

Resumen

Uno de los principales objetivos de los programas de mejora genética de mandarinos es generar nuevas variedades que no produzcan semillas ni induzcan la formación de semillas en otras variedades por polinización cruzada, como es el caso de los híbridos triploides. La manipulación del nivel de ploidía es una estrategia fundamental para la obtención de híbridos triploides de mandarino sin semillas, que se pueden obtener a partir de hibridaciones entre dos genotipos diploides, como consecuencia de la formación de gametos no reducidos diploides, o mediante hibridaciones entre parentales diploides y tetraploides.

En cítricos, la citometría de flujo se ha empleado para determinar el tamaño del genoma y para determinar el nivel de ploidía de plantas regeneradas mediante técnicas de cultivo *in vitro* e hibridaciones sexuales. Sin embargo, no se ha aplicado hasta el momento para el análisis del nivel de ploidía de granos de polen maduros de genotipos diploides y euploides, debido a la inexistencia de una metodología apropiada de extracción de núcleos. Por otro lado, Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) es una metodología que permite, a partir de poblaciones o subpoblaciones de núcleos de granos de polen, su aislamiento y clasificación según su nivel de ploidía para su posterior análisis genético con marcadores moleculares. No obstante, los análisis genéticos con marcadores moleculares se encuentran limitados por la escasa cantidad de ADN que poseen los núcleos individualizados. Una opción para solventar este problema es el uso de kits de Whole Genome Amplification (WGA) que permiten generar mayor cantidad de ADN a partir del contenido de un solo núcleo. La utilización conjunta de estas dos metodologías nunca se ha aplicado en cítricos y su implementación permitiría generar nuevo conocimiento sobre su biología reproductiva y su aplicación en los programas de mejora genética.

Las hibridaciones sexuales $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ son dos estrategias que permiten obtener elevadas poblaciones de híbridos triploides. Las estructuras genéticas de estos híbridos dependen en gran medida de los modelos de segregación cromosómica de los parentales tetraploides, ya que influyen en la transmisión de heterocigosidad parental al gameto diploide. Existen dos modelos extremos de segregación de plantas tetraploides, disómico y tetrasómico, aunque también se han descrito modelos de segregación intermedia. En este sentido, es clave realizar estudios con marcadores moleculares que permitan determinar los modelos de segregación de los parentales tetraploides utilizados en los programas de mejora genética de mandarino para optimizar y seleccionar las estrategias más eficientes para la obtención de híbridos triploides con determinadas características.

En esta tesis, se ha utilizado por primera vez la citometría de flujo para determinar el nivel de ploidía de poblaciones de granos de polen de diferentes especies diploides, triploides y tetraploides de cítricos, demostrando que los granos de polen maduros son binucleados. Los granos de polen de genotipos diploides mostraron dos picos perfectamente definidos con diferentes intensidades de fluorescencia, correspondiendo el primer pico a la población de núcleos vegetativos y el segundo, a los núcleos generativos. Únicamente se han identificado dos excepciones con picos adicionales en sus histogramas; el tangor 'CSO' y la lima 'Mexicana'. El tangor 'CSO' mostró un pico adicional de fluorescencia equivalente a la suma de los valores fluorescencia de los núcleos vegetativos y generativos, lo que sugiere que los núcleos permanecen unidos después de su aislamiento de los granos de polen mediante el método de ruptura y aislamiento; y corroborado posteriormente mediante marcadores moleculares, ya que las tres poblaciones de núcleos presentan el mismo origen genético. Sin embargo, en la lima 'Mexicana' se han identificado por primera vez en cítricos gametos no reducidos de polen mediante citometría de flujo. Las poblaciones de granos de polen de genotipos triploides no evidenciaron picos claros y definidos en los histogramas obtenidos-, mientras que los genotipos tetraploides revelaron dos poblaciones de núcleos, una de núcleos vegetativos y la otra de núcleos generativos, con el doble de intensidad de fluorescencia que sus núcleos homólogos en los genotipos diploides.

Una vez puesta punto una metodología para determinar el nivel de ploidía de los núcleos de granos de polen, utilizando la técnica FACS, se aislaron individualmente los núcleos de las poblaciones identificadas

con el objetivo de analizar el origen y la estructura genética de los núcleos de los granos de polen de genotipos diploides y tetraploides e identificar los mecanismos implicados en la formación de gametos no reducidos de lima 'Mexicana', mediante la amplificación del genoma de cada núcleo utilizando un kit de WGA y su posterior análisis con marcadores moleculares de tipo Simple Sequence Repeat (SSR) y Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Inicialmente se aislaron núcleos de las tres poblaciones identificadas en el histograma del tangor 'CSO' y se demostró la presencia de un solo alelo, confirmando que corresponden a núcleos de granos de polen reducidos (normales). Estos resultados son de gran importancia para una correcta interpretación de los histogramas, lo que nos permite afirmar que la presencia de un segundo (o tercer) pico en las poblaciones de granos de polen no corresponde con la presencia de granos de polen no reducidos.

El uso combinado de FACS y WGA se mostró como una metodología válida y adecuada para la individualización y amplificación genómica de núcleos haploides de granos de polen de genotipos diploides, permitiendo su posterior genotipado con marcadores SSR y SNP. Posteriormente, esta metodología se utilizó tentativamente para identificar el mecanismo implicado en la formación de gametos no reducidos de polen de lima 'Mexicana' y para estudiar el modo de segregación cromosómica de las plantas tetraploides. Para ello, y como control, se aislaron y amplificaron núcleos de hojas de genotipos diploides que se analizaron con diferentes marcadores heterocigotos. Los resultados obtenidos a partir de los núcleos diploides de hoja evidenciaron una amplificación desbalanceada hacia uno de los dos alelos y por lo tanto no amplificando los alelos correspondientes en la proporción esperada (1:1). Estos resultados indican que esta metodología no es adecuada para la realización de estudios genéticos con núcleos no haploides.

Con la puesta a punto de la metodología combinada para individualizar y amplificar núcleos haploides para su posterior análisis con múltiples marcadores moleculares, se estudiaron por primera vez eventos de recombinación y distorsiones de la segregación (SD) en núcleos de granos de polen haploides. El análisis de los eventos de recombinación se realizó en el cromosoma 1 del limón 'Eureka', revelando la presencia de hasta cinco eventos en un brazo y cuatro en el otro brazo, con un promedio 1.97 puntos de recombinación por gameto. Asimismo, cinco muestras mostraron ausencia de eventos de recombinación para los marcadores moleculares utilizados. La SD se analizó en una población de núcleos de granos de polen individualizados del tangor 'CSO' y una población de plantas ('RTSO') que se obtuvo a partir del cruzamiento entre el tangor 'RTO' como parental femenino y el tangor 'CSO' como parental masculino. La SD obtenida en los núcleos de granos de polen del tangor 'CSO' fue ligeramente menor (13.8%) respecto a la observada en la población de plantas 'RTSO' (20.7%). Ambas poblaciones mostraron SD sincronizada en el grupo de ligamiento (GL) 2, mientras que el GL 7 solo mostró una SD en la población de plantas 'RTSO'. Se distinguieron mecanismos de selección gametofítica masculina en la población de núcleos de granos de polen, mientras que en la población de plantas se observaron mecanismos de selección gametofítica y/o selección zigótica. Estos resultados demuestran que esta metodología es eficiente para realizar estudios genéticos con un gran número de marcadores moleculares sin la necesidad de generar poblaciones. Además, podría permitir la realización de proyectos de secuenciación en especies altamente heterocigóticas como los cítricos evitando la obtención de haplotipos a través de técnicas de cultivo *in vitro*.

La obtención de dos poblaciones de híbridos triploides generadas con el mandarino 'Moncada' tetraploide en hibridaciones $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ nos ha permitido estudiar los modelos de segregación cromosómica a nivel masculino y femenino de un mismo genotipo. Como parental femenino, presentó un modelo de segregación tetrasómica completa en siete de los nueve GLs (GL1, GL2, GL3, GL5, GL6, GL7, y GL9). Sin embargo, en el GL8 se observó un modelo de herencia intermedia con tendencia hacia la tetrasomía, mientras que el GL4 mostró una clara herencia intermedia. Como parental masculino, siete de los GL se ajustaron a un modelo de segregación tetrasómica, excepto en los GL 5 y 6 que presentaron modelos de segregación intermedios. Estas variaciones en el modo de segregación a nivel de GL según la dirección de las hibridaciones tienen importantes implicaciones en los programas de mejora genética. Dependiendo

en qué GL se encuentre un gen que controle un carácter de interés, la regulación genética del carácter y la dirección del cruzamiento, la segregación obtenida en la descendencia será diferente.

Además, el mandarino 'Moncada' 4x presentó valores significativos de DR. Como parental femenino se observaron valores significativos en cinco GLs (GL2, GL3, GL4, GL7 y GL9) y como parental masculino en seis GLs (GL2, GL3, GL4, GL5 GL6 y GL7). La producción de valores más elevados de homocigosidad podría ser útil para los programas de mejora genética de mandarino dirigidos a la obtención de híbridos triploides debido al potencial efecto de "limpieza" que puede tener la DR al revelar alelos nocivos o deletéreos para la selección y aumentar las configuraciones alélicas raras pero favorables que pueden detectarse mediante marcadores moleculares.

El conocimiento generado en esta tesis doctoral a sobre el análisis del nivel de ploidía e individualización de núcleos de granos de polen de genotipos diploides, triploides y tetraploides de cítricos mediante FACS y posterior amplificación genómica para su genotipado con marcadores SSR y SNP, así como el conocimiento de los modelos de segregación cromosómica del mandarino 'Moncada' 4x permitirá un desarrollo más eficiente de los programas de mejora genética de cítricos con el objetivo de obtener nuevas variedades de elite sin semillas para el mercado de consumo en fresco. De hecho, los resultados obtenidos se están aplicando actualmente, y suponen un punto de partida para realizar nuevos trabajos de investigación.