

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL**



**GENOTIPADO POR SECUENCIACIÓN PARA LA
TOLERANCIA A SALINIDAD EN PATRONES DE
CÍTRICOS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL

Virginia García-Calabrés Marín

TUTORES

M^a Ángeles Forner Giner (IVIA)

José Miguel Blanca Postigo (UPV)

CURSO ACADÉMICO 2020/21

Convocatoria 13 de septiembre de 2021

VALENCIA, 13 SEPTIEMBRE 2021

GENOTIPADO POR SECUENCIACIÓN PARA LA TOLERANCIA A SALINIDAD EN PATRONES DE CÍTRICOS

Resumen

Los cítricos son un conjunto de cultivos sensibles a salinidad que incluso a concentraciones moderadas sufren desordenes fisiológicos tales como la toxicidad por iones específicos, desequilibrios nutricionales, alteración de los parámetros de intercambio gaseoso o condiciones hídricas adversas que conducen a un retraso del crecimiento. El componente más importante del árbol en cuanto a la tolerancia o sensibilidad a la sal es el patrón. La elección del patrón adecuado es de suma importancia, no solo para obtener el mayor rendimiento posible de las variedades injertadas en condiciones salinas u otros estreses abióticos, sino para proteger a la planta frente al ataque de patógenos. El cribado de patrones de cítricos es un proceso largo y costoso, que requiere de mucho espacio para los ensayos y una gran inversión para llevar a cabo la evaluación.

En el presente trabajo de fin de máster se ha realizado por primera vez un estudio de asociación de genomas (GWAS) en una población de patrones híbridos de cítricos resultantes del cruce mandarino Cleopatra x *Poncirus trifoliata* donde se relaciona la tolerancia a salinidad con el genotipo obtenido mediante el genotipado por secuenciación (GBS) de cada uno de los híbridos, con el objetivo de acortar el tiempo de evaluación del material vegetal y determinar las diferencias genéticas subyacentes en respuesta a la salinidad.

Del GBS se obtuvieron un total de 91,794 SNPs distribuidos en los 9 cromosomas de *Citrus clementina*, genoma utilizado como referencia. En base a ocho modelos genéticos distintos se asociaron 142 SNPs con la tolerancia a la salinidad postulándose como posibles candidatos para la obtención de marcadores moleculares en programas de mejora para la tolerancia a salinidad en patrones de cítricos.

Palabras Clave: Citrus, cítricos, patrón, GBS, GWAS, salinidad, estrés abiótico

GENOTYPING-BY-SEQUENCING (GBS) FOR SALT TOLERANCE ON CITRUS ROOTSTOCKS

Abstract

Citrus is a salt-sensitive crop, which, even at moderate salinities, suffers physiological disturbances such as ion-specific toxicity, nutrient imbalances, altered gas exchange parameters and adverse water relations leading to stunted growth. The most important component of the tree, as far as its salt tolerance or sensitivity is concerned, is the rootstock. The choice of the appropriate rootstock is of the utmost importance in obtaining the greatest yield possible from citrus in saline conditions. The use of rootstocks includes not only better tolerance to abiotic stresses but also better resistance to pathogens and a better performance of the grafted variety. The screening of citrus rootstocks is a long and expensive process, requiring a lot of space for trials and large costs for evaluation.

In this work, we will perform for the first time a Genome-Wide Association Study (GWAS) association study for the salt tolerance character on different *Citrus* hybrids rootstocks as a result of a Cleopatra mandarin x *Poncirus trifoliata* crossing, where salt tolerance is related with the genotype obtained through a genotyping-by-sequencing (GBS) approach performed on each hybrid, with the aim to shorten the time of evaluation of the new plant material and to assess the genetic differences of the hybrids which could underlay the response to salt tolerance.

Based on the GBS approach 91,794 SNPs were obtained along the 9 chromosomes found in *Citrus clementina*, the genome used as a reference. Based on eight different genetic models 142 SNPs were associated as salt tolerance being potential candidates as molecular markers in future breeding programmes related to salt tolerance on citrus rootstocks.

Keywords: Citrus, rootstock, GBS, GWAS, salinity, abiotic stress

AGRADECIMIENTOS

Con la entrega de este trabajo no pongo punto final simplemente al Trabajo de Fin de Máster, si no a dos años llenos de penas y glorias con mis compañeros del máster. Dos años difíciles, pero en los que creo que todos hemos crecido como personas y profesionales. Por eso en primer lugar, me gustaría agradecer a los profesores del máster por compartir sus conocimientos con nosotros y a mis compañeros por compartir este viaje conmigo. Voy a echar mucho de menos los ratitos en la cafetería del Poli y las muchas risas y cafés que allí nos hemos echado. Alicia, Maya, Marina y Silvia gracias por demostrarme que andaluces y murcianos somos primos hermanos. Pablo, no has venido a Córdoba, pero no dudes que iré a visitarte a Paraguay.

Muchas gracias al IVIA por permitirme realizar el TFM en sus instalaciones y muchas gracias especialmente a M^a Ángeles por su atención y dedicación; a Amparo por su paciencia y sus consejos en el laboratorio; y muchas gracias a Vicky por hacer que la genómica parezca un juego. Para mí sois un ejemplo a seguir.

No me puedo olvidar de las personas que han estado junto a mí en este camino: Macarena e Irene perdón por todas las veces que habéis tenido que escuchar la palabra TFM, sois las mejores compañeras de piso del mundo. María, Laura, Rama, Javi, Miriam y Virginia, gracias por estar siempre que os necesito. No sabéis el apoyo que suponéis para mí en todos los sentidos.

Por último, pero no menos importante muchas gracias a mi familia: Pablo, Ángel, Encarnación y Rafael; por haberme brindado todos los recursos, el cariño y el apoyo para haber podido llegar hasta aquí.

Gracias a todos,
Virginia

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1.Importancia económica de los cítricos	2
1.2.Origen y taxonomía	4
1.3.Patrones de cítricos	7
1.4.Salinidad	10
1.4.1. La salinidad en los cítricos	12
1.4.2. Patrones de cítricos y salinidad	12
1.5.Mecanismos de tolerancia a salinidad en cítricos	15
1.5.1. Exclusión de sodio	15
1.5.2. Exclusión de cloruro	15
1.5.3. Comportamiento de los cítricos frente a la salinidad	17
1.6. Genotipado por secuenciación (GBS)	19
1.7. Genome-Wide Association Study (GWAS)	22
2. Objetivos	23
3. Materiales y métodos	24
3.1.Material vegetal y condiciones de crecimiento	24
3.2.Fenotipado del material vegetal	25
3.2.1. Parámetros de crecimiento	25
3.2.2. Determinación de cloruro	25
3.2.3. Determinación de sodio	25
3.2.4. Medidas de intercambio gaseoso	26
3.3.Extracción de ADN y secuenciación	26
3.4.Preparación de la librería GBS y secuenciación	27
3.5.SNP calling	27
3.6.GWAS	28

3.7. Clasificación de los SNPs en base a la cercanía a genes anotados	29
3.8. Contraste de los SNPs con genes previamente descritos en salinidad	30
4. Resultados	31
4.1. Fenotipado del material vegetal	31
4.2. Genotipado por secuenciación (GBS)	32
4.3. GWAS	34
4.3.1. Modelo Dominante Resistente Referencia	
4.3.2. Modelo Dominante Resistente Alternativo	36
4.3.3. Modelo Dominante Sensible Referencia	37
4.3.4. Modelo Dominante Sensible Alternativo	38
4.3.5. Modelo Recesivo Resistente Referencia	39
4.3.6. Modelo Recesivo Resistente Alternativo	40
4.3.7. Modelo Aditivo Resistente Referencia	40
4.3.8. Modelo Aditivo Resistente Alternativo	41
4.4. Contraste de los SNPs con genes previamente descritos en salinidad	43
5. Discusión	44
6. Conclusiones	54
Bibliografía	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de cítricos a nivel mundial (Sanfeliú Feliú, 2016)	2
Figura 2. Producción española de cítricos (FAOSTAT, 2015)	3
Figura 3. Superficie citrícola española por comunidades (Sanfeliú Feliú, 2016)	3
Figura 4. Genealogía de los principales genotipos de cítricos. (Wu <i>et al.</i> , 2018)	5
Figura 5. Centro de origen propuesto para los cítricos y principales rutas de dispersión (Wu <i>et al.</i> , 2018)	6
Figura 6. Regulación de la translocación de Cl ⁻ en el xilema de la raíz por medio de los canales aniónicos SLAH1 y SLAH3 (Cubero-Font <i>et al.</i> , 2016)	16
Figura 7. Modelo propuesto para la regulación de las raíces en respuestas a estrés salino (Xie <i>et al.</i> , 2018)	18
Figura 8. Evolución de los precios por marcador molecular desde 2001 hasta 2020	20
Figura 9. Flujo de trabajo en la plataforma de secuenciación Illumina (Mardis, 2008)	21
Figura 10. Gel de agarosa al 1% que presenta banda nítida de ADN	26
Figura 11. Fenotipo de los individuos en relación con la respuesta al tratamiento salino	31
Figura 12. Distribución de los SNPs obtenidos en el GBS	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características determinadas por el patrón (Castle, 2010)	8
Tabla 2. Modelos establecidos para el estudio de asociación de genomas	28
Tabla 3. SNPs obtenidos por cromosoma, número de megabases por cromosoma (Mb) y densidad de SNPs por Mb	32
Tabla 4. Número de SNPs con más de un 70% de asociación y más de un 40% de individuos genotipados para cada SNP obtenidos en cada modelo empleado	34
Tabla 5. SNPs obtenidos en el Modelo Dominante Resistente Referencia	35
Tabla 6. SNPs obtenidos en el Modelo Dominante Resistente Alternativo	36
Tabla 7. SNPs obtenidos en el Modelo Dominante Sensible Referencia	37
Tabla 8. SNPs obtenidos en el Modelo Dominante Sensible Alternativo	38
Tabla 9. SNPs obtenidos en el Modelo Recesivo Resistente Referencia	39
Tabla 10. SNPs obtenidos en el Modelo Recesivo Resistente Alternativo	40
Tabla 11. SNPs obtenidos en el Modelo Aditivo Resistente Referencia	40
Tabla 12. SNPs obtenidos en el Modelo Aditivo Resistente Alternativo	42

PRINCIPALES ABREVIACIONES

ABA: Abscisic Acid

ACC: Amino Cyclopropane Carboxylic Acid

GBS: Genotyping-by-Sequencing

GRF: Growth Regulating Factor

GWAS: Genome-Wide Association Study

GRF: Growth Regulating Factor

HKT: High K Affinity Transporter

JA: Jasmonic Acid

QLQ: Glutamine-Leucine-Glutamine

RING: Really Interesting New Gene

ROS: Reactive Oxygen Species

SOS: Salt Overly Sensitive

WAK: Wall Associated Kinase

ZF: Zinc Finger

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son conocidos por poseer frutos con un refrescante aroma, capacidad para saciar la sed y por proveer unos niveles adecuados de vitamina C según las dosis diarias recomendadas. Además, estudios recientes indican que cuentan con una gran cantidad de compuestos fitoquímicos con propiedades nutraceuticas tales como los carotenoides, limonoides, flavononas, vitamina B y nutrientes relacionados que actúan como importantes sustancias anticancerígenas y que juegan un papel muy importante en procesos antioxidantes, inflamatorios y de alergias. Muchos de estos compuestos resultan esenciales en la lucha contra enfermedades cardiovasculares y degenerativas, trombosis, cáncer, aterosclerosis y obesidad. Debido a su importancia y a su creciente demanda, se hacen necesarios estudios relacionados con la mejora del cultivo para adaptarlo a las actuales condiciones agroambientales y garantizar su calidad y productividad. (Ma *et al.*, 2020; Nimbolkar *et al.*, 2016)

1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS CÍTRICOS

Los cítricos son el cultivo de árboles frutales más consumidos a nivel mundial con una producción total de 121,3 millones de toneladas que incluyen tanto el mercado en fresco como la industria según los datos publicados por la FAO en el año 2014. Si hacemos una distinción en función de la especie, la naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) representa un 57% del total de la producción, la mandarina y especies afines (*C. reticulata* Blanco) un 26%, limones (*C. limon* Burm. F.) y limas (*C. latifolia* Tan. y *C. aurantifolia* Swingle) el 11% y en último lugar el pomelo (*C. paradisi* Macf.) con una producción del 6% (Fig. 1). (Sanfeliú Feliú, 2016)



Figura 1. Producción de cítricos a nivel mundial (Sanfeliú Feliú, 2016)

Esta producción no ha hecho más que aumentar en los últimos años, pasando de las 106 millones de toneladas producidas en el año 2007 a las 121 millones de Tm del año 2014, lo cual supone un aumento del 14% con un crecimiento medio anual del 2% en un periodo de tiempo inferior a diez años, debido a distintos factores como el aumento de la población, una mayor tendencia a consumir fuentes de vitamina C o la mejor conservación de los cítricos frente a otro tipo de frutas.

Los principales países productores son China, Brasil, Estados Unidos, México, India y España, en la sexta posición. El papel de España no es para nada despreciable en el panorama de la citricultura mundial ya que a pesar de su sexta posición en la producción mundial de cítricos encabeza la lista en cuanto a exportación mundial de cítrico en fresco se refiere, además de ser el primer exportador mundial de naranjas, mandarinas y limón y el sexto en pomelo (Sanfeliú Feliú, 2016)

PRODUCCIÓN ESPAÑOLA DE CÍTRICOS

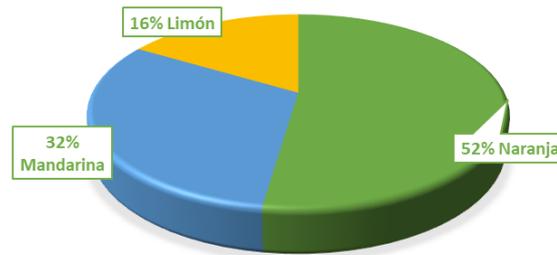


Figura 2. Producción española de cítricos (FAOSTAT, 2015)

La superficie citrícola española se concentra principalmente en la naranja, la cual supone un 52% del total de la producción, mandarina (32%) y limonero (16%) (Fig. 2.). La producción de pomelo, naranjo amargo y otros cítricos es residual. Si nos fijamos en las principales zonas de producción españolas, vemos que destacan principalmente la Comunidad Valenciana, Andalucía y Murcia (Fig. 3)

CCAA	Sup (ha)
C. Valenciana	162.093
Andalucía	82.772
Murcia	41.078
Cataluña	11.157
Baleares	1.050
Otras CC.AA.	1.368
TOTAL	299.518

SUPERFICIE CITRÍCOLA ESPAÑOLA

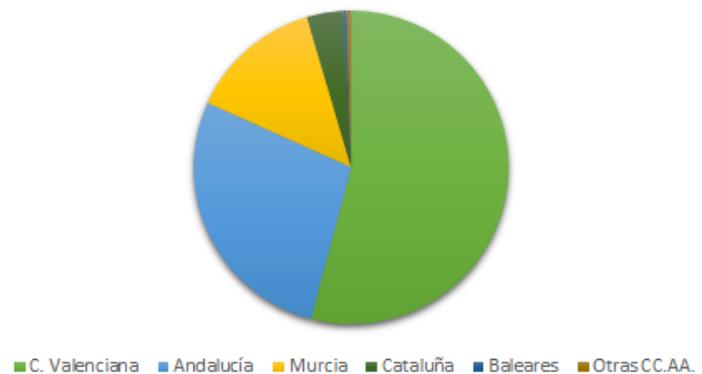


Figura 3. Superficie citrícola española por comunidades (Sanfeliú Feliú, 2016)

1.2. ORIGEN Y TAXONOMÍA

El género *Citrus* y otros géneros relacionados tales como *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* y *Microcitrus* pertenecen a la familia *Rutaceae*, más concretamente a la subfamilia *Aurantioideae*. Una característica de esta subfamilia es que es monofilética, todos sus individuos han evolucionado a partir de una única población ancestral. Las especies de esta familia son árboles o arbustos de hoja perenne, excepto las pertenecientes al género *Poncirus* (Agustí *et al.*, 2020).

Las especies pertenecientes al género *Citrus* presentan una elevada variabilidad incluyéndose un gran número de especies e híbridos. Las especies más importantes desde el punto de vista agronómico tanto para la producción de frutos destinados consumo en fresco como destinados a la industria son las siguientes:

- *C. aurantifolia*. Lima Mexicana
- *C. latifolia*. Lima Tahití
- *C. aurantium* L. Naranja amargo
- *C. grandis* (L.) Osb. Pummelo
- *C. limon*. Limonero
- *C. paradisi*. Pomelo
- *C. reticulata*. Mandarina
- *C. sinensis*. Naranja dulce

La alta variabilidad de los cítricos es el resultado de un proceso multifactorial donde han tenido gran peso eventos tales como la domesticación o la elevada compatibilidad sexual interespecífica e intergenérica con géneros como *Poncirus*. Esto, unido a las diferentes mutaciones e hibridaciones naturales, una apomixis bastante frecuente dentro del género y un alto grado de heterocigosis, ha hecho que la taxonomía y filogenia de los cítricos sea una tarea difícil de resolver (Agustí *et al.*, 2020).

El sistema taxonómico original de los cítricos data de finales del siglo XIX y fue desarrollado Hooker y Engler en base a las características morfológicas y el supuesto origen de las especies. A mediados del siglo XX, Swingle creó un sistema taxonómico basado en la morfología que incluía 13 especies (Swingle, W. T. & Reece, 1967) y posteriormente Tanaka en 1977 desarrolló una clasificación más amplia identificando un total de 145 especies diferentes (Tanaka, 1977).

Estudios más recientes proponen una reformulación del género basada en la divergencia genética interespecífica resultante de la comparación entre genotipos diploides. El estudio de Wu. *et al.* (2018) muestra cómo varios géneros (*Fortunella*, *Eremocitrus* y *Microcitrus*) se encuentran en el clado *Citrus* mientras que *Poncirus* constituye un clado diferente. El criterio de divergencia genética para la delimitación de las especies muestra dos géneros diferentes, *Poncirus* y *Severinia* y diez especies ancestrales que incluyen siete procedentes de Asia y tres procedentes de Australia. Las siete especies asiáticas serían *C. medica* (cidro), *C. máxima* (pomelo), *C. reticulata* (mandarinas puras), *C. micrantha*, *C. ichangensis*, *Fortunella margarita* (Nagami kumquat) y *C. mangshanensis*. Las especies australianas son *Eremocitrus glauca*, *Microcitrus australis* y *Microcitrus australasica*. El resto de las especies proceden de hibridaciones sucesivas e introgresiones genéticas. Por ejemplo, el naranjo amargo procedería del cruce entre mandarina y pomelo que a su vez dio lugar al limón al cruzarse con el cidro (*C. medica*) (Fig. 4).

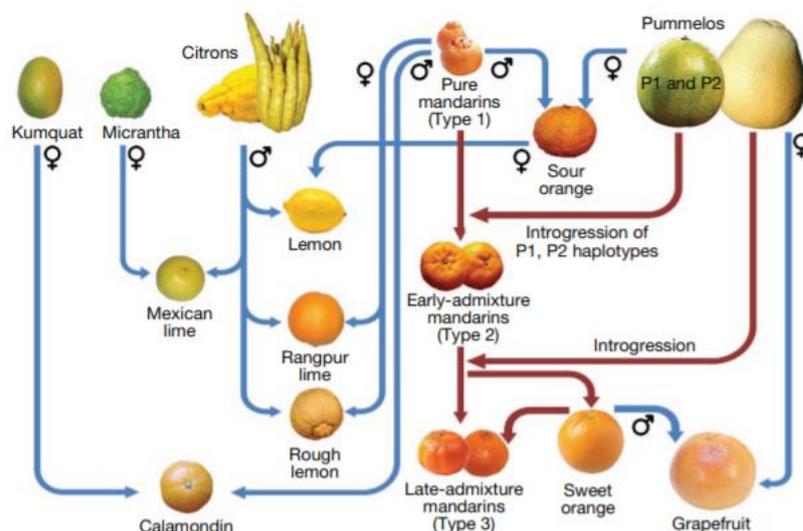


Figura 4. Genealogía de los principales genotipos de cítricos. Las cinco especies progenitoras se muestran en la parte superior. Las líneas azules representan cruces simples entre dos genotipos parentales y las líneas rojas procesos más complejos que involucran a múltiples individuos, generaciones y o retrocruces. (Wu *et al.*, 2018)

El género *Citrus* se encuentra ampliamente distribuido en Asia y su centro de origen se ha situado tradicionalmente desde la parte oeste de Pakistán hasta el centro-norte de China y en la parte sur desde India Oriental hasta Nueva Guinea y el archipiélago de Bismarck, noreste de Australia, Nueva Caledonia, Melanesia y las islas de Polinesia occidental (Swingle, W. T. & Reece, 1967). Recientemente se ha conseguido acotar su centro de origen, situándolo en las laderas del Himalaya en una región que incluye el oeste de Assam, el norte de Myanmar y el este de Yunnan.

La estrella roja señalada en el mapa (Fig. 5) marca la ubicación de *Citrus ichangensis*. Las flechas indican hacia qué zonas migraron las principales especies de cítricos. El principal evento de especiación se explica durante el Mioceno tardío a causa de una radiación que coincidió con una pronunciada transición de unas condiciones húmedas a un clima más seco. Posteriormente hubo otros eventos de especiación durante el Plioceno temprano y el Pleistoceno que dieron lugar a las especies cítricas australianas y la Tachibana japonesa, separándolas de las especies continentales (Jena *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2018)

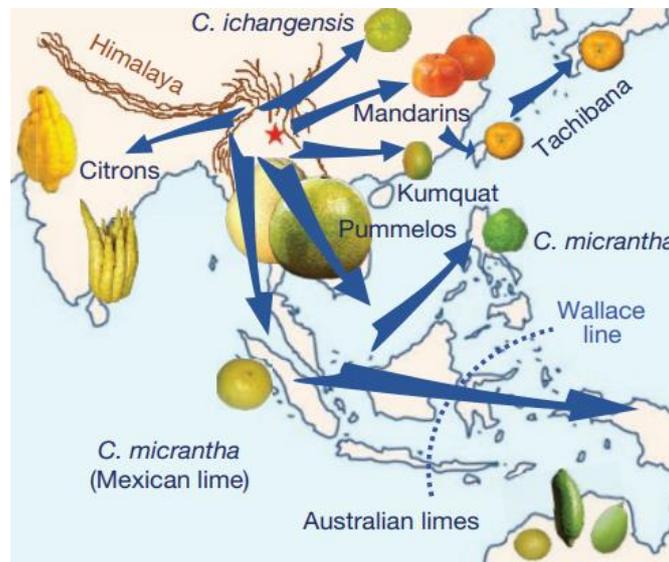


Figura 5. Centro de origen propuesto para los cítricos y principales rutas de dispersión (Wu *et al.*, 2018)

1.3. PATRONES DE CÍTRICOS

La utilización de patrones es fundamental en cítricos, ya que todas las variedades, ya sean, naranjas, mandarinas, limones o pomelos; son muy sensibles a hongos del género *Phytophthora*, presentes en casi todos los suelos. El naranjo amargo se convirtió en el patrón estándar utilizado en todas las plantaciones de cítricos en los países mediterráneos debido a su buena adaptación a nuestras condiciones de cultivo. Desafortunadamente en 1957 los árboles de mandarinas, naranjas y pomelos injertados sobre naranjo amargo murieron a causa del virus de la tristeza de los cítricos (CTV), enfermedad que ya había afectado a millones de árboles en todo el mundo y que supuso la muerte de aproximadamente 50 millones de plantas y la reconversión de la citricultura española al tener que identificar y utilizar patrones tolerantes a esta enfermedad. El cultivo sobre un solo patrón puso en peligro la totalidad de las plantaciones, siendo este un riesgo inasumible en el sector productivo cítrico actual (Aleza *et al.*, 2020)

Los estreses abióticos que más afectan a la citricultura española son la clorosis férrica inducida por suelos calizos, la salinidad, la asfixia radical, ya sea por inundaciones o una capa freática alta; y la sequía (Aleza *et al.*, 2020).

Actualmente el citrange Carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata* (L.) Raf.) es el patrón más utilizado para naranjos, mandarinos y pomelos (80% de las plantaciones), aunque también se utilizan otros patrones, como el mandarino Cleopatra (*C. reshni* Hort. ex Tan.) (8%), el *C. volkameriana* Ten. & Pasq. (4%) y el citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) (menos del 1%). El patrón *C. macrophylla* Wester se utiliza para variedades de limonero, aunque en la actualidad también se está empleando en naranjas y mandarinas. Sin embargo, el comportamiento agronómico de dichos patrones presenta determinadas sensibilidades específicas. Este hecho unido en muchos casos a la utilización incorrecta de los patrones ocasiona la aparición de múltiples problemas en campo (Agustí *et al.*, 2020; Bowman & Joubert, 2020).

Las variedades injertadas sobre el citrange Carrizo muestran frecuentemente problemas causados por la clorosis férrica y/o la salinidad. El mandarino Cleopatra es tolerante a este problema, pero crece lentamente los primeros años en el campo y aunque la fruta es de muy

buena calidad, su producción no es muy elevada y es de menor tamaño que la producida sobre otros patrones siendo esto un importante problema comercial. El citrumelo Swingle es muy sensible a la clorosis férrica. *C. volkameriana* es sensible a *Phytophthora* spp. en las condiciones españolas y *C. macrophylla* presenta sensibilidad a tristeza e induce baja calidad en la fruta. (Agustí *et al.*, 2020; Bowman & Joubert, 2020)

No existe ningún patrón que combine todas las características deseables y su elección depende de los factores limitantes de cada región, su clima, tipo de suelo y variedad a cultivar. Aunque un patrón se adapte perfectamente a las características de una región nunca es recomendable el uso masivo de un único patrón debido a la incidencia de posibles nuevas enfermedades o que puedan llegar a arrasarse con el cultivo como fue el caso del naranjo amargo y el CTV mencionado anteriormente. (Agustí *et al.*, 2020; Bowman & Joubert, 2020)

La elección del patrón determina enormemente el éxito de la plantación ya que nos va a permitir optimizar la duración y la sanidad vegetal del sistema radicular. El patrón va a ser responsable de la absorción de agua y nutrientes, la acumulación de carbohidratos sintetizados en las hojas, la síntesis de hormonas, la adaptación de las variedades a las condiciones de suelo y de la tolerancia de estas a determinadas enfermedades. Más de 20 características de una variedad están influidas por la elección del patrón incluyéndose: el vigor y tamaño del árbol, el desarrollo y la profundidad de las raíces, la cosecha, tamaño, textura, calidad intrínseca y época de maduración del fruto, tolerancia del frío, adaptación a las condiciones del suelo tales como la salinidad, pH y excesos de agua, comportamiento frente a nemátodos, hongos o tolerancia a virus (Tabla 1) (Castle, 2010).

Tabla 1. Características determinadas por el patrón (Castle, 2010)

	Attribute	Remarks on attributes as a rootstock selection criterion
1	Yield	A major consideration
2	Precocity	A special factor as interest in higher-density plantings increases
3	Yield efficiency	Can be important, but not usually a selection criterion
4	Fruit quality	A major factor for fresh fruit growers
5	Fruit size	Important enough to be considered separately from quality
6	Juice quality	Brix and acid are affected; a major factor for growers of both fresh and processing fruit
7	Tree growth	Usually considered in terms of vigor and eventual tree size, a criterion that is increasing in importance
8	Compatibility	Scion-rootstock vegetative compatibility is often important
9	Ease of propagation	Largely a matter of seed production and degree of nucellar embryony
10	Shoot flushing	A new criterion related to Huanglongbing and spread by psyllids
11	Mineral nutrition	Not usually a selection criterion, but there are rootstock effects
12	Salinity	In some instances, an important selection criterion
13	Clay soil	High content or soil horizons can affect a rootstock decision
14	High soil pH	A very important factor with trifoliolate orange-based rootstocks
15	Wet soil (flooding)	Not usually a selection factor but can be important
16	Drought	Modern irrigation methods usually preclude this as a selection factor
17	Cold (freezes)	Often considered in regions threatened by chronic cold
18	Citrus blight	At one time, a major consideration, but less so now in Florida
19	Phytophthora rots	Still an important factor in rootstock decisions
20	<i>P. palmivora</i> /root weevil complex	A problem specific to Florida involving a particular species of <i>Phytophthora</i> fungus and <i>Diaprepes</i> root weevil
21	Root weevils	A troublesome problem at times in some areas
22	Burrowing nematode	A problem in Florida for which specific rootstocks are used
23	Citrus nematode	A more universal problem with specific rootstock options
24	Tristeza virus	A serious threat with some rootstock options
25	Exocortis and xyloporosis viroids	Not generally a threat today with clean budwood

*The list is not intended to be comprehensive but to show the most important attributes representative of the world's citrus industries.

AVANCES EN LA MEJORA DE PATRONES

Los primeros trabajos enfocados a la mejora genética de cítricos se iniciaron en 1893 de la mano de Swingle y Webber, que aprovechando la capacidad de hibridación interespecífica e intergenérica de los cítricos obtuvieron numerosos híbridos con *Poncirus* con el objetivo de obtener nuevas variedades tolerantes al frío. Posteriormente muchos son los autores que han llevado a cabo programas de mejora principalmente enfocados a variedades, aunque posteriormente los materiales hayan llegado a alcanzar gran importancia como patrones, como es el caso del citrange Troyer o Carrizo (Forner Giner, 2002).

En España los trabajos de mejora genética de nuevos patrones comenzaron en 1974 en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Los objetivos de dicho programa son la obtención de nuevos materiales tolerantes a estreses bióticos y abióticos presentes en la citricultura española. Fruto de dicho programa hay 5 nuevos patrones comerciales siendo uno de ellos el Forner-Alcaide 5, uno de los patrones más demandados.

Cabe destacar que con el fin de obtener nuevos materiales, los programas de mejora en cítricos están incorporando nuevas herramientas como: la fusión de protoplastos, que permite la reproducción de especies sexualmente incompatibles y la obtención de patrones y/o variedades con diferentes niveles de ploidía (Grosser & Gmitter, 2010); la ingeniería genética con distintos objetivos como la introducción de genes de tolerancia a salinidad (Cervera *et al.*, 2015) o de floración temprana (Soares *et al.*, 2020); así como la edición de genomas mediada por CRISPR-Cas, la cual a pesar de su reciente desarrollo ya arroja resultados prometedores en la resistencia a enfermedades en cítricos, como por ejemplo en la lucha contra el chancro de los cítricos (*Xanthomonas axonopodis*) (Jia *et al.*, 2017).

Tradicionalmente la mejora de las plantas se ha hecho en base a una selección según el fenotipo de los individuos por presentar alguna característica de interés. Si la selección sólo era realizada por características del fruto, sólo podía comenzar a realizarse a los 3-6 años de la siembra dado que el periodo de juvenilidad en este género es elevado. Por tanto, se necesitaban al menos 10-15 años hasta su evaluación. El uso de técnicas genómicas facilita la selección del material vegetal obtenido, permitiendo un fenotipado más rápido y preciso, acortando de manera significativa la selección del material vegetal, y permitiendo que esté disponible más rápidamente por el sector. Con la selección asistida por marcadores es posible

seleccionar a los individuos en base a su genotipo durante las primeras fases de desarrollo cuando se encuentran en estadio de plántula permitiendo reducir no sólo el tiempo de evaluación si no los costes derivados del personal y las infraestructuras para cultivar el material vegetal (Ibanez, 2020).

1.4. SALINIDAD

El término “salinidad” se refiere a la presencia de cationes de sodio (Na^+), calcio, boro, magnesio, potasio y/o aniones cloruro (Cl^-), así como sulfato y carbonato en la cantidades elevadas en el suelo como para reducir el crecimiento (Ferguson & Grattan, 2005). Sin embargo, en la mayoría de los estudios se observa que el causante principal de este problema es el cloruro de sodio (NaCl).

La salinidad es un problema ampliamente extendido a nivel mundial. Se estima que aproximadamente un tercio de la superficie terrestre está afectada por un exceso de sales, especialmente en regiones áridas y semiáridas donde la escasez de agua de lluvia provoca su acumulación en el suelo. (Moya, 2000)

La necesidad de producir cada vez más alimentos ha provocado el uso de terrenos marginales caracterizados frecuentemente por suelos y aguas con un alto grado de salinidad natural. Esto, unido a las prácticas de cultivo utilizadas por el hombre a lo largo de la historia, que han tenido como consecuencia una alteración de las características del suelo y de la cubierta vegetal ha provocado que el problema de la salinidad no haya hecho más que agravarse a la vez que ha limitado el rendimiento de los cultivos agrícolas (Moya, 2000)

Ciertas prácticas como la mejora del drenaje de los suelos (capaz de facilitar la lixiviación de las sales), la mejora del riego o el uso de cultivos tolerantes son capaces de aliviar este problema. Pero para obtener el mejor cultivo en lo que respecta a la tolerancia a salinidad se hace imprescindible evaluar la respuesta del material vegetal disponible en la actualidad en condiciones de estrés salino, así como el desarrollo de nuevos genotipos con mayor capacidad de adaptación a este problema. (Gorhan *et al*, 1985; Greenway, H. y Munns, 1980)

La salinidad inhibe el desarrollo de las plantas principalmente por dos causas. En primer lugar, como consecuencia del efecto osmótico ya que la presencia de sal en el suelo interfiere en la capacidad de la planta para absorber agua traduciéndose en un desarrollo más lento. Y, en segundo lugar, debido a la toxicidad por exceso de iones que daña las células de las hojas inhibiendo su actividad enzimática y/o fotosintética reduciendo consecuentemente su crecimiento y desarrollo. Además, el crecimiento del árbol se ve reducido porque los iones salinos interfieren con la absorción de otros nutrientes como K^+ , Ca^{2+} y NO_3^- . (Cuartero *et al*, 2008; Greenway, H. y Munns, 1980; Tester, 2008)

Las consecuencias provocadas por el estrés osmótico o la toxicidad de iones afectan negativamente a la planta a distintos niveles relacionados con la germinación, el desarrollo, la producción y la fisiología de la planta. Sin embargo, en algunos cultivos puede aumentar la calidad del fruto ya que proporciona una mayor cantidad de solutos solubles como en melón y tomate o el contenido en proteína, como ocurren en el trigo. (Cuartero *et al*, 2008; Greenway, H. y Munns, 1980; Tester, 2008)

Distinguimos dos grupos de plantas en función de su respuesta a la sal: las plantas halófitas, capaces de completar su ciclo de vida en ambientes salinos; y las glicófitas, sensibles a ellos. Las plantas halófitas son capaces de impedir que la sal penetre en la planta o presenta tolerancia por mecanismos como compartimentalización o secuestro de la sal en vacuolas, almacenamiento de sales en hojas y tejidos senescentes o desarrollo de órganos glandulares para almacenar la sal. Las plantas glicófitas son capaces de utilizar los mecanismos descritos anteriormente, pero con mucha menos eficiencia. La mayoría tratan de llevar a cabo un ajuste osmótico del medio mediante la síntesis de osmolitos: compuestos orgánicos (trealosa, fructanos) y/o proteínas osmoprotectoras (chaperonas, glicina-betaína). Sin embargo, no podemos establecer una delimitación clara entre ambos grupos ya que existe todo un espectro de posibilidades (Gorhan *et al*, 1985; Greenway, H. y Munns, 1980).

1.4.1. LA SALINIDAD EN LOS CÍTRICOS

Los cítricos son un cultivo sensible a la salinidad, que, incluso a concentraciones moderadas, sufre alteraciones fisiológicas tales como toxicidad específica de los iones, desequilibrios de nutrientes, alteración de los parámetros de intercambio gaseoso y/o relaciones hídricas adversas que tienen como consecuencia la disminución del crecimiento. Los efectos pueden ser aún más graves cuando la concentración de sal es elevada en las hojas, causando una senescencia prematura y posteriormente la muerte de la planta. Sin embargo, existen importantes diferencias entre las especies y variedades pertenecientes a la familia *Aurantoidea*.

Actualmente, se considera que la sensibilidad a la salinidad en las especies y variedades de cítricos está asociada a la acumulación de concentraciones excesivas de Cl^- en las hojas, lo que implica una alta absorción de este ion por las raíces, así como su eficiente translocación (Cooper, 1961; Grieve & Walker, 1983). La tolerancia a la salinidad en este cultivo está relacionada con la capacidad de restringir la absorción y/o el transporte hacia la parte aérea del árbol (Cerdá *et al.*, 1979; Zekri & Parsons, 1992).

1.4.2. PATRONES DE CÍTRICOS Y SALINIDAD

Teniendo en cuenta que los cítricos comerciales están formados por la combinación patrón-variedad, la respuesta de los árboles a la salinidad depende del comportamiento individual de cada una de las partes que lo componen, así como de las posibles interacciones entre ambas que puedan darse. Sin embargo, tal y como demuestran numerosos estudios y prácticas de cultivo, es evidente que el componente principal implicado en la respuesta de los árboles a la salinidad es el patrón. Por este motivo, la elección del patrón adecuado es crucial para obtener el máximo rendimiento en las plantaciones de cítricos, tanto en condiciones salinas como en otras (Castle, 2010)

El mandarino Cleopatra destaca respecto al resto de materiales, siendo uno de los principales genitores en los programas de mejora de patrones de cítricos de todo el mundo. Este

mandarino es originario de la India y se caracteriza por dar frutos de pequeño tamaño (Hodgson, 1967). Presenta tolerancia ante varios estreses abióticos tales como el frío (Platt, R.G. y Bitters, 1971), la sequía y la caliza (Cooper *et al*, 1954). Destaca especialmente su tolerancia a salinidad (Cooper, 1961; Platt, R.G. y Bitters, 1971) ya que es el patrón comercial que mejor se adapta a tales condiciones gracias a su capacidad de excluir iones sodio y cloruro. Por el contrario, presenta sensibilidad a la asfixia radical (Forner *et al*, 1983; Platt, R.G. y Bitters, 1971).

En lo que respecta a estreses bióticos es sensible al nematodo de los cítricos *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. (Hutchison *et al*, 1973; O'Bannon, J.H. y Hutchison, 1973), tolerante al virus de la tristeza (CTV) (Grant, T.J. y Costa, 1948), y a exocortis, xyloporosis y psoriasis (Newcomb, 1978). Presenta además tolerancia a *Phytophthora* spp.

El principal defecto que presenta es la irregularidad que induce sobre las variedades injertadas. Su comportamiento en vivero no es bueno ya que requiere hasta dos años de semillero alargándose el período de producción de plántulas. La entrada en producción se demora ligeramente en comparación con otros patrones. (Agustí *et al.*, 2020; Forner Giner, 2002). A pesar de esto, y de que los frutos obtenidos de las variedades injertadas son de un tamaño inferior al producido en otros patrones, la calidad es muy buena y el contenido en azúcares elevado. (Agustí *et al.*, 2020; Forner Giner, 2002)

A pesar de esto, y de que los frutos obtenidos de las variedades injertadas son de un tamaño inferior al producido en otros patrones, la calidad es muy buena y el contenido en azúcares, elevado. (Agustí *et al.*, 2020; Forner Giner, 2002)

P. trifoliata es el patrón que mayor sensibilidad presenta a la salinidad, manifestando graves síntomas incluso a bajas concentraciones. Está presente en China (Swingle, W. T. & Reece, 1967) desde hace miles de años y fue difundido como patrón en Japón, China, Nueva Zelanda o Argentina. Es muy resistente al frío y a la asfixia radical pudiendo cultivarse en amplias zonas y con buena adaptación a distintos tipos de suelo, incluidos los más pesados y húmedos. Su principal inconveniente es la sensibilidad a pH altos, la salinidad y la sequía (Bowman & Joubert, 2020).

Es resistente a tristeza, psoriasis y xyloporosis y resistente a los hongos *Phytophthora* spp, *A. mella* y nemátodos pero sensible a exocortis. Estas características lo han convertido en uno de los genitores más importantes en la mejora de cítricos.

Aunque es considerado poco vigoroso, en suelos ácidos puede dar lugar a un desarrollo normal del arbolado. Induce buena productividad y calidad de fruto (Agustí *et al.*, 2020). El tamaño de los frutos es pequeño en comparación con otros patrones, pero estos presentan un alto contenido en grados Brix y ácidos (Bowman & Joubert, 2020)

MEJORA DE PATRONES DE CÍTRICOS Y SALINIDAD

Durante años los mejoradores han buscado las mejores combinaciones entre injerto y patrón para el cultivo de cítricos en suelos afectados por la salinidad. La capacidad de excluir sodio y cloruro son caracteres heredables pudiendo las progenies tener un mejor comportamiento en campo que los parentales (Sykes, 1992). Esto se ha observado en híbridos procedentes de la lima Rangpur (*C. limonia* Osbeck.), excluyente de Cl^- , y de mandarino Cleopatra, o de *P. trifoliata*, patrón excluyente de Na^+ a bajas concentraciones salinas (Sykes, 1985, 1992), lo que indica que es posible seleccionar la tolerancia a la sal en experimentos de screening a corto plazo.

Los genotipos resistentes a tristeza suelen ser muy sensibles a salinidad como es el caso de *Poncirus trifoliata*. Por ello se han llevado a cabo distintas hibridaciones que apuntan al mandarino Cleopatra (*Citrus reshni*) como un excelente parental en programas de mejora de patrones para obtener híbridos resistentes a sal; siendo, por ejemplo, el patrón Forner-Alcaide 5 (FA-5) fruto de estos esfuerzos.

1.5. MECANISMOS DE TOLERANCIA A SALINIDAD EN CÍTRICOS

1.5.1. EXCLUSIÓN DE SODIO

Los transportadores HKT1 (High Affinity K⁺ Transporter) y SOS1 (Salt Overly Sensitive) son los encargados de regular la homeostasis de los iones Na⁺ y K⁺ plantas de cítricos en condiciones de estrés salino (Wang *et al.*, 2014). SOS1 actúa a nivel radicular facilitando la extrusión de Na⁺ de las células epidérmicas de la raíz (Shi *et al.*, 2002) mientras que en las células parenquimáticas del xilema actúa transportándolo a la savia y facilitando indirectamente el ajuste osmótico en los meristemos gracias a la compartimentalización vacuolar. HKT1 media el flujo reverso, cogiendo el Na⁺ de las vesículas del xilema para prevenir su acumulación en los órganos fotosintéticos (Berthomieu *et al.*, 2014). La coordinación de estos dos transportadores permite el reparto de cationes tóxicos entre los distintos órganos de la planta.

Poncirus es un eficiente exclusor de iones Na⁺ cuando este se encuentra a bajas concentraciones, en comparación con el mandarino Cleopatra. Estas diferencias pueden subyacer en los niveles de expresión de los genes mencionados anteriormente. En *Poncirus* hay una mayor concentración de iones Na⁺ en la raíz, pero no en los tallos ya que la traslocación no es eficiente. Esto puede ser debido a una sobreexpresión de los genes *SOS1* (en las raíces) y *HKT1* (en raíces y tallos) (Martínez-Alcántara *et al.*, 2015) (Colmenero-Flores *et al.*, 2020).

1.5.2. EXCLUSIÓN CLORURO

La exclusión de Cl⁻ en los meristemos ha sido ampliamente reconocida como el mecanismo más relevante a la hora de evitar el estrés salino en cítricos (Hussain *et al.*, 2012). Debido a que este ion es una molécula cargada negativamente, su absorción está ampliamente gobernada por un transporte de tipo simporte de alta o baja afinidad Cl⁻/H⁺ en respuesta a concentraciones externas de Cl⁻ bajas o medias (Felle *et al.*, 1994). Por otro lado, el ion sale de la célula mediante transporte pasivo a través de canales de eflujo aniónico siguiendo el gradiente electroquímico (Roberts, 2006). Estos canales aniónicos también pueden intervenir

en la absorción de cloruro cuando las concentraciones salinas son elevadas (Skerrett & Tyerman, 1994). En la raíz, la liberación de los iones cloruro a la savia del xilema por parte las vesículas adyacentes dependen de este tipo de canales.

Un importante transportador aniónico es la proteína SLAH3, que forma parte de la familia SLAC/SLAH y presenta alta selectividad a NO_3^- sobre Cl^- (Geiger *et al.*, 2011). En la raíz, SLAH3 se localiza en las células del periciclo frente a las vesículas del xilema. SLAH1 se localiza junto a SLAH3 formando un heterómero en el periciclo del xilema y funciona como un interruptor molecular que regula la traslocación de Cl^- de acuerdo con factores ambientales. Cuando las condiciones de crecimiento son favorables y en ausencia de estrés, el gen *AtSLAH1* es altamente expresado y SLAH1 forma un heterómero con SLAH3, permitiendo la conductancia de Cl^- . Bajo estrés salino, este gen es fuertemente reprimido por la acción de ABA, reduciendo significativamente la conductancia de Cl^- y disminuyendo su traslocación al xilema (Fig. 6) (Cubero-Font *et al.*, 2016). Recientemente se ha descubierto otra proteína presente en la membrana plasmática que permite el transporte de Cl^- desde la raíz a los brotes, la proteína NPF2.4 (Colmenero-Flores *et al.*, 2020; B. Li *et al.*, 2016).

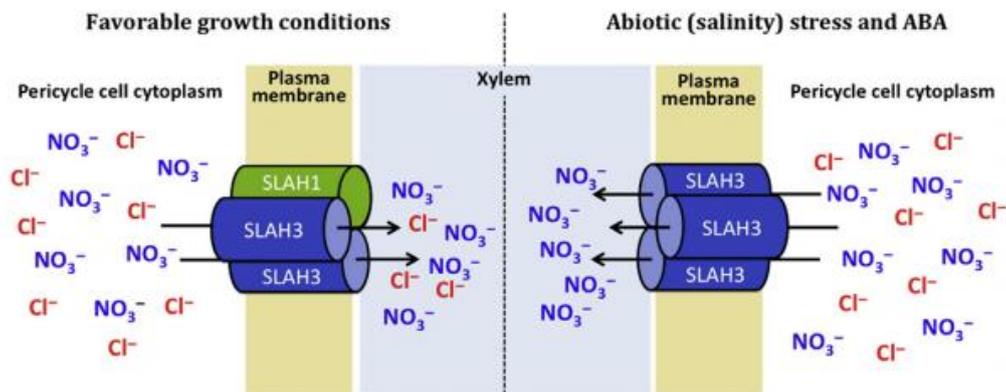


Figura 6. Regulación de la translocación de Cl^- en el xilema de la raíz por medio de los canales aniónicos SLAH1 y SLAH3 (Cubero-Font *et al.*, 2016)

1.5.3. COMPORTAMIENTO DE LOS CÍTRICOS FRENTE A SALINIDAD

EXPRESIÓN GÉNICA

Existen distintos análisis de la expresión génica en respuesta a estrés salino en cítricos. Brumós *et al.* (2009) compararon mediante genómica funcional y estudios fisiológicos el patrón Carrizo (sensible a salinidad) con mandarino Cleopatra (tolerante y exclusor de iones Cl^-) en un amplio rango de tiempo. A corto plazo, Cleopatra mostró una mayor acumulación de ácido abscísico (ABA) seguido de un fuerte incremento en la acumulación de iones cloruro como consecuencia de la disminución en la translocación de iones Cl^- en el xilema. Estas respuestas activaron genes implicados en la señalización y silenciamiento de la cromatina y ABA, además de respuestas a estrés osmótico y biosíntesis de ácido jasmónico (JA) en el genotipo resistente. Otras respuestas importantes que se observaron en el genotipo resistente respecto al sensible es la inducción de genes envueltos en la respuesta a estrés, catabolismo de carbohidratos y aminoácidos, y biosíntesis de metabolitos secundarios (Brumós *et al.*, 2009)

En hojas de patrones sujetas a estrés salino durante varias semanas, es principalmente la toxicidad por Cl^- y no por Na^+ el factor responsable de las respuestas a nivel molecular frente a salinidad. Se indujeron genes de aclimatación a estrés y se reprimieron aquellos envueltos en procesos metabólicos centrales como la fotosíntesis. Esta respuesta se produce mucho antes de que las hojas alcancen niveles dañinos de Cl^- , sugiriendo que se tratan de mecanismos tempranos de señalización de la raíz (Brumós *et al.*, 2009).

Mientras que algunos genotipos sensibles a salinidad como Carrizo mantienen una actividad fotosintética alta, los resistentes como Cleopatra muestran una rápida inducción de mecanismos de defensa y reducción de la conductancia estomática y fotosintética (López-Climent *et al.*, 2008). Se propone que la capacidad de resistencia a salinidad se basa en una respuesta temprana de ABA y respuestas de señalización promovidas por la raíz ralentizando procesos del metabolismo primario y estimulando el secundario con el fin de excluir los aniones.

En cítricos aclimatados a una salinidad moderada (NaCl 30 mM) tras dos años de tratamiento, las hojas fotosintéticamente activas mantienen concentraciones no tóxicas para el ion cloruro, pero exhiben una respuesta a salinidad 10 veces mayor que aquellas que acumulan mayores concentraciones de iones cloruro (Pérez-Pérez *et al.*, 2015). Se propone que la aclimatación a largo plazo en respuesta a estrés salino requiere: una compartimentalización diferencial en función de la antigüedad de la hoja; la represión de genes envueltos en el metabolismo primario que permite a la planta disminuir la actividad fotosintética; y, ajustar procesos fisiológicos, metabólicos y celulares a las nuevas condiciones homeostáticas relacionadas con la estructura de la pared celular, los mecanismos de defensa, el metabolismo de los lípidos, y la actividad del sistema endomembrana y respuesta antioxidante.

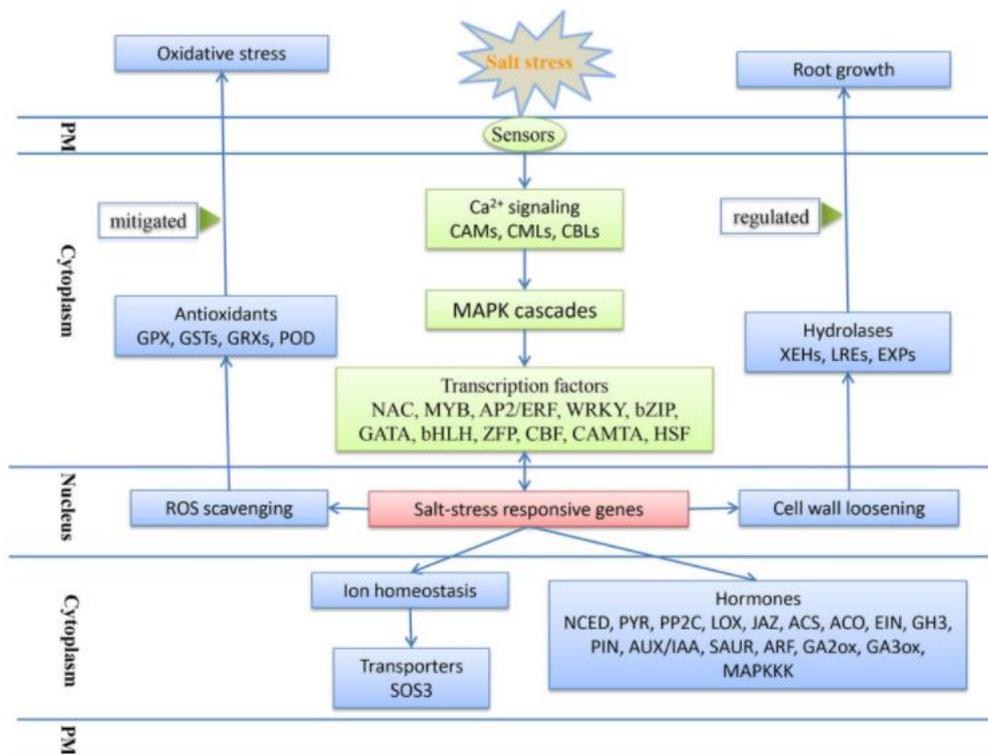


Figura 7. Modelo propuesto para la regulación de las raíces en respuestas a estrés salino (Xie *et al.*, 2018)

Recientemente se han obtenido resultados similares en raíces de cítricos bajo estrés salino. Los genes diferencialmente expresados estaban relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, la transducción hormonal, el sistema de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el metabolismo de la fenilalanina. Un importante número de genes codificaban para factores de transcripción (NACs, MYBs, CBFs, ERFs, WRKYs, ZFPs, CAMTAs o bZIPs entre otros) relacionados con el metabolismo de carbohidratos, el sistema ROS y la señalización de

hormonas (Fig.7). También cabe destacar que aproximadamente el 20% de los genes diferencialmente expresados bajo condiciones de estrés salino están relacionados con genes expresados durante situaciones de estrés hídrico (Colmenero-Flores *et al.*, 2020; Xie *et al.*, 2018).

REGULACIÓN HORMONAL

Una de las respuestas más llamativas del estrés inducido por salinidad es la abscisión de las hojas más antiguas que acumulan cloruro y se caen. El análisis de los niveles endógenos de hormonas como el ABA, el etileno y su precursor directo, el 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) revelan una respuesta paralela a la acumulación por cloruro. A corto plazo se observaron aumentos transitorios en los niveles de ABA y ACC tras el tratamiento salino, seguidos de una acumulación gradual de Cl⁻ a largo plazo. Se piensa que, tras la respuesta inicial hormonal los niveles de hormonas se incrementan con el fin de llevar a cabo un ajuste osmótico en un momento inicial mientras que el ion cloruro es el responsable de la acumulación hormonal. Durante la segunda fase, los niveles de iones Cl⁻ se encuentran correlacionados con el ratio de hojas que se caen del árbol. Las poliaminas también han sido propuestas como moléculas señalizadoras ante estrés por salinidad en cítricos (Colmenero-Flores *et al.*, 2020).

1.6. GENOTIPADO POR SECUENCIACIÓN (GBS)

El interés por secuenciar el genoma humano a bajo coste ha tenido un gran impacto no sólo en la genética humana, si no en todos los campos de la ciencia. Gracias a los esfuerzos destinados a conseguir este objetivo, las técnicas de secuenciación de nueva generación han avanzado enormemente y han transformado los campos de la mejora y la genómica vegetal. El hecho de contar con una tecnología de secuenciación económica ha transformado la forma en que se secuencian los genomas (Xu *et al.*, 2011), se descubren polimorfismos (Mardis, 2008), se analiza la expresión génica (Gerald *et al.*, 2011) y se genotipan poblaciones (Baird *et al.*, 2008). La secuenciación es una técnica que hasta hace poco resultaba inaccesible para la mayoría de los grupos de investigación pero que, gracias al gran avance sufrido en los últimos años, ha visto reducido drásticamente su precio. En la Figura 8 vemos cómo han evolucionado los precios por marcador molecular. en los últimos años

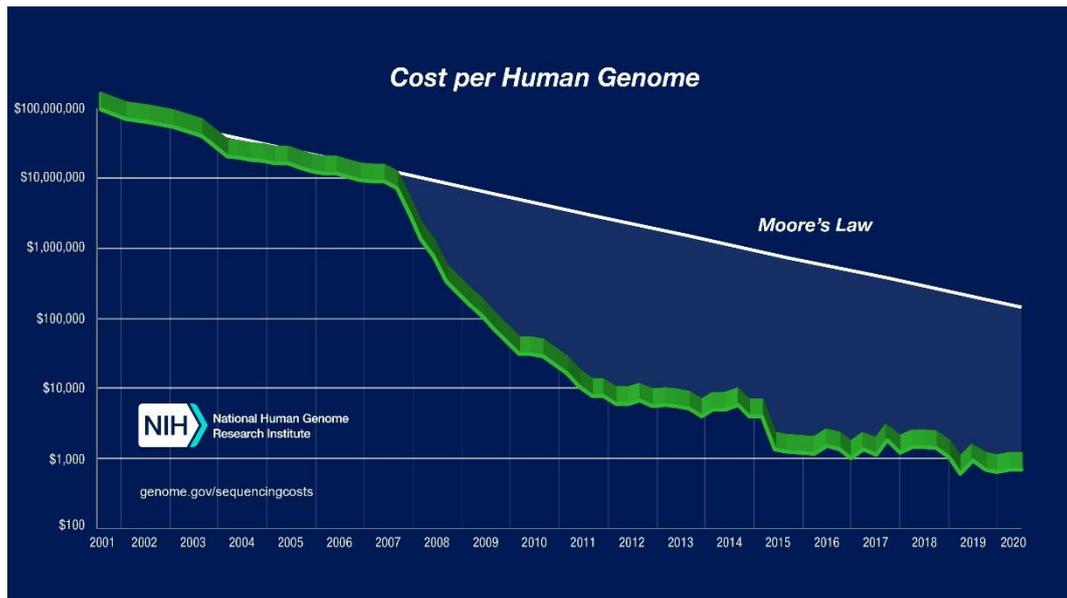


Figura 8. Evolución de los precios por marcador molecular desde 2001 hasta 2020

Uno de los principales objetivos de la genómica vegetal es correlacionar el fenotipo con el genotipo con el fin de utilizar este conocimiento para hacer predicciones fenotípicas y mejorar el ideotipo de las plantas. Para llevar a cabo este proceso a gran escala es necesario contar con grandes poblaciones con un alto número de marcadores moleculares. Una de las técnicas más prometedoras para conseguir este objetivo es el genotipado por secuenciación (GBS), que usa una o varias enzimas de restricción para reducir la complejidad del genoma; acopladas a adaptadores de ADN capaces de generar grandes librerías de las muestras a analizar para posteriormente llevar a cabo la secuenciación (Figura 9). Esta aproximación ha demostrado su eficacia en un gran número de especies y eficiencia a la hora de generar un gran número de marcadores moleculares (Elshire *et al.*, 2011). La flexibilidad del GBS en cuanto a especies, poblaciones y objetivos de investigación la hace una técnica ideal para los estudios genéticos de plantas.

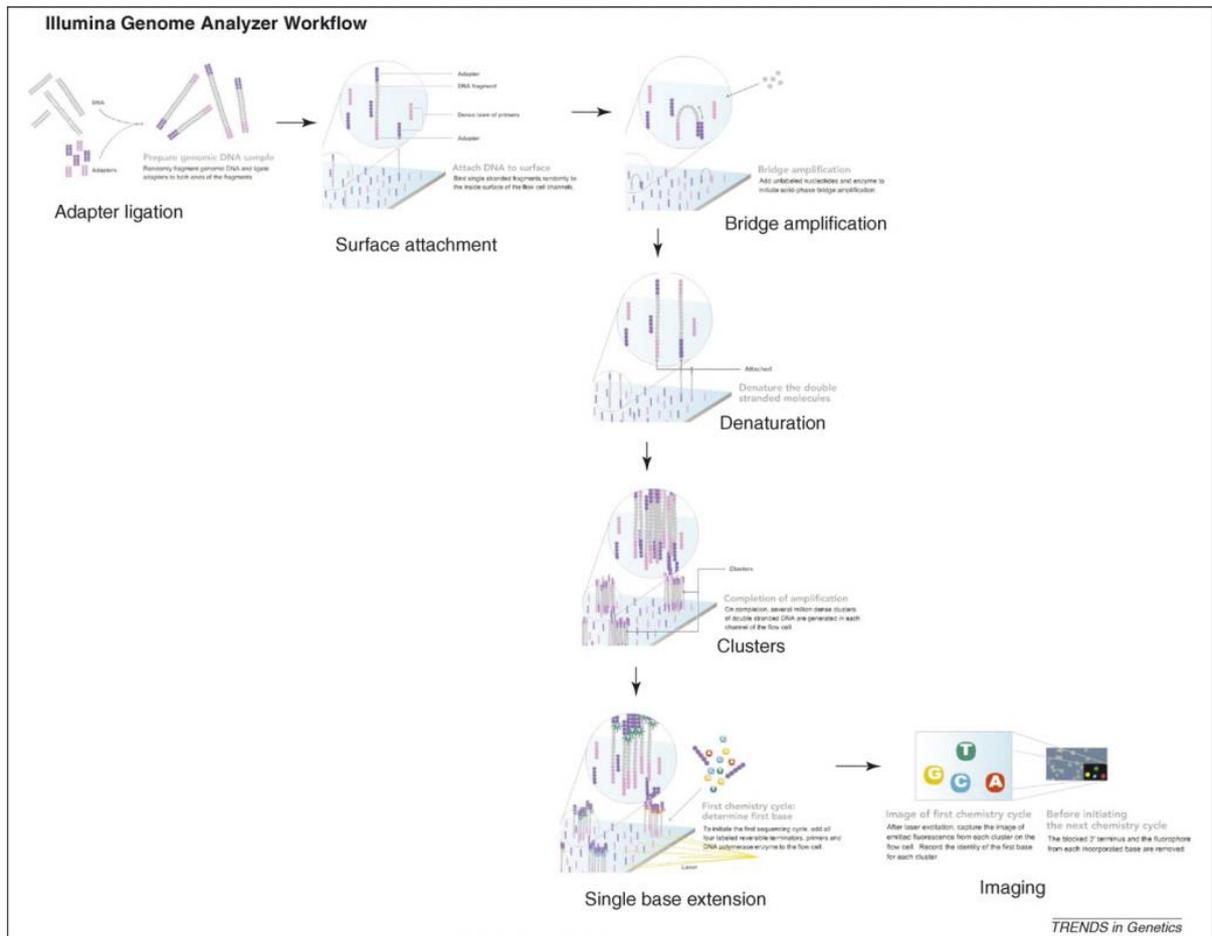


Figura 9. Flujo de trabajo en la plataforma de secuenciación Illumina (Mardis, 2008)

Otra de las ventajas de la información obtenida en la secuenciación es que los datos resultantes quedan almacenados en bases de datos. De este modo pueden ser posteriormente reanalizados y descubrirse más información a medida que las técnicas de bioinformática van mejorando, los genomas de referencia se desarrollan y las secuencias de datos aumentan. El objetivo del GBS no es descubrir polimorfismos para aplicarlos a un ensayo en concreto, si no descubrir polimorfismos a la vez que se obtiene información genotípica de la población de interés. Esto resulta clave a la hora de llevar a cabo la selección genómica (GS) en programas de mejora (Poland & Rife, 2012).

1.7. GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY (GWAS)

Las variantes naturales de los cultivos son el resultado de mutaciones espontáneas en los progenitores silvestres. Desde el comienzo de la agricultura hace 10,000 años, un gran número de cultivos adaptados a distintos ambientes han sido cultivados. La domesticación y la mejora realizada por el hombre han tenido un gran impacto en la diversidad genética existente actualmente. Entender las bases genéticas de las variaciones fenotípicas y los procesos de domesticación de los cultivos, permiten utilizar eficientemente estos recursos fitogenéticos para la mejora de los cultivos (Huang & Han, 2014).

El GWAS se basa en eventos de recombinación presentes en los genomas para identificar los loci subyacentes a un determinado fenotipo. Esta metodología ha sido bien establecida en estudios de genética humana y actualmente se está convirtiendo en una poderosa arma para detectar tratos agronómicos complejos en varios cultivos, desde que se aplicase por primera vez en el maíz en el año 2001 (Thornsberry *et al.*, 2001). Tradicionalmente los cultivos más utilizados en este tipo de estudios han sido el maíz y el arroz, pero poco a poco se ha ido aplicando a otros como el algodón (Cao *et al.*, 2020), el tomate (Lin *et al.*, 2014) o el melocotón (Cao *et al.*, 2016).

Los recientes avances en las tecnologías de secuenciación de alta resolución permiten llevar a cabo estudios de asociación en conjuntos de variantes genéticas de todo el genoma para identificar miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) relacionados con el fenotipo. Un SNP es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base, pudiendo modificar o no la cadena de aminoácidos a la que da lugar (Ramírez-Bello *et al.*, 2013).

Con todas sus ventajas, este tipo de análisis de asociación presenta claras limitaciones, especialmente en cuestiones de correlación de la estructura de la población y alelos causales de baja frecuencia que conducen a falsos negativos (Korte & Farlow, 2013); limitaciones que irán subsanándose a medida que se mejora la técnica. A pesar de ello, el uso de esta herramienta seguirá siendo fundamental en el futuro para la obtención de marcadores moleculares correlacionados con tratos agronómicos de interés que sirvan para su aplicación en la selección genómica y la mejora de los cultivos.

2. OBJETIVOS

- 1) Llevar a cabo un genotipado por secuenciación en una población de híbridos resultantes del cruce de mandarino Cleopatra, muy tolerante a salinidad; y *Poncirus trifoliata*, muy sensible a salinidad.
- 2) Utilizar los datos genotípicos obtenidos del GBS y los datos fenotípicos de los híbridos para llevar a cabo un estudio de asociación de genomas (GWAS) en relación con la tolerancia a salinidad e identificar SNPs con el fin de obtener marcadores moleculares relacionados con esta característica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Dentro del programa de mejora genética de patrones de cítricos del IVIA de 2000 se realizaron cruces para la obtención de híbridos de mandarina Cleopatra (tolerante a salinidad) x *P. trifoliata* (sensible a salinidad) que fueron nombrados híbridos 0301. De estos cruces se sembraron 130 semillas por bandeja (55 x 40 cm) y genotipo, el invernadero sobre un sustrato estéril compuesto de turba y arena (60:40). Para el genotipado se utilizaron 68 genotipos distintos de los que finalmente 22 fueron fenotipados.

Tras 5 meses las plantas fueron trasplantadas individualmente a recipientes plásticos opacos de 5L de capacidad, eliminándose los restos de turba de las raíces y utilizando arena silícea como sustrato en este caso. Las condiciones ambientales del invernadero oscilaron entre los 15°C de mínima y 28°C de máxima con una humedad relativa (HR) de entre el 50-80%.

Una vez trasplantadas a los recipientes de 5L se mantuvieron en las mismas condiciones durante seis meses con el fin de favorecer su desarrollo, regándolas con solución nutritiva (3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 3 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 2.3 mM H_3PO_4 , 17.9 μM Fe-EDDHA y elementos traza según (Hoagland & Arnon, 1950). El pH de la solución nutritiva fue ajustada a 6.0 con 1M KOH o 1M H_2SO_4 . Tras ese periodo se agruparon en cuatro grupos homogéneos, de al menos seis individuos, uno para cada tratamiento salino (0, 40 y 80 mM de NaCl) en una distribución al azar. A cada planta se le aplicó la solución nutritiva con el tratamiento salino correspondiente durante 60 días. Durante este periodo de salinización se realizaron medidas periódicas de los parámetros de intercambio gaseoso y al final del experimento las plantas se arrancaron y se determinó el peso seco de cada uno de los órganos, así como la concentración de iones salinos.

3.2. FENOTIPADO DEL MATERIAL VEGETAL

El fenotipado de los híbridos obtenidos del cruce de mandarino Cleopatra x *P. trifoliata* se llevó a cabo en función de varios parámetros que detallaremos en el siguiente apartado para 22 genotipos distintos. Los ensayos se realizaron según la metodología descrita en Forner-Giner *et al.*, (2009)

3.2.1. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Cada una de las plantas analizadas fue dividida en función de sus órganos: hojas, tallos y raíces. Se limpiaron y lavaron con agua, agua destilada que contenía un detergente no iónico y finalmente 3 veces en agua destilada. El peso seco (DW, en g) de cada uno de los órganos fue determinado tras secar cada una de las muestras a 70°C durante 48 horas.

3.2.2. DETERMINACIÓN DE CLORURO

El análisis en los tejidos vegetales del contenido en cloruro se realizó según el método de Gilliam (Gilliam, 1971). Se separaron las hojas, tallos y raíces de las plantas, se trocearon los dos últimos y se secaron en estufa a 60°C durante al menos 72 horas. Posteriormente se trituraron. Se tomaron 500 mg. de materia seca pulverizada de cada muestra y se le añadieron 100 ml. de solución de extracción, compuesta por ácido nítrico 0.1 N y ácido acético glacial al 10%. La mezcla se agitó y se dejó en reposo durante una noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se filtraron 5 ml. de la mezcla, y se añadió una alícuota de 500 µl al tampón ácido combinado Corning. La concentración de Cl⁻ se determinó mediante valoración con un electrodo de plata, empleando un clorímetro automático Corning-926. La determinación de cloruros se repitió al menos cinco veces.

3.2.3. DETERMINACIÓN DE SODIO

El contenido en Na⁺ se determinó mediante digestión húmeda y resolución por análisis de absorción atómica. La concentración de los distintos elementos se determinó con un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer modelo 4100.

3.2.4. MEDIDAS DE INTERCAMBIO GASEOSO

La asimilación neta de CO₂ y otros parámetros relacionados con las medidas de intercambio gaseoso, como la transpiración y la conductancia estomática se determinaron mediante un medidor portátil LICOR-6400.

3.3. EXTRACCIÓN DE ADN Y SECUENCIACIÓN

El ADN genómico de los 68 individuos se aisló mediante el protocolo CTAB (Doyle & Doyle, 1987) modificado. De cada individuo se utilizaron dos discos de hoja fresca que se trituraron tras haber estado sumergidos en nitrógeno líquido. Se añadieron 800 µL de CTAB + 2 µL de bromuro de etidio por muestra, se homogeneizó el contenido mediante vórtex y se dejaron en el baño caliente a 65°C durante 30 minutos. Posteriormente se añadieron 800 µL de cloroformo-isoamílico (24:1) y se centrifugó durante 20 minutos a 12,000x g. Tras la centrifugación se pasaron 400 µL del sobrenadante a un tubo nuevo, se añadieron 400 µL de isopropanol y se incubó durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó cada muestra durante 20 minutos hasta que precipitó el ADN y se hicieron tres lavados con etanol al 70% durante 5 minutos. Se secó el pellet 20 minutos a 37°C en el termobloque y se resuspendió en 50 µL de tampón TE (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA). Se añadieron 2 µL de ARNasa (introducir marca) y se incubaron las muestras durante 30 minutos a 37°C. La pureza del ADN se comprobó mediante espectrometría de UV utilizando el Nanodrop ND-1000 mediante los ratios 260/280 y 260/230 nm y se seleccionaron las muestras que presentaban un ratio de 1.8. La degradación del ADN se comprobó en geles de agarosa al 1% mediante lectura de banda nítida (Fig. 10)

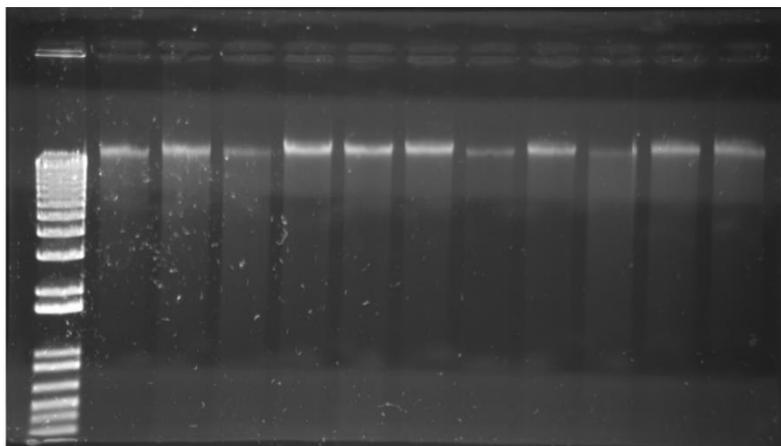


Figura 10. Gel de agarosa al 1% que presenta banda nítida de ADN

Finalmente, la concentración de ADN se midió mediante el Kit de Ensayo de ADN Qubit® con el dispositivo Qubit® 2.0 Fluorimeter (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). El kit incluye un reactivo, un tampón de dilución y ADN a una concentración de 0 y 100 ng/μL para poder efectuar la recta de calibrado. El reactivo se diluyó en el buffer (1:200) y posteriormente se añadieron 2 μL de cada muestra. Se llevó cada muestra a un volumen final de 200 μL para poder medirlas en el dispositivo.

3.4. PREPARACIÓN DE LA LIBRERÍA GBS Y SECUENCIACIÓN

El ADN genómico extraído con anterioridad fue ajustado a una concentración de 20 ng/μL y las librerías de GBS para la enzima *ApeKI* [sitio de corte (G/CWCG)] se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Elshire *et al.*, (2011). Cada muestra de ADN (200 ng) fue digerida con la enzima *ApeKI* (New England Biolabs, Hitchin, UK) durante 2 horas a 75°C y posteriormente la temperatura se cambió a 65°C durante 20 minutos para inactivar la enzima. La reacción de ligación se llevó a cabo en la misma plataforma que la digestión usando para ello la enzima ligasa de ADN T4 (New England, Biolabs, Hitchin, UK) a 22°C durante 1 hora. Posteriormente fue inactivada durante 20 minutos a 65°C. Las muestras ya ligadas fueron agrupadas y amplificadas por PCR con una base selectiva (A) (Sonah *et al.*, 2013). La secuenciación de tipo “single-end” de 150 bases fue llevada a cabo por Illumina HiSeq 4000 con dos líneas para las librerías con 100 individuos multiplexados. (Oueslati *et al.*, 2017)

3.5. SNP CALLING

El programa utilizado para llevar a cabo el “SNP calling” fue Tassel 4.0. En el primer paso se usó el genoma de referencia de la Clementina (con los scaffolds presentes a partir del 10 unificados en UN Scaffold). Se seleccionaron únicamente los SNP dialélicos. Posteriormente se utilizó el número de lecturas de cada alelo para determinar el genotipo de acuerdo con los filtros aplicados en el mapa genético de Cleopatra.

El alelo de referencia es el alelo que aparece más frecuentemente en una accesión de datos durante el “SNP calling”. La matriz resultante arrojó los siguientes datos:

- 0/0 genotipos homocigotos para el alelo de referencia
- 0/1 genotipos heterocigotos

- 1/1 homocigotos para el alelo alternativo
- ./ datos faltantes

A continuación, estos datos fueron transformados, utilizando otra terminología para facilitar su tratamiento: los genotipos homocigotos para el alelo de referencia se sustituyeron por “0”, los heterocigotos “1” y los homocigotos para el alelo alternativo “2”. Los datos faltantes fueron sustituidos por “N”.

3.6. Genome-Wide Association Study (GWAS)

Para llevar a cabo el GWAS se utilizó el programa Microsoft® Excel® 2020, donde relacionaron los 91,794 SNPs obtenidos gracias al genotipado por secuenciación llevado a cabo con la plataforma HiSeq Illumina4000 con los datos fenotípicos obtenidos en los ensayos de salinidad llevados a cabo en 22 genotipos distintos.

Se establecieron 8 modelos de asociación como se detalla en la Tabla 2 en función de si se consideró el SNP de referencia o el alternativo como dominante o resistente relacionándolo con el fenotipo para la resistencia (R), la tolerancia (T) o la sensibilidad (S).

Se llevó a cabo un filtrado de SNPs en cada uno de los modelos en función del número de datos presentes para cada SNP, que había de ser superior al 40%; y la correspondencia con el modelo, superior al 70%.

Tabla 2. Modelos establecidos para el estudio de asociación de genomas

Modelo	Alelo	Genotipo	Fenotipo	Nomenclatura	
Dominante	Resistente	Referencia	0,1	5,4	R
			2	1,2	S
	Alternativo	1,2	5,4	R	
		0	1,2	S	
Dominante	Sensible	Referencia	0,1	1,2	S
			2	5,4	R
	Alternativo	1,2	1,2	S	

		0	5,4	R
Recesivo	Resistente			
	Referencia	0	5,4	R
		2	1,2	S
	Alternativo	2	5,4	R
		0	1,2	S
Aditivo	Resistente			
	Referencia	0	5,4	R
		1	3	T
		2	1,2	S
	Alternativo	0	1,2	S
		1	3	T
		2	5,4	R

3.7. CLASIFICACIÓN DE LOS SNPs EN BASE A LA CERCANÍA A GENES ANOTADOS

La matriz de SNP empleada en los modelos de asociación no contenía información de anotación génica por lo que se realizó una búsqueda. Para ello se empleó la herramienta “JBrowse” de la base de datos “Phytozome” (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) en base al genoma de la clementina (Citrus clementina v1.0), genoma utilizado para llevar a cabo el SNP calling.

Se clasificó cada uno de los SNP en tres categorías en función de la posición en la que se encontraban: promotor, cuando la posición era inferior a 2kb aguas arriba del gen que se encontraba más cercano; intergénica, cuando el SNP no se encontraba en ninguna zona codificante; y por último intragénica cuando éste se encontraba en un gen.

La identidad de cada dominio o proteína venía predicha mediante anotación funcional en las páginas InterPro y Panther con sus respectivos códigos (IPRXXXXXX y PHTRXXXXX) y cuyos códigos se incluyeron en cada uno de los dominios o proteínas identificados.

3.8. CONTRASTE DE LOS SNPs CON GENES PREVIAMENTE DESCRITOS EN SALINIDAD

Se llevó a cabo el cruce de las posiciones de los SNPs obtenidos en este trabajo con las posiciones de genes previamente descritos en mecanismos de tolerancia a salinidad en cítricos. Para ello se descargaron las secuencias fasta del listado de genes incluidos en el estudio de de Xie *et al.* (2018) y Şahin-Çevik *et al.*, (2020) se llevó a cabo un TBLASTX en phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>) empleando como referencia el genoma de clementina. Los resultados significativos ($p\text{-value} < 0.001$) fueron comparados con el listado de SNPs que habían sido clasificados en la categoría “promotor” o “intragénica”.

4. RESULTADOS

4.1. FENOTIPADO DEL MATERIAL VEGETAL

Se obtuvieron datos para un total de 22 genotipos en base a los parámetros mencionados anteriormente: parámetros de intercambio gaseoso, determinación de iones Cl^- , determinación de iones Na^+ y medidas de intercambio gaseoso y se hizo una clasificación en función del resultado obtenido tras el tratamiento salino.

En base a los resultados obtenidos, los genotipos fueron clasificados en 5 categorías: 1) Muy sensible, 2) Sensible, 3) Medio, 4) Resistente y 5) Muy resistente (Fig. 11). Los genotipos más interesantes para llevar a cabo la asociación son los fenotipos extremos, es decir, los muy sensibles a salinidad y los muy resistentes a salinidad ya que son los que nos van a permitir relacionar los SNP con una característica u otra, pero debido a que las diferencias entre los individuos clasificados como muy sensibles y sensibles y los muy resistentes y los resistentes eran mínimas se tomaron también los datos de los individuos 2 y 4. Esto nos permite contar con un mayor número de individuos para realizar el análisis.

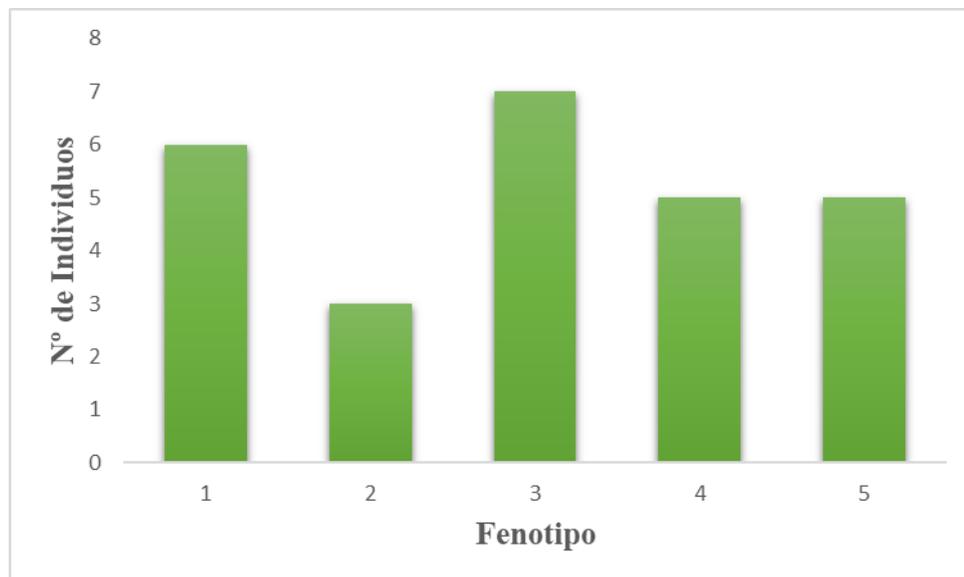


Fig. 11. Fenotipo de los individuos en relación con la respuesta al tratamiento salino

4.2. GENOTIPADO POR SECUENCIACIÓN

Los resultados del GBS arrojaron un total de 91.794 SNPs distribuidos de forma desigual entre los 9 cromosomas de los híbridos (Tabla 3), dado que la longitud de cada cromosoma es distinta, aunque dividiendo el número de SNPs obtenidos por Mb vemos que los resultados son similares en todos ellos. En la Figura 12 podemos observar cómo se distribuyen los SNPs en los cromosomas. Se puede observar que en todos los cromosomas existe una zona valle correspondiente a los centrómeros, zonas evolutivamente más conservadas.

Tabla 3. SNPs obtenidos por cromosoma, número de megabases por cromosoma (Mb) y densidad de SNPs por Mb

Cromosoma	Número de SNPs	Mb	SNPs/Mb
1	8402	29	289
2	12675	36	352
3	15259	51	299
4	8492	26	326
5	12931	43	300
6	8322	26	320
7	8126	21	386
8	7926	25	317
9	9661	31	311

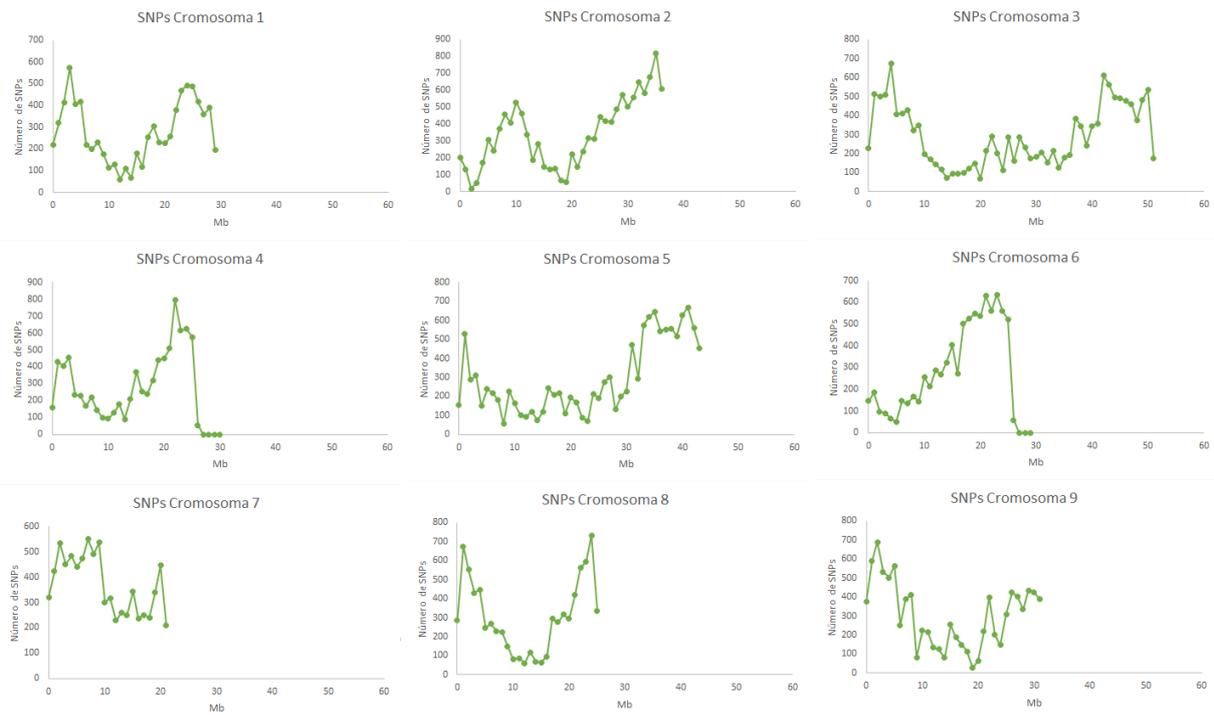


Figura 12. Distribución de los SNPs obtenidos en el GBS

4.3. GWAS

La asociación entre los polimorfismos obtenidos en el GBS y el fenotipo de salinidad se realizó empleándose 8 modelos (Tabla 4). Para cada SNP se obtuvo un porcentaje de asociación, seleccionándose aquellos SNPs que tuvieron una asociación superior al 70%. Se obtuvieron un total de 142 SNPs, algunos de ellos redundantes en varios modelos. El mayor número de SNP se obtuvo en el modelo Dominante Resistencia Alternativo (DRA) con un total de 26 SNPs, seguido de los modelos Dominante Sensible Alternativo (DSA) y Aditivo Resistencia Alternativo (ARA) con 24 SNPs (Tabla 4). En los siguientes apartados se procede a analizar los SNPs asociados a cada modelo.

Tabla 4. Número de SNPs con más de un 70% de asociación y más de un 40% de individuos genotipados para cada SNP obtenido en cada modelo empleado

Modelo	Abreviación	Número de SNPs
Dominante Resistente Referencia	DRR	14
Dominante Resistente Alternativo	DRA	26
Dominante Sensible Referencia	DSR	19
Dominante Sensible Alternativo	DSA	24
Recesivo Resistente Referencia	RRR	4
Recesivo Resistente Alternativo	RRA	9
Aditivo Resistente Referencia	ARR	22
Aditivo Resistente Referencia	ARA	24

4.3.1. MODELO DOMINANTE RESISTENTE REFERENCIA (DRR)

En este modelo se asoció la resistencia al alelo de referencia con una relación de dominancia se obtuvieron un total de 14 SNPs candidatos. Del total de los SNPs tenemos 4 presentes en zonas intergénicas. De los presentes en el promotor de proteínas de función conocida tenemos 2 asociados a un dominio dedo de zinc de tipo RING/FYVE/PHD y dos asociados a una cuproproteína. Respecto de los 6 SNPs presentes en zonas intragénicas: 2 de ellos se encuentra en un gen sin función conocida, 2 asociados a un factor regulador del crecimiento y

2 de ellos asociados a dos proteínas, una relacionada con una proteína quinasa y a una proteína quinasa asociada a la pared de unión a ácido galacturónico (proteína de tipo WAK).

Tabla 5. SNPs obtenidos en el Modelo Dominante Resistente Referencia

Nombre	Chr	Posición	N	Asociación	SNP	Zona	Gen	Anotación Funcional
rs2.12692184	2	12692184	13	77,78	A/C	Intragénica	Ciclev10017857m.g	-
rs3.4122810	3	4122810	13	77,78	A/G	Intergénica	-	-
rs4.23634445	4	23634445	13	77,78	A/G	Intragénica	Ciclev10031221m.g	-
rs5.24794718	5	24794718	13	77,78	C/T	Intragénica	Ciclev10001613m.g	IPR031137: Growth-regulating factor
rs5.24794738	5	24794738	13	77,78	A/G	Intragénica	Ciclev10001613m.g	IPR031137: Growth-regulating factor
rs5.29125149	5	29125149	12	80	T/C	Promotor	Ciclev10000893m.g	IPR013083: Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type
rs5.29125184	5	29125184	12	80	T/C	Promotor	Ciclev10000893m.g	IPR013083: Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type
rs5.30166052	5	30166052	11	72,73	T/A	Intergénica	-	-
rs6.22999043	6	22999043	7	73,33	C/A	Intragénica	Ciclev10011179m.g	IPR000719: Protein kinase domain IPR025287: Wall-associated receptor kinase galacturonan-binding domain
rs6.22999079	6	22999079	7	73,33	G/C	Intragénica	Ciclev10011179m.g	IPR000719: Protein kinase domain IPR025287: Wall-associated receptor kinase galacturonan-binding domain
rs8.2476715	8	2476715	13	77,78	T/A	Promotor	Ciclev10030206m.g	IPR008972: Cupredoxin
rs8.2476719	8	2476719	13	77,78	C/T	Promotor	Ciclev10030206m.g	IPR008972: Cupredoxin
rs9.1159239	9	1159239	12	80	T/G	Intergénica	-	-
rs9.29989601	9	29989601	11	72,73	T/C	Intergénica	-	-

4.3.2. MODELO DOMINANTE RESISTENTE ALTERNATIVO (DRA)

Tomando el alelo alternativo como resistente con una relación de dominancia se obtuvieron un total de 26 SNPs. De ellos, 16 se encontraban presentes en zonas intergénicas; 2 asociados al promotor de dos genes distintos codificantes para un dominio de tipo EmaA y para un dominio de proteína quinasa y 8 SNPs presentes en zonas intragénicas.

De los SNPs presentes en zonas intragénicas 3 se relacionaban con dominios típicos de células eucariotas animales: un dominio BRCT, TRAF y Mpv17/PMP22. Se encontró también un SNP presente en una proteína de tipo SEO (Sieve Element Occlusion); un SNP presente en un dominio WAK de unión a ácido galacturónico; otro SNP asociado a una proteína quinasa y finalmente 2 SNPs presentes en una proteína predicha como villina/gelsolina.

Tabla 6. SNPs obtenidos en el Modelo Dominante Resistente Alternativo

Nombre	Cr	Posición	N	Asociación	SNP	Zona	Gen	Anotación Funcional
rs1.963694	1	1963694	11	72,73	C/T	Intergénica	-	-
rs1.1963718	1	1963718	11	72,73	T/C	Intergénica	-	-
rs1.9755483	1	9755483	11	72,73	G/T	Intergénica	-	-
	2							IPR001357:
rs2.9692170		9692170	13	77,78	G/A	Intragénica	Ciclev10014699m.g	BRCT domain
rs2.10588347	2	10588347	8	71,43	C/T	Intergénica	-	-
rs2.10588393	2	10588393	8	71,43	C/T	Intergénica	-	-
rs2.12692195	2	12692195	13	77,78	G/A	Intragénica	Ciclev10017857m.g	-
rs4.7741400	4	7741400	13	88,89	G/T	Intergénica	-	-
rs4.7741415	4	7741415	13	88,89	A/G	Intergénica	-	-
rs5.11680975	5	11680975	12	80	G/A	Intergénica	-	-
	5							IPR027942: Sieve element occlusion, N-terminal IPR027944: Sieve element occlusion, C-terminal
rs5.20551001		20551001	11	72,73	G/T	Intragénica	Ciclev10000431m.g	
rs5.25257936	5	25257936	8	71,43	G/A	Intergénica	-	-
rs5.25257972	5	25257972	8	71,43	C/T	Intergénica	-	-
rs5.29150902	5	29150902	8	78,57	T/G	Intergénica	-	-
rs5.32748970	5	32748970	13	77,78	C/T	Intergénica	-	-
rs5.32749006	5	32749006	13	77,78	T/C	Intergénica	-	-
	5							IPR000620: EamA domain
rs5.41483206		41483206	13	77,78	C/G	Promotor	Ciclev10001438m.g	
	6							IPR007248: Mpv17/PMP22
rs6.21688995		21688995	12	80	T/G	Intragénica	Ciclev10012325m.g	
rs6.22698135	6	22698135	7	73,33	T/G	Intragénica	Ciclev10012175m.g	IPR008974: TRAF-like
	6							IPR000719: Protein kinase domain IPR025287:
rs6.22999075		22999075	7	73,33	A/G	Intragénica	Ciclev10011179m.g	

								Wall-associated receptor kinase galacturonan-binding domain IPR000719: Protein kinase domain
rs8.23756663	8	23756663	10	75	G/T	Promotor	Ciclev10030201m.g	
rs8.24368651	8	24368651	9	76,92	G/A	Intragénica	Ciclev10027779m.g	IPR030010: Villin-1, plant
rs8.24368663	8	24368663	9	76,92	C/T	Intragénica	Ciclev10027779m.g	IPR030010: Villin-1, plant
rs9.9091555	9	9091555	13	77,78	C/T	Intergénica	-	-
rs9.21110379	9	21110379	11	72,73	A/T	Intergénica	-	-
rs9.21110381	9	21110381	11	72,73	G/A	Intergénica	-	-

4.3.3. MODELO DOMINANTE SENSIBLE REFERENCIA (DSR)

Tomando como el alelo referencia como sensible en un modelo de dominancia encontramos un total de 19 SNPs. De ellos, 10 se localizan en zonas intergénicas, 1 asociado a un promotor de un dominio EamA y 8 asociados a zonas intragénicas.

Respecto de los SNPs presentes en zonas intragénicas encontramos uno localizado en un dedo de Zinc de tipo RING/FYVE/PHD, un SNP asociado a una bomba de protones, dos SNPs asociados a un dedo de Zinc de tipo LIM, tres asociados a una hidrolasa Alpha/beta y finalmente uno asociado a una proteína translocasa mitocondrial.

Tabla 7. SNPs obtenidos en el Modelo Dominante Sensible Referencia

Nombre	Cr	Posición	N	% Id	SNP	Zona	Gen	Anotación Funcional
rs1.1963694	1	1963694	11	72,73	C/T	Intergénica	-	-
rs1.1963718	1	1963718	11	72,73	T/C	Intergénica	-	-
rs2.34345000	2	34345000	13	77,78	T/C	Intragénica	Ciclev10015691m.g	IPR013083: Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type
rs4.24797835	4	24797835	10	75	C/T	Intergénica	-	-
rs5.11680975	5	11680975	12	80	G/A	Intergénica	-	-
rs5.29150912	5	29150912	8	71,43	T/A	Intergénica	-	-
rs5.32748970	5	32748970	13	77,78	C/T	Intergénica	-	-
rs5.32749006	5	32749006	13	77,78	T/C	Intergénica	-	-
rs5.33986201	5	33986201	13	88,89	T/C	Intragénica	Ciclev10003420m.g	IPR004131: Pyrophosphate-energised proton pump
rs5.34673317	5	34673317	11	72,73	C/T	Intragénica	Ciclev10002540m.g	IPR001781: Zinc finger, LIM-type
rs5.34673330	5	34673330	11	72,73	T/C	Intragénica	Ciclev10002540m.g	IPR001781: Zinc finger, LIM-type
rs5.34742712	5	34742712	11	72,73	G/T	Intragénica	Ciclev10001055m.g	IPR029058: Alpha/Beta hydrolase fold

rs5.34742713	5	34742713	11	72,73	G/C	Intragénica	Ciclev10001055m.g	IPR029058: Alpha/Beta hydrolase fold
rs5.34742740	5	34742740	11	72,73	A/T	Intragénica	Ciclev10001055m.g	IPR029058: Alpha/Beta hydrolase fold
rs5.41483206	5	41483206	13	77,78	C/G	Promotor	Ciclev10001438m.g	IPR000620: EamA domain
rs9.6882970	9	6882970	13	77,78	T/C	Intragénica	Ciclev10006291m.g	IPR005683: Mitochondrial import receptor subunit Tom22
rs9.9091555	9	9091555	13	77,78	C/T	Intergénica	-	-
rs9.21110379	9	21110379	11	72,73	A/T	-	-	-
rs9.21110381	9	21110381	11	72,73	G/A	-	-	-

4.3.4. MODELO DOMINANTE SENSIBLE ALTERNATIVO (DSA)

Tomando el alelo sensible como alternativo en una relación de dominancia se obtienen un total de 24 SNPs de los cuales 7 se localizaron en zonas intergénicas, 8 en el promotor y 9 en zonas intragénicas.

Respecto de los SNPs presentes en los promotores encontramos dos asociados a un dedo de zinc de tipo RING/FYVE/PHD, dos asociados a una proteína hierro-azufre, uno asociado a una cuproproteína y tres asociados al promotor de una tiorredoxina reductasa. En los SNPs presentes en las zonas intragénicas encontramos uno asociado de nuevo a un dedo de Zinc de tipo RING/FYVE/PHD, dos asociados a un dominio Rho, uno a un dominio MYB y uno en una polimerasa de ARN de tipo III.

Tabla 8. SNPs obtenidos en el Modelo Dominante Sensible Alternativo

Nombre	Cr	Posición	N	% Id	SNP	Zona	Gen	Anotación Funcional
rs2.245580	2	245580	13	77,78	G/A	Intergénica	-	-
rs2.6667355	2	6667355	11	72,73	A/C	Intergénica	-	-
rs2.6667373	2	6667373	11	72,73	A/T	Intergénica	-	-
rs2.28533441	2	28533441	11	72,73	G/A	Intergénica	-	-
rs2.34345000	2	34345000	13	77,78	T/C	Intragénica	Ciclev10015691m.g	IPR013083: Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type
rs3.5397534	3	5397534	13	77,78	C/T	Intragénica	Ciclev10018892m.g	-
rs4.19956252	4	19956252	8	71,43	A/T	Intragénica	Ciclev10032937m.g	IPR011992: EF-hand domain pair
rs5.29125149	5	29125149	12	80	T/C	Promotor	Ciclev10000893m.g	IPR013083: Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type
rs5.29125184	5	29125184	12	80	T/C	Promotor	Ciclev10000893m.g	IPR013083: Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type
rs5.29150925	5	29150925	8	78,57	C/T	Intergénica	-	-

rs5.30166052	5	30166052	11	72,73	T/A	Intergénica	-	IPR000198: Rho GTPase-activating protein domain
rs5.35732416	5	35732416	12	80	A/T	Intragénica	Ciclev10003194m.g	IPR016135: Ubiquitin-conjugating enzyme/RWD-like
rs5.42565738	5	42565738	11	72,73	C/T	Intragénica	Ciclev10003381m.g	IPR016135: Ubiquitin-conjugating enzyme/RWD-like
rs5.42565769	5	42565769	11	72,73	G/T	Intragénica	Ciclev10003381m.g	IPR007592: Protein of unknown function DUF573
rs6.8872558	6	8872558	13	77,78	T/G	Intragénica	Ciclev10011975m.g	PTH10072 IRON-SULFUR CLUSTER ASSEMBLY PROTEIN
rs6.20496725	6	20496725	11	72,73	A/G	Promotor	Ciclev10013333m.g	PTH10072 IRON-SULFUR CLUSTER ASSEMBLY PROTEIN
rs6.20496726	6	20496726	11	72,73	C/T	Promotor	Ciclev10013333m.g	PTH10072 IRON-SULFUR CLUSTER ASSEMBLY PROTEIN
rs7.8440841	7	8440841	13	77,78	G/C	Intragénica	Ciclev10025950m.g	IPR006447: Myb domain, plants
rs8.2476738	8	2476738	12	80	C/A	Promotor	Ciclev10030206m.g	IPR008972: Cupredoxin
rs8.22774783	8	22774783	11	72,73	G/T	Intragénica	Ciclev10027681m.g	PTH19376:SF32 DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE III SUBUNIT RPC1
rs9.23383473	9	23383473	13	77,78	A/C	Promotor	Ciclev10004686m.g	IPR005982: Thioredoxin reductase
rs9.23383485	9	23383485	13	77,78	T/G	Promotor	Ciclev10004686m.g	IPR005982: Thioredoxin reductase
rs9.23383501	9	23383501	13	77,78	C/A	Promotor	Ciclev10004686m.g	IPR005982: Thioredoxin reductase
rs9.29989601	9	29989601	11	72,73	T/C	Intergénica	-	-

4.3.5. MODELO RECESIVO REFERENCIA RESISTENTE (RRR)

El modelo que tomaba el alelo de referencia como resistente en un modelo de recesividad fue el que menos resultados arrojó. Un total de 4 SNPs localizándose dos de ellos en zonas intergénicas y dos de ellos en el promotor de un dedo de zinc de tipo RING/FYVE/PHD.

Tabla 9. SNPs obtenidos en el Modelo Recesivo Referencia Resistente

Nombre	Cr	Posición	N	% Id	SNP	Zona	Gen	Anotación Funcional
rs5.29125149	5	29125149	12	80	T/C	Promotor	Ciclev10000893m.g	IPR013083: Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type
rs5.29125184	5	29125184	12	80	T/C	Promotor	Ciclev10000893m.g	IPR013083: Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type
rs5.30166052	5	30166052	11	72,72	T/A	Intergénica	-	-
rs5.29989601	9	29989601	11	72,72	T/C	Intergénica	-	-

4.3.6. MODELO RECESIVO RESISTENTE ALTERNATIVO (RRA)

El modelo que toma el alelo alternativo como resistente arroja un total de 9 SNPs situándose la mayoría de ellos en zonas intergénicas, concretamente 7 y únicamente 2 de ellos se localizaron en el promotor de dos genes que codificaban para una cuproproteína y un dominio EamA.

Tabla 10. SNPs obtenidos en el Modelo Recesivo Resistente Alternativo

Nombre	Cr	Posición	N	% Id	SNP	Zona	Gen	Anotación Funcional
rs1.1963694	1	1963694	11	72,73	C/T	Intergénica	-	-
rs1.1963718	1	1963718	11	72,73	T/C	Intergénica	-	-
rs5.11680975	5	11680975	12	80	G/A	Promotor	Ciclev10003124m.g	IPR008972: Cupredoxin
rs5.32748970	5	32748970	13	77,78	C/T	Intergénica	-	-
rs5.32749006	5	32749006	13	77,78	T/C	Intergénica	-	-
rs5.41483206	5	41483206	13	77,78	C/G	Promotor	Ciclev10001438m.g	IPR000620: EamA domain
rs9.9091555	9	9091555	13	77,78	C/T	Intergénica	-	-
rs9.21110379	9	21110379	11	72,73	A/T	Intergénica	-	-
rs9.21110381	9	21110381	11	72,73	G/A	Intergénica	-	-

4.3.7. MODELO ADITIVO RESISTENTE REFERENCIA (ARR)

Cuando utilizamos el modelo aditivo tomando como referencia el resistente se obtienen un total de 22 SNPs. De ellos 8 se localizaron en zonas intergénicas, 2 en promotores y 12 en zonas intragénicas.

Los dos SNPs presentes en el promotor se localizan en el promotor de una cuproproteína. Respecto de los SNPs localizados en zonas intragénicas encontramos muchos genes que habían aparecido previamente en los demás modelos como dominios de dedo de zinc o proteínas quinasa. Cabe destacar tres SNPs asociados a una ARN polimerasa y el SNP rs9.2680986 asociado a una expansina.

Tabla 11. SNPs obtenidos en el Modelo Aditivo Resistente Referencia

Nombre	Cr	Posición	N	% Id	SNP	Zona	Gen	Anotación Funcional
rs1.22876929	1	22876929	13	77,78	C/A	Intragénica	Ciclev10007504m.g	IPR013083: Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type IPR001025: Bromo adjacent homology (BAH) domain
rs3.3656868	3	3656868	13	77,78	T/A	Intragénica	Ciclev10019340m.g	IPR000719: Protein kinase domain

									IPR000719: Protein kinase domain
rs3.3656879	3	3656879	13	77,78	C/T	Intragénica	Ciclev10019340m.g		
rs4.17271494	4	17271494	9	76,92	C/G	Intergénica	-		-
rs4.17271499	4	17271499	9	76,92	T/C	Intergénica	-		-
rs4.17271537	4	17271537	9	76,92	A/C	Intergénica	-		-
									IPR029262: DNA-directed RNA polymerase N-terminal domain
rs4.20295936	4	20295936	13	88,89	G/A	Intragénica	Ciclev10030633m.g		
									IPR029262: DNA-directed RNA polymerase N-terminal domain
rs4.20295937	4	20295937	13	88,89	A/C	Intragénica	Ciclev10030633m.g		
									IPR029262: DNA-directed RNA polymerase N-terminal domain
rs4.20295938	4	20295938	13	88,89	G/T	Intragénica	Ciclev10030633m.g		
									IPR011990: Tetratricopeptide-like helical domain
rs4.20337193	4	20337193	9	76,92	G/A	Intragénica	Ciclev10031004m.g		
									IPR001841: Zinc finger, RING-type
rs5.29125149	5	29125149	12	80	T/C	Promotor	Ciclev10000893m.g		
									IPR001841: Zinc finger, RING-type
rs5.29125184	5	29125184	12	80	T/C	Promotor	Ciclev10000893m.g		
rs5.30166052	5	30166052	11	72,73	T/A	Intergénica	-		-
rs5.31542859	5	31542859	3	73,68	G/T	Intergénica	-		-
rs5.32508891	5	32508891	8	71,43	T/A	Intergénica	-		-
rs5.32508892	5	32508892	8	71,43	T/A	Intergénica	-		-
									IPR011011: Zinc finger, FYVE/PHD-type
rs6.18968060	6	18968060	11	72,73	C/A	Intragénica	Ciclev10013637m.g		
									IPR011011: Zinc finger, FYVE/PHD-type
rs6.18968062	6	18968062	11	72,73	C/A	Intragénica	Ciclev10013637m.g		
									IPR008972: Cupredoxin
rs8.2476715	8	2476715	13	77,78	T/A	Promotor	Ciclev10030206m.g		
									IPR008972: Cupredoxin
rs8.2476719	8	2476719	13	77,78	C/T	Promotor	Ciclev10030206m.g		
									IPR007117: Expansin, cellulose-binding-like domain
rs9.26809868	9	26809868	12	80	G/C	Intragénica	Ciclev10005627m.g		
rs9.29989601	9	29989601	11	72,73	T/C	Intergénica	-		-

4.3.8. MODELO ADITIVO RESISTENTE ALTERNATIVO (ARA)

El modelo aditivo que establecía la resistencia asociada al alelo alternativo arrojó un total de 24 SNPs. Sin embargo, la mayoría de ellos se localizan en zonas intergénicas. Únicamente un SNP se localiza en el promotor del dominio EamA y el resto en zonas intragénicas.

Del total de SNPs presentes en zonas codificantes encontramos uno en un glicosil hidrolasa, uno en una proteína de tipo SEO, uno en un dominio tetratricopéptido de tipo hélice, dos SNPs localizados en una hélice de tipo armadillo y un dominio WD40/YVTN.

Tabla 12. SNPs obtenidos en el Modelo Aditivo Resistente Referencia

Nombre	Cr	Posición	N	% Id	SNP	Zona	Gen	Anotación Funcional
rs1.1963694	1	1963694	11	72,73	C/T	Intergénica	-	-
rs1.1963718	1	1963718	11	72,73	T/C	Intergénica	-	-
								IPR017853:
rs2.21318401	2	21318401	10	75	C/A	Intragénica	Ciclev10014929m.g	Glycoside hydrolase superfamily
rs4.25581586	4	25581586	12	80	C/A	Intragénica	Ciclev10031906m.g	-
rs5.11680975	5	11680975	12	100	G/A	Intergénica	-	-
								IPR027942:
								Sieve element occlusion, N-terminal
								IPR027944:
rs5.20551001	5	20551001	11	72,73	G/T	Intragénica	Ciclev10000431m.g	Sieve element occlusion, C-terminal
								IPR011990:
rs5.27590001	5	27590001	4	77,78	G/T	Intragénica	Ciclev10000488m.g	Tetratricopeptide-like helical domain
rs5.31542840	5	31542840	3	73,68	C/T	Intergénica	-	-
rs5.31617346	5	31617346	11	72,73	T/C	Intergénica	-	-
rs5.32748970	5	32748970	13	77,78	C/T	Intergénica	-	-
rs5.32749006	5	32749006	13	77,78	T/C	Intergénica	-	-
rs5.41483206	5	41483206	13	77,78	C/G	Promotor	Ciclev10001438m.g	IPR000620: EamA domain
rs6.14434430	6	14434430	8	71,43	T/C	Intergénica	-	-
rs6.14434431	6	14434431	8	71,43	T/C	Intergénica	-	-
rs6.14434436	6	14434436	8	71,43	G/A	Intergénica	-	-
rs6.14434445	6	14434445	8	71,43	G/T	Intergénica	-	-
rs6.14434456	6	14434456	8	71,43	A/C	Intergénica	-	-
								IPR011989:
rs7.7921219	7	7921219	13	77,78	G/C	Intragénica	Ciclev10024928m.g	Armadillo-like helical
								IPR011989:
rs7.7921223	7	7921223	13	77,78	A/G	Intragénica	Ciclev10024928m.g	Armadillo-like helical
								IPR015943:
rs9.7604934	9	7604934	11	72,73	A/G	Intragénica	Ciclev10004383m.g	WD40/YVTN repeat-like-containing domain
rs9.9091555	9	9091555	13	77,78	C/T	Intragénica	-	-
rs9.12199853	9	12199853	12	80	G/A	Intergénica	-	-
rs9.21110379	9	21110379	11	72,73	A/T	Intergénica	-	-
rs9.21110381	9	21110381	11	72,73	G/A	Intergénica	-	-

4.4. CRUCE DE LOS SNPs CON ESTUDIOS ANTERIORES DE SALINIDAD EN CÍTRICOS

Al realizar el cruce de los SNPs obtenidos en esta asociación con los 56 fragmentos cDNA obtenidos en el estudio de salinidad en cítricos de Şahin-Çevik *et al.* (2020) no se encontraron coincidencias. No obstante, se observó que el SNP rs7.8440841 se localiza 10917pb downstream del fragmento del cromosoma 7 de 8451758-8451856 con una homología alta ($p\text{-value} = 2.00E-30$) con el gen H0666653 [NADP-dependent malic enzyme, (*C. sinensis*)]. Del mismo estudio, el cDNA con código de GeneBank H066663 alineó con tres zonas del genoma de clementina: el fragmento del cromosoma 6 de 14452097 a 14452002 se localizó 17641 pb del rs6.14434456, el fragmento del cromosoma 4 de 20325121 a 20325228 a 12072 pb de rs4.20337193 y el fragmento del cromosoma 4 de 20295938-20295938 a 29183 pb de rs4.20295938. La función de H066663 descrita es el gen 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, molécula precursora de la hormona etileno la cual está ampliamente estudiada que se incrementa en situación de estrés (Vanderstraeten & van Der Straeten, 2017). Un estudio posterior a partir de las ubicaciones indicadas podría informar de la posible existencia de tres ortólogos de ACC en clementina.

Al realizar el cruce con los genes presentes en el artículo de Xie *et al.* (2018) observamos que dos de los SNPs sí que caen en genes descritos anteriormente para la tolerancia a salinidad que son los SNPs rs5.34673317 que cruza con el gen Ciclev10002540m.g y el SNP rs9.26809868 que cruza con el gen Ciclev10005627m.g. Estos genes se encuentran relacionados con un factor de transcripción de tipo GATA y una expansina.

5. DISCUSIÓN

La salinidad es un problema que afecta actualmente a un tercio de la superficie de los cultivos y que continuará afectando debido al aumento de la temperatura como consecuencia del calentamiento global. Por ello se hace fundamental la adaptación de los cultivos ante nuevas condiciones climáticas (Afzal, 2018). Una herramienta fundamental para llevar a cabo la domesticación de las variedades actuales hacia unos cultivos más tolerantes a salinidad es la selección genómica, que utiliza para ello técnicas como el estudio de asociación de genomas o GWAS (Poland & Rife, 2012).

Por un lado, cabe destacar la lentitud en los programas de mejora para la tolerancia a la salinidad debido fundamentalmente a tres aspectos: la evaluación de la tolerancia a salinidad, que supone un problema respecto a la planta y respecto al método de cribado; la imposibilidad de encontrar una fuente única de tolerancia y, su control genético. Por otro lado cabría destacar la lentitud de crecimiento de las especies arbóreas, así como el espacio y recursos necesarios para tal fin. Los árboles evaluados son híbridos de *P. trifoliata* y el mandarino Cleopatra, fruto del “Programa de Mejora de Patrones del IVIA” que llevó a cabo los cruces en el año 2000. Es por ello que el número de muestras incluidas en este estudio de asociación de genomas (n=22) no alcanza un número tan alto de muestras como otros, llevados a cabo en trigo o arroz y que pueden llegar a incluir muestras de n=130 y n=250 individuos (Zhang *et al.*, 2018; Gizaw *et al.*, 2018).

Con anterioridad se han hecho estudios relacionados con la tolerancia a salinidad en cítricos utilizando técnicas como el RNA-seq (Xie *et al.*, 2018), microarrays comparativos o mediante mapeo de QTLs (B. Li *et al.*, 2016; Raga *et al.*, 2016; Şahin-Çevik *et al.*, 2020). En este trabajo se presenta por primera vez un GWAS en patrones de cítricos. El GWAS se llevó a cabo gracias a la asociación de los datos fenotípicos existentes para la tolerancia a salinidad con el genotipado realizado, permitiendo la obtención de SNPs para dicho carácter. Los SNPs son polimorfismos muy válidos para estos estudios ya que se localizan en cualquier parte de las estructuras de los genes y el genoma. Debido a que los genes por sí mismos no representan la totalidad de los mecanismos de tolerancia o resistencia frente a un determinado estrés biótico o abiótico (como es en este caso la salinidad), resulta fundamental la obtención de SNPs que se encuentran en zonas no codificantes (Caratachea, 2007).

En el GBS llevado a cabo se obtuvieron 91,794 SNPs distribuidos a lo largo del genoma (Fig. 12). Tras realizar el GWAS se obtuvieron un total de 142 SNPs candidatos a partir de 8 modelos distintos.

MODELO DOMINANTE RESISTENCIA REFERENCIA (DRR)

En base al modelo DRR, se encontraron los SNPs rs2.12692184 y rs4.23634445 en los genes Ciclev10017857m.g y Ciclev10031221m.g para los que no existe ninguna proteína o dominio anotado.

Los SNPs rs5.24794718 y rs5.24794738 se encontraron en el gen Ciclev10001613m.g que según la anotación funcional codifica para un factor de regulación del crecimiento (Growth-Regulating Factor, GRF). Estos factores de transcripción contienen un dominio Glutamina-Leucina-Glutamina (QLQ) implicado en la interacción proteína-proteína; y un dominio WRC que contienen una señal de localización nuclear y un motivo de unión a ADN. El primer GRF fue identificado en arroz, donde jugaba un papel regulatorio durante el desarrollo de las hojas y los tallos (Van der Knaap *et al.*, 2000). Estudios posteriores han estudiado su implicación en respuesta a estreses abióticos. En *Arabidopsis* el gen de respuesta a estrés *DREB2A*, cuya expresión incrementa la tolerancia de la planta frente a estrés osmótico requiere la represión de al menos un GRF (Kim *et al.*, 2012). Bajo condiciones control, GRF7 se une al promotor *DREB2A* para suprimir su expresión; sin embargo, el estrés abiótico lleva a la supresión de la expresión de *GRF7* y consecuentemente la activación de genes de respuesta a estrés osmótico (Kim *et al.*, 2012). En algodón se ha estudiado la implicación de los GRFs con relación a salinidad y se vio que bajo estrés salino disminuían notablemente su expresión (Cao *et al.*, 2020).

Los SNPs rs5.29125149 y rs5.29125184 se encontraban presentes en un dedo de Zinc de tipo RING/FYVE/PHD. Los motivos de dedos de zinc en plantas comprenden una gran familia de proteínas presentes que están envueltas principalmente en la tolerancia a estreses abióticos. En *Arabidopsis* se observó que la expresión del gen RING/FYVE/PHD ZFP At5g62460 (*AtRZFP*) fue inducida significativamente ante el estrés por sequía y por salinidad. Bajo condiciones de estrés, este gen mejoraba la tolerancia a través de una serie de procesos fisiológicos, incluyendo la captación de ROS, manteniendo la homeostasis de Na⁺ y K⁺,

controlando la apertura estomática para reducir la tasa de pérdida de agua y acumulando azúcares solubles y prolina para ajustar el potencial osmótico (Zang *et al.*, 2016).

Los SNPs rs6.22999043 y rs6.22999079 se encontraban en el gen Ciclev10011179m.g donde según la anotación funcional se encuentran un dominio de proteína quinasa y/o una proteína de tipo WAK (Wall-associated receptor kinase). Un dominio de proteína quinasa es un dominio proteico conservado que contiene la subunidad catalítica de la proteína quinasa. En el gen *SOS2* de *Arabidopsis*, necesario para regular la homeostasis de los iones Na⁺ y K⁺, resulta fundamental este tipo de dominio ya que en su alelo recesivo (*sos2-5*), un residuo conservado de glicina del dominio catalítico de la proteína quinasa cambia a glutamato. Esta mutación evita que se produzca la autofosforilación, sugiriendo que este dominio es fundamental para la tolerancia a salinidad (Liu *et al.*, 2000). Las proteínas de tipo WAK, son un tipo de proteínas transmembrana que se encuentran asociadas a la pared celular y que contienen un dominio citoplasmático serina/treonina y un dominio extracelular en contacto con la fracción de pectina de la pared celular. Este tipo de proteínas están envueltas en procesos de desarrollo y respuesta a estrés. En cebada se observó que el gen *WAK1* jugaba un papel fundamental a la hora de lidiar con estreses abióticos de distinta naturaleza (Kaur *et al.*, 2013). También se ha estudiado su implicación en respuesta a estrés salino en tomate, donde la disrupción del gen *SIWAK1* se relacionaba con la sensibilidad a sal (Meco *et al.*, 2020).

Por último, los SNPs rs8.2476715 y rs8.2476719 se ubicaban en el promotor del gen Ciclev10030206m.g que codifica para una cuproproteína. No se ha encontrado bibliografía alguna que relacione el papel de las cuproproteínas con la respuesta a estreses abióticos.

MODELO DOMINANTE RESISTENCIA ALTERNATIVO (DRA)

En este modelo se obtuvieron algunos SNPs asociados a genes donde la anotación funcional los identificaba como proteínas de origen animal. Estos fueron los SNPs rs2.9692170, rs6.21688995, rs6.22698135 y rs5.41483206; asociados a un dominio BRCT (BRCA1 C Terminus), al complejo Mpv17/PMP22, a un dominio TRAF y a un dominio EamA. El SNP rs2.12692195 estaba en un gen (Ciclev10017857m.g) que no ha sido descrito. Sin embargo, sí que encontramos otros SNPs que se localizan en genes presentes en el reino vegetal.

En primer lugar, el SNP rs5.20551001 se localizó en el gen Ciclev10000431m.g que codifica para una proteína “Sieve Element Occlusion” (SEO). Este tipo de proteínas también conocidas como forisomas son proteínas típicas del floema de especies leguminosas, pero no exclusivas en ellas. En el estudio llevado a cabo por Srivastava *et al.* (2016) se sobreexpresó el gen del forisoma del guisante (*PsSEOF-1*) en líneas transgénicas de tabaco obteniéndose una mayor tolerancia a salinidad debido a una menor toxicidad por iones y una mayor expulsión de las ROS lo que probablemente llevó a un menor daño en la membrana celular y un mejor rendimiento bajo condiciones de estrés salino.

El SNP rs6.22999075 se localizó en el Ciclev10011179m.g donde encontramos anotados un dominio de proteína quinasa y proteína de tipo WAK, de los que previamente se ha explicado su posible implicación en mecanismos de tolerancia a salinidad. El SNP rs8.23756663 (Ciclev10030201m.g) también se localizó en un dominio proteína quinasa.

Por último, se encontraron 2 SNPs (rs8.24368651 y rs8.24368663) en el promotor del gen Ciclev10027779m.g, codificante para vilina. La vilina pertenece a la familia de proteínas Vilina/Gelsolina, cuyos miembros son proteínas moduladoras de actina que cortan la actina F, protegen los extremos e impiden el intercambio de monómeros. Esta proteína participa en la remodelación de la actina necesaria para muchos procesos celulares (Vardar *et al.*, 2002). Se ha visto que, bajo condiciones de estrés en ambientes adversos, las plantas de algodón activan un sistema de respuesta para los genes de vilina (VLN), acumulándose en tejidos como las hojas o los pétalos. Dos miembros de esta familia (*GhVLN3* y *GhVLN10*) se ven inducidos diferencialmente en condiciones de estrés abiótico (sal, PEG, frío y calor) (Fenni *et al.*, 2021).

MODELO DOMINANTE SENSIBLE REFERENCIA (DSR)

En los SNPs rs2.34345000 y rs5.41483206 presentes en el gen Ciclev10015691m.g y en el promotor del gen Ciclev10001438m.g, respectivamente se encontraron un dedo de zinc de tipo RING/FYVE/PHD y un dominio EamA, previamente descritos.

En este modelo cabe destacar la presencia del SNP rs5.33986201 en la región intragénica de Ciclev10003420m.g que según la anotación funcional se corresponde con una pirofosfatasa energizada con una bomba de protones. La sobreexpresión de este gen en *Arabidopsis*, tomate y arroz ha demostrado su efectividad frente a condiciones de estrés salino, debido

fundamentalmente a un mayor gradiente electroquímico de protones que facilita el secuestro de iones y azúcares en la vacuola, reduciendo el potencial hídrico. Además, en *Arabidopsis* el gen *AVPI* que presenta una pirofosfatasa de este tipo, parece estimular el transporte de auxinas en el sistema radicular, elongando las raíces y permitiendo una mayor absorción del agua (Pasapula *et al.*, 2011).

A continuación, se encontraron los SNPs rs5.34673317 y rs5.34673330 en el gen Ciclev10002540m.g (Xie *et al.*, 2018). En InterPro la anotación funcional lo clasifica como un dedo de zinc de tipo LIM, mientras que en el mencionado artículo aparece como “GATA type zinc finger transcription factor”. El gen Ciclev10002540m.g anotado como dedo de zinc de tipo GATA ha sido descrito como un factor de transcripción implicado en la activación de genes en respuesta a estrés salino en cítricos y que desencadena procesos como la homeostasis de iones, la eliminación de ROS o la pérdida de la pared celular (Xie *et al.*, 2018)

Los SNPs rs5.34742712, rs5.34742713 y rs5.34742740 se encontraron dentro del Ciclev10001055m.g anotado como una alfa/beta hidrolasa, un grupo muy amplio de enzimas hidrolíticas donde se incluyen proteasas, lipasas o peroxidasas entre otras. En una línea de batata tolerante a salinidad (ND98) se aisló el gen *IbMas*, que contiene un dominio de maspardina (proteína perteneciente a la familia de las alfa/beta hidrolasas). Se vio que este gen era regulado positivamente en condiciones salinas y que al sobreexpresarse en una variedad tolerante (cv. Shangshu 19), esta presentaba mayor tolerancia a salinidad en comparación con la wild-type. Esta tolerancia se relaciona con la regulación del balance osmótico, la protección de la integridad de la membrana y la fotosíntesis además de una mayor capacidad de eliminación de ROS (Liu *et al.*, 2014)

Por último, el SNP rs9.6882970 se localizó en el gen Ciclev10006291m.g anotado como la subunidad Tom22 de una translocasa mitocondrial del que no se ha encontrado bibliografía relacionada con el objeto de estudio.

MODELO DOMINANTE SENSIBLE ALTERNATIVO (DSA)

En este modelo aparecen varios SNPs en dominios previamente descritos y de los que ya se ha hablado sobre su posible implicación en mecanismos de tolerancia a salinidad. Estos son

los SNPs rs2.34345000, rs5.29125184 y rs5.29150925 que aparecen en zonas intragénicas o del promotor de un dedo de zinc de tipo RING/FYVE/PHD.

El SNP rs4.19956252 se encontró en el gen Ciclev10032937m.g relacionado con un dominio EF-hand. Este tipo de dominios están relacionados con la unión de calcio, una de las primeras señales que se activan en respuesta a estrés salino. De hecho, el gen *SOS3* que juega un importante papel en la tolerancia a salinidad en numerosas especies, entre ellas los cítricos, presenta un dominio de este tipo (Mouhaya *et al.*, 2010).

El SNP rs5.35732416 se encontró en el gen Ciclev10003194m.g que codifica para una proteína Rho-GTPasa. Las GTPasas de tipo Rho presentes en plantas (ROP) actúan como interruptores moleculares que participan en el control espacial de los procesos celulares mediante la señalización del citoesqueleto y el tráfico vesicular (Nagawa *et al.*, 2010). En estudios realizados en *Arabidopsis* se ha visto que son capaces de activar respuestas relacionadas con la reorganización de los microtúbulos en respuesta a estrés salino (Li *et al.*, 2017)

Los SNPs rs5.42565738 y rs5.42565769 se encontraron dentro del gen Ciclev10003381m.g de una enzima conjugadora de ubiquitina (E2). Este tipo de enzima juega un papel crítico en la vía ubiquitina-proteasoma (UPP), un versátil sistema de señales celulares que también se encarga de regular muchos aspectos de la fisiología celular porque elimina la mayoría de péptidos y proteínas anormales de vida corta. Existen varios estudios que destacan el importante papel que la ubiquitinación juega en los estreses abióticos. En el estudio de Zhou *et al.*, (2010) se sobreexpresó el gen de correspondiente a la enzima conjugadora de ubiquitina (*GmUBC2*) en soja y se vio que su expresión aumentaba cuando existía estrés por sequía o salinidad. En el mismo estudio se clonó este gen en *Arabidopsis* y se observó que las plantas transgénicas eran más tolerantes que las plantas control. Los resultados obtenidos sugieren que este gen regula la homeostasis de los iones, la síntesis de osmolitos y la respuesta a estrés oxidativo (Zhou *et al.*, 2010)

El SNP rs6.8872558 se encuentra en el gen Ciclev10011975m.g que es una proteína de función desconocida.

Los SNPs rs6.20496725 y rs6.20496726 se encontraron en el promotor de un cluster de hierro-azufre del gen Ciclev10013333m.g. Este tipo de proteínas incluyen proteínas como las de fijación de nitrógeno (Nif), que juegan un importante papel en la protección de las plantas frente a estreses bióticos y abióticos. En el estudio de Liu *et al.*, (2014) se introdujo un cluster hierro-azufre (*IbNFUI*) aislado en una batata tolerante a sal en una batata sensible, logrando que la planta exhibiera una mayor tolerancia gracias a una mayor regulación del balance osmótico, la protección de la integridad de la membrana y la fotosíntesis así como la eliminación de ROS.

El SNP rs7.8440841 está presente en el gen Ciclev10025950m.g que se trata de un dominio Myb. Este tipo de dominio ya ha sido descrito como factor de transcripción implicado en la respuesta a estrés por sal en cítricos (Xie *et al.*, 2018).

El SNP rs8.22774783 presente en el gen Ciclev10027681m.g está anotado funcionalmente como la subunidad RPC1 de la ARN polimerasa 3 de unión a ADN. Apenas existen referencias que la relacionen con células vegetales. Aparece únicamente anotada en una entrada de *Musa acuminata*. Se describe sobre todo en humanos y levaduras.

Por último, dentro de este modelo se encontraron los SNPs rs9.23383473, rs9.23383485 y rs9.23383501 en el promotor del Ciclev10004686m.g. Aparece descrita en la anotación la proteína tioredoxina reductasa. Una vez la tioredoxina pasa a su forma reducida sirve como donador de electrones a la tioredoxina peroxidasa que consecuentemente reduce los niveles de H₂O₂ y H₂O. Se ha reconocido su papel en la tolerancia a estrés oxidativo y sequía en *Arabidopsis* gracias a la homeostasis de ROS (Cha *et al.*, 2014). No hay literatura previa que implique directamente a este gen en la tolerancia de salinidad, pero debido a que la disminución de ROS es una consecuencia de la activación de los genes de respuesta a estrés salino, podría estar indirectamente relacionado.

MODELO RECESIVO REFERENCIA RESISTENTE (RRR)

En este modelo contamos con los SNPs rs5.29125149 y rs5.29125184 en el promotor del Ciclev10000893m.g donde según la anotación funcional encontramos un dedo de zinc de tipo RING/FYVE/PHD, previamente descrito. Los otros dos SNPs (rs5.30166052 y rs5.29989601) se encuentran en zonas intergénicas.

MODELO RECESIVO RESISTENCIA ALTERNATIVO (RRA)

En este modelo aparecen dos SNPs (rs5.116809755 y rs5.41483206) presentes en el promotor de dos genes (Ciclev10003124m.g y Ciclev10001438m.g) en los que según la anotación funcional se encuentran una cuproproteína y un dominio EamA, previamente descritos.

MODELO ADITIVO RESISTENTE REFERENCIA

El primer SNP de este modelo, el SNP rs1.22876929 se encontró en el gen Ciclev10007504m.g, donde la anotación funcional predice que pueden hallarse un dedo de zinc RING/FYVE/PHD, ya descrito; o un dominio adyacente a bromo por homología (Bromo Adjacent Homology, BAH). Normalmente se encuentra en proteínas que se asocian con la cromatina (Chambers *et al.*, 2013). Parece actuar como un módulo de interacción proteína-proteína especializado en silenciamiento génico. Podría jugar un papel importante en la relación de la metilación del ADN con la replicación y la regulación transcripcional (Callebaut *et al.*, 1999). Según la bibliografía el dominio BAH no parece estar directamente implicado en mecanismos de tolerancia a salinidad, pero sí que se encuentra en algunas proteínas que podrían estar implicadas (Roy *et al.*, 2013), aunque no hay muchos artículos al respecto.

Los SNPs rs3.3656868 y rs3.3656879 se encontraron en el gen Ciclev10019340m.g donde se encuentra una proteína quinasa y los SNPs rs4.20295936, rs4.20295937 y rs4.20295938 en el Ciclev10030633m.g donde se encuentra una ARN-polimerasa de ADN, ambas proteínas previamente descritas.

El SNP rs4.20337193 se encontró en una región intragénica del gen Ciclev10031004m.g donde encontramos un dominio en hélice de tipo tetratricopéptido (TPR) que media las interacciones proteína-proteína y el ensamblado de un gran número de complejos. En el estudio de Sahi *et al.*, (2006) llevado a cabo en *Arabidopsis*, se propone que las proteínas que comparten estos dominios están implicadas en la respuesta a tolerancia a sal en el correcto plegamiento de otras proteínas.

Los SNPs rs5.29125149 y rs5.29125184 se encontraron en el promotor del gen Ciclev10000893m.g que se encuentra en un dedo de Zinc de tipo RING (Really Interesting New Gene). Este es un dominio de interacción con proteínas implicado en un gran número de procesos biológicos. Existen varios estudios al respecto que indican que distintas proteínas que lo contienen son importantes en respuesta a estrés salino (Agarwal & Khurana, 2020; Jung *et al.*, 2013). En un estudio de trigo apuntan a la proteína TaZnF de tipo RING, como un regulador positivo en respuesta a estrés salino o sequía ya que actúa como un factor de transcripción que activa genes relacionados con estrés. Además, se indica que este gen puede usarse en ingeniería genética para mejorar la tolerancia a distintos estreses abióticos (Agarwal & Khurana, 2020).

El SNP rs9.26809868 se encontró en el Ciclev10005627m.g, previamente descrito en la literatura como un gen de respuesta a estrés salino en cítricos (Xie *et al.*, 2018) donde se localiza una expansina. Esta familia de proteínas que se encuentran en la pared celular, tienen un importante papel en procesos como por ejemplo, el crecimiento de las células vegetales (Cosgrove, 2000). En respuesta a estrés salino la expresión de este gen se ve reducida, lo que explicaría por qué el crecimiento de la raíz de los cítricos se ve inhibido previamente descrito en la literatura como un gen de respuesta a estrés salino en cítricos (Xie *et al.*, 2018).

MODELO ADITIVO RESISTENTE ALTERNATIVO

En este último modelo encontramos varios SNPs localizados en genes donde están anotadas proteínas previamente descritas por lo que se describirán las que aún no lo han sido.

En primer lugar, se encontró el SNP rs2.21318401 localizado en el gen Ciclev10014929m.g donde encontramos una glicósido hidrolasa. Este tipo de enzimas son las encargadas de hidrolizar el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos. En el estudio llevado a cabo en arroz por Chen *et al.*, (2009).se estudió el proteoma de la mitocondria en respuesta a la muerte celular programada (PCD) por estrés salino y se vio que entre los genes que se activaban en respuesta a la PCD se incluía la glicósido hidrolasa, relacionándola con el transporte de electrones.

En segundo lugar, encontramos los SNPs rs7.7921219 y rs7.7921223 localizados en el gen Ciclev10024928m.g donde hay una hélice tipo Armadillo. Estos motivos están incluidos en

varios procesos incluidos el transporte vesicular y el anclaje a la membrana (Striegl *et al.*, 2010). En la especie *Lotus japonicus* L., una leguminosa silvestre; se vio que proteínas que tenían este tipo de motivos presentaban respuesta a estreses abióticos y que concretamente la proteína ARM LjTDF-5 funcionaba en el núcleo en respuesta a altas concentraciones salinas o deshidratación (Kojima *et al.*, 2012)

Por último, encontramos el SNP rs9.7604934 en el gen Ciclev10004383m.g donde encontramos un dominio con repeticiones WD40/YVTN. No se han encontrado artículos que relacionen estos dos dominios en conjunto con la tolerancia a sal. Sin embargo, sí que relacionan a proteínas que contienen repeticiones WD40 con la tolerancia a sal. En *Arabidopsis* se observó que las plantas transgénicas que sobreexpresaban estas proteínas eran más tolerantes a sal ya que reducían la acumulación de iones e incrementaban los niveles de osmolitos.

En base a los genes obtenidos como candidatos para la tolerancia a salinidad a partir del estudio de asociación realizado, se buscaron genes previamente descritos para la tolerancia a salinidad en otros estudios llevados a cabo en cítricos (Xie *et al.*, 2018). Estos fueron los genes Ciclev10002540m.g y Ciclev10005627m.g donde se encontraban los SNPs rs5.34673317 y rs9.26809868 respectivamente por lo que a priori estos dos SNPs serían interesantes para su validación como marcadores moleculares en estudios de salinidad en patrones de cítricos.

Destacan los SNPs presentes en los dominios de dedos de Zinc de tipo RING y RING/FYVE/PHD, en los dominios de proteína kinasa, el presente en la pirofosfatasa de protones y el dominio EF de unión a calcio. Estos SNPs a pesar de no estar en genes previamente descritos sí que se encuentran en familias génicas que se han descrito como implicadas en la respuesta a salinidad en cítricos (Xie *et al.*, 2018).

Del mismo modo encontramos un gran número de SNPs presentes en genes donde están anotados funcionalmente dominios proteicos o proteínas que a pesar de no haber sido previamente descritos en cítricos en respuesta a estrés salino sí que se han descrito en otras especies, en su mayoría *Arabidopsis thaliana*, al ser esta especie un organismo modelo.

No hemos de olvidar que muchos de los SNPs obtenidos en esta asociación se encuentran en regiones intergénicas. Los SNPs que se encuentran en regiones no codificantes pueden tener consecuencias en el proceso de traducción, en procesos como el splicing, la unión de factores de transcripción o la modificación de la secuencia de ARN no codificante. Tal es la importancia de este tipo de SNP, que la resistencia o susceptibilidad de cítricos a la enfermedad ABS (Alternaria Brown Spot) puede ser detectada a partir de un único SNP presente en una zona intergénica (Cuenca *et al.*, 2016)

CONCLUSIONES

1. Se han obtenido 91794 SNPs distintos a lo largo de los 9 cromosomas correspondientes al genoma de Clementina de los cuales 142 se han correlacionado con la sensibilidad o tolerancia a salinidad en base a ocho modelos distintos.
2. La asociación realizada ha identificado 2 SNPs localizados en genes o promotores de genes previamente descritos en respuesta a salinidad en cítricos: los SNPs rs5.34673317 en el gen Ciclev10002540m.g y el SNP rs9.26809868 presente en el gen Ciclev10005627m.g donde según la anotación funcional encontramos una expansina y un factor de transcripción de tipo GATA.
3. Muchos de los SNPs que no estaban en genes previamente descritos en respuesta a salinidad en cítricos sí que se encuentran en genes descritos en otras especies en respuesta a tolerancia a salinidad.
4. Los SNPs presentes en zonas intergénicas pueden ser interesantes debido a que puedan tratarse de elementos trans de regulación génica.
5. La extrapolación de estos resultados a nivel de especie o incluso de género requiere de su estudio en otros genotipos de cítricos para poder ser validados y empleados en futuros programas de mejora varietal.

BIBLIOGRAFÍA

- Afzal, M. (2018). Impact of climate change on crop adaptation: current challenges and future perspectives. *Pure and Applied Biology*, 7(3).
<https://doi.org/10.19045/BSPAB.2018.700115>
- Agarwal, P., & Khurana, P. (2020). TaZnF, a C3HC4 type RING zinc finger protein from *Triticum aestivum* is involved in dehydration and salinity stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 2020 29:3, 29(3), 395–406.
<https://doi.org/10.1007/S13562-019-00546-8>
- Agustí et al. (2020). *Citricultura* (3^a ed. rev) [Book]. Mundi-Prensa.
- Aleza, P., Forner-Giner, M., & del Pino, A. (2020). El panorama varietal y nuevos patrones. In *Una hoja de ruta para la citricultura española* (p. 151).
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3(10), 1–7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- Berthomieu, P., Nublat, Â., Brackenbury, W. J., Lambert, Â., Savio, C., Yamada, K., Gosti, È., Simonneau, T., Essah, P. A., Tester, M., Ve, Â., Sentenac, Â., & Casse, F. (2014). Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO Journal*, 22(9), 2004–2014.
- Bowman, K. D., & Joubert, J. (2020). Citrus rootstocks. In *The Genus Citrus*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00006-1>
- Brumós, J., Colmenero-Flores, J. M., Conesa, A., Izquierdo, P., Sánchez, G., Iglesias, D. J., López-Climent, M. F., Gómez-Cadenas, A., & Talón, M. (2009). Membrane transporters and carbon metabolism implicated in chloride homeostasis differentiate salt stress responses in tolerant and sensitive Citrus rootstocks. *Functional and Integrative Genomics*, 9(3), 293–309. <https://doi.org/10.1007/s10142-008-0107-6>
- Callebaut, I., Courvalin, J.-C., & Mornon, J.-P. (1999). The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. *FEBS Letters*, 446(1), 189–193. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00132-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00132-5)
- Cao, J. F., Huang, J. Q., Liu, X., Huang, C. C., Zheng, Z. S., Zhang, X. F., Shanguan, X. X., Wang, L. J., Zhang, Y. G., Wendel, J. F., Grover, C. E., & Chen, Z. W. (2020). Genome-wide characterization of the GRF family and their roles in response to salt stress in *Gossypium*. *BMC Genomics*, 21(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06986-0>

- Cao, K., Zhou, Z., Wang, Q., Guo, J., Zhao, P., Zhu, G., Fang, W., Chen, C., Wang, X., Wang, X., Tian, Z., & Wang, L. (2016). Genome-wide association study of 12 agronomic traits in peach. *Nature Communications*, 7, 1–10.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13246>
- Caratachea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 213–221.
- Castle, W. S. (2010). A Career Perspective on Citrus Rootstocks, Their Development, and Commercialization. *HortScience*, 45(1), 11–15.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.1.11>
- Cerdá, A., Fernandez, F., Caro, M., (Italy), M. G.-A., & 1979, U. (1979). Growth and mineral composition of two lemon varieties irrigated with saline waters. *Agris.Fao.Org*.
<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XE8061128>
- Cervera, M., Ortega, C., Navarro, A., Navarro, L., & Peña, L. (2015). *Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene HAL2 from yeast*. 75(1), 26–30. <https://doi.org/10.1080/14620316.2000.11511195>
- Cha, J. Y., Kim, J. Y., Jung, I. J., Kim, M. R., Melencion, A., Alam, S. S., Yun, D. J., Lee, S. Y., Kim, M. G., & Kim, W. Y. (2014). NADPH-dependent thioredoxin reductase A (NTRA) confers elevated tolerance to oxidative stress and drought. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 184–191. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2014.04.008>
- Chambers, A. L., Pearl, L. H., Oliver, A. W., & Downs, J. A. (2013). The BAH domain of Rsc2 is a histone H3 binding domain. *Nucleic Acids Research*, 41(19), 9168–9182.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKT662>
- Chen, X., Wang, Y., Li, J., Jiang, A., Cheng, Y., & Zhang, W. (2009). Mitochondrial proteome during salt stress-induced programmed cell death in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(5), 407–415. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2008.12.021>
- Colmenero-Flores, J. M., Arbona, V., Morillon, R., & Gómez-Cadenas, A. (2020). Salinity and water deficit. In *The Genus Citrus*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00014-0>
- Cooper et al. (1954). Screening citrus rootstocks seedlings for tolerance to calcareous soils. *J. Rio Grande Valley Hort Soc.*, 4:100-105.
- Cooper, W. C. (1961). Toxicity and accumulation of salts in citrus trees on various rootstocks in Texas. *Fla. St. Hort. Soc.*, 95–104.
- Cosgrove, D. J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802), 321–326. <https://doi.org/10.1038/35030000>

- Cuartero et al. (2008). Tolerancia a la salinidad. Adaptación al ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal. *Junta de Andalucía, Sevilla*.
- Cubero-Font, P., Maierhofer, T., Jaslan, J., Rosales, M. A., Espartero, J., Díaz-Rueda, P., Müller, H. M., Hürter, A. L., AL-Rasheid, K. A. S., Marten, I., Hedrich, R., Colmenero-Flores, J. M., & Geiger, D. (2016). Silent S-Type Anion Channel Subunit SLAH1 Gates SLAH3 Open for Chloride Root-to-Shoot Translocation. *Current Biology*, 26(16), 2213–2220. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2016.06.045>
- Cuenca, J., Aleza, P., Garcia-Lor, A., Ollitrault, P., & Navarro, L. (2016). Fine mapping for identification of citrus alternaria brown spot candidate resistance genes and development of new SNP markers for marker-assisted selection. *Frontiers in Plant Science*, 7(DECEMBER2016), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01948>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *PHYTOCHEMICAL BULLETIN*. <https://worldveg.tind.io/record/33886>
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- FAOSTAT. (2015). *No Title*.
- Felle, H. H., Botanisches, I., Giessen, U., & Giessen, D.-. (1994). *The H⁺/Cl⁻ Symporter*. 1131–1136.
- Fenni, L., Wang, S., Tian, R., Wang, P., & Liu, K. (2021). Villin Family Members Associated with Multiple Stress Responses in Cotton. *Phyton*, 90(6), 1645–1660. <https://doi.org/10.32604/phyton.2021.016947>
- Ferguson, L., & Grattan, S. R. (2005). How salinity damages citrus: Osmotic effects and specific ion toxicities. *HortTechnology*, 15(1), 95–99. <https://doi.org/10.21273/horttech.15.1.0095>
- Forner et al. (1983). Comportamiento de patrones y variedades de agrios ante situaciones extremas de asfixia radical. *I Congreso Mundial de La Asociación de Viveristas de Agrios, Valencia (España) 4-10 Diciembre*, 55–65.
- Forner Giner, M. A. (2002). *Comportamiento de nuevos patrones híbridos de cítricos a la salinidad y el estrés hídrico* [Universitat Politècnica de València]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=217297&info=resumen&idioma=SPA>
- Geiger et al. (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Science Signaling*, 4(173).

<https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2001346>

Geraldes, A., Pang, J., Thiessen, N., Cezard, T., Moore, R., Zhao, Y., Tam, A., Wang, S., Friedmann, M., Birol, I., Jones, S. J. M., Cronk, Q. C. B., & Douglas, C. J. (2011). SNP discovery in black cottonwood (*Populus trichocarpa*) by population transcriptome resequencing. *Molecular Ecology Resources*, *11*(SUPPL. 1), 81–92.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02960.x>

Gilliam, J. W. (1971). Rapid Measurement of Chlorine in Plant Materials. *Soil Science Society of America Journal*, *35*(3), 512–513.

<https://doi.org/10.2136/sssaj1971.03615995003500030051x>

Gorhan et al. (1985). Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and Soil*, *89*: 15-40.

Grant, T.J. y Costa, A. S. (1948). A progress report on studies of tristeza in Brazil. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 20–33.

Greenway, H. y Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, *31*: 149-190.

Grieve, A., & Walker, R. (1983). Uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in salt-treated citrus plants. *Australian Journal of Agricultural Research*, *34*(2), 133–143. <https://doi.org/10.1071/AR9830133>

Grosser, J. W., & Gmitter, F. G. (2010). *Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus*. *104*(3), 343–357.

<https://doi.org/10.1007/S11240-010-9823-4>

Hoagland, D., & Arnon, D. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Cabdirect.Org, Circular*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257>

Hodgson, R. W. (1967). (n.d.). *Horticultural Varieties of Citrus*. In Reuther, W., Webber, H.J. and Batchelor, L.D., Eds., *The Citrus Industry, University of California, Berkeley*, 431-459. - *References - Scientific Research Publishing*. Retrieved May 17, 2021, from [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1325125](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1325125)

Huang, X., & Han, B. (2014). Natural variations and genome-wide association studies in crop plants. *Annual Review of Plant Biology*, *65*(November 2013), 531–551.

<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035715>

Hussain, S., Luro, F., Costantino, G., Ollitrault, P., & Morillon, R. (2012). Physiological analysis of salt stress behaviour of citrus species and genera: Low chloride accumulation as an indicator of salt tolerance. *South African Journal of Botany*, *81*(May 2015), 103–

112. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.06.004>
- Hutchison et al. (1973). Reaction of selected citrus rootstocks to foot rot, burrowing and citrus nematodes. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 44:39-43.
- Ibanez, V. et al. (2020). Herramientas genómicas para la identificación, autenticación y mejora del material vegetal. In *Una hoja de ruta para la citricultura española*.
- Jena, S. N., Kumar, S., & Nair, N. K. (2009). Molecular phylogeny in Indian Citrus L. (Rutaceae) inferred through PCR-RFLP and trnL-trnF sequence data of chloroplast DNA. *Scientia Horticulturae*, 119(4), 403–416.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.030>
- Jia, H., Zhang, Y., Orbović, V., Xu, J., White, F. F., Jones, J. B., & Wang, N. (2017). Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*, 15(7), 817–823. <https://doi.org/10.1111/PBI.12677>
- Jung, Y. J., Lee, I. H., Nou, I. S., Lee, K. D., Rashotte, A. M., & Kang, K. K. (2013). BrRZFP1 a Brassica rapa C3HC4-type RING zinc finger protein involved in cold, salt and dehydration stress. *Plant Biology*, 15(2), 274–283. <https://doi.org/10.1111/J.1438-8677.2012.00631.X>
- Kaur, R., Singh, K., & Singh, J. (2013). A root-specific wall-associated kinase gene, HvWAK1, regulates root growth and is highly divergent in barley and other cereals. *Functional and Integrative Genomics*, 13(2), 167–177. <https://doi.org/10.1007/s10142-013-0310-y>
- Kim, J. S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K., Mitsuda, N., Takiguchi, Y., Ohme-Takagi, M., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Matsui, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). Arabidopsis GROWTH-REGULATING FACTOR7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including DREB2A. *Plant Cell*, 24(8), 3393–3405.
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.100933>
- Kojima, T., Kinoshita, M., Yamada, T., Umezaki, S., Iwaizako, M., Saito, Y., Noguchi, K., & Takahara, H. (2012). Molecular Characterization of a Novel Armadillo Repeat-Like Protein Gene Differentially Induced by High-Salt Stress and Dehydration from the Model Legume Lotus Japonicus. *Plant Molecular Biology Reporter 2012 31:3*, 31(3), 698–706. <https://doi.org/10.1007/S11105-012-0542-3>
- Korte, A., & Farlow, A. (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: A review. *Plant Methods*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-29>
- Li, B., Byrt, C., Qiu, J., Baumann, U., Hrmova, M., Evrard, A., Johnson, A. A. T., Birnbaum,

- K. D., Mayo, G. M., Jha, D., Henderson, S. W., Tester, M., Gilliam, M., & Roy, S. J. (2016). Identification of a stelar-localized transport protein that facilitates root-to-shoot transfer of chloride in arabidopsis. *Plant Physiology*, *170*(2), 1014–1029.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.01163>
- Li, C., Lu, H., Li, W., Yuan, M., & Fu, Y. (2017). A ROP2-RIC1 pathway fine-tunes microtubule reorganization for salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment*, *40*(7), 1127–1142. <https://doi.org/10.1111/pce.12905>
- Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., Zhang, Z., Lun, Y., Li, S., Wang, X., Huang, Z., Li, J., Zhang, C., Wang, T., Zhang, Y., Wang, A., Zhang, Y., Lin, K., Li, C., ... Huang, S. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics*, *46*(11), 1220–1226. <https://doi.org/10.1038/ng.3117>
- Liu, D., Wang, L., Liu, C., Song, X., He, S., Zhai, H., & Liu, Q. (2014). An Ipomoea batatas iron-sulfur cluster scaffold protein gene, IbNFU1, is involved in salt tolerance. *PLoS ONE*, *9*(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0093935>
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.-S., & Zhu, J.-K. (2000). The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(7), 3730–3734.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.97.7.3730>
- López-Climent, M. F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R. M., & Gómez-Cadenas, A. (2008). Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, *62*(2), 176–184.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.08.002>
- Ma, G., Zhang, L., Sugiura, M., & Kato, M. (2020). Citrus and health. In *The Genus Citrus*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00024-3>
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, *24*(3), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007>
- Martínez-Alcántara, B., Martínez-Cuenca, M. R., Quiñones, A., Iglesias, D. J., Primo-Millo, E., & Forner-Giner, M. A. (2015). Comparative expression of candidate genes involved in sodium transport and compartmentation in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, *111*, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.11.002>
- Meco, V., Egea, I., Ortíz-Atienza, A., Drevensek, S., Esch, E., Yuste-Lisbona, F. J., Barneche, F., Vriezen, W., Bolarin, M. C., Lozano, R., & Flores, F. B. (2020). The salt sensitivity induced by disruption of cell wall-associated kinase 1 (Slwak1) tomato gene is linked to altered osmotic and metabolic homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*,

- 21(17), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21176308>
- Mouhaya, W., Allario, T., Brumos, J., Andrés, F., Froelicher, Y., Luro, F., Talon, M., Ollitrault, P., & Morillon, R. (2010). Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Functional Plant Biology*, 37(7), 674–685. <https://doi.org/10.1071/FP10035>
- Moya, J. (2000). *Procesos y factores que determinan la tolerancia a la salinidad en los cítricos. Absorción y distribución de iones cloruro en los patrones mandarino Cleopatra y citrange Carrizo. Valencia.*
- Munns, R.; Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. In *Annu. Rev. Plant. Biol.* (pp. 59:651-81).
- Nagawa, S., Xu, T., & Yang, Z. (2010). RHO GTPase in plants: Conservation and invention of regulators and effectors. *Small GTPases*, 1(2), 78. <https://doi.org/10.4161/SGTP.1.2.14544>
- Newcomb, D. A. (1978). Selection of rootstocks for salinity and disease resistance. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 117–120.
- Nimbolkar, P. K., Shiva, B., & Rai, A. K. (2016). Rootstock breeding for abiotic stress tolerance in fruit crops. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 9(3), 375. <https://doi.org/10.5958/2230-732x.2016.00049.8>
- O'Bannon, J.H. y Hutchison, D. J. (1973). Development and selection of rootstocks resistant to the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*. *Proc. First. Int. Citrus Short Course*, :22-29.
- Oueslati, A., Salhi-Hannachi, A., Luro, F., Vignes, H., Mournet, P., & Ollitrault, P. (2017). Genotyping by sequencing reveals the interspecific *C. maxima* / *C. reticulata* admixture along the genomes of modern citrus varieties of mandarins, tangors, tangelos, orangelos and grapefruits. *PLoS ONE*, 12(10), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185618>
- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qiu, X., Zhu, L., Zhang, X., Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., Gaxiola, R., & Payton, P. (2011). Expression of an Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 9(1), 88–99. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00535.x>
- Pérez-Pérez, J. G., Gómez-Gómez, A. G., Botía, P., Brumós, J., Talón, M., & Colmenero-Flores, J. M. (2015). Transcriptional Profile Analysis of Young and Mature Leaves of Citrus Trees Acclimated to Salinity. *Acta Horticulturae*, 1065, 1359–1370.

- <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.172>
- Platt, R.G. y Bitters, W. P. (1971). Characteristics of rootstocks used for citrus in California. *Citrus Notes. Cooperative Extension. University of California. Tulare County.*, 10 pp.
- Poland, J. A., & Rife, T. W. (2012). Genotyping-by-Sequencing for Plant Breeding and Genetics. *The Plant Genome*, 5(3). <https://doi.org/10.3835/plantgenome2012.05.0005>
- Raga, V., Intrigliolo, D. S., Bernet, G. P., Carbonell, E. A., & Asins, M. J. (2016). Genetic analysis of salt tolerance in a progeny derived from the citrus rootstocks Cleopatra mandarin and trifoliolate orange. *Tree Genetics and Genomes*, 12(3). <https://doi.org/10.1007/s11295-016-0991-1>
- Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C., & Fragoso, J. M. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): Implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Medica de Mexico*, 149(2), 220–228.
- Roberts, S. K. (2006). *Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots*. 647–666.
- Roy, S. J., HUANG, W., WANG, X. J., EVRARD, A., SCHMÖCKEL, S. M., ZAFAR, Z. U., & TESTER, M. (2013). A novel protein kinase involved in Na⁺ exclusion revealed from positional cloning. *Plant, Cell & Environment*, 36(3), 553–568. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2012.02595.X>
- Sahi, C., Singh, A., Blumwald, E., & Grover, A. (2006). Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. *Physiologia Plantarum*, 127(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.2005.00610.X>
- Şahin-Çevik, M., Çevik, B., & Coşkan, A. (2020). Identification and Expression Analysis of Salinity-induced Genes in Rangpur lime (*Citrus limonia*). *Horticultural Plant Journal*, 6(5), 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.07.005>
- Sanfeliú Feliú, I. (2016). *Citricultura en España: Presente y Futuro*. <https://docplayer.es/27510363-Inmaculada-sanfeliu-feliu.html>
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Zhu, J. K. (2002). The putative plasma membrane NA⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance NA⁺ transport in plants. *Plant Cell*, 14(2), 465–477. <https://doi.org/10.1105/tpc.010371>
- Skerrett, M., & Tyerman, S. D. (1994). A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. *Planta* 194:3, 192(3), 295–305. <https://doi.org/10.1007/BF00198563>
- Soares, J. M., Weber, K. C., Qiu, W., Stanton, D., Mahmoud, L. M., Wu, H., Huyck, P., Zale,

- J., Jasim, K. Al, Grosser, J. W., & Dutt, M. (2020). The vascular targeted citrus FLOWERING LOCUS T3 gene promotes non-inductive early flowering in transgenic Carrizo rootstocks and grafted juvenile scions. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78417-9>
- Sonah, H., Bastien, M., Iqaira, E., Tardivel, A., Légaré, G., Boyle, B., Normandeau, É., Laroche, J., Larose, S., Jean, M., & Belzile, F. (2013). An Improved Genotyping by Sequencing (GBS) Approach Offering Increased Versatility and Efficiency of SNP Discovery and Genotyping. *PLoS ONE*, *8*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054603>
- Srivastava, V. K., Raikwar, S., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2016). Ectopic expression of phloem motor protein pea forisome PsSEO-F1 enhances salinity stress tolerance in tobacco. *Plant Cell Reports*, *35*(5), 1021–1041. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1935-9>
- Striegl, H., Andrade-Navarro, M. A., & Heinemann, U. (2010). Armadillo Motifs Involved in Vesicular Transport. *PLOS ONE*, *5*(2), e8991. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008991>
- Swingle, W. T. & Reece, P. C. (1967). The Citrus Industry, revised 2nd edn. In *History, World Distribution, Botany, and Varieties Vol. 1* (eds Reuther, W. et al.) (pp. 190–430).
- Tanaka, T. (1977). Fundamental discussion of citrus classification. *Studia Citrologia*, *14*, 1–5.
- Thornberry, J. M., Goodman, M. M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D., & Buckler, E. S. (2001). Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*, *28*(3), 286–289. <https://doi.org/10.1038/90135>
- Van der Knaap, E., Kim, J. H., & Kende, H. (2000). A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiology*, *122*(3), 695–704. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.695>
- Vanderstraeten, L., & van Der Straeten, D. (2017). Accumulation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: Current status, considerations for future research and agronomic applications. *Frontiers in Plant Science*, *8*(January), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00038>
- Vardar, D., Chishti, A. H., Frank, B. S., Luna, E. J., Noegel, A. A., Oh, S. W., Schleicher, M., & McKnight, C. J. (2002). Villin-type headpiece domains show a wide range of F-actin-binding affinities. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *52*(1), 9–21. <https://doi.org/10.1002/cm.10027>
- Wang, Q., Guan, C., & Wang, S. M. (2014). Coordination of AtHKT1;1 and AtSOS1 facilitates Na⁺ and K⁺ homeostasis in *Arabidopsis thaliana* under salt stress. *Journal of*

- Plant Biology*, 57(5), 282–290. <https://doi.org/10.1007/s12374-014-0222-y>
- Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F. R., Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Curk, F., Du, D., Ollitrault, P., Roose, M. L., Dopazo, J., Gmitter, F. G., Rokhsar, D. S., & Talon, M. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*, 554(7692), 311–316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>
- Xie, R., Pan, X., Zhang, J., Ma, Y., He, S., Zheng, Y., & Ma, Y. (2018). Effect of salt-stress on gene expression in citrus roots revealed by RNA-seq. *Functional and Integrative Genomics*, 18(2), 155–173. <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0582-8>
- Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., Zhang, G., Yang, S., Li, R., Wang, J., Orjeda, G., Guzman, F., Torres, M., Lozano, R., Ponce, O., Martinez, D., De La Cruz, G., Chakrabarti, S. K., Patil, V. U., ... Visser, R. G. F. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475(7355), 189–195. <https://doi.org/10.1038/nature10158>
- Zang, D., Li, H., Xu, H., Zhang, W., Zhang, Y., Shi, X., & Wang, Y. (2016). An Arabidopsis zinc finger protein increases abiotic stress tolerance by regulating sodium and potassium homeostasis, reactive oxygen species scavenging and osmotic potential. *Frontiers in Plant Science*, 7(AUG2016), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01272>
- Zekri, M., & Parsons, L. R. (1992). Salinity tolerance of citrus rootstocks: Effects of salt on root and leaf mineral concentrations. *Plant and Soil*, 147(2), 171–181. <https://doi.org/10.1007/BF00029069>
- Zhang, Y., Zhou, L., Shen, X., Chen, D., Wu, W., Zhan, X., Liu, Q., Zhu, A., Lou, X., Xu, H., Cheng, S., Cao, L., Gizaw, S. A., Godoy, J. G. V., Pumphrey, M. O., & Carter, A. H. (2018). Genetic dissection of yield traits in super hybrid rice Xieyou9308 using both unconditional and conditional genome-wide association mapping. *Crop Science*, 7(6), 2289–2301. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.11.0690>
- Zhou, G. A., Chang, R. Z., & Qiu, L. J. (2010). Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 72(4), 357–367. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9575-x>