus homocigótico	
Locus heterocigótico ^a	Con dosis	Sin dosis	Con dosis	Sin dosis
	Nº teórico de genotipos identificables			
0	60.466.176	60.466.176	1.024	1.024
1	60.466.176	9.765.625	1.024	1.024
2	1.048.576	59.049	-	-
Locus homocigótico ^a				
0	59.049	59.049	1	1
1	59.049	1.024	1	1

a. 0,1 y 2 indican el número de alelos compartidos entre los parentales.

Tabla 6.2. Proporciones de las áreas y alturas de los picos correspondientes a los alelos específicos del locus microsatélite Ci02D09 correspondientes a dos reacciones independientes de PCR y resolución de fragmentos en el Analizador Genético Automático CEQTM 800 de Beckam Coulter.

Genotipos	Proporciones área PCR 1			Proporciones área PCR 2			Proporciones altura PCR 1			Proporciones altura PCR 2		
	248/256	248/254	254/256	248/256	248/254	254/256	248/256	248/254	254/256	248/256	248/254	254/256
Hernandina	1,1			1,1			1,0			1,0		
M. Comun			1,2			1,3			1,2			1,2
Willits.Newcom	1,2			1,3			1,2			1,2		
Kara		1,3			1,4			1,3			1,3	
Fortune	0,9			1,1			0,9			1,1		
ForMur 96-086	2,6			2,4			2,4			2,4		
ForEll 96-023	1,9			1,6			1,7			1,4		
ForKar 96-073	2,3			2,1			2,2			2,2		
ForMur 96-023	2,1			2,4			1,9			2,2		
ForMco 96-082	2,7			2,7			2,7			2,7		
Cwn? 95-001	2,5			2,1			2,1			1,9		
ForMur 96-081	2,7			2,7			2,7			2,7		
ForEll 96-060	2,1			2,2			1,9			2,1		
ForEll 96-058	2,1			2,5			1,9			2,4		

Tabla 6.3.a. Análisis genético de los parentales e híbridos triploides seleccionados con marcadores microsatélites.

Locus	Parentales							Híbridos triploides													
	For	EII	Mur	Kar	Mco	Cle	Orl 4x	ForEII 96-023	ForEII 96-058	ForEII 96-060	ForMur 96-019	ForMur 96-023	ForMur 96-081	ForMur 96-086	ForKar 96-037	ForKar 96-073	ForMco 96-082	For? 95-087	For? 95-097	Cwn? 95-001	HerOrIT 97-047
Ci06A12	96	96	96	96	96	96	96	96-96	96-96	96-96	96-96	96-96	96-96	96-96	96-96	96-96	96	96	96	96-96	96-96
					100												100	100	100		
	102	102				102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102
Ci08C05				151																	
	157		157				157	157-157		157-157	157-157	157-157	157-157	157		157		157-157-157	157		157-157
					165												165				
	175				175	175			175-175		175	175	175	175-175	175-175	175	175-175		175-175	175-175-175	175
	179		179					179	179	179				179	179						
Ci02D09	248	248	248	248	254	248	248	248-248	248-248	248-248	248-248-248	248-248	248-248	248-248	248-248-248	248-248	248-248	248	248	248-248	248-248-248
				254	254													254	254		
	256				256	256		256	256	256		256	256	256		256	256	256	256	256	
Ci05A04			264	264	264	264	264				264	264	264	264	264	264	264	264	264	264	264-264
	268	268			268	268		268-268-268	268-268-268	268-268-268	268-268	268-268	268-268	268-268	268-268	268-268	268-268	268-268	268-268	268-268	268
Ci05A05	144				144	144		144		144		144	144	144	144	144	144-144	144	144-144	144	
		152	152	152	152	152	152				152	152	152	152	152	152				152-152	152-152
	162	162			162		162	162-162	162-162-162	162-162	162-162	162	162	162	162	162	162	162-162	162		162
Ci06B07					102																
		105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105				105-105-105	105-105
	107			107	107	107		107		107	107	107	107	107	107	107	107-107-107	107	107-107-107	107-107-107	
	109					109	109	109-109	109	109	109	109	109	109	109	109					109
TAA 41	138	138				138	138-138	138	138-138	138-138	138-138	138	138	138	138-138	138	138	138	138	138	138-138
	148			148	148	148		148	148	148		148	148	148	148	148	148-148	148-148	148-148	148-148	148-148
			154			154	154					154	154	154	154					154	154
		152		152													152				
TAA 15								164	164	164											
				186											186	186					
			188	188		188	188				188-188	188						188		188-188	188-188
	192				192	192		192	192	192		192	192-192	192-192	192	192	192-192		192		192
204	204	204		204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204-204	204-204	204	204	

Los números escritos en cada celda indican el tamaño en nucleótidos (nt) de los dos alelos correspondientes a cada locus microsatélite.

Tabla 6.3.b. Análisis genético de los parentales e híbridos triploides seleccionados con marcadores microsatélites.

LOCUS	Parentales							Híbridos triploides														
	For	Ell	Mur	Kar	Mco	Cle	Orl 4x	ForEII 96-023	ForEII 96-058	ForEII 96-060	ForMur 96-019	ForMur 96-023	ForMur 96-081	ForMur 96-086	ForKar 96-037	ForKar 96-073	ForMco 96-082	For? 95-087	For? 95-097	Cwn? 95-001	HerOrIT 97-047	
Mest 458					209													209				
	215	215	215		215	215	215	215-215-215	215-215-215	215-215-215	215-215-215	215-215	215-215	215-215-215	215-215	215-215	215-215-215	215-215	215-215	215-215-215	215-215-215	215-215-215
			227	227			227					227	227		227	218		227				
Ci07D06	166					166			166			166	166-166		166-166	166-166	166-166		166	166-166-166		
					178														178			
	188	188		188	188	188	188	188-188-188	188-188	188-188-188	188-188	188	196	196	188-188		188	188-188-188	188			188
Mest 123			254		254	254	254	254	254	254	254-254	254	254	254-254	254	254	254-254	254	254-254		254-254	254-254
			260	260								260	260					260-260				
				270																		
Ci03G05	280	280			280	280	280	280-280	280-280	280-280	280	280	280-280	280	280	280	280		280	280-280-280		280
	199						199	199	199	199-199	199	199-199	199	199	199	199	199	199	199	199	199	199
		227	227	227	227	227					227	227	227		227				227	227	227-227	227
Mest 15	229	229	229		229	229	229	229-229	229-229	229	229		229	229-229	229	229	229-229	229	229			229
		173	173	173			173	173	173		173	173	173		173	173						173
	182					182		182	182	182	182	182	182	182	182	182	182		182	182-182-182		182
Ci07F11	185				185	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185	185-185	185	185-185	185-185	185
		188	188	188						188				188				188				
					191												191					
Mest 431				146																		
	152				152	152		152	152		152		152-152	152-152	152	152	152-152	152	152-152	152-152-152		152
		160	160	160		160	160		160	160	160	160			160	160		160				160
Mest 431		162						162	162													
	164		164		164		164	164	164	164-164	164	164-164	164	164	164	164	164	164	164	164		164
	312	312	312	312	312	312	312	312-312	312-312	312-312	312-312-312	312-312-312	312-312-312	312-312-312	312-312	312-312	312-312-312	312-312-312	312-312-312	312-312-312	312-312-312	312-312-312
	323		323				323	323	323					323	323							

Los números escritos en cada celda indican el tamaño en nucleótidos (nt) de los dos alelos correspondientes a cada locus microsatélite.

Tabla 6.4. Heterocigosidad de los parentales, diversidad de Nei, poder de discriminación considerando la dosis alélica y porcentaje de restitución de la heterocigosidad maternal en los híbridos triploides de mandarino 'Fortune' analizados.

Locus	Heterocigosidad materna^a	Heterocigosidad paterna	Diversidad de Nei	Poder de discriminación	% restitución heterocigosidad
Ci06A12	1	0,50	0,26	17	100
Ci08C05	1	0,50	0,53	58	50
Ci02D09	1	0,50	0,36	25	80
Ci05A04	0	0,25	0,36	17	-
Ci05A05	1	0,50	0,36	42	80
Ci06B07	1	0,50	0,36	25	70
TAA 41	1	0,50	0,48	33	90
TAA 15	1	1,00	0,34	58	90
Mest 458	0	0,75	0,32	33	-
Ci07D06	1	0,50	0,36	58	30
Mest 123	1	0,75	0,36	33	90
Ci03G05	1	1,00	0,09	42	80
Mest 15	1	1,00	0,19	50	90
Ci07F11	1	1,00	0,25	42	80
Mest 431	0	0,50	0,21	17	-

a. El número 1 se refiere a aquellos *loci* microsatélites heterocigóticos en mandarino 'Fortune' y 0 a los *loci* homocigóticos.

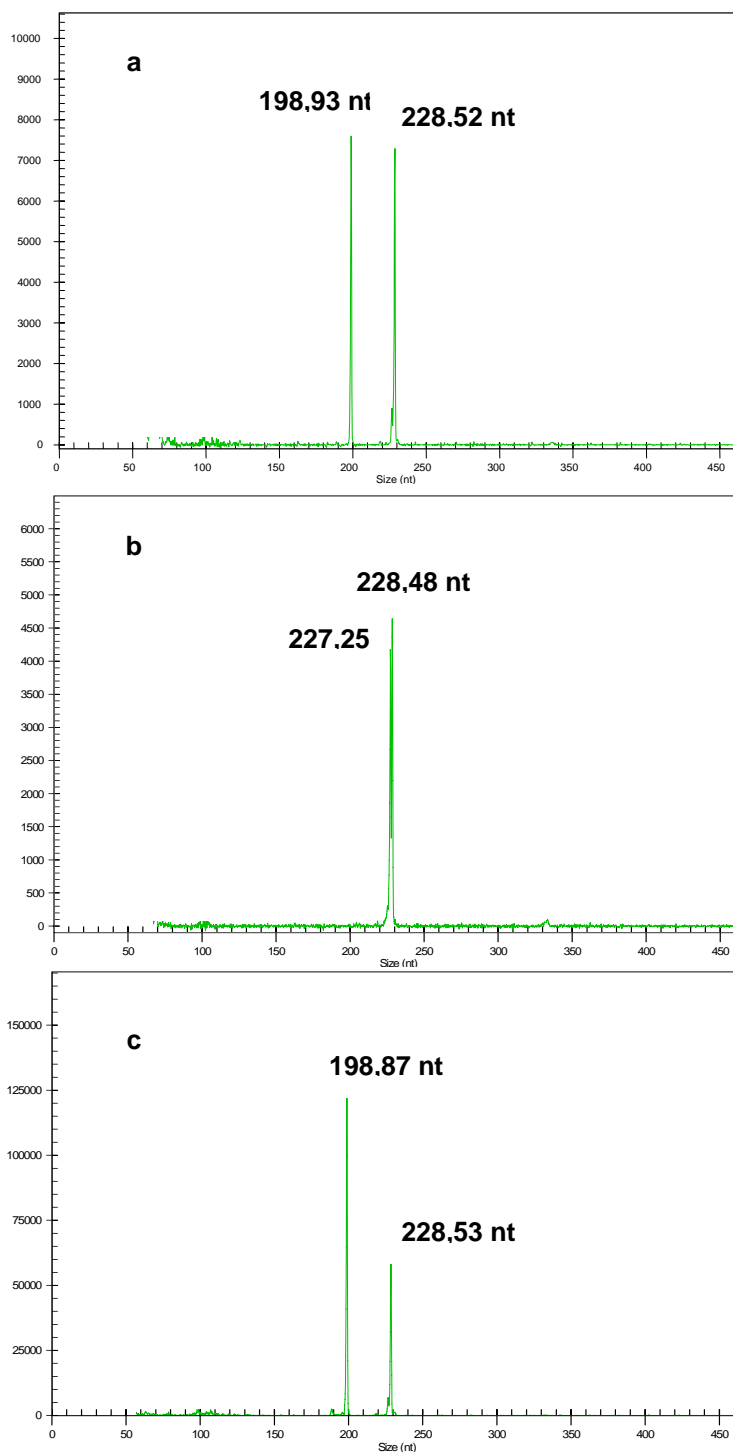


Figura 6.1. Electroferogramas correspondientes al análisis genético realizado con el locus microsatélite Ci03G05 en mandarino `Fortune` (a), tangor `Ellendale` (b) y el híbrido triploide ForEII 96-060 (c).

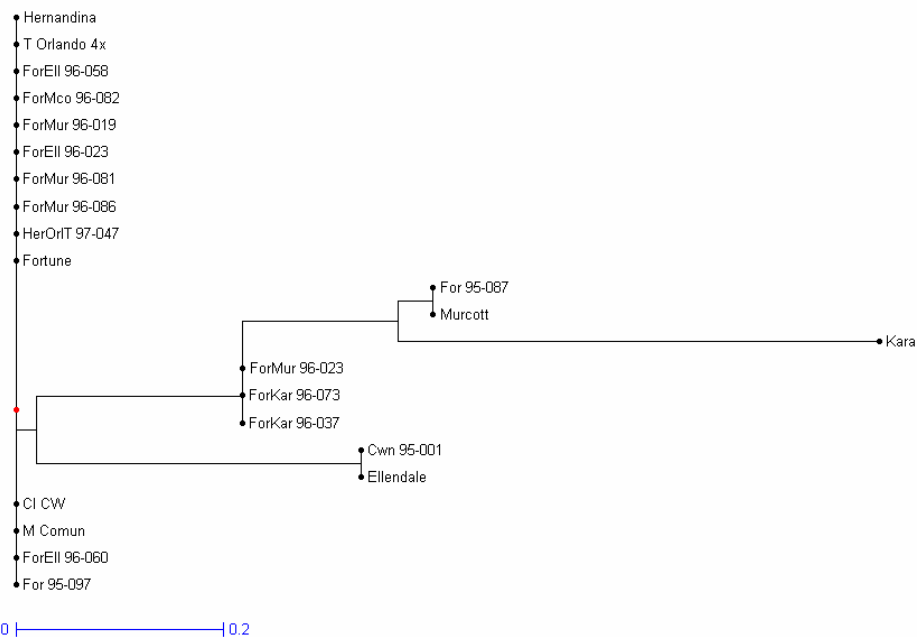


Figura 6.2. Dendrograma correspondiente al análisis genético realizado con el *locus* microsatélite Mest 123 sin considerar la dosis alélica obtenido mediante el cálculo del coeficiente de similitud de Dice y construcción del árbol mediante el método Weighted Neighbor – Joining.

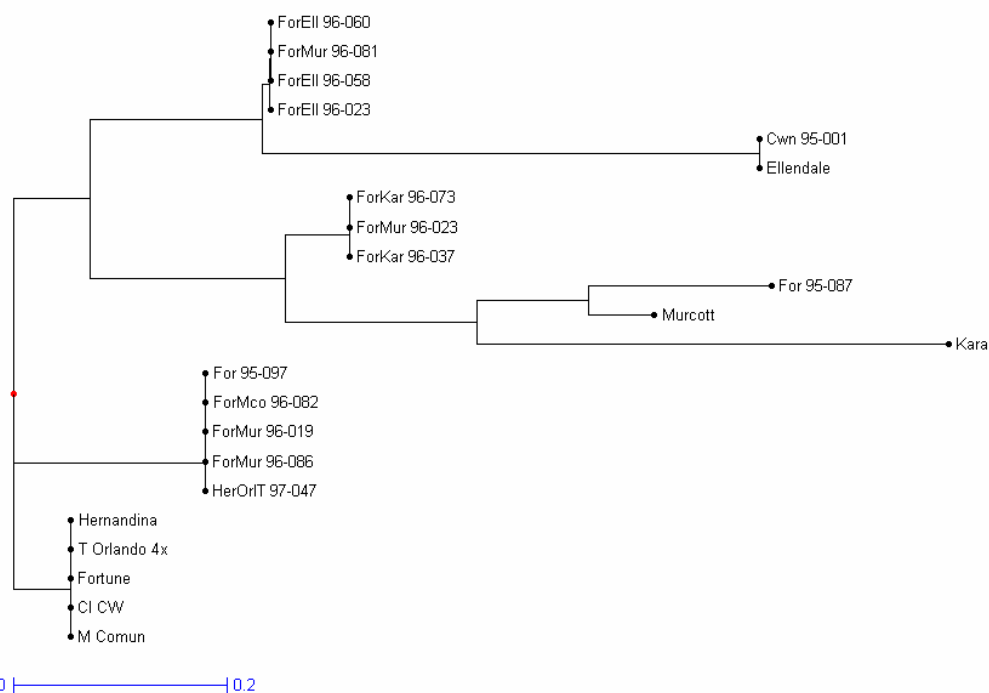


Figura 6.3. Dendrograma correspondiente al análisis genético realizado con el *locus* microsatélite Mest 123 considerando la dosis alélica obtenido mediante el cálculo de la distancia euclídea y construcción del árbol mediante el método Weighted Neighbor – Joining.

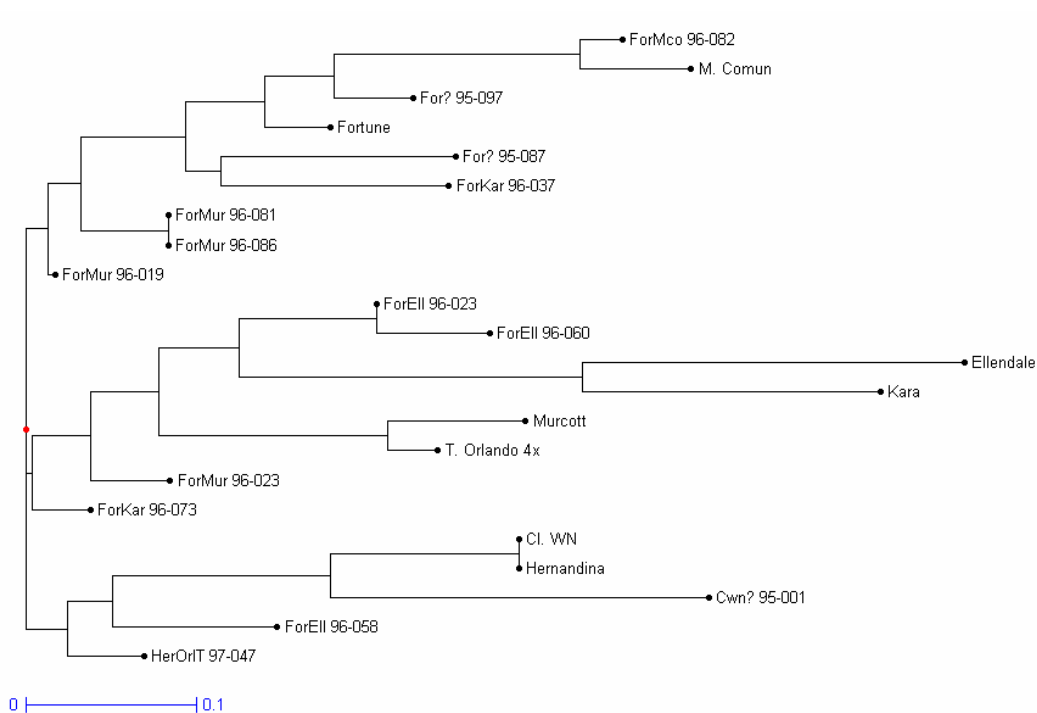


Figura 6.4. Dendrograma correspondiente al análisis genético realizado con los *loci* microsatélites Ci08C05, Ci06B07 y Ci07F11 sin considerar la dosis alélica obtenido mediante el cálculo del coeficiente de disimilitud de Dice y construcción del árbol mediante Weighted Neighbor – Joining.

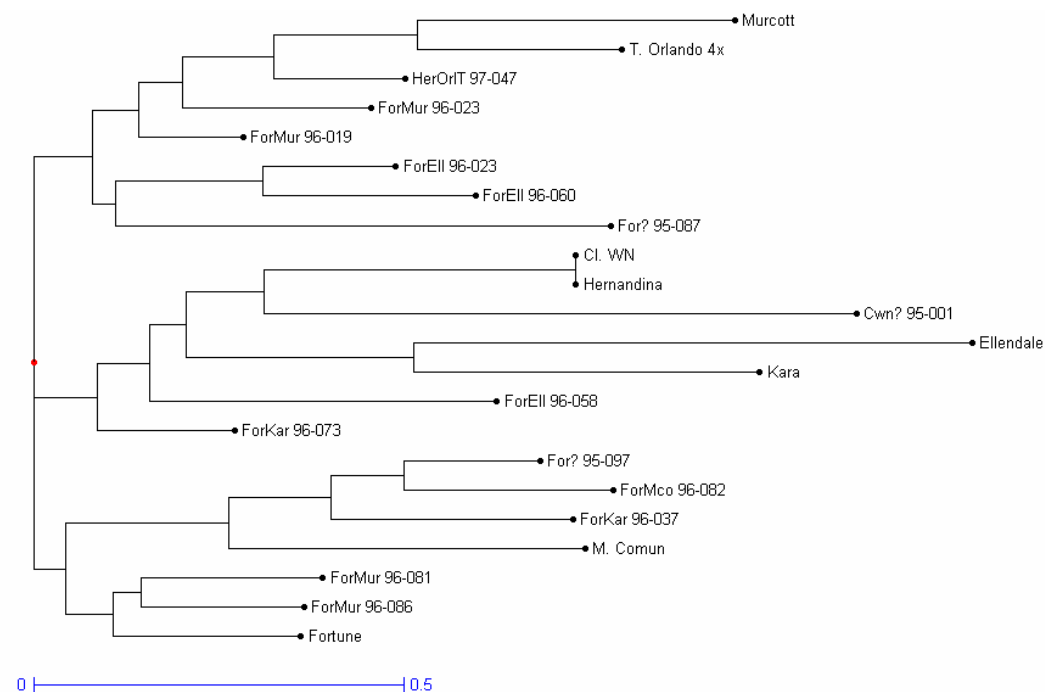


Figura 6.5. Dendrograma correspondiente al análisis genético realizado con los *loci* microsatélite Ci08C05, Ci06B07 y Ci07F11 considerando la dosis alélica obtenido mediante el cálculo de la distancia euclídea y construcción del árbol mediante Weighted Neighbor – Joining.

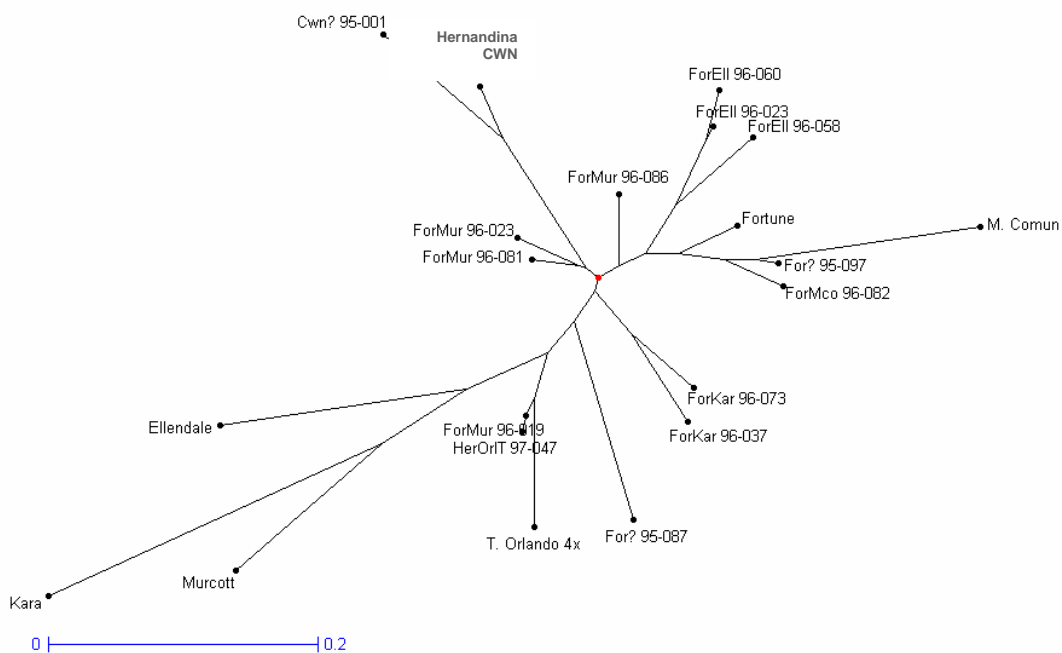


Figura 6.6. Dendrograma correspondiente al análisis genético realizado con marcadores microsatélites sin considerar la dosis alélica obtenido mediante el cálculo de la distancia euclídea y construcción del árbol mediante el método Weighted Neighbor – Joining.

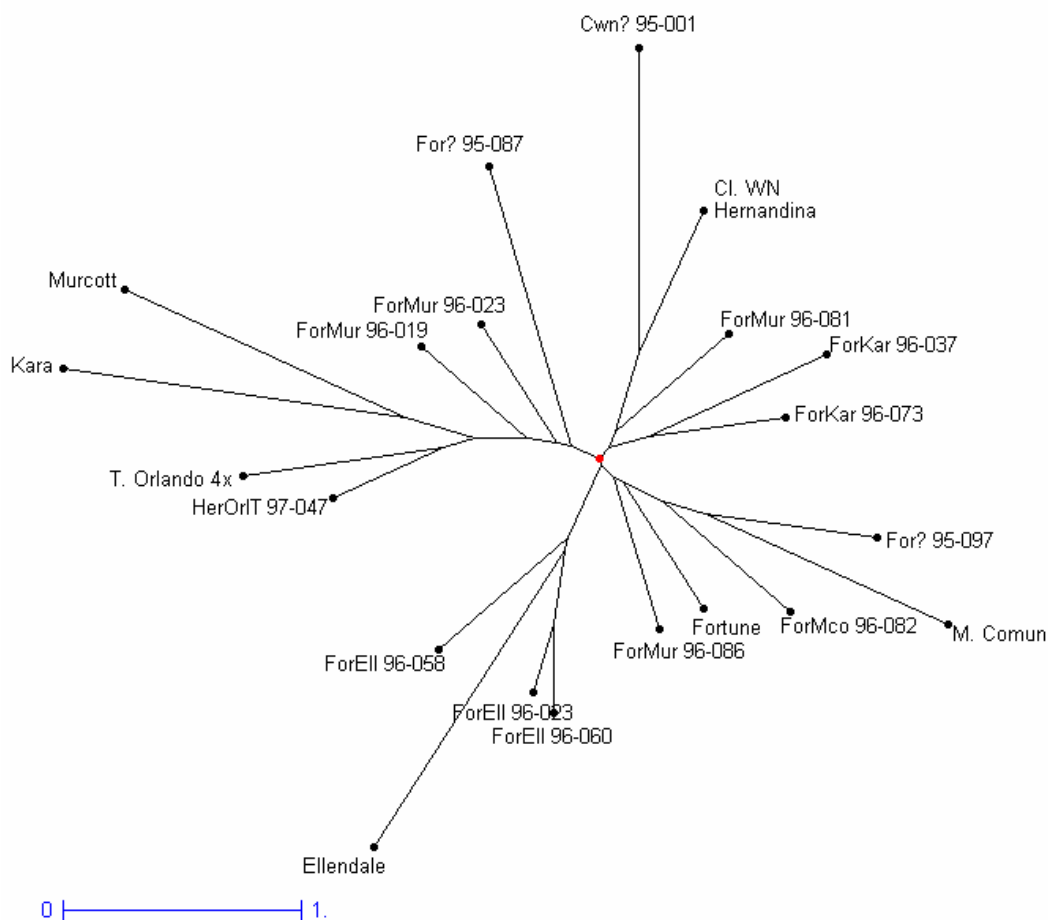


Figura 6.7. Dendrograma correspondiente al análisis genético realizado con marcadores microsatélites considerando la dosis alélica obtenido mediante el cálculo de la distancia euclídea y construcción del árbol mediante el método Weighted Neighbor – Joining.

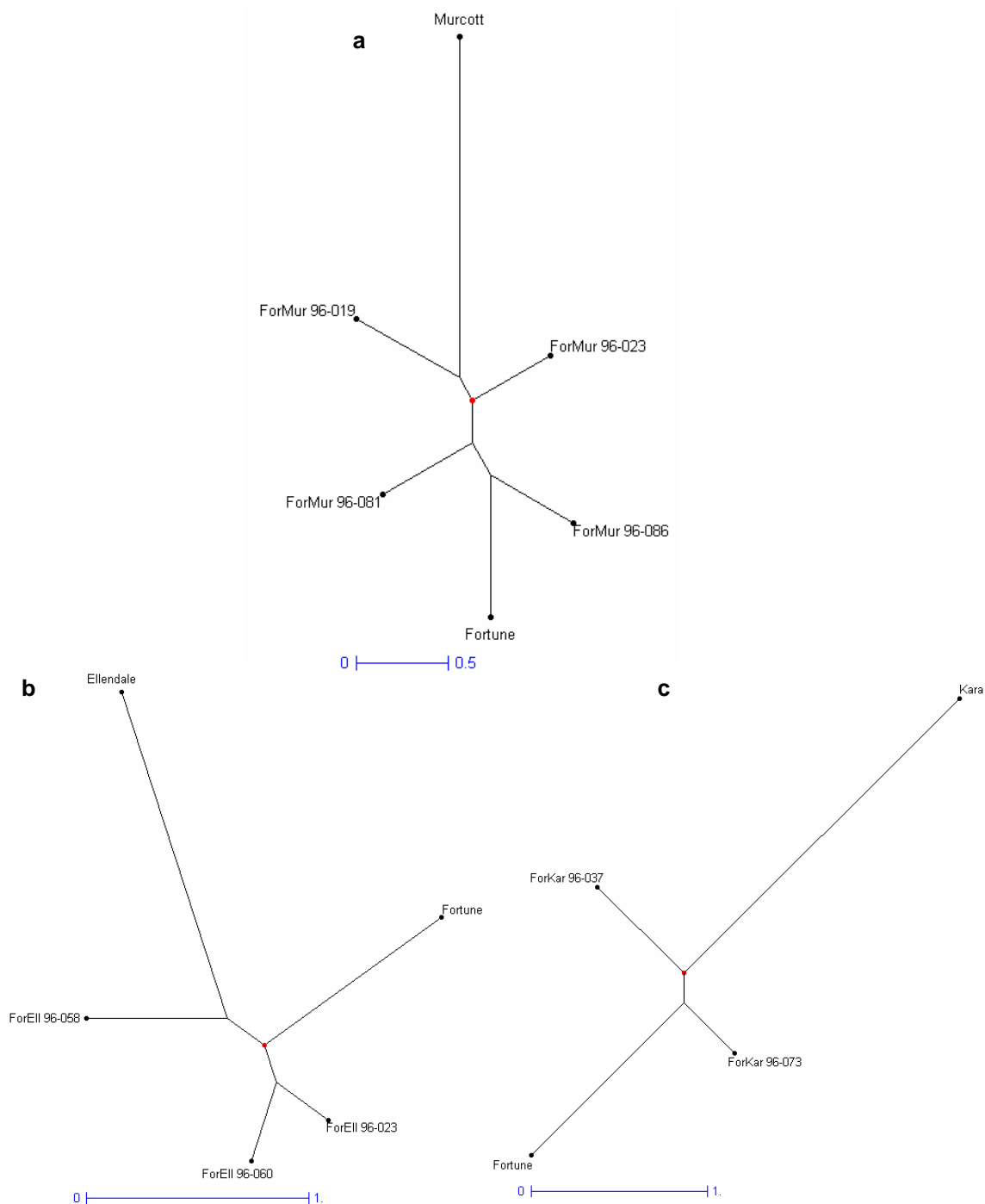


Figura 6.8. Dendrogramas correspondientes al análisis genético realizado con todos los *loci* microsatélites considerando la dosis alélica obtenidos mediante el cálculo de la distancia euclídea y construcción de los árboles mediante el método Weighted Neighbor – Joining. a. Híbridos triploides obtenidos a partir de la hibridación entre mandarina ‘Fortune’ y tanger ‘Murcott’. b. Híbridos triploides obtenidos a partir de la hibridación entre mandarina ‘Fortune’ y tanger ‘Ellendale’. c. Híbridos triploides obtenidos a partir de la hibridación entre mandarina ‘Fortune’ y mandarina ‘Kara’.

Conclusiones generales

CONCLUSIONES GENERALES.

1. La ginogénesis *in situ* inducida por polen irradiado de mandarino 'Fortune' es una técnica que permite obtener plantas y callos embriogénicos haploides, dobles haploides y aneuploides de clementina. Las plantas y callos haploides pueden ser utilizados como fuente de protoplastos para la obtención de híbridos somáticos alotriploides mediante fusión de protoplastos. Además el CIGC ha seleccionado uno de estos haploides para establecer la secuencia completa de referencia del genoma de los cítricos.
2. Se han obtenido plantas tetraploides de origen nucelar de los genotipos apomícticos de mandarino 'Anana', 'Fairchild', 'Kara', 'Kinnow', 'Sunburst', 'Tardivo de Ciaculli', tangelo 'Mapo', tangelo 'Minneola', tangor 'Murcott', tangor 'Nadorcott', tangor 'Ortanique', 'Page', naranjo 'Sanguinelli', pomelo 'Duncan' y pomelo 'Star Ruby'. Estas plantas se han incorporado a la colección de genotipos apomícticos tetraploides del Banco de Germoplasma del IVIA y están siendo utilizadas como parentales masculinos en el programa de obtención de híbridos triploides.
3. Se han obtenido plantas tetraploides de los genotipos no apomícticos clementina 'Clemenules', 'Fina', 'Marisol' y mandarino 'Moncada' mediante el microinjerto *in vitro* de ápices caulinares tratados con colchicina y orizalina. Esta metodología permite obtener plantas tetraploides a partir de la brotación directa del ápice microinjertado y a partir de la segregación de citoquimeras $2x - 4x$. Estas plantas se han incorporado a la colección de genotipos tetraploides no apomícticos del Banco de Germoplasma del IVIA y están siendo utilizadas como parentales masculinos y femeninos en el programa de obtención de híbridos triploides.
4. Se han establecido los distintos parámetros que influyen en la eficiencia de obtención de híbridos triploides de cítricos a partir de hibridaciones sexuales $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$, lo que permitirá realizar una planificación más eficiente del programa de mejora genética de mandarinos actualmente en ejecución.
 - 4.1. En las hibridaciones $2x \times 2x$ la obtención de híbridos triploides está relacionada con la frecuencia en la producción de megagametofitos no reducidos. Es una característica intrínseca del parental femenino. Mandarino 'Fortune' presentó una elevada frecuencia en la producción de híbridos triploides, muy superior a la obtenida con las clementinas.
 - 4.2. En las hibridaciones $2x \times 4x$ la obtención de híbridos triploides está influenciada tanto por el parental femenino como por el parental masculino. El parental femenino clementina 'Clemenules' y el parental masculino mandarino 'Nova'

tetraploide produjeron las mayores eficiencias en la obtención de híbridos triploides.

- 4.3. En las hibridaciones 4x X 2x el parental masculino presenta un destacado efecto en la obtención de plantas triploides. El mayor número de híbridos triploides se obtuvo con mandarino `Moncada` y el menor con mandarino `Común`.
- 4.4. La eficiencia en la obtención de híbridos triploides es más elevada en las hibridaciones 2x X 4x y 4x X 2x que en las hibridaciones 2x X 2x. En las hibridaciones 2x X 2x, 2x X 4x y 4x X 2x entre los parentales clementina `Clemenules` y mandarino `Común` el mayor número de híbridos triploides se obtuvo en la hibridación 2x X 4x.
5. La biología reproductiva de los genotipos no apomícticos de cítricos es mucho más compleja de lo que se suponía hasta el momento. En las hibridaciones entre parentales femeninos no apomícticos diploides y parentales masculinos tetraploides se producen semillas parcialmente desarrolladas que contienen varios embriones. El análisis genético realizado con marcadores microsatélites demuestra que todas las plantas obtenidas a partir de una misma semilla son híbridas e iguales genéticamente, lo que implica que en programas de mejora genética únicamente es necesario regenerar una planta por semilla parcialmente desarrollada. Además, las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* y de la germinación del embrión zigótico contenido en el interior de las semillas analizadas con marcadores microsatélites, demuestran que todas las plantas son de origen sexual.

Los estudios realizados indican que cuando se produce la fecundación en los genotipos no apomícticos de cítricos, en algún momento del proceso de desarrollo de la ovocélula fecundada, se originan por un proceso de embriogénesis secundaria a partir del embrión zigótico nuevos proembriones idénticos genéticamente al original. Probablemente el embrión zigótico adquiere dominancia quedando el resto de proembriones en estado latente y sólo evolucionan si se interrumpe el desarrollo del embrión original por métodos mecánicos y cultivando *in vitro* la nucela o bien mediante polinizaciones 2x X 4x. Este mecanismo no ha sido descrito en cítricos ni en otras especies vegetales.

6. Los marcadores SSR permiten diferenciar fácilmente los híbridos triploides incluso aquellos que proceden de una misma hibridación. El poder de discriminación de los marcadores SSR considerando la dosis alélica es más elevado, lo que permite aplicar un menor número de marcadores para poder identificarlos. Los datos obtenidos se han incluido en la descripción de las 14 variedades triploides de mandarino presentadas en el Registro de Variedades Protegidas de la OEVV.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, K.L., Wendel, J.F. 2005. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends and Genetics*. 21: 539-543.
- Asins, M.J., Herrero, R., Pina, J.A., Carbonell, E.A., Navarro, L. 1996. Genetic relationship in Citrus and related genera. En *Proceedings of 8th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Sun City, South Africa. 1: 248-253.
- Asíns, M.J., Monforte, A.J., Mestre, P.F., Carbonell E.A. 1999. Citrus and Prunus-like retrotransposons. *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 503-510.
- Asins, M.J., Juárez, J., Pina, J.A., Puchades, J., Carbonell, E.A., Navarro, L. 2002. Nulesin, una nueva clementina. *Levante Agrícola*. 359: 36-40.
- Baack, E.J. 2005. Ecological factors influencing tetraploid establishment in snow buttercups (*Ranunculus adoneus*, Ranunculaceae): minority cytotype exclusion and barriers to triploid formation. *American Journal of Botany*. 92(11): 1827-1835.
- Bacchi, O. 1943. Cytological observations in Citrus: III. Megaesporogenesis, fertilization and polyembryony. *Botanical Gazette*. 105: 221-225.
- Banerji, I. 1954. Morphological and cytological studies on Citrus grandis Osbeck. *Phytomorphology*. 4: 390-396.
- Barkley, N.L., Roose, M.L., Krueger, R., Frederici, C.T. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (ssrs). *Theoretical and Applied Genetics*. 112:1519-1531.
- Barret, H.C. 1974. Colchicine-induced polyploidy in Citrus. *The Botanical Gazette*. 135: 29-41.
- Barret, H.C., Rhodes, A.M. 1976. A numerical taxonomic study of the affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Systematic Botany*. 1: 105-136.
- Barrett H. C., Hutchison D. J. 1978. Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of Citrus. *Economic Botany*. 32: 27-45.
- Barret, H.C., Hutchison, D.J. 1981. Occurrence of a spontaneous octoploid in apomictic seedlings of a tetraploid citrus hybrid. En *Proceedings of 4th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Tokyo, Japan. 1: 27-29.
- Benbouzas, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P., Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 10(2): 77-81.
- Berhow, M.A, Hasegawa, S., Kwan, K., Bennet, R.D. 2000. Limonoids and the chemotaxonomy of Citrus and the Rutaceae family. p. 212-228. En Berhow, M.A., Hasegawa, S. and Manners, G.D. (eds.) *Citrus limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Food*. American Chemical Society, Washington (D.C.), USA.
- Bernet, G. P., Asins, M. J.. 2003. Identification and genomic distribution of gypsy like retrotransposons in Citrus and Poncirus. *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 121-130.
- Bicknell, R.A., Koltunow, A.M. 2004. Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell*. 16:228-245.

- Billotte, N., Risterucci, A.M., Barcelos, E., Noyer, J.L., Amblard, P., Baurens, F.C. 2001. Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome*. 44: 413-425.
- Blakeslee, A.F., Avery, A.G. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *Journal of Heredity*. 393-411.
- Bon, M.C., Hurard, C., Gaskin, J., Risterucci, A.M. .2005. Polymorphic microsatellite markers in polyploid *Lepidium draba* L. ssp. *Draba* (Brassicaceae) and cross-species amplification in closely related taxa. *Molecular Ecology Notes*. 5: 68-70.
- Bono, R., Soler, J., Buj, A. 2005. Características de cinco mutaciones precoces de clementina Oronules y de las mandarina Nadorcott y Moncada. En *III Congreso Internacional de Hortofruticultura de la Ribera*, L'Alcudia, Valencia, España. En prensa.
- Bouvier, L., Zhang, Y.X., Lespinasse, Y. 1993. Two methods of haploidisation in pera, *Pyrus communis* L.: greenhouse seedling selection and in situ parthenogenesis induced by irradiated pollen. *Theoretical and Applied Genetics*. 87: 229-232.
- Bretagnolle, F., Thompson, J.D. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*. 129:1-22.
- Bretó, M.P., Ruíz, C., Pina, J.A., Asins, M.J. 2003. The Diversification of Citrus clementina Hort. Ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21(2): 285-293.
- CAPA. Consejería de Agricultura Pesca y Alimentación. 2008. Aforo de la cosecha de cítricos. Campaña 2007/2008. Comunitat Valenciana. <http://www.agricultura.gva.es/estadisticos/>
- CAPA. Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Decreto 29/2002 (DOGV, 04-03-2002).
- Cai, Q., Guy, C.L., Moore, G.A. 1994. Extension of the genetic linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation responsive loci. *Theoretical and Applied Genetics*. 89(5): 606-614.
- Cameron J. W., Frost H. B. 1968. Genetic, breeding and nucellar embryony. p. 325-370. En Reuther W, Batchelor L. D. and Webber H. J (ed.) *The Citrus Industry*. V.1. University of California, Riverside, USA.
- Cameron, J. W., Soost R. K. 1968. Characters of new populations of Citrus polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny. En *Proceedings of First International Citrus Symposium*. University of California, Riverside, USA. 1: 199-205.
- Cameron, J.W., Burnett, R.H. 1978. Use of sexual tetraploide seed parents for production of triploid citrus hybrids. *HortScience*. 13: 167-169.
- Cameron, J.W., Garber, M. 1968. Identical twin-hybrids of Citrus x Poncirus from strictly sexual seed parents. *American Journal of Botany*. 55(2): 199-205.
- Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Durán-Vila, N., Navarro, L., Peña, L. 1998. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Research*. 7: 51-59.

- Cervera, M., Navarro, A., Navarro, L., Peña, L. 2008. Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. *Tree Physiology*. 28: 55-66.
- Chapot, H. 1975. The Citrus plant. En *Citrus technical monographie*. Ciba-Geigy Agrochemicals. 4: 6-13.
- Chen, Z.Q., Wang, M.Q., Huihua, L. 1980. The induction of Citrus pollen plants in artificial media. *Acta Genetica Sinica*. 7: 189-191.
- Chen, C., Zhou, P., Choi, Y.A., Huang, S., Gmitter, F.G. 2006. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 112(7): 1248-1257.
- Chen, C., Bowman, K.D., Choi, Y.A., Dang, P.M., Rao, M.N., Huang, S., Soneji, J.R., McCollum, T.G., Gmitter, F.G. 2007. EST-SSR genetic maps for Citrus sinensis and Poncirus trifoliata. *Tree Genetics & Genomics*. 4(1): 1-10.
- Chen, C., Lyon, M.T., O'Malley, D., Federici, C.T., Gmitter, J., Grosser, J.W., Chaparro, J.X., Roose, M.L., Gmitter, F.G. 2008. Origin and Frequency of 2n Gametes in Citrus sinensis x Poncirus trifoliata and Their Reciprocal Crosses. *Plant Science*. 174: 1-8.
- Cheung, F. y Town, C.D. 2007. BACend view of the Musa acuminata genome. *BMC Plant Biology*. 7: 29.
- Corazza-Nunes, M.J., Machado, M.A., Nunes, W.M.C., Cristofani, M., Tragón, M. 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*. 126(2): 169-176.
- Cordeiro, G.M., Casu, R., McIntyre, C.L., Manners, J.M., Henry, R.J. 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. *Plant Science*. 160: 1115-1123.
- Cordeiro, G.M., Pan, Y.B., Henry, R.J. 2003. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science*. 165: 181-189.
- D'Hont, A., Grivet, L., Feldmann, P., Rao, P., Berding, N., Glaszmann, J.C. 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular Genetics and Genomics*. 250: 405-413.
- Dellaporta, J., Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reports*. 1: 19-21.
- Delong, Y., Wei, L., Sheng, L., Xiuling, Y., Jiling, W., Ziyi, C. 2007. In vitro rescue culture of F1 progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties. *Plant Growth Regulation*. 51: 63-71.
- Deng, X.X., Liu, G.B., Zhang, W.C. 1985. Study on the chromosomal variation of citrus callus. *China Citrus*. 3: 4-7.
- Deng, X.X., Deng, Z.A., Xiao, S.Y., Zhang, W.C. 1992. Pollen Derived Plantlets from Anther Cultura of Chiang Papeda Hybrid N° 14 and Trifoliata Orange. En *Proceedings of 7th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Acireale, Italy. 1: 190-192.

- Deng, Z.N., Gentile A., Domina, F., Nicolosi, E., Tribulato, E. 1995. Selecting lemon protoplasts for insensitivity to Poma tracheiphila toxin and regenerating tolerant plants. *Journal of the American Society of Horticultural Science*. 120(6): 902-905.
- Deng, X.X., Yi, H.L., Guo, W.W. 1996. Triploid Plants regenerated from Crossing Diploid Pummelo and Tangerine with Allotetraploid Somatic Hybrid of Citrus. En *Proceedings of 8th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Sun City, South Africa. 1: 189-192.
- Deng, X.X., Hao, Y.J. 2000. Chromosome Number Variation of Citrus Embryonic Calli during Subculture. En *Proceedings of 9th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Orlando, USA. 1:142-144.
- Dweikat, I.M., Lyrene, P.M. 1990. Twin Seedlings and Haploids in Blueberry (*Vaccinium* spp.). *Journal of Heredity*. 81(3): 198-200.
- Domínguez, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L. 2000. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*. 19: 427-433.
- Dira, N. Y A. Benbadis. 1975. Analysis, by in vitro anther culture, of the androgenética potential of two Citrus species (*Citrus medica* and *Citrus limon*). *Comptes Rendus Hebdomadaires de Séances de l'Academie des Sciences*. 281(18): 1321–1324.
- Durham, R.E., Liou, P.C., Gmitter, F.G., Moore, G. 1992. Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus. *Theoretical and Applied Genetics*. 84: 39-48.
- Esan, E.B. 1973. A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae. Ph.D. Diss. University of California, Riverside. USA.
- Esen, A., Soost, R.K. 1971a. Unexpected triploids in Citrus: Their origin, identification and possible use. *Journal of Heredity*. 62: 329–333.
- Esen, A., Soost, R.K. 1971b. Tetraploid progenies from 2x - 4x crosses of Citrus and their origin. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 97: 410–414.
- Esen, A., Soost, R.K. 1972. Aneuploidy in Citrus. *American Journal of Botany*. 59(5): 473-477.
- Esen, A., Soost, R.K. 1973. Precocious development and germination of spontaneous triploid seeds in Citrus. *Journal of Heredity*. 64: 147–154.
- Esen, A., Soost, R. K. 1977. Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo: endosperm ploidy ratio in Citrus. En *Proceedings del Primer Congreso Mundial de Citricultura*. International Society of Citriculture. Murcia-Valencia, España. 2: 53-63.
- Esen, A., Soost, R.K., Geraci, G. 1978. Seed set, size and development after 4x - 2x and 4x - 4x crosses in Citrus. *Euphytica*. 27: 283–293.
- Esen, A., R.K. Soost, G. Geraci. 1979. Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in Citrus. *Journal of Heredity*. 70: 5–8.
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2006. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>
- Fagoaga, C., Rodrigo, L., Conejero, V., Hinarejos, C., Tuset, J.J., Arnau, J., Pina, J.A., Navarro, L., Peña, L. 2001. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic sweet oranges over-expressing pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding*. 7: 175-185.

- Fagoaga, C., Vidal, A., Pina, J.A., Lliso, L., Tadeo, F.R., Talón, M., García-Martínez, J.L., Navarro, L., Peña, L. 2003. Engineering of gibberelin levels in citrus by sense and antisense expresión of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture. En *VI International Congress of Plant Molecular Biology*. Barcelona, Spain.
- Fagoaga, C., López, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L. 2005. Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of Citrus tristeza virus are citrus-specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 18: 435-445.
- Fagoaga, C., López, C., De Mendoza, A.H., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L. 2006. Post-Transcriptional Gene Silencing of the p23 Silencing Suppressor of Citrus tristeza virus Confers Resistance to the Virus in Transgenic Mexican Lime. *Plant Molecular Biology*. 60(2): 153-165.
- Fagoaga, C., Tadeo, F.R., Iglesias, D., Huerta, L., Lliso, I., Vidal, A.M., Talón, M., Navarro, L., García-Martínez, J.L., Peña, L. 2007. Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture. *Journal Experimental Botany*. 58: 1407-1420.
- Fatta Del Bosco, S., Matranga, G., Geraci, G. 1992. Micro and macro-sporogenesis of two triploid hybrids of Citrus. En *Proceedings of 7th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Acireale, Italy. 1:122-124.
- Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W., Roose, M.L. 1998. Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 96: 812-822.
- Forment, J., Gadea, J., Huerta, L., Abizanda, L., Agusti, J., Alamar, S., Alos, E., Andres, F., Berbel, A., Blázquez, M.A., Brumos, J., Cercos, M., Colmenero-Flores, J.M., Conesa, A., Estables, B., Gandía, M., Garcia-Martinez, J.L., Gimeno, J., Gisbert, A., Gomez, G., Gonzalez-Candelas, L., Granell, A., Guerra, J., Lafuente, T., Madueno, F., Marcos, J.F., Martinez, F., Martinez-Godoy, M.A., Miralles, S., Moreno, P., Navarro, L., Pallas, V., Perez-Amador, M.A., Perez-Valle, J., Pons, C., Rodrigo, I., Rodríguez, P., Royo, C., Serrano, R., Soler, G., Tadeo, F., Talón, M., Perol, J., Trenor, M., Vaello, L., Vicente, O., Vidal, Ch., Zacarias, L., Conejero, V. 2005. Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Molecular Biology*. 57: 375-391
- Forster, B.P., Erwin, H-B., Ken, J.K., Alisher, T. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*. 12: 368-375.
- Froelicher, Y., Bassene, J.P., Jedidi-Neji, E., Morillon, R., Bernardini, G., Costantino, G., Ollitrault, P. 2007. Induced parthenogenesis in mandarin: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Reports*. 26(7): 937-944.
- Froelicher, Y., Dambier, D., Bassene, J.B., Costantino, G., Lotfy, S., Didout, C., Beaumont, V., Brottier, P., Risterucci, A.M., Luro, F., Ollitrault, P. 2008. Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular ecology resources*. 8(1): 119-122.

- Froneman, I.J., Breedt, H.J., Koekemoer, P.J.J., Van Rensburg, P.J.J. 1996. Producing seedless Citrus cultivars with gamma irradiation. *En Proceedings of 8th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Sun City, South Africa. 1: 159-163.
- Frost, H.B. 1925. Tetraploidy in Citrus. *En Proceedings of the National Academy of Sciences*. 11: 535-537.
- Frost, H.B., Krug, C.A. 1942. Diploid-tetraploid periclinal chimeras as bud variants in citrus. *Genetics*. 27: 619-634.
- Frost H. B., Soost R. K. 1968. Seed reproduction, development of gametes and embryos. p. 290-324. En Reuther W., Batchelor L.D. and Webber H.B. (ed.) *The Citrus Industry*. V.2. University of California, Barkley, USA.
- Furr, J.R. 1964. New tangerines for the desert. *California Citrograph*. 49: 266-276.
- Gaeta, R.T., Pires, J.C., Iniguez-Luy, F., Leon, E., Osborn, T. 2007. Genomic Changes in Resynthesized *Brassica napus* and Their Effect on Gene Expression and Phenotype. *The Plant Cell*. 19: 3403:3417.
- Galán-Sauco, V., Grajal Martín, M.J., Fernández Galván, D., Coello Torres, A., Juárez, J., Navarro, L. 2001. Occurrence of Spontaneous Tetraploid Nucellar Mango Plants. *HortScience*. 36(4): 755-757.
- Ganga, M., Chezhiyan, N. 2002. Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on in vitro regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 77(5): 572-575.
- Gao, L.F, Jing, R.L, Huo, N.X, Li, Y., Li, X.P, Zhou, R.H, Chang, X.P, Tang, Jjf, Ma, Z.Y, Jia, J.Z. 2004. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 108:1392-1400
- Geraci, G., Esen, A., Soost. R.K. 1975. Triploid progenies from 2x - 2x crosses of Citrus cultivars. *Journal of Heredity*. 66: 177-178.
- Geraci G., De Pasquale F., Tusa N. 1977. Percentages of spontaneous triploids in progenies of diploid lemons and mandarins. *En Proceedings of 2nd International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Orlando, Florida. 2: 596-597.
- Germanà, M.A., Reforgiato-Recupero, G. 1997. Haploid embryos regeneration from anther culture of 'Mapo' tangelo (*Citrus deliciosa* x *C. paradisi*). *Advances in Horticultural Science*. 11(3): 147-152.
- Germanà, M.A., Crescimano, F.G., Reforgiato Recupero, G., Russo, M.P. 2000. Preliminary characterization of several doubled haploid of *Citrus clementina* cv. Nules. *En Proceedings of First International Citrus Biotechnology Symposium*. *Acta Horticulturae*. 535: 183-193.
- Germanà, M.A., Chiancone, B. 2001. Gynogenetic haploids of Citrus after in vitro pollination with triploid pollen grains. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 66: 59-66.
- Germanà, M.A., Chiancone, B., Lain, O., Testolin, R. 2005. Anther culture in *Citrus clementina*: a way to regenerate tri-haploids. *Australian Journal of Agricultural Research*. 56: 839-845.
- Germanà, M.A. 2006. Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86: 131-146.

- Germanà, M.A. 2007. Haploidy. p. 167-196. En I.A. Khan (ed.), *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*, CABI Head Office, Wallingford, UK.
- Ghorbel, R., Domínguez, A., Navarro, L., Peña, L. 2000. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Tree Physiology*. 20: 1183-1189.
- Gmitter, F.G., Ling, X.B., Deng, X.X. 1990. Induction of triploid citrus plants from endosperm calli in vitro. *Theoretical and Applied Genetics*. 80: 785-790.
- Gmitter, F.G., Ling, X.B. 1991. Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recovery from underdeveloped Citrus ovules treated with colchicine. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116:317-321.
- Gmitter, F.K., Grosser, J.W., Moore, G.A. 1992. Citrus. CAB Internacional, Wallingford, UK.
- Grant, V. 1981. Plant speciation. Columbia Univ. Press, New York.
- Griffiths, A.J.F.; Gelbart, W.M.; Miller, J.H. & Lewontin, R.C. 1999. Modern Genetic Analysis. 1ª Edición. W.H. Freeman & Co. New York, USA.
- Grimanelli, D., Leblanc, O., Perottil, E., Grossniklaus, U. 2001. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*. 17:597-604.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Reviews*. 8:339-374.
- Grosser, J.W., Chandler, J.L., Goodrich, R.M. 2002. Variação somaclonal para o melhoramento de laranja doce. 7º *Seminário Internacional de Citros-Melhoramento*. Bebedouro, Brasil.
- Grosser, J.W., Deng, X.X., Goodrich, R.M. 2007. Somaclonal variation in Sweet Orange: Practical applications for Variety Improvement and Possible Causes. p. 219-234. En Khan, I.A. (ed.) *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI Head Office, Wallingford, UK.
- Gu, X.F., Yang, A.F., Meng, H., Zhang, J.R. 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. Cv. Zhanhua. *Plant Cell Reports*. 24: 671-676.
- Gulsen, O., Roose, M.L. 2001. Lemons: diversity and relationship with selected Citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 126: 309-317.
- Guo, W.W., Prasad, D., Serrano, P., Deng, X.X., Grosser, J.W. 2004. Targeted cybridization in citrus: transfer of satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potencial seedlessness. *Plant Cell Reports*. 22: 752-758.
- Hamill, S.D., Smith, M.K., Dodd, W.A. 1992. In vitro induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. *Australian Journal of Botany*. 40(6): 887-896.
- Harlan J.R., De Wet J.M. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*. 20 (4), 509-517.
- Hauck, N.R., Yamane, H., Ryutaro, T., Iezzoni, A.F. 2002. Self-compatibility and incompatibility in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Sexual Plant Reproduction*. 15: 39-46.
- Hearn C. J. 1969. Self-incompatibility and the effects of different pollen sources upon fruit characteristics of four Citrus hybrids. En *Proceeding of the American Society for Horticultural Science*. 87:183-187.

- Hearn, C.J. 1984. Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 109: 270-273.
- Henz, R.A. 1971. Star Ruby, a new deep red fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics. *Journal Rio Grande Valley Horticultural Society*. 25: 54-58.
- Henz, R.A. 1985. Rio Red, a new grapefruit with a deep red color. *Journal Rio Grande Valley Horticultural Society*. 38: 75-76.
- Herrero, M. 1929. Variedades de grape-fruit. *Agricultura*. 1: 322-324.
- Herrero, M. 1973. Introducción de la naranja navel en España. *Levante Agrícola*. 136, 9.
- Herrero, R., Asins, M.J., Carbonell, E., Navarro, L. 1995. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theoretical and Applied Genetics*. 92: 599-609.
- Hidaka, T., Yamada, Y., Shichijo, T. 1979. In vitro differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Japanese Journal Breeding*. 29(3): 248-254.
- Hidaka, T., Kajiura, I. 1989. A simple method for Acclimatization of in vitro plantlets of Citrus. *Bulletin Fruit Tree Research Station B*. 16: 19-28.
- Höfer, M., Grafe, Ch. 2003. Induction of doubled haploids in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Euphytica*. 130: 191-197.
- Husband, B.C., Sabara, H.A. 2004. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium*. *New Phytologist*. 161:703-713
- Hutchison, D.J. 1974. Swingle Citrumelo-A promising rootstock hybrid. *Florida State Horticultural Society*. 87: 89-91.
- Hutchison D. J., Barrett H. C. 1981. Tetraploid frequency in nucellar seedlings from single trees of Carrizo and Troyer Citrus hybrids. En *Proceedings of 4th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Tokyo, Japan. 1: 27-29.
- Intercitrus. Interprofesional Citrícola Española. 2008. Datos del sector. <http://www.intercitrus.org/ndsite.php?section=sectorCitricolaDatosDelSector>
- Iwamasa, M. 1966. Studies on the sterility in the genus Citrus with special reference to the seedlessness. *Bulletin of the Horticulture Research Station*. 6: 1-81.
- Iwamasa, M., Iwasaki, T. 1962. On the sterility phenomenon caused by low temperatures in the Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Bulletin of the Horticulture Research Station*. 2: 25-46.
- Iwamasa M., Nito N., Ling J.T. 1988. Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily, Aurantioideae. En *Proceedings 6st International Citrus Congress*, International Society of Citriculture, Balaban, Philadelphia. 123-130.
- Jarrell, D.C., Roose, M.L., Traugh, S.N., Kupper, R.S. 1992. A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. *Theoretical and Applied Genetics*. 84: 49-56
- Jaskani, M.J., Saghir-ul-Hasnain, M.A., Bashir, M.A., Khan, I.A. 1996. Morphological Description of Citrus Colchiploids. En *Proceedings of 8th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Sun City, South Africa. 1: 130-132.

- Jensen, W.A. 1962. *Botanical Histochemistry*. (ed.) W. H. Freeman, San Francisco, California, USA.
- Jiménez-Cuesta, M., Cuquerella, J., Martínez-Jávega, J.M. 1981. Determination of a color index for citrus fruit degreening. En *Proceedings of 4th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Tokyo, Japan. 2: 750-752.
- Kadota, M., Niimi, Y. 2002. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Reports*. 21: 282-286.
- Kepiro, J.L., Roose, M.L. 2007. Nucellar Embryony. p. 141-150. En Khan, I.A. (ed.) *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI Head Office, Wallingford, UK.
- Khan, M.M., Khan, I.A., Mughal, A.H. 1992. Growth and Morphological Comparison of Diploid and Tetraploid Strains of 'Kinnow' Mandarin. En *Proceedings of 7th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Acireale, Italy. 1: 93-95.
- Kijas, J.M.H., Fowler, J.C.S, Thomas, M.R. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. *Genome*. 38: 349-355.
- Kijas, J.M.H., Thomas, M.R., Fowler, J.C.S., Roose, M.L. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 701-706.
- Kobayashi, S., Ieda, I., Nakatani, M. 1981. Role of the primordium cell in nucellar embryogenesis in citrus. En *Proceedings of 4th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Tokyo, Japan. 1: 44-48.
- Kobayashi S., Ohgawara, T., Saito, W., Nakamura, Y., Omura, M. 1997. Production of triploid somatic hybrids in Citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 66: 453-458.
- Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell*. 5: 1425-1437.
- Krueger, R.R., Navarro, L. 2007. Citrus Germplasm Resources and Their Use. p. 45-140. En I. Khan (ed.), *Citrus Genetics, Breeding, and Biotechnology*. CABI Head Office, Wallingford, UK.
- Krug C. A. 1943. Chromosomes numbers in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus Citrus. *Botanical Gazette*. 48: 602-611.
- La Rota, M., Kantety, R.V., Yu, J.K., Sorrells, M.E. 2005. Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat, and barley. *BMC Genomics*. 6: 23.
- Lacape, M., Nguyen T.B., Thibivilliers, S., Bojinov, B., Courtois, B., Cantrell, R.G., Burr, B., Hau, B. 2003. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome*. 4(46): 612-626.
- Lanaud, C., Risterucci, A.M., Pieretti, I., Falque, M., Bouet, A., Lagoda, P.J.L. 1999. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Molecular Ecology*. 8: 2141-2152.
- Lapin, W. K. 1937. Investigations on polyploidy in Citrus. USSR all-Union Science Research Institute Humid Subtropics Works. 1: 1-68.
- Lee, L.S. 1988. Citrus polyploidy. Origins and potencial for cultivar improvement. *Australian Journal of Agricultural Research*. 39: 735-747.

- Ling, P., Yu, C., Deng, Z., Chen, C., Huang, S., Wendell, M.K., Gmitter, F.G. 1999. Citrus genome mapping with AFLP markers. En *Plant and Animal Genomes XIII Conference*, San Diego, California, USA.
- Liou, P.C. 1990. A molecular study of the Citrus genome through analysis of restriction fragment length polymorphism and isozyme mapping. Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, USA.
- Liu, G., Li, Z., Bao, M. 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica*. 157: 145-154.
- Longley A. E. 1925. Polycary, polyspory and polyploidy in Citrus and Citrus relatives. *Journal of the Washington Academy of Science*. 15: 347-351.
- Luro, F., Rist, D., Ollitrault, P. 2001. Evaluation of genetic relationships in Citrus genus by means of sequence tagged microsatellites. En Proceedings of the International Symposium on Molecular markers for characterizing genotypes and identifying cultivars in Horticulture. *Acta Horticulturae*. 546: 537-542.
- Luro, F., Maddy, F., Jacquemond, C., Froelicher, Y., Morillon, R., Rist, D., Ollitrault, P. 2004. Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. En XI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics. *Acta Horticulturae*. 663: 841-847.
- Luro, F., Costantino, G., Billot, C., Froelicher, Y., Morillon, R., Ollitrault, P., Terol, J., Talon, M., Gmitter-Jr, F., Chen, C. 2007. Genetic Maps of Clementine Mandarin and Intergeneric Hybrid Clementine X Poncirus Using Genomic and EST Microsatellite Markers. En Plant & Animal Genomes XV Conference. San Diego, California, USA.
- Luro, F., Costantino, G., Terol, J.F., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., Talon, M., Ollitrault, P., Morillon, R. 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics*. 9(287): 1-13.
- Lyerene, P.M., Vorsa, N., Ballington, J.R. 2003. Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. *Euphytica*. 133: 27-36.
- MAPA. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 2006. *Anuario de Estadística Agroalimentaria 2004-2005*. http://www.mapa.es/es/estadistica/pag/anuario/Anu_06/indice.asp
- MAPA. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. 2008. Semillas y plantas de vivero. <http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/semillas/introduccion.htm>
- Mabberley, D.J. 1997. A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea*. 7: 167-172.
- Masterson, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*. 264: 421-424.
- Mattews, L., Federici, C.T., Kacar, Y., Chen, C., O'Malley, D., Chaparro, J.X., Gmitter, F.G., Roose, M.L. 2007. SSR-Based Linkage Maps For Sweet Orange And Trifoliate Orange. En *Plant & Animal Genomes XV Conference*. San Diego, California, USA.
- Moore, G. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics*. 17: 536-540.

- Morejohn L. C., Bureau T. E., Molé-Bajer J., Bajer A., and Fosket D.E. 1987. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization. *Planta*. 172: 141-147.
- Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*. 30: 194-200.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-479.
- Murashige, T., Tucker, D.P.H. 1969. En *Proceedings of the First Citrus Symposium*. 3. 1155-1161.
- Nakamura, M. 1943. Cytological and ecological studies on the genus Citrus with special referente to the occurence of sterile pollen grain. *Memorial of the Faculty of Science and Agriculture*. Tohoku University. 27: 53-159.
- Navarro, L., Roistacher, C.N., Murashige, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. *Journal of American Society and Horticultural Science*. 100: 471-479.
- Navarro, L. 1976. The citrus variety improvement program in Spain. En *Proceedings of the 7th Conference International Organization of Citrus Virologist*. Riverside. California. USA. 198-203.
- Navarro, L., Juárez, J., Ballester, J.F., Pina, J.A., Ortega, C. 1979. Obtención de plantas nucelares libres de virus de diversas variedades de agrios del grupo navel (*C. sinensis* L. Osbeck) por cultivo de óvulos *in vitro*. Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, serie: Protección Vegetal, Nº 10.
- Navarro, L., Ortiz, J., Juárez, J. 1985. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured in vitro. *HortScience*. 20:214-215.
- Navarro, L., Juárez, J., Pina, J.A., Ballester, J.F., Arregui, J.M. 1988. The citrus variety improvement program in Spain after eleven years. En *Proceedings 10th Conference International Organization of Citrus Virologist*, Riverside, California, USA. 400-406.
- Navarro, L. 1992. Citrus shoot tip grafting in vitro. p. 327-338. En J.P.S. Bajaj (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. V. 18. High-Tech and Micropropagation. Springer-Verlag. Berlin.
- Navarro, L., 1994. Programa de mejora sanitaria de variedades de agrios. p. 159-167. I Congreso de Citricultura de la Plana, Ediciones y Promociones LAV, Nules, Castellón.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Pina, J.A. 2002. Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from $2n \times 2n$ and $2n \times 4n$ crosses by embryo rescue and flow cytometry. En *Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress, Plant Biotechnology 2002 and Beyond*. Orlando, Florida, USA. 541-544.
- Navarro, L. 2005a. Necesidades y problemática de la mejora sanitaria y genética de los cítricos en España. *Phytoma*. 170: 2-5.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Pina, J.A., Olivares-Fuster, O., Cuenca, J., Julve, J.M. 2005b. Programa de obtención de híbridos triploides de mandarino en España. *Phytoma*. 170: 36-41.
- Navarro, L., Aleza, P., Juárez, J. 2006a. Mejora de la calidad de los cítricos. p. 581-596. En Llácer, G., Díez M.J., Carrillo J.M. y Badenes M.L., (eds.). *Mejora genética de la calidad de las plantas*. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Sociedad Española de Genética, Universidad Politécnica de Valencia.

- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Cuenca, J., Julve, J.M., Pina, J.A. 2006b. Mandarino ForMur 96-081. NRVP 20064673 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Aleza, P., Juárez, J., Julve, J.M., Cuenca, J., Pina, J.A. 2006c. Mandarino ForKar 96-037. NRVP 20064674 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Juárez, J. 2007. Shoot-tip grafting in vitro. p. 353-364. En I.A. Khan (ed.), *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*, CABI Head Office, Wallingford, UK.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Cuenca, J., Julve, J.M., Pina, J.A. 2007a. Mandarino ForEII 96-058. NRVP 20074716 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Aleza, P., Juárez, J., Julve, J.M., Cuenca, J., Pina, J.A. 2007b. Mandarino Cwn ? 95-001. NRVP 20074735 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Cuenca, J., Julve, J.M., Pina, J.A. 2007c. Mandarino For ? 95-087. NRVP 20074746 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Aleza, P., Juárez, J., Julve, J.M., Cuenca, J., Pina, J.A. 2007d. Mandarino For ? 95-097. NRVP 20074747 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Cuenca, J., Julve, J.M., Pina, J.A. 2007e. Mandarino ForKar 96-073. NRVP 20074748 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Aleza, P., Juárez, J., Julve, J.M., Cuenca, J., Pina, J.A. 2007f. Mandarino ForMco 96-082. NRVP 20074749 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Cuenca, J., Julve, J.M., Pina, J.A. 2007g. Mandarino ForMur 96-086. NRVP 20074750 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Cuenca, J., Julve, J.M., Pina, J.A. 2008a. Mandarino ForMur 96-019. NRVP 20084776 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente
- Navarro, L., Aleza, P., Juárez, J., Julve, J.M., Cuenca, J., Pina, J.A. 2008b. Mandarino ForMur 96-023. NRVP 20084777 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Cuenca, J., Julve, J.M., Pina, J.A. 2008c. Mandarino ForEII 96-023. NRVP 20084778 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Titulo de Obtención Vegetal pendiente.

- Navarro, L., Aleza, P., Juárez, J., Julve, J.M., Cuenca, J., Pina, J.A. 2008d. Mandarino HerOrLT 97-047. NRVP 20084779 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Título de Obtención Vegetal pendiente.
- Navarro, L., Aleza, P., Juárez, J., Julve, J.M., Cuenca, J., Pina, J.A. 2008e. Mandarino ForEII 96-060. NRVP 20084818 de la Oficina Española de Variedades Vegetales. Título de Obtención Vegetal pendiente.
- Nei, M., Li, W.H. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Genetics*. 75: 213-219.
- Nesumi, H., Nakano, M., Yoshioka, T., Omura, M., Yoshida, T. 2000. Genetic analysis of female sterility from satsuma. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 69-192.
- Nesumi, H., Nakano, M., Yoshida, T. 2001. Mode of inheritance on the abnormal development of impregnated ovules derived from Mukaku-kishu. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 70-403.
- Nguyen, T., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y., Hiroshi, O. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 72: 19-25.
- Nicolosi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., Tribulato, E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 100: 1155-1166.
- Obute, G.C., Ndukwu, B.C., Chukwu, O.F. 2007. Targeted mutagenesis in *Vigna unguiculata* (L.) Walp and *Cucumeropsis mannii* (Naud.) in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 21: 2467-2472.
- Ohgawara, T., Kobayashi, S., Ohgawara, E., Uchima, H., Ishii, S. 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theoretical and Applied Genetics*. 71: 1-4.
- Oiyama, I., Okudai, N., Takahara, T. 1981. Ploidy levels of seedlings obtained from 2x X 4x crosses in citrus. En *Proceedings of 4th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Tokyo, Japan. 1: 32-34.
- Oiyama, I., Okudai, N. 1986. Production of Colchicine-induced Autotetraploid Plants through Micrografting in Monoembryonic Citrus Cultivars. *Japanese Journal Breeding*. 36: 371-376.
- Oiyama, I., Kobayashi, S. 1990. Polyembryony in undeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with a citrus tetraploid. *HortScience*. 25: 1276-1277.
- Oiyama, I., Kobayashi, S., Yoshinaga, K. 1991a. Use of pollen from a somatic hybrid between *Citrus* and *Poncirus* in the production of triploids. *HortScience*. 26: 198-200.
- Oiyama, I., Kobayashi, S. 1991b. Citrus pentaploids from small seeds of diploid x diploid crosses. *HortScience*. 26(3): 292-293.
- Oiyama, I., S. Kobayashi. 1993. Haploids obtained from diploid x triploid crosses of citrus. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science*. 62: 89-93.
- Olivares-Fuster, O. 1998. Hibridación somática de cítricos. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. Valencia. España

- Olivares-Fuster, O., Duran-Vila, N., Navarro, L. 2005. Electrochemical protoplast fusion in citrus. *Plant Cell Reports*. 24(2): 112-119.
- Ollitrault, P., Michaux-Ferriere N. 1992. Application of flow cytometry for citrus genetic and breeding. En *Proceeding 7th International Citrus Congress*, International Society of Citriculture, Acireale, Italy. 1: 193-198.
- Ollitrault, P., Fauré, X. 1992. Système de reproduction et organisation de la diversité génétique dans le genre Citrus. En *Actes du Colloque International Complexe d'Espèces, Flux de Gènes et Ressources Génétiques des Plantes*. Paris. 133-151.
- Ollitrault, P., Jacquemond, C. 1995. Facultative apomixis, spontaneous polyploidization and inbreeding in Citrus volkameriana seedlings. *Fruits*. 49: 398-400.
- Ollitrault, P., Allent, V., Luro, F. 1996a. Production of Haploid Plants and Embryonic Calli of Clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after *in situ* Parthenogenesis Induced by Irradiated Pollen. En *Proceedings of 8th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Sun City, South Africa. 2: 913-917.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Allent, V., Luro, F., Jacquemond, C. 1996b. In vitro embryo rescue and selection of spontaneous triploid by flow cytometry for easy peeler citrus breeding. En *Proceeding of the 8th Citrus International Congress*. International Society of Citriculture. Sun City, South Africa. 1: 254-258.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Vanel, F., Froelicher, Y. 2000. Creation of triploid Citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. En *Proceedings of First International Citrus Biotechnology Symposium*. *Acta Horticulturae*. 535:191-198.
- Ollitrault, P., Guo, W., Grosser, J.W. 2007a. Somatic Hybridization. p. 235-260. En Khan, I.A. (ed.) *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI Head Office, Wallingford, UK.
- Ollitrault, P., Luro, F., Yamamoto, M. 2007b. Seedlessness and Ploidy Manipulations. p. 197-233. En Khan, I.A. (ed.) *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI Head Office, Wallingford, UK.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F., Froelicher, Y. 2008. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breeding Reviews*. 20: 323-354.
- O'Malley, D.M., Clevenger, D., Chaparro, J.X. 2007. Centromere Mapping In *Citrus sinensis*. En *Plant and Animal Genome XV Conference*. San Diego, California, USA.
- Omura, M., Ueda, T., Kita, M., Komatsu, A., Takanokura, Y., Shimada, T., Endo-Inagaki, T., Nesumi, H., Yoshida, T. 2000. EST Mapping in Citrus. En *Proceedings of the 9th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Orlando, Florida, USA. 1: 71-74.
- Ortiz, R., Vuylsteke, D. 1995. Factors influencing seed set in triploid *Musa* spp. L. and production of euploid hybrids. *Annals of Botany*. 75: 151-155.
- Osawa, I. 1912. Cytological and experimental studies in Citrus. *Journal of the College of Agriculture*. Tokyo University. 4: 83-116.
- Osborn, T.C., Pires, J.C., Birchler, J.A., Auger, D.L., Chen, Z.J., Lee, H.S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R.W., Colot, V., Martienssen, R.A. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends and Genetics*. 19: 141-147.

- Otto, S.P., Whitton J. 2000. Polyploid Incidence and Evolution. *Annual Review of Genetics*. 34: 401-437.
- Pandey, K.K., Phung, M. 1982. `Hertwig Effect´ in Plants: Induced Partenogénesis Through the Use of Irradiated Pollen. *Theoretical and Applied Genetics*. 62: 295-300.
- Pandey, K.K., Przywara, L., Sanders, P.M. 1990. Induced parthenogenesis in kiwifruit (*Actinida deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. *Euphytica*. 51: 1-9.
- Peloquin, S.J., Boiteaux, L.S., Simon, P.W., Jansky, S.H. 2008. A Chromosome-Specific Estimate of Transmisión of Heterozygosity by 2n Gametes in Potato. *Journal of Heredity*. Publicado online: doi:10.1093/jhered/esm110.
- Peña, L., Martín-Trillo, M., Juárez, J., Pina, J.A., Navarro, L., Martínez-Zapater, J.M. 2001. Constitutive expresión of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduce their generation time. *Nature Biotechnology*. 19: 263-267.
- Peña, L., Cervera, M., Fagoaga, C., Pérez, R., Romero, J., Juárez, J., Pina, J.A., Navarro, L. 2004. Agrobacterium – mediated transformation of Citrus. p. 145-147. En Curtis I.S. (ed.), *Transgenic Crops of the World-Essencial Protocols*. Kluwer Academic Publishers.
- Peña, L., Cervera, M., Ghorbel, R., Domínguez, A., Fagoaga, C., Juárez, J., Pina, J.A. 2007. Genetic Transformation. p. 329-344. En Khan, I.A. (ed.) *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI Head Office, Wallingford, UK.
- Perrier, X., Flori, A. , Bonnot, F. 2003. Data analysis methods. En Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X. , Glaszmann, J. C. (eds.) *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Enfield, Science Publishers, Montpellier: 43 - 76.
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. 2006. DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- Petersen, K.K., Hagberg, P., Kristiansen, K. 2003. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 73(2): 137-146.
- Pooler, M., Scorza, R. 1995. Occurrence of viable eggs in haploid peach. *Fruit Variety Journal*. 49: 239-241.
- Raghuvanshi S. S. 1962. Cytogenetical studies in genus Citrus IV. Evolution in genus Citrus. *Cytologia*. 27: 172-188.
- Ramsey J., Schemske D.W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Revue of Ecology and Systematics*. 29: 467-501.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. 2002. Neopolyploidy in flowering plant. *Annual Revue of Ecology and Systematics*. 33: 589-639.
- Rangan, T.S., Murashige, T., Bitters, W.P. 1968. In vitro initiation of nucelar embryos in monoembryonic citrus. *HortScience*. 3: 226-227.
- Reece, P.C., Hearn, C.J., Gardner, F.E. 1964. Nova tangelo an early ripening hybrid. En *Proceedings Florida State Horticultural Society*. 77: 109-110.
- Risterucci, A.M., Duval, M.F., Rohde, W., Billotte, N. 2005. Isolation and Characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes*. 5: 745-748.

- Rittera, E., Aragonésa, A., Markussenb, T., Acheréc, V., Espinela, S., Fladungb, M., Wrobelb, S., Faivre-Rampantc, P., Jeandrozc, S., Favrec, J.M. 2002. Towards construction of an ultra high density linkage map for *Pinus pinaster*. *Annals of Forest Science*. 59: 637-643.
- Roistacher, C.N. 1979. Elimination of Citrus pathogens in propagative budwood I. Budwood selection, indexing and thermotherapy. En *Proceedings of the International Society of Citriculture*. University of California. Riverside. USA. 3: 965–972.
- Romero-Aranda, R., Bondada, B.R., Syvertsen, J.P., Grosser, J.W. 1996. Leaf Characteristics and Net Gas Exchange of Diploid and Autotetraploid Citrus. *Annals of Botany*. 79: 153-160.
- Roose, M.L., D. Feng, D., Cheng, F.S., Tayyar, R.I., Federici, C.T., Kupper, R.S. 2000. Mapping the citrus genome. En *Proceedings First International Citrus Biotechnology Symposium*. Acta Horticulturae. 535: 25-32.
- Roose, M.L. Williams, T. E. 2007. Mandarin tree named `Tango`. US Patent PP17863.
- Roose, M.L., Randall, P.N., Gmitter, F.G., Timothy, J.C., Abhaya, M.D., Cheng, J.F., Rokhsar, D.S. 2007. Analysis Of A 1.2x Whole Genome Sequence Of *Citrus sinensis*. En *Plant and Animal Genome XV Conference*. San Diego, California, USA.
- Roy, A.T., Legget, G., Koutoulis, A. 2001. In vitro, tetraploide induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*. 20: 489-495.
- Ruiz, C., Bretó, M.P., Asins, M.J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica*. 112: 89-94.
- Ruiz, C., Asíns, M.J. 2003. Comparison between Poncirus and Citrus genetic linkage maps. *Theoretical and Applied Genetics*. 106: 826–836.
- Russo, G., S. Recupero, A. Puglisi, and G.R. Recupero. 2004. New triploid citrus hybrids by Italian genetic improvement. Nuovi ibridi triploidi di agrumi dal miglioramento genetico italiano. *Rivista Frutticoltura Ortofloricoltura* 66(3):14–18.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2004. *Estadística básica*. Mexico. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
- Sankar, A.A., Moore, G.A. 2001. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*. 102: 206-214.
- Saunt, J. 2000. Citrus Varieties of The World. Sinclair International Limited (ed.) 2nd edition. Norwich, England.
- Savage, E.M., Gardner, F.E. 1965. The Troyer and Carriso citranges. *California Citrograph*. 50(3): 112-116.
- Savidan, Y. 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. *Plant Breeding Reviews*. 18: 13-85.
- Schneider, H. 1968. The Anatomy of Citrus. p. 2-17. En Reuther W, Batchelor L. D. and Webber H. J (eds.) *The Citrus Industry*. V.2. University of California, Riverside, USA.
- Schranz, M.E.; Dobes, C.; Koch, M. A.; Mitchell-Olds, T.M. 2005. Sexual reproduction, hybridization, apomixis, and polyploidization in the genus *Boechera* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*. 92:1797-1810.

- Schwarz, S.F. 2001. Autotetraploides espontáneos en patrones de cítricos: incidencia, características y comportamiento en vivero y campo. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Scora, R.W. 1975. On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 102: 369-375.
- Scora, R.W., Kumamoto, J., Soost, R.K., Nauer, E.M. 1982. Contribution to the origin of the grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). *Systematic Botany*. 7: 170-177.
- Scora, R.W. 1988. Biochemistry, taxonomy, and evolution of modern cultivated citrus. En *Proceedings 6th International Citrus Congress*. International Society of citriculture. Margraf, Tel Aviv, Israel. 1: 277-289.
- Scott, K.D., Eggler, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E.M., Lee, L.S., Henry, R.J. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 100:723-726.
- Shimada, T., Fujii, H., Endo, T., Yakazi, J., Kishimoto, N., Shimbo, K., Kikuchi, S., Omura, M. 2005. Toward comprehensive expression profiling by microarray analysis in citrus: monitoring the expression profiles of 2213 genes during fruit development. *Plant Science*. 168(5): 1383-1385.
- Shultz, J., Samreen, K., Rabia, K., Jawaad, A., Lightfoot, D. 2007. The development of BAC-end sequence-based microsatellite markers and placement in the physical and genetic maps of soybean. *Theoretical and Applied Genetics*. 114(6): 1081-1090.
- Simone, M., Russo, M.P., Puelo, G., Marsan, P.A., Lorenzoni, C., Marocco, A., Recupero, R.G. 1998. Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. *Fruits*. 53(6): 383-390.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. 1993. The Dynamic Nature of Polyploid Genomes. En *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(18): 8089-8091.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. 1995. The dynamic nature of polyploid genomes. En *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 8089-8091.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Tate, J.A. 2004. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*. 161: 173-191.
- Soost, R.K. 1969. The incompatibility gene system in Citrus. En *Proceedings of the 1st International Citrus Symposium*. 1: 189-190.
- Soost, R.K., Cameron, J.W. 1975. Citrus. p. 507-540. En J.Janick y J.N. Moore (eds.). *Advances in fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, England.
- Soost, R.K., J.W. Cameron. 1980. 'Oroblanco' a triploid pummelo-grapefruit hybrid. *HortScience*. 15:667-669.
- Soost, R.K., J.W. Cameron. 1985. 'Melogold' a triploid pummelo-grapefruit hybrid. *HortScience*. 20:1134-1135.
- Spiegel-Roy, P., Vardi, A. 1984. Citrus. p. 355-372. En Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Yamada, Y. (eds.) *Handbook of Plant Cell Culture*. V.3. Macmillan, New York, USA.
- Stanys, V., Weckman, A., Staniene, G., Duchovskis, P. 2006. In vitro induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 84: 263-268.

- Starrantino, A., Recupero, G. 1981. Citrus hybrids obtained in vitro from 2x females X 4x males. En *Proceedings 4th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Tokyo, Japan. 1: 31-32.
- Starrantino, A. 1992. Use of triploids for production of seedless cultivars in citrus improvement. En *Proceedings 7th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Acireale, Italy. 1: 117-121.
- Stebbins, G.L. 1970. Chromosomal evolution in higher plants. Edwin Arnold, London, UK.
- Stupar, R., Bhaskar, P.B., Yandell, B.S., Rensik, W.A., Hart, A.L., Ouyang, S., Veillux, R.E., Busse, J.S., Erhardt, R.J., Buell, C.R., Jiang, J. 2007. Phenotypic and Transcriptomic Changes Associated With Potato Autopolyploidization. *Genetics*. 176: 2055-2067.
- Swingle, D.B. 1946. A textbook of systematic botany. (ed.) McGraw-Hill Book Company, Inc. New York and London.
- Swingle, W.T., Reece, P.C. 1967. The botany of citrus and its wild relatives. p. 190-430. En Reuther, W.; Batchelor, L.D.; Webber, H.J. (eds.) *The Citrus Industry*. V.1. University of California, Berkeley, USA.
- Tachikawa T., Tanaka Y., Hara S. 1961. Investigation on the breeding of Citrus trees. Study on the breeding of triploid Citrus varieties. *Bulletin of the Shizuoka Prefectural Citrus Experiment Station*. 4: 33-44.
- Talón, M., Gmitter, F.G. Citrus Genomics. *International Journal of Plant Genomics*. (En prensa).
- Tanaka, T. 1977. Fundamental discussion of Citrus classification. *Studia Citrologica*. 14: 1-6.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 17: 6463-6471.
- Terol, J., Conesa, A., Colmenero, J.M., Cercos, M., Tadeo, F.R., Agustí, J., Alós, E., Andres, F., Soler, G., Brumos, J., Iglesias, D.J., Götz, S., Legaz, F., Argout, X., Courtois, B., Ollitrault, P., Dossat, C., Wincker, P., Morillon, R., Talon, M. 2007. Analyses of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC Genomics*. 8-31.
- Terol, J., Naranjo, M.A., Ollitrault, P., Talon, M. 2008. Development of genomic resources for Citrus clementina: characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. *BMC Genomics*. 9:423 doi:10.1186/1471-2164-9-423
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K., Graner, A. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 106: 411-422.
- Tokunaga, T., M. Nii, T. Tsumura, and M. Yamao. 2005. Production of triploids and breeding seedless cultivar 'Tokushima 3X No.1' from tetraploid x diploid crosses in sudachi (*Citrus sudachi* Shirai). *The Japanese Society for Horticultural Science*. 4(1):11-15.
- Toolapong, P., H. Komatsu, H., Iwamasa, M. 1996. Triploids and haploid progenies derived from small seeds of 'Banpeiyu' pummelo, crossed with 'Ruby Red' grapefruit. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science*. 65: 255-260.
- Torres, A.M., Mau-Lastovicka, T., Williams, T.E., Soost, R.K. 1985. Segregation distortion and linkage of citrus and Poncirus isozyme genes. *Journal of Heredity*. 76(4): 289-294.

- Tusa, N., Fatta del Bosco, S., Nardi, L., Lucretti, S. 1996. Obtaining triploid plants by crossing Citrus limon cv. Feminello 2N x 4N allotetraploid somatic hybrids. En *Proceedings of 8th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Sun City, South Africa. 1: 133-136.
- UPOV. Unión Internacional para la Protección de Variedades. Directrices para los perfiles de ADN: Selección de marcadores moleculares y creación de bases de datos. 2007. Documento: Directrices BMT (proj. 9).
- UPOV. Unión Internacional para la Protección de Variedades. Technical Questionnaire. 2006. Documento: CPVO-TP/201/1.
- Väinölä, A. 2000. Polyploidization and early screening of Rhododendron hybrids. *Euphytica*. 112: 239-244.
- Vardi, A., Spiegel-Roy, P., Elchanati, A. 1993a. Mandarin tree named 'Mor'. US Patent PP8378.
- Vardi, A., Spiegel-Roy, P., Elchanati, A. 1993b. Mandarin tree named 'Winola'. US Patent PP08219.
- Vardi, A., Elchanati, A., Frydman-Shani, A., Neumann H. 1996. Strategies and considerations in mandarin improvement programmes. En *Proceedings of 8th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Sun City, South Africa. 1: 109-112.
- Vardi, A., Spiegel-Roy, P., Frydman-Shani, A., Elchanati, A., Neumann, H. 2000. Citrus tree named 'Orri'. US Patent PP13616.
- Velu, S., Mullainathan, L. Arulbalachandran, D., Dhanavel, D., Poongkuzhali, R. 2008. Studies on effect of chemical mutagens in cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). *Plant Archives*. 1: 265-266.
- Wakana, S., Iwamasa, M., Remoto, S. 1981. Seed development in relation to ploidy of zygotic embryo and endosperm in polyembryonic citrus. En *Proceedings 4th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture, Tokyo, Japan. 1: 35-59.
- Wakana, A., Uemoto, S. 1987. Adventive embryogenesis in citrus I. The occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. *American Journal of Botany*. 74: 517-530.
- Wakana, A., Uemoto, S. 1988. Adventive embryogenesis in citrus (Rutaceae) II. Postfertilization development. *American Journal of Botany*. 75: 1033-1047.
- Wakana, A., Ngo, X.B., Isshiki, S. 1998. Self-incompatibility in Citrus: linkage between GOT isozyme loci and the incompatibility loci. pp. 90-93. En Omura, M., Hayashi, T., Scott, N.S. (eds.) *Breeding and Biotechnology for Fruit Trees; Second Japan-Australia International Workshop*. NIFTS/CSIRO.
- Wakana, A., Hanada, N., Park, S., Fukudome, I., Kajiwara, K. 2005. Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*. 50(1): 93-102.
- Weathers, L.G., Calavan, E.C. 1959. Nucellar embryony as a means of freeing citrus clones of virus diseases. p. 197-202. En Wallace, J.M. (ed.) *Citrus Virus Diseases*. University of California, Berkeley, USA.
- Webber, H.J. 1967. History and development of the Citrus industry. p. 1-39. En Reuther, W., Batchelor, L.D. y Webber, H.J. (eds.) *The Citrus industry*. University of California, California, USA.

- Wendel, J., Doyle, J. 2005. Polyploidy and evolution in plants. p. 97–117. En R.J. Henry (ed.) Plant diversity and evolution. *Genotypic and phenotypic variation in higher plants*. CAB International.
- Williams, T.E., Roose, M.L. 2004. `TDE2` Mandarin hybrid (Shasta Gold® Mandarin), `TDE3` Mandarin hybrid (Tahoe Gold® Mandarin) and `TDE4` Mandarin hybrid (Yosemite Gold® Mandarin): Three New Mid and Late-Season Triploid Seedless Mandarin Hybrids from California. En *Proceedings of 10th International Citrus Congress*. International Society of Citriculture. Agadir, Marruecos. 1: 394-398.
- Wu, J-H., Money, P. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from in vitro Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70: 99-104.
- Wu, Y.Q. y Huang, Y. 2007. An SSR genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and its comparison to a published genetic map. *Genome*. 1:84–89.
- Yahata, M., Harusaki, S., Komatsu, H., Takami, K., Kunitake, H., Yabuya, T., Yamashita, K., Toolapong, P. 2005a. Morphological Characterization and Molecular Verification of a Fertile Haploid Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck). *Journal of American Society of Horticultural Science*. 130(1): 34-40.
- Yahata, M., Kunitake, H., Yabuya, T., Yamashita, K., Kashihara, Y., Komatsu, H. 2005b. Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130 (6): 899-903.
- Yamamoto, M., Tominaga, S. 2004. CMA Banding Pattern of Chromosomes Is Useful for the Identification of Chromosome Doubling in Haploid Citrus. *Breeding Science*. 54: 351-354.
- Yang, C., Mulligan, B.J., Wilson, Z.A. 2004. Molecular genetic analysis of pollen irradiation mutagenesis in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 164: 279-288.
- Yoshida T., Nesumi H., Yoshioka T., Ieki H., Ito Y., Nakano M., Ueno I., Yamada Y., Murase S. and Takishita F. 2003. New kumquat cultivar 'Puchimaru'. *Bulletin of the National Institute of Fruit Tree Science*. 2: 9-16.
- Zaffar, G., Wani, S.A., Anjum, T., Zeerak, N.A. 2004. Colchicine induced variability in saffron. En *Proceedings of the First International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology*. Albacete, España. 650: 277-280.
- Zaragoza, S. 2007. Aproximación a la historia de los cítricos. Origen, dispersión y evolución de su uso y cultivo. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Departamento de Producción Vegetal. Valencia. España.
- Zhang, Y.X., Lespinasse, Y. 1991. Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. *Euphytica*. 54: 101-109.
- Zhang, M., Deng, X., Qin, C., Chen, C., Zhang, H., Liu, Q., Song, W., Tan, Y., Liao, S. 2007. Characterization of a New Natural Periclinal Navel-Satsuma Chimera of Citrus: `Zaohong` Navel Orange. *Journal the American Society of Horticultural Science*. 132(3): 374-380.
- Zhou, S., Ramana, M.S., Visser, R.G.F., Van Tuyl J.M. 2008. Genome composition of triploid lily cultivars derived from sexual polyploidization of Longiflorum x Asiatic hybrids (Lilium). *Euphytica*. 160: 207-215.

