



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ivia
Instituto Valenciano
de Investigaciones Agrarias

Universitat Politècnica de València

Escola Tècnica Superior d'Enginyers Agrònoms i del Medi Natural

Institut Valencià d'Investigacions Agràries

Análisis del Modelo de Segregación Cromosómica del Mandarino 'Moncada' Tetraploide

Trabajo Final de Grado

Neus Ortega Alberó

Tutor UPV: José Gadea Vacas

Cotutor IVIA: Pablo Aleza Gil

Grado en Biotecnología

Curso 2017-2018

València, 9 de Julio de 2018

Análisis del modelo de segregación cromosómica del mandarino ‘Moncada’ tetraploide

Neus Ortega Albero

València, 9 de Julio de 2018

Tutor: Prof. D. José Gadea Vacas

Cotutor: D. Pablo Aleza Gil

RESUMEN

La obtención de híbridos triploides en cítricos es una herramienta clave para el desarrollo de nuevos programas de mejora genética. Los híbridos triploides se caracterizan por la ausencia de semillas en sus frutos, evitando problemas derivados de la polinización cruzada, además de presentar una gran demanda en el mercado para el consumo en fresco. La obtención de híbridos puede abordarse mediante diferentes estrategias como la utilización de gametos no reducidos ($2n$) en las hibridaciones entre individuos diploides ($2x \times 2x$) o mediante hibridaciones interploides entre individuos diploides y tetraploides ($2x \times 4x$ ó $4x \times 2x$). La configuración genética de las poblaciones triploides obtenidas depende de la estrategia empleada en su obtención y viene determinada por el mecanismo de formación de los gametos $2n$ en cruzamientos entre parentales diploides, y del modo de segregación cromosómica del parental tetraploide en cruzamientos interploides.

En este estudio se pretende analizar el modo de segregación cromosómica (disómica, tetrasómica o intermedia) del mandarino ‘Moncada’ $4x$ [*Citrus clementina* Hort. ex Tan. \times (*Citrus unshiu* (Mak) Marc. \times *Citrus nobilis* Lour.)]. Para ello, se utilizará ‘Moncada’ $4x$ como parental para obtener una segregación de individuos triploides que se analizarán mediante marcadores moleculares microsatélite (*Simple Sequence Repeat* - SSRs) y polimorfismos de único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNP) distribuidos a lo largo de los nueve grupos de ligamiento de los cítricos. Los SSRs se encuentran en regiones repetitivas del genoma y su variación en el número de repeticiones permite caracterizar los parentales, así como los híbridos triploides obtenidos. Los SNPs se encuentran en regiones con una variación en uno o varios nucleótidos y la presencia de nucleótidos diferenciales permite caracterizar los parentales y los híbridos triploides. El análisis mediante marcadores moleculares permitirá el estudio de la estructura genética del gameto diploide procedente de ‘Moncada’ $4x$ que ha originado cada híbrido triploide, evaluando así la restitución de heterocigosidad parental transmitida a las poblaciones triploides.

La variedad ‘Moncada’ $4x$ será utilizada como parental femenino en una hibridación ‘Moncada’ $4x \times$ *Citrus reticulata* Blanco ‘Anana’ y como parental masculino en una hibridación *C. clementina* ‘Clemenules’ \times ‘Moncada’ $4x$ para obtener dos familias de híbridos triploides. Se podrán analizar así, de forma adicional, los mecanismos de selección de gametos y de incompatibilidad que determinan la ‘Impronta Genética’. Los marcadores moleculares serán diseñados y seleccionados por presentar polimorfismo entre los parentales de cada población.

Una vez analizada la estructura génica de ambas poblaciones, se estimarán los ratios de segregación disómica, tetrasómica o intermedia para cada grupo de ligamiento, y se estudiarán las posibles diferencias de herencia al utilizar la variedad ‘Moncada’ $4x$ como parental masculino o femenino. Los resultados obtenidos serán de gran utilidad para planificar las estrategias de cruzamientos dentro del programa de mejora genética de cítricos para la obtención de híbridos triploides.

PALABRAS CLAVE

Cítricos, tetraploide, marcador SSR y SNP, herencia disómica, herencia tetrasómica

Analysis of chromosomal segregation model in tangerine ‘Moncada’ tetraploid

Neus Ortega Albero
València, 9 de Julio de 2018
Tutor: Prof. D. José Gadea Vacas
Cotutor: D. Pablo Aleza Gil

ABSTRACT

Breeding of triploid individuals in Citrus is a key tool to develop innovating programs in genetics field. Triploid hybrids are distinguished for being seedless cultivars in fruits, avoiding problems derived of cross pollination and they are really requested in the market worldwide to fresh consumption. Obtaining triploid hybrids may be approached through different strategies such as the use of unreduced gametes ($2n$) in diploid individuals hybridizations ($2x \times 2x$) or interploid hybridization between diploid and tetraploid individuals ($2x \times 4x$ or $4x \times 2x$). Genetic configuration of triploid populations depends on the strategy used in their obtention and it is determined by the formation mechanism of gametes $2n$ in diploid parental crossings, and the chromosomal segregation mode of the tetraploid parental in interploid crossings.

In this study, we aim to analyze the chromosomal segregation model (disomic, tetrasomic or intermediate) of tangerine ‘Moncada’ $4x$ [*Citrus clementina* Hort. ex Tan. \times (*Citrus unshiu* (Mak) Marc. \times *Citrus nobilis* Lour.)]. For this purpose, ‘Moncada’ $4x$ will be used as parental to obtain a triploid segregation which will be analyzed with Simple Sequence Repeat markers (SSR) and Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) located along the nine linkage groups of Citrus. SSR are located in repetitive regions of the genome and their variation in repetition numbers allow to characterize parent individuals and triploid hybrids. SNP are in regions with one or two nucleotide variation and the presence of differential nucleotides allows to characterize both parents and hybrids. Molecular marker analysis allows the study of genetic structure of the diploid gamete which comes from ‘Moncada’ $4x$ and origins every triploid hybrid, evaluating the heterozygosity restitution of the tangerine transmitted to the population.

‘Moncada’ $4x$ cultivar will be used to this study as feminine parental in a hybridation ‘Moncada’ $4x \times$ *Citrus reticulata* Blanco ‘Anana’ and as masculine parental in a crossing *C. clementina* ‘Clemenules’ \times ‘Moncada’ $4x$ to obtain two triploid families. Furthermore, it will be possible to study the mechanisms of gamete selection as well as incompatibility mechanisms which determine ‘Genetic Imprinting’. Molecular markers will be designed and selected by the presence of polymorphism between every population parents.

Once the genetic structure of both populations is studied, ratios will be estimated for disomic, tetrasomic or intermediate inheritance for every linkage group, and inheritance differences will be observed when ‘Moncada’ $4x$ is used as masculine or feminine parental. The results obtained will be useful to plan crosses strategies within the improvement Citrus genetic program to produce triploid hybrids.

KEY WORDS

Citrus, tetraploid, SSR and SNP markers, disomic inheritance, tetrasomic inheritance

ABREVIATURAS

dC = Distancia al Centrómero

DR = Doble Reducción

GL = Grupo de Ligamiento

IC = Intervalo de Confianza

P (n) = Probabilidad en función de n

PP = *Preferential Pairing* o Apareamiento Preferente de cromosomas

RHP = Restitución de la Heterocigosidad Parental

SNP = Marcador molecular *Single Nucleotide Polymorphisms*

SSR = Marcador *Simple sequence repeats* o microsatélite

χ^2 = Análisis chi-cuadrado

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Pablo Aleza y Andrés García-Lor, y al futuro doctor Miguel Garavello, por su dedicación y paciencia para responder a todas mis preguntas, y por enseñarme más de lo que podría haber imaginado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS CÍTRICOS.....	1
1.2	CLASIFICACIÓN BOTÁNICA, ORIGEN Y DIFUSIÓN DE LOS CÍTRICOS	1
1.3	GENOMA, CARACTERÍSTICAS Y PECULIARIDADES.....	2
1.4	PROBLEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA VARIETAL DE MANDARINOS EN ESPAÑA	2
1.5	MEJORA GENÉTICA DE CÍTRICOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN SEXUAL.....	3
1.6	ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES DE CÍTRICOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN SEXUAL	3
1.6.1	<i>Hibridaciones entre parentales diploides</i>	4
1.6.2	<i>Hibridaciones interploides</i>	5
1.7	MARCADORES MOLECULARES EN CÍTRICOS	5
1.8	UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA DETERMINAR LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LOS HÍBRIDOS TRIPLOIDES DE CÍTRICOS OBTENIDOS MEDIANTE HIBRIDACIONES SEXUALES INTERPLOIDES	7
2	OBJETIVOS	8
3	MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1	MATERIAL VEGETAL	9
3.2	RECOLECCIÓN DEL POLEN.....	9
3.3	POLINIZACIÓN	9
3.4	RESCATE Y CULTIVO DE EMBRIONES IN VITRO	9
3.5	ANÁLISIS DEL NIVEL DE PLOIDÍA	10
3.6	GENOTIPADO DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES CON MARCADORES SSR Y SNP	10
3.6.1	<i>Marcadores SSR</i>	10
3.6.2	<i>Marcadores SNP</i>	10
3.7	DISEÑO DE MARCADORES SSR.....	11
3.8	ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	13
3.8.1	<i>Identificación del parental que produce el gameto diploide</i>	13
3.8.2	<i>Cálculo de Restitución de la Heterocigosidad Parental</i>	13
3.8.3	<i>Cálculo de la frecuencia de asociación preferencial y Doble Reducción máxima</i>	13
3.8.4	<i>Organización de la diversidad de la población</i>	15
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1	POLINIZACIÓN, CULTIVO IN VITRO Y ANÁLISIS DEL NIVEL DE PLOIDÍA	15
4.2	ANÁLISIS MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES	15
4.2.1	<i>Identificación de origen de los gametos diploides</i>	16
4.2.2	<i>Estimación del coeficiente de asociación preferencial (PP) y doble reducción (DR)</i>	17
4.2.3	<i>Estructura genética de las poblaciones de híbridos triploides obtenidas utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino y masculino</i>	21
4.2.4	<i>Variabilidad genotípica</i>	25
4.3	IMPLICACIONES EN LOS PROGRAMAS DE MEJORA GENÉTICA DE CÍTRICOS.....	26
5	CONCLUSIÓN	27
6	BIBLIOGRAFÍA CITADA	28

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Marcadores moleculares SSR y SNP utilizados en este trabajo con su configuración alélica para los parentales utilizados	11
TABLA 2.	Estimación de PP y DR en los nueve GL para ‘Moncada’ 4x como parental femenino	20
TABLA 3.	Estimación de PP y DR en los nueve GL para ‘Moncada’ 4x como parental masculino.....	20
TABLA 4.	Frecuencia de la Restitución de la Heterocigosidad Parental para cada marcador en los híbridos triploides y el análisis de la segregación mendeliana (chi-cuadrado).....	24
TABLA 5.	Restitución de la Heterocigosidad Parental, grupos diferenciados entre genotipos analizados y distancia genética en ‘Moncada’ 4x utilizado como parental femenino y masculino	25

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Representación de los gametos obtenidos mediante un mecanismo meiótico normal, <i>First Division Restitution</i> (FDR) y <i>Second Division Restitution</i> (SDR) en ausencia de eventos de recombinación entre cromosomas.....	5
FIGURA 2.	Frecuencias genotípicas teóricas para un locus heterocigoto (aabb) considerando diferentes modelos de segregación cromosómica: disómico, tetrasómico e intermedio	8
FIGURA 3.	Análisis del marcador SSR TAA-41 en los parentales (a) ‘Moncada’ 4x, (b) ‘Anana’ y (c) en un híbrido triploide	16
FIGURA 4.	Análisis del marcador SSR CI07C07 en los parentales (a) ‘Moncada’ 4x, (b) ‘Clemenules’ y (c) en un híbrido triploide	17
FIGURA 5.	Ejemplo de la estimación de PP mediante el método de máxima verosimilitud de los marcadores centroméricos en GL1 (herencia tetrasómica, PP=0), GL4 (herencia intermedia, PP=0.5) y GLO (grupo ficticio incluido en la figura para representar una supuesta herencia disómica, PP=1) utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino.....	18
FIGURA 6.	Distribucion de la Restitución de la Heterocigosidad Parental (RHP) (a) a nivel de gameto diploide y (b) a nivel de marcador en las poblaciones de híbridos triploides obtenidas con ‘Moncada’ 4x como parental femenino (azul) y masculino (naranja).....	21
FIGURA 7.	Representación de los resultados obtenidos con los marcadores SNP (a) CIC 5950-02 en ‘Moncada’ 4x x ‘Anana’ y (b) INVA-P855 en ‘Clemenules’ x ‘Moncada’ 4x, donde cada punto corresponde a un híbrido. Los diferentes colores representan grupos de híbridos con la misma configuración alélica.....	22
FIGURA 8.	Dendogramas correspondiente al análisis genético realizado con marcadores SSR y SNP obtenido mediante el cálculo del <i>Simple Matching Dissimilarity index</i> y construcción del árbol mediante <i>weighted Neighbour-Joining</i> de dos poblaciones de híbridos triploides regeneradas a partir de los cruzamientos a) ‘Moncada’ 4x x ‘Anana’ y b) ‘Clemenules’ x ‘Moncada’ 4x	26

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia económica de los cítricos

Los cítricos son el principal cultivo de frutales en el mundo, con una producción anual de 125 millones de toneladas. Según la FAO (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA, 2016), hay 140 países productores, entre los cuales, España destaca con una superficie total de cultivo de, aproximadamente, 300.000 hectáreas y una producción de 7 millones de toneladas, el 5% de la producción mundial. Entre las especies más importantes cultivadas, los naranjos constituyen un 49% de la producción a nivel nacional, los mandarinos un 34%, los limones un 15%, y pomelos y otras especies, un 1%. España es el primer exportador de fruta fresca con un 25% del comercio mundial en este sector y es el primer exportador de naranjas, mandarinas y limones.

Además, la Comunidad Valenciana es la primera comunidad exportadora de cítricos con el 69% del total de la exportación española, alcanzando un valor en el mercado de más de 1.980 millones de euros, lo que convierte a los cítricos en una de sus principales actividades económicas (IVACE, 2018).

1.2 Clasificación botánica, origen y difusión de los cítricos

El género *Citrus* pertenece a la familia Rutaceae (orden Geraniales, suborden Geraniineae), que comprende 6 subfamilias, entre las cuales, la subfamilia Aurantioideae se encuentra dividida en 2 tribus, Clauseneae y Citreae. La última tribu se encuentra a su vez, compuesta por 3 subtribus, entre las cuales Citrinae comprende los géneros *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Clymenia*, *Fortunella*, *Poncirus* y *Citrus*. Son los considerados cítricos verdaderos, (Swingle y Reece, 1967) de los cuales *Fortunella*, *Poncirus* y *Citrus* pueden encontrarse cultivados para su comercialización.

La taxonomía de los cítricos sigue sometida a numerosos debates debido a su diversidad morfológica, su compatibilidad sexual interespecífica y la apomixis parcial en ciertas variedades. Actualmente, hay dos sistemas de clasificación aceptados, el de Swingle (1943) y Swingle y Reece (1967), que reconoce 16 especies del género *Citrus*, y otro por Tanaka (1977) que incluye 162 especies.

El origen de los cítricos se encuentra establecido en cuatro ancestros o especies ‘fundamentales’ entre las cuales ocurrieron numerosas hibridaciones interespecíficas que dieron lugar al resto de especies: *C. medica* L. (cidro), *C. reticulata* Blanco (mandarino), *C. maxima* L. Osbeck (pummelo) y *C. micrantha* Wester (papeda, especie silvestre) (Barkley *et al.*, 2006; Barrett y Rhodes, 1976; Federici *et al.*, 1998; Garcia-Lor *et al.*, 2013; Gulsen y Roose, 2001; Herrero, 1996; Li *et al.*, 2010; Nicolosi *et al.*, 2000; Penjor *et al.*, 2013; Scora, 1975; Wu *et al.*, 2018).

La diversificación de estos ancestros vendría determinada por su establecimiento en cuatro zonas geográficas diferentes y una evolución inicial alopátrica (Ollitrault *et al.*, 2012). Usando análisis genómicos, filogenéticos, y biogeográficos de germoplasma de cítricos, Wu *et al.* (2018), propusieron una diversificación durante el Mioceno tardío y una propagación al sudeste asiático hace aproximadamente 8 millones de años, gracias al cambio en las condiciones climáticas húmedas a un clima más seco. Posteriormente, las variedades fueron capaces de distribuirse al continente australiano vía transoceánica, donde se fija otro de sus puntos calientes de biodiversidad, en el Plioceno temprano, hace 4 millones de años.

Durante el proceso de domesticación de los principales cultivos de cítricos (naranjos, limas, limones, pomelos y mandarinos), son dos las actividades que determinaron la fijación de los genotipos con los caracteres de mayor interés: el injerto y la clonación vegetativa por apomixis,

un proceso natural que permite que los embriones nucleares tengan el mismo origen genético que la madre y, por tanto, se mantengan sus características invariantes en la descendencia (Liu *et al.*, 2012).

1.3 Genoma, características y peculiaridades

El genoma de los cítricos está constituido por dos sets de 9 cromosomas ($2n=2x=18$) (Krug, 1943) y un tamaño de 367Mb por genoma haploide (Terol *et al.*, 2008), aunque puede haber variaciones significativas de tamaño entre especies (Ollitrault *et al.*, 2003). Las especies principales de cítricos suelen ser diploides, no obstante, existen en la naturaleza genotipos euploides, que se caracterizan por una dotación cromosómica mayor. En especies de cultivos leñosos, la poliploidía ha sido atribuida a una mayor adaptabilidad a las condiciones climáticas (Lacadena, 1996) y todo parece indicar que fue el mecanismo de evolución principal de las angiospermas que ha permitido su diversificación y diferenciación (Wendel y Doyle, 2005). Entre las ventajas que presentan los poliploides se encuentran la elevada heterosis, la redundancia génica que lleva a una mayor expresión de ciertos genes y enmascara los efectos deletéreos de las mutaciones que se acumulen en el genoma, y la reproducción asexual, que permite mantener genotipos de interés durante generaciones. También se han documentado algunas desventajas como los efectos mitóticos anormales debido al aumento del genoma, la propensión a formación de células aneuploides y la inestabilidad epigenética que puede ocasionar una regulación de genes transgresiva o no aditiva (Comai, 2005). A partir del descubrimiento de la colchicina, muchas especies cultivadas fueron modificadas para duplicar su información genética, sin embargo, no son muchas las que han demostrado tener un interés real a nivel agronómico o en investigación (Lacadena, 1996).

En especies de cítricos, los genotipos poliploides más estudiados son los triploides y tetraploides, con tres y cuatro juegos completos de cromosomas respectivamente ($2n=3x=27$ y $2n=4x=36$). En la clasificación de los individuos tetraploides, se puede diferenciar entre autotetraploides (AAAA), cuando los cuatro cromosomas proceden de la misma especie (debido a reproducción intraespecífica) o alotetraploides (AABB), cuando los cromosomas proceden de distintas especies (debido a un cruzamiento interespecífico). Para poder entender el efecto que pueden tener los tetraploides en la evolución de los genomas de cítricos, es necesario conocer y entender los mecanismos que llevan a cabo durante su proceso reproductivo (Comai, 2005; Sybenga, 1996).

1.4 Problemática de la estructura varietal de mandarinos en España

Para asegurar la competitividad y sostenibilidad de la citricultura, es necesario el desarrollo de nuevas variedades resistentes a estreses bióticos y abióticos adaptadas a las nuevas necesidades de los consumidores. En este contexto, los consumidores demandan frutos de alta calidad, y, para su consumo en fresco, frutos sin semillas.

En España se distinguen tres grandes grupos de mandarinos comerciales: satsumas, clementinas e híbridos tipo mandarino. Las satsumas se recolectan desde principios de septiembre hasta finales de diciembre. El polen y los óvulos de estas variedades presentan baja viabilidad, por tanto, sus frutos no contienen semillas. No obstante, debido al bajo contenido en azúcares y ácidos totales, sus características organolépticas son inferiores a otras variedades y el interés de los consumidores disminuye. Las clementinas, en cambio, son las variedades más deseadas por los consumidores por su elevada calidad. Se cultivan muchas variedades, la mayoría obtenidas por selección de mutaciones espontáneas, que se recolectan entre mediados de septiembre y finales de enero. Son partenocárpicas, autoincompatibles y no se polinizan entre ellas, por tanto, sus frutos no tienen semillas. Sin embargo, tanto el polen como los óvulos son viables, y pueden producir semillas por polinización cruzada con otras variedades de mandarino. Los híbridos tipo mandarino, fundamentalmente Fortune, Nova y Murcott, fueron introducidos en la citricultura

debido a la demanda de mandarinas para su consumo durante un periodo mayor de tiempo en los mercados a nivel internacional. Estas variedades son autoincompatibles y permiten prolongar la recolección hasta mayo, pero tienen un gran inconveniente, pueden realizar la polinización cruzada con las clementinas, apareciendo semillas en frutos de ambas variedades. Además, estas variedades son susceptibles a la enfermedad de la mancha marrón causada por el hongo *Alternaria alternata*. Los frutos afectados presentan depresiones necróticas y pústulas suberosas en la corteza que deprecian la fruta para su consumo en fresco y, en el caso que las infecciones afecten a los frutos jóvenes, sufren una abscisión prematura, reduciendo notablemente la producción. Este hongo se presenta actualmente como una de las mayores enfermedades en cítricos, provocando la eliminación de árboles enfermos o el sobreinjerto de las variedades susceptibles.

La obtención de variedades de mandarino sin semillas mediante hibridación sexual que produzcan frutos de alta calidad y resistentes a *Alternaria*, daría un gran impulso al consumo de frutos de mandarino y, en consecuencia, un aumento de la competitividad de la citricultura española.

1.5 Mejora genética de cítricos mediante hibridación sexual

La hibridación sexual entre parentales cuidadosamente seleccionados es una de las técnicas tradicionales de mejora genética, utilizada para optimizar los procesos de producción, el desarrollo de portainjertos, y las características organolépticas de las nuevas variedades. Las hibridaciones en cítricos pueden presentar ciertas limitaciones como consecuencia de su compleja biología reproductiva. Uno de los problemas principales de la técnica de hibridación sexual es la gran cantidad de variedades apomícticas, que producen semillas poliembriónicas. Estos genotipos desarrollan embriones no sexuales a partir de la nucela (tejido propio del ovario), que limitan o impiden el desarrollo del embrión sexual. Por ello se deben utilizar, en la medida de lo posible, variedades no apomícticas (llamadas también variedades monoembriónicas ya que sus semillas contienen únicamente un embrión de origen sexual) como parentales femeninos para la obtención de híbridos (Aleza *et al.*, 2011). Además, muchos genotipos de gran interés presentan esterilidad masculina y/o femenina y, por lo tanto, no pueden ser utilizados en programas de mejora basados en hibridación sexual. Por último, existen mecanismos de inter y autoincompatibilidad que limitan el número de parentales disponibles para determinadas combinaciones.

La mayoría de las especies de cítricos presentan una elevada heterocigosis, causando una gran segregación de caracteres en la descendencia y mostrando un elevado número de posibles fenotipos (Aleza *et al.*, 2009a). No obstante, debido al largo periodo juvenil de los cítricos (entre 3 y 5 años) que dificulta la evaluación de la descendencia en campo, y el escaso conocimiento sobre los mecanismos genéticos que controlan la segregación de los caracteres de interés, no se ha podido hasta ahora explotar el potencial genético de las variedades.

1.6 Estrategias para la obtención de híbridos triploides de cítricos mediante hibridación sexual

En el marco de la mejora genética mediante hibridación sexual, los genotipos tetraploides han sido estudiados desde hace más de un siglo (Comai, 2005) y están siendo utilizados actualmente por su interés como parental para obtener cultivos híbridos triploides estériles, es decir, sin semilla, muy cotizados en el mercado de productos de consumo en fresco (Aleza *et al.*, 2016). En la meiosis de individuos triploides, se originan asociaciones multivalentes y como consecuencia, se producen gametos con distintas dotaciones cromosómicas que reducen la viabilidad de los mismos (Cameron y Frost, 1968; Fatta del Bosco *et al.*, 1992). Por ello, los híbridos triploides tienen muy baja fertilidad y normalmente no producen semillas ni inducen la formación de semillas en otras variedades por polinización cruzada. En cítricos, la partenocarpia

es un fenómeno común, por lo que la formación de semillas no es necesaria para obtener buenas producciones.

En los años setenta del siglo pasado se estudió cómo podían obtenerse híbridos triploides mediante hibridaciones sexuales $2x \times 4x$, $4x \times 2x$ y $2x \times 2x$ (Cameron y Burnett, 1978; Esen y Soost, 1971; Esen *et al.*, 1978). En el último caso, cruzamientos entre parentales diploides, el aumento de la ploidía está causado por la formación de gametos femeninos no reducidos (gametos $2n$) (Aleza *et al.*, 2015; Cuenca *et al.*, 2015). Sin embargo, en hibridaciones entre parentales diploides y tetraploides, los híbridos triploides se producen por la fecundación de un gameto diploide del parental tetraploide y un gameto haploide del parental diploide.

No obstante, estas observaciones no pudieron aplicarse en programas de mejora para la obtención de elevadas poblaciones de híbridos triploides hasta que se desarrollaron técnicas biotecnológicas para el rescate y cultivo de embriones *in vitro*, para el análisis del nivel de ploidía mediante citometría de flujo y la obtención de nuevos parentales tetraploides (Aleza *et al.*, 2012a; 2012b; 2011; 2010; 2009b). Estas técnicas biotecnológicas han permitido establecer amplios programas de híbridos triploides a nivel mundial para obtener variedades sin semillas de alta calidad y que maduren a lo largo de toda la campaña de producción. De hecho, varios grupos de investigación en diversos países han orientado sus programas en esta dirección (Aleza *et al.*, 2010; Cuenca *et al.*, 2010; Grosser *et al.*, 2010; Ollitrault y Navarro, 2012; Starrantino y Recupero, 1981).

1.6.1 Hibridaciones entre parentales diploides

La obtención de híbridos triploides puede llevarse a cabo mediante un cruzamiento de dos individuos diploides, como consecuencia de la formación de gametos no reducidos ($2n$) a nivel de óvulo (Aleza *et al.*, 2009b; Cuenca *et al.*, 2015; Rouiss *et al.*, 2017b) aunque las primeras poblaciones de híbridos $3x$ y $4x$ a partir de gametos no reducidos de polen se han obtenido recientemente (Rouiss *et al.*, 2017c).

Los dos mecanismos principales de la producción de gametos no reducidos son la no restitución de la primera división meiótica (*First división restitution* FDR), y la no restitución de la segunda división meiótica (*Second división restitution* SDR) (Mok y Peloquin, 1975), mecanismos que son comparados con el mecanismo meiótico habitual de las plantas diploides en la *Figura 1*. La configuración alélica de cada gameto para un locus determinado depende del tipo de mecanismo que produce los gametos $2n$, la distancia al centrómero y la interferencia cromosómica. Un genotipo cuyo mecanismo meiótico sea FDR, originará gametos $2n$ constituidos por cromátidas no hermanas y cuya restitución de la heterocigosidad será del 100% en ausencia de recombinación meiótica, mientras que, si se considera un evento de entrecruzamiento entre el locus considerado y el centrómero, la restitución de la heterocigosidad varía del 100% al 50%. En cambio, un genotipo que produzca los gametos $2n$ mediante el mecanismo SDR, presentará gametos constituidos por las cromátidas hermanas con una restitución de la heterocigosidad del 0% sin eventos de recombinación, mientras que, si se origina un evento de recombinación entre el locus considerado y el centrómero, la restitución de la heterocigosidad varía entre 0 y 100%. Por lo tanto, FDR y SDR originan gametos $2n$ con estructuras genéticas muy diferentes (Cuenca *et al.*, 2011).

En cítricos ambos mecanismos se encuentran presentes. En mandarino y limón ha sido demostrada la presencia del mecanismo SDR (Cuenca *et al.*, 2015) mientras que para la formación de polen no reducido, predomina el mecanismo FDR (Rouiss *et al.*, 2017c).

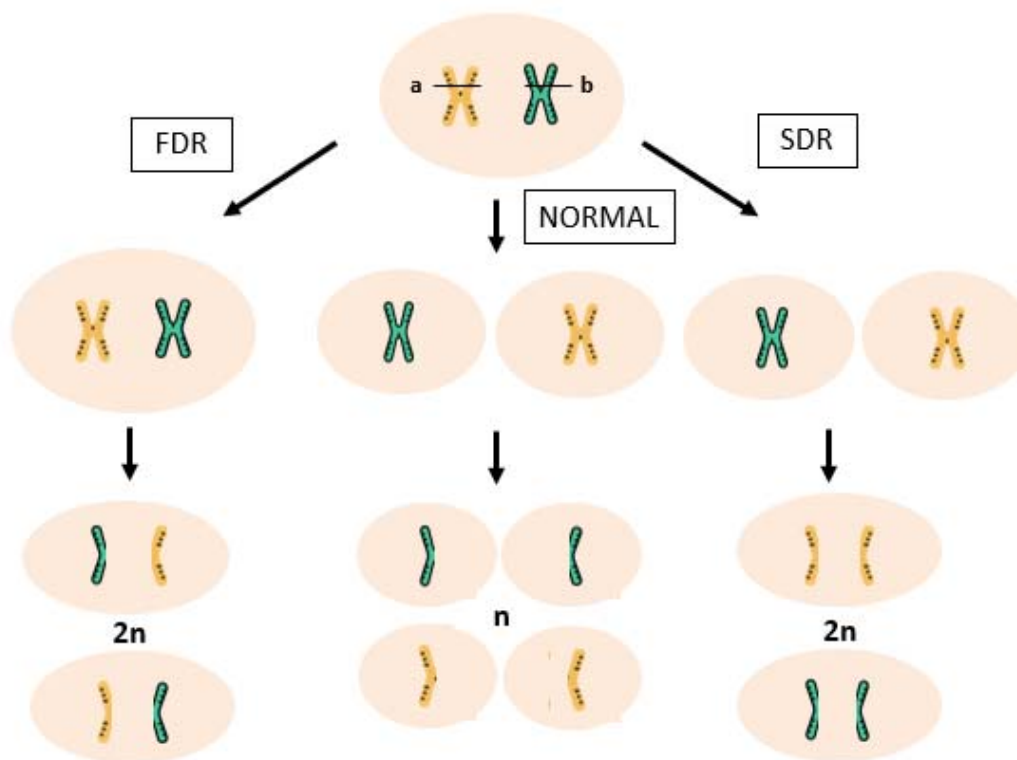


Figura 1. Representación de los gametos obtenidos mediante un mecanismo meiótico normal, First Division Restitution (FDR) y Second Division Restitution (SDR) en ausencia de eventos de recombinación entre cromosomas

1.6.2 Hibridaciones interploides

Otra estrategia que permite la obtención de triploides es la hibridación sexual interploide, que consiste en realizar cruzamientos entre genotipos con distinto nivel de ploidía, generalmente entre individuos tetraploides y diploides donde los genotipos tetraploides aportan la doble dotación génica mediante gametos diploides ($2x \times 4x$ ó $4x \times 2x$) (Lacadena, 1996).

Muchos de los parentales tetraploides utilizados son individuos doble diploides, es decir, tetraploides que contienen información duplicada del genotipo diploide del cual se ha obtenido. La mayoría de plantas $4x$ de cítricos se han obtenido por tratamiento con colchicina ($C_{22}H_{25}NO_6$) u orizalina ($C_{12}H_{18}N_4O_6S$) (Aleza *et al.*, 2009b), o por duplicación espontánea del número de cromosomas en células de la nucela en genotipos apomíticos y posterior desarrollo de los embriones mediante embrionía adventicia (Aleza *et al.*, 2011). Además, se han desarrollado híbridos somáticos alotetraploides mediante hibridación somática por fusión de protoplastos (Grosser *et al.*, 2000; 2010; Grosser y Gmitter, 2011).

1.7 Marcadores moleculares en cítricos

En el campo de la ingeniería genética, los marcadores moleculares han sido uno de los descubrimientos clave de las últimas décadas por su capacidad para distinguir individuos con distinto genotipo. Del grupo de marcadores moleculares, los marcadores de DNA han sido los más desarrollados gracias a su elevada resolución encontrando polimorfismos en la secuencia génica. En cítricos, se han utilizado numerosos tipos de marcadores moleculares para la realización de estudios genéticos como las isoenzimas (Roose, 1988; Torres *et al.*, 1978), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPDs; Luro *et al.*, 2004), *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCARs; Nicolosi *et al.*, 2000), *Restriction Fragments Length*

Polymorphism (RFLPs; Federici *et al.*, 1998), *Simple Sequence Repeats* (SSRs; Barkley *et al.*, 2006; Froelicher *et al.*, 2008; Kijas *et al.*, 1997; Terol *et al.*, 2007; 2008), *Intersimple Sequence Repeat* (ISSRs; Fang *et al.*, 1997), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLPs; Liang *et al.*, 2007), *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences* (CAPs; Lotfy *et al.*, 2003), *Insertion-Deletion* (InDel), *Diversity Arrays Technology* (DArT; Curtolo *et al.*, 2017), y *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs; Chen y Gmitter, 2013; Cuenca *et al.*, 2013; García-Lor *et al.*, 2012; 2015; Ollitrault *et al.*, 2012). Los marcadores moleculares se han utilizado para la realización de estudios filogenéticos, caracterización de germoplasma, y nuevas variedades, distinción entre embriones zigóticos y nucelares, análisis del origen de gametos no reducidos, desarrollo de mapas genéticos y selección asistida con marcadores (Aleza *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2008; Cuenca *et al.*, 2011; 2013; 2016; Curk y Navarro, 2018; Curtolo *et al.*, 2017; Froelicher *et al.*, 2008; Garcia-Lor *et al.*, 2015; Luro *et al.*, 2004; Oueslati *et al.*, 2017; Rouiss *et al.*, 2017a; Rouiss *et al.*, 2017c; Ruiz y Asins, 2003; Ruiz *et al.*, 2000). Actualmente, están apareciendo nuevas técnicas de alto rendimiento, que permiten realizar el análisis con un elevado número de marcadores como Genotipado por Secuenciación (GBS) (Elshire *et al.*, 2011) o marcadores DArT, que se están utilizando en los cítricos para la realización de estudios filogenéticos y de asociación genómica relacionados con caracteres de calidad de los frutos (Gois *et al.*, 2016; Minamikawa *et al.*, 2017; Oueslati *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2016).

Con el fin de utilizar marcadores moleculares de forma eficiente en estudios relacionados con genética y mejora de los cítricos, es necesario tener disponible un mapa genético de referencia anclado a la secuencia física del genoma. En 2012, se estableció por primera vez el mapa genético de cítricos (Ollitrault *et al.*, 2012) que se obtuvo a partir del genotipado con marcadores SNP, SSR e InDel de varias poblaciones segregantes. Este mapa está constituido por 961 marcadores que comprenden 1084.1 cM y abarca los nueve grupos de ligamiento. La disponibilidad de este mapa saturado fue un prerrequisito indispensable para el ensamblaje de la secuencia de referencia del genoma realizada a partir de una planta haploide de clementina (Aleza *et al.*, 2009a). Posteriormente, Aleza *et al.*, (2015) posicionaron los centrómeros en los 9 grupos de ligamiento, siendo de gran importancia para posteriores estudios genéticos relacionados con los patrones de recombinación y con la genética de plantas poliploides.

Los *Simple sequence repeats* (SSR), también conocidos como *Short tandem repeats* (STR) o, más habitualmente, marcadores microsatélite, son unas secuencias repetidas en tándem de una longitud entre uno y seis nucleótidos, distribuidas a lo largo de todo genoma (Grover y Sharma, 2016). Los elementos genéticos repetitivos tienen la característica de replicarse con algunos errores, debido a que la polimerasa tiende a formar bucles y soltarse de la cadena nucleotídica. De esta forma, se generan nuevos alelos con diferente número de unidades que conforman la repetición. Estas regiones SSR pueden ser fácilmente amplificadas mediante cebadores específicos que flanqueen la región completa de la repetición (Weber y May, 1989). Los marcadores microsatélite se han utilizado ampliamente dado que presentan ventajas como su abundancia en el genoma, alto nivel de polimorfismo, gran resolución, codominancia (se pueden distinguir en el mismo análisis todos los alelos que presenten diferencias en la longitud de la repetición), su técnica de detección es universal, son robustos, fiables, reproducibles e implementables en tecnologías de genotipado automatizables. Los *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), se caracterizan por presentar diferencias en un único nucleótido de la secuencia génica debido a sustituciones, deleciones o inserciones. Aunque la gran mayoría se encuentran en regiones no codificantes, se han encontrado también como causa de mutaciones en secuencias codificantes. El número de marcadores disponibles SNP ha aumentado con celeridad debido a su eficiencia en estudios de diversidad y de evaluación de la estructura de la población y su gran utilidad en tecnologías automatizables así como su compatibilidad con tecnologías *Next Generation Sequencing* (NGS), donde han tenido un papel fundamental

reduciendo la complejidad del genoma y aumentando la cobertura (Grover y Sharma, 2016; Filippi *et al.*, 2015).

En cítricos poliploides, los marcadores SSR y SNP se han utilizado para determinar el origen y las configuraciones de los híbridos triploides y tetraploides. En el caso de marcadores SSR en que los parentales comparten algún alelo, se puede estimar la dosis alélica con la metodología MAC-PR desarrollado por Esselink *et al.* (2004) y validado por Cuenca *et al.* (2011). Con los marcadores SNP también se puede calcular la dosis alélica de los híbridos 3x y 4x mediante la metodología descrita por Cuenca *et al.*, (2013) comparando las señales alélicas de una PCR competitiva específica de alelo.

1.8 Utilización de marcadores moleculares para determinar la estructura genética de los híbridos triploides de cítricos obtenidos mediante hibridaciones sexuales interploides

La estructura genética de los híbridos 3x obtenidos mediante hibridaciones 2x x 4x y 4x x 2x depende principalmente de la asociación preferencial entre los cromosomas del parental 4x. En las plantas autotetraploides hay cuatro versiones homologas de cada cromosoma (AAAA) y cada uno puede aparearse aleatoriamente con cualquiera de sus homólogos originando asociaciones de cromosomas bivalentes o tetravalentes durante la meiosis al azar (Stift *et al.*, 2008) originando la llamada herencia tetrasómica, en la cual la restitución de la heterocigosidad parental oscila entre el 55-66% (Mather, 1936; Muller, 1914; Sanford *et al.*, 1983). En las plantas autotetraploides puede originarse también la doble reducción, que consiste en la presencia de dos cromátidas hermanas en un mismo gameto. Para ello, se tienen que producir asociaciones cromosómicas multivalentes, un evento de recombinación entre el locus considerado y el centrómero y que las dos parejas de cromátidas hermanas se trasladen al mismo polo durante la anafase I, proceso que viene determinado por la distancia del locus al centrómero (Gallais, 2003; Haynes y Douches, 1993).

En las plantas alotetraploides, hay dos parejas de cromosomas homeólogos y cada juego está constituido por dos cromosomas homólogos (AABB). La herencia disómica ocurre si cada cromosoma se empareja exclusivamente con su homólogo lo cual se traduce en una fijación de la heterocigosidad en los estudios genéticos, únicamente se forman gametos heterocigotos (AB) (Ramsey y Schemske, 2002; Stift *et al.*, 2008). El emparejamiento entre cromosomas homeólogos es posible si las plantas dobles diploides se han originado como resultado de hibridaciones entre líneas (géneros, especies) que no son lo suficientemente divergentes para que ocurra un estricto emparejamiento preferencial (PP, del inglés *Preferential Pairing*). Esta característica ocasiona nuevas oportunidades para la recombinación intergenómica. Aunque algunas combinaciones alélicas específicas pueden ser menos frecuentes dependiendo del grado de PP, a menos que no sean viables, todas las combinaciones alélicas se pueden transmitir a la descendencia lo cual abre un nuevo escenario entre la herencia disómica y tetrasómica denominado herencia intermedia (Stift *et al.*, 2008; Kamiri *et al.*, 2011; Jackson y Jackson, 1996; Aleza *et al.*, 2016; Stebbins, 1947; Sybenga, 1996). En la *Figura 2* se muestra un esquema de los modelos de segregación cromosómica de plantas tetraploides y las frecuencias de gametos esperadas para cada uno.

El estudio con marcadores moleculares de progenies de híbridos 3x obtenidos mediante hibridaciones sexuales interploides permite conocer el modo de herencia cromosómica de los parentales 4x y sus patrones de segregación de caracteres así como la estructura genética de las poblaciones de híbridos 3x. De tal forma, se pueden diseñar nuevos proyectos de mejora genética de cítricos donde se elijan las estrategias y se diseñen las combinaciones parentales de una forma mucho más eficiente con el fin de obtener híbridos 3x con las características de interés.

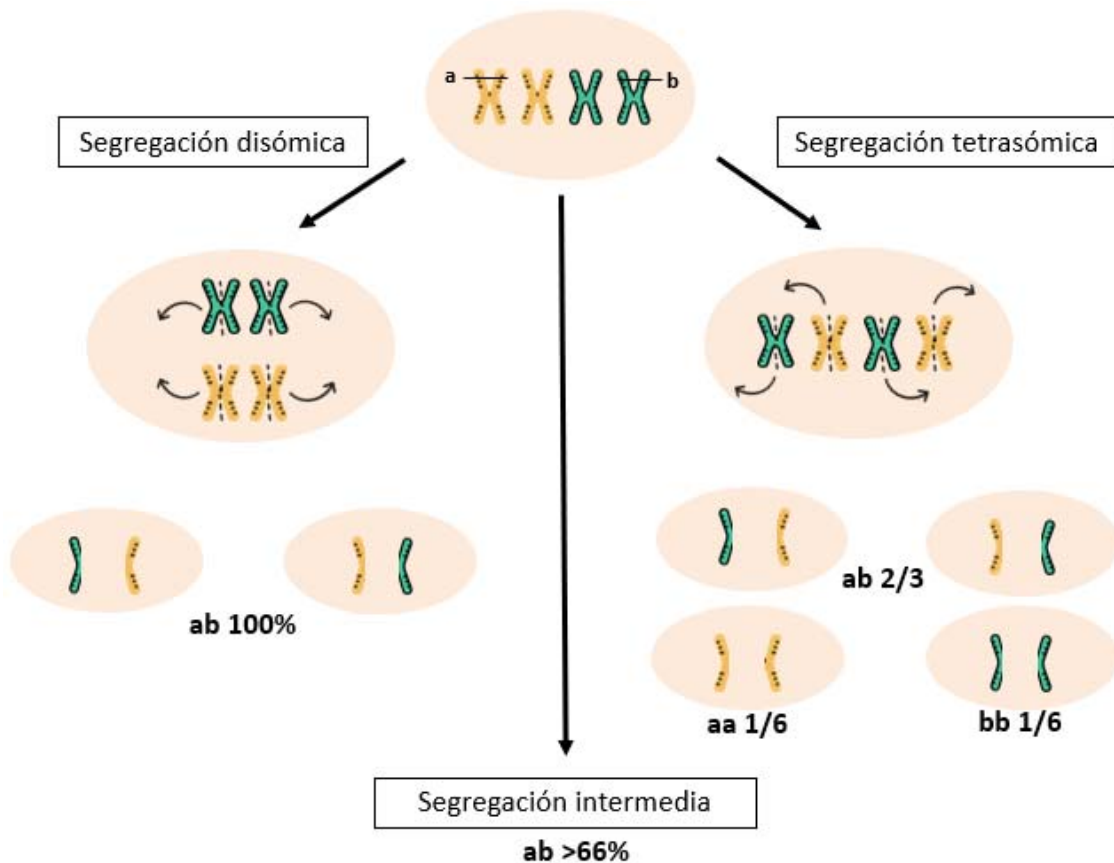


Figura 2. Frecuencias genotípicas teóricas para un locus heterocigoto (aabb) considerando diferentes modelos de segregación cromosómica: disómico, tetrasómico e intermedio

2 OBJETIVOS

En el contexto del programa de obtención de híbridos triploides que se está realizando en el IVIA mediante hibridaciones sexuales interploides, los objetivos que se plantean en este trabajo son:

1. Estudiar el modelo de segregación cromosómica del mandarino ‘Moncada’ 4x para uno de sus cromosomas utilizando marcadores moleculares SSR y SNP.
2. Analizar las diferencias meióticas existentes en el modelo de segregación cromosómica del mandarino ‘Moncada’ 4x cuando se utiliza como parental masculino y femenino en hibridaciones sexuales 2x x 4x y 4x x 2x para la obtención de triploides, analizando la estructura genética de los gametos que habrían dado lugar a sendas familias de híbridos triploides.
3. Discutir las posibles implicaciones de los modelos de segregación cromosómica en los programas de mejora genética de cítricos basados en hibridación sexual entre parentales diploides y tetraploides, dirigidos a la obtención de una forma mucho más eficiente de híbridos triploides de mandarino con características agronómicas de interés.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

El mandarino ‘Moncada’ es una variedad obtenida en el IVIA mediante un cruzamiento entre clementina ‘Oroval’ (*C. clementina* Hort. Ex Tan.) y mandarino ‘Kara’ (*Citrus unshiu* (Mak) Marc. x *Citrus nobilis* Lour.). A partir del mandarino ‘Moncada’ diploide mediante el tratamiento de ápices microinjertados con colchicina ($C_{22}H_{25}NO_6$) y posterior selección de plantas tetraploides estables por citometría de flujo se regeneró el mandarino ‘Moncada’ 4x (Aleza *et al.*, 2009b).

Se realizaron hibridaciones con el objetivo de obtener dos familias de híbridos triploides utilizando ‘Moncada’ 4x como parental masculino y femenino. La primera surge del cruzamiento entre ‘Moncada’ 4x y el mandarino ‘Anana’ (*C. reticulata* Blanco) actuando ‘Moncada’ 4x parental femenino (MA), mientras que en la segunda hibridación se utilizó clementina ‘Clemenules’ (*C. clementina*) como parental femenino y ‘Moncada’ 4x como parental masculino (CM).

Estas hibridaciones se realizaron en parcelas experimentales del IVIA (Moncada, València).

3.2 Recolección del polen

Las anteras de los parentales masculinos se extrajeron de las flores que se encontraban en pre-antesis con la ayuda de unas pinzas pequeñas. Las anteras se depositaron sobre placas de Petri que se introdujeron en un desecador con sílica gel a temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente, las anteras abiertas y con polen de coloración amarilla se seleccionaron y se almacenaron a -20° hasta su utilización.

3.3 Polinización

Las polinizaciones se llevaron a cabo durante el mes de abril de 2007 para la familia CM y de 2016 para la familia MA en árboles bajo malla de protección, evitando la entrada de abejas que favorezcan la polinización cruzada. Las flores idóneas para la polinización son las que se encuentran en brotes campaneros, es decir, brotes vegetativos con una sola flor terminal (Agustí, 1999). Las flores deben encontrarse cerradas (asegurando que no han sido polinizadas previamente) pero deben ser fáciles de abrir aplicando una ligera presión, indicando que las flores se encuentran maduras. En este caso, no es necesario emasculación de las flores ya que ambos parentales femeninos son autoincompatibles. Una vez abierta la flor se puede observar una secreción estigmática sobre la superficie del estigma que indica que la flor se encuentra receptiva al polen y puede ser fecundada. Sobre ella se depositó una antera del parental masculino, que queda adherida. Se polinizaron un total de 50 flores de clementina ‘Clemenules’ y 125 flores del mandarino ‘Moncada’ 4x. Los frutos se recolectaron cuando alcanzaron la madurez.

3.4 Rescate y cultivo de embriones in vitro

En los cruzamientos 2x x 4x, las semillas que contienen los embriones triploides se encuentran en semillas abortadas y en algún caso aislado, en las semillas normales (Aleza *et al.*, 2012a). Por otra parte, en las hibridaciones 4x x 2x, los embriones triploides se encuentran en semillas de tamaño intermedio (Aleza *et al.*, 2012b).

Las semillas se seleccionaron y se esterilizaron utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (solución de 150 g/L de cloro activo) durante 10 minutos. A continuación, se hicieron 5 lavados con agua estéril para eliminar el hipoclorito de sodio. Los embriones se aislaron en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar con la ayuda de un microscopio estereoscópico y se cultivaron en placas de Petri que contenían un medio de cultivo compuesto

por las sales de Murashige y Skoog, (1962), sacarosa 50 g/L, 500 mg/L de extracto de malta, suplementado con vitaminas (100 mg/L myo-inositol, 1 mg/L clorhidrato de piridoxina, 1 mg/L ácido nicotínico, 0.2 mg/L clorhidrato de tiamina, 4 mg/L glicina) y 8 g/L de Bacto agar. Una vez germinadas, las plántulas fueron transferidas a tubos de 25 x 150 mm con el mismo medio de cultivo pero sin extracto de malta. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo a $24\pm 1^\circ\text{C}$, 60% humedad y con una iluminación de 16 horas de luz a $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.5 Análisis del nivel de ploidía

El análisis de ploidía se realizó utilizando un citómetro de flujo (CyFlow® Ploidy Analyzer, Partec®) y el kit correspondiente (High Resolution DNA Kit Type P; Partec, Münster, Germany). Se recolectaron pequeñas secciones de hoja (alrededor de $0,5 \text{ mm}^2$) de las plántulas que habían crecido in vitro a partir de los embriones y se machacaron con una cuchilla junto con una sección de hoja de un individuo diploide (control comparativo) en 1 mL de tampón de extracción. La solución se filtró a través de filtros de $30 \mu\text{m}$ para eliminar los restos del material vegetal y se añadieron 5 mL de una solución de tinción DAPI (CyStain ultraviolet Precise P) de forma que la solución quedó a punto para su análisis en el citómetro.

3.6 Genotipado de híbridos triploides con marcadores SSR y SNP

La extracción de ADN se realizó mediante la utilización del kit DNeasy Plant de Qiagen. Se calcularon las concentraciones de cada individuo mediante un espectrofotómetro NanoDrop y se hicieron diluciones para obtener una concentración final de $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de ADN de cada individuo triploide.

Para genotipar y analizar la progenie de triploides se usaron marcadores SSR y SNP (Tabla 1) distribuidos a lo largo de los nueve grupos de ligamiento (GL) del mapa genético de clementina (Ollitrault *et al.*, 2012). En general se utilizaron tres marcadores por GL, uno cerca del centrómero y dos en regiones teloméricas. Los marcadores seleccionados presentaban heterocigosidad para ‘Moncada’ 4x y eran polimórficos con los otros parentales, clementina ‘Clemenules’ y mandarino ‘Anana’.

3.6.1 Marcadores SSR

Se analizaron un total de 25 marcadores SSR, 15 en la familia para MA y 14 en la familia CM. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó usando un termociclador (Eppendorf®) con un volumen final de $15 \mu\text{l}$ por pocillo que contiene $1,5 \mu\text{l}$ de cada muestra de DNA ($10 \text{ ng}/\mu\text{L}$), *Taq* polimerasa, tampón 10x y MgCl_2 (Biotools®), cebador directo marcado con fluorescencia diluido a 2 mM, cebador indirecto no marcado, dNTPs a una dilución de 2 mM. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: desnaturalización a 94° durante 5 minutos seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94° , 1 minuto a 50 o 55° (dependiendo de la temperatura de anillamiento de cada SSR) y 45 segundos a 72° y una elongación final de 4 minutos a 72° .

Para llevar a cabo la separación de los fragmentos amplificados, se realizó una electroforesis capilar utilizando el secuenciador automático CEQ™ 8000 Genetic Analysis de Beckman Coulter. Posteriormente los fragmentos se visualizaron y analizaron con el software GenomeLab™ GeXP v.10.0 (Beckman Coulter®). La dosis alélica se calculó utilizando la metodología MAC-PR (Microsatellite DNA Allele Counting Peak Ratio) validado en cítricos por Cuenca *et al.* (2011).

3.6.2 Marcadores SNP

Los 13 marcadores SNP disponibles (3 para CM y 10 para MA), se genotiparon utilizando la tecnología KASPar™ (LGC Genomics; <http://www.lgcgenomics.com>) que consiste en un ensayo FRET (Förster Resonance Energy Transfer) específico de alelo analizado mediante el

software KlusterCallerTM. El software permite visualizar la distribución en dos dimensiones (espacio XY) de los genotipos de los individuos analizados, de forma que, dependiendo del ángulo donde se encuentran en el gráfico de dispersión, se puede caracterizar un individuo triploide por su dosis alélica (Cuenca *et al.*, 2013).

3.7 Diseño de marcadores SSR

Dado que, con los marcadores SSR y SNP disponibles, no se encontraron marcadores suficientes con las configuraciones alélicas adecuadas, especialmente en la familia CM ya que el parental femenino y uno de los parentales del mandarino ‘Moncada’ son clementinas y comparten mucha información génica, se diseñaron 60 marcadores SSR adicionales para los GL 4, 6 y 9.

Para ello, se obtuvieron de la web *Phytozome* (PHYTOZOME) las secuencias génicas de las regiones donde debían encontrarse los marcadores. Estas secuencias, fueron remitidas al software online gratuito *Primer 3* (PRIMER3) y se diseñaron los cebadores para regiones repetitivas con unas características adecuadas (entre 100 y 400 pb, temperatura de anillamiento óptima de 55°C para aumentar la especificidad, baja probabilidad de formar dímeros, ausencia de complementariedad entre los cebadores y, al menos, 5 repeticiones para asegurar que existieran alelos diferenciales entre los parentales). Los 60 SSR diseñados se analizaron siguiendo el método descrito anteriormente. En este caso, el método de amplificación tenía una ligera diferencia debido a que los cebadores directos no se encuentran marcados con fluorescencia, y fueron marcados con una cola M13 durante la PCR.

Tabla 1. Marcadores moleculares SSR y SNP utilizados en este trabajo con su configuración alélica para los parentales utilizados

SSR		Cebadores	Moncada 4x	Anana	Clemenules	Referencia
CAC15	F	TAAATCTCCACTCTGCAAAAGC	150-160	160-160	-	Kijas <i>et al.</i> (1997)
	R	GATAGGAAGCGTCGTAGACCC				
CI01F04a	F	AAGCATTTAGGGAGGGTCACT	185-208	216-218	185-201	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	TGCTGCTGCTGTTGTTGTTCT				
CI02A09	F	ACAGAAGGTAGTATTTTAGGG	151-161	-	159-161	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	TTGTTTGATGGAAG				
CI02C09	F	TACTGACTGACCCACC	248-255	248-250	-	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	TCCCGTCTCTACC				
CI02D09	F	AATGATGAGGGTAAAGATG	225-235	235-267	248-256	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	ACCCATCACAAAACAGA				
CI02F12	F	GGCCATTTCTCTGATG	173-185	-	182-185	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	TAAGTGAGGGATTGGTTT				
CI02G08	F	CATGCAATGTTCCACTT	244-246	248-254	244-248	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	AGGCAGTTGTTAGACCC				
CI03B07	F	CACCTTCCCTTCCA	260-264	263-265	263-265	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	TGAGGGACTAAACAGCA				
CI03D12a	F	GCCATAAGCCCTTTCT	261-280	251-261	251-261	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	CCCACAACCATCACC				
CI06A02	F	TGAATCCTCTATGGCTAT	221-225	225-238	-	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	TAAGATAAAAACAGCACA				
CI07B05	F	TTTGTCTTTTTGGTCTTTT	220-226	-	220-239	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	CTTTTCTTTCCTAGTTTCCC				
CI07C07	F	TATCCAGTTTGAAATGAG	245-252	256-258	245-258	Froelicher <i>et al.</i> (2008)
	R	TGATATTTGATTAGTTTGG				

SSR		Cebadores	Moncada 4x	Anana	Clemenules	Referencia
CI07D05	F	TCGTTCTTGCTTTTCCAC	183-187	-	183-185	Froelicher et al. (2008)
	R	GAATCAAACCTACCCTCCAAT				
CI07E12	F	TGTAGTCAAAAGCATCAC	138-142	-	136-142	Froelicher et al. (2008)
	R	TCTATGATTCTTGACTTTA				
CI07F11	F	ACTATGATTACTTTGCTTTGAG	164-178	160-164	170-178	Froelicher et al. (2008)
	R	GAAGAAACAAGAAAAAAAAT				
CIBE5720	F	TGAAGGACACTGATGTAGGAC	326-334	-	323-334	Ollitrault et al. (2010)
	R	AAACTTGGTGGGAAGGAG				
CMS30	F	AACACCCCTTGGAGGGAG	150-152	-	152-156	(Ahmad et al. (2003)
	R	GCTGTTCCACACACACAACCC				
CX0124	F	-	182-188	-	179-188	Chen et al. En proceso
	R	-				
Mest104	F	CCTTATCTTCATCACCTCCGTC	254-256	-	256-260	García-Lor et al (2012)
	R	TAAAAAGATGGGGCCTTGTG				
Mest107	F	GCTGAGATGGGGATGAAAGA	176-184	166-176	176-184	Garcia-Lor et al. (2012)
	R	CCCCATCCTTTCAACTTGTG				
Mest123	F	GGGATGGACTCCCAGTGTTA	270-276	-	268-298	Aleza et al. (2011)
	R	AAGAAAAGATTTGCTGGCAGAG				
Mest15	F	TTATTACGAAGCGGAGGTGG	173-185	-	182-185	Garcia-Lor et al. (2012)
	R	GCCTCGCATTCTCTTACTC				
Mest256	F	CATTAAAATATCCGTGCCGC	221-225	225-225	-	Garcia-Lor et al. (2012)
	R	GAGCAAGTGC GTTGTGTGT				
Mest70	F	TTCTGCCATGTTCCAACT	216-229	216-235	216-229	Garcia-Lor et al. (2012)
	R	AGTCGTCGTTGGAATTGGAC				
TAA41	F	AGGTCTACATTGGCATTGTC	154-162	138-148	148-154	Kijas et al. (1997)
	R	ACATGCAGTGCTATAATGAATG				

SNP		Cebadores	Moncada 4x	Anana	Clemenules	Referencia
AOC-M290	X	AAGGGGTGCATCTGAGCCAAAG	T:C	T:T	-	Garcia-Lor et al. (2013)
	Y	AAAGGGGTGCATCTGAGCCAAAA				
ATMR-M728	X	GTTTGATTTAATGGAAGTCATATGTATCTTTTT	G:T	T:T	-	Garcia-Lor et al. (2013)
	Y	TGATTTAATGGAAGTCATATGTATCTTTTG				
CHI-M598	X	TTCTCTTGCTTTACGTGT	G:C	G:G	-	Garcia-Lor et al. (2013)
	Y	GTCACAGGTAACGGATTTTC				
CHS-M183	X	GTTGGAGCTGACCCATTCTG	C:G	-	C:C	Garcia-Lor et al. (2013)
	Y	GTTGGAGCTGACCCATTCTC				
CIC0446-01	X	GTCTTCTCCCCTCGTTTTTTTCATTA	T:A	T:N	-	Ollitrault et al. (2012)
	Y	TCTTCTCCCCTCGTTTTTTTCATT				
CIC2417-04	X	ACGCCGCACGCTTCTTGGGATCT	T:A	T:T	-	Ollitrault et al. (2012)
	Y	CCGCACGCTTCTTGGGATCA				
CIC3712-01	X	AAATGAAAGTGCACAATCACAAGAAAA	C:A	C:C	-	Ollitrault et al. (2012)
	Y	AAATGAAAGTGCACAATCACAAGAAAC				
CIC4681-02	X	ACTTCTAACTCCAGACTCCTCCAATT	T:A	T:T	-	Ollitrault et al. (2012)
	Y	ACTTCTAACTCCAGACTCCTCCAATA				
CIC5087-01	X	TTAAGTTAGAGCACCAAGAGCAAAAAGT	T:A	A:A	-	Ollitrault et al. (2012)
	Y	TTAAGTTAGAGCACCAAGAGCAAAAAGA				

SNP		Cebadores	Moncada 4x	Anana	Clemenules	Referencia
CIC5842-02	X	AATCAACTGGATCAAAGTTAAACTGTGT	C:A	C:C	-	Ollitrault <i>et al.</i> (2012)
	Y	AATCAACTGGATCAAAGTTAAACTGTGG				
EMA-M30	X	GCCGGTGAATAAACACAAC	C:T	T:T	-	Garcia-Lor <i>et al.</i> (2013)
	Y	CTCTTTCTGCTTCCTGACATC				
FLS-M400	X	CCGTCTTCTATCAACTACCGCTTT	C:T	-	T:T	Garcia-Lor <i>et al.</i> (2013)
	Y	CGTCTTCTATCAACTACCGCTTC				
INVA-P855	X	GGCACTGTCAATAGAATCCTCACAAT	C:T	-	T:T	Garcia-Lor <i>et al.</i> (2013)
	Y	GCACTGTCAATAGAATCCTCACAAC				

F: Primer directo, R: primer reverso, X: alelo 1, Y: alelo 2

3.8 Análisis de los datos

3.8.1 Identificación del parental que produce el gameto diploide

Para cada híbrido, se determinó el origen del gameto diploide (2x), es decir, el parental del cual se heredó la doble dotación genética. Para ello, se utilizaron marcadores capaces de diferenciar inequívocamente los parentales. Para un locus con configuraciones alélicas de los parentales completamente diferentes ($A_1A_2 \times A_3A_4$), el genotipo del gameto 2x puede ser reconocido directamente a partir de la configuración del híbrido triploide. Cuando los parentales femeninos y masculinos comparten un alelo ($A_1A_2 \times A_2A_2$ ó $A_1A_2 \times A_2A_3$), la estructura del gameto 2x del híbrido triploide se estima a partir del cálculo de la dosis alélica (Cuenca *et al.*, 2011; 2013).

3.8.2 Cálculo de Restitución de la Heterocigosidad Parental

Para cada marcador se calculó la restitución de la heterocigosidad parental (RHP) como el porcentaje de individuos con la misma configuración alélica heterocigótica que el mandarino 'Moncada' 4x.

$$RHP (\%) = \frac{\text{Número de individuos heterocigotos}}{\text{Número total de individuos analizados}} \times 100$$

Además, se calculó el RHP promedio de cada GL.

$$RHP \text{ promedio } (\%) = \frac{\sum RHP_{GL}}{\text{Número de marcadores analizados por GL}}$$

Por último, se calculó la heterocigosidad de cada individuo para todos los marcadores analizados.

$$RHP (\%) = \frac{\text{Número de marcadores heterocigotos}}{\text{Número de marcadores analizados}} \times 100$$

3.8.3 Cálculo de la frecuencia de asociación preferencial y Doble Reducción máxima

Para estimar si el modo de segregación es tetrasómico, disómico o intermedio, se calculó el parámetro *Preferential pairing* (PP), cuyos valores varían entre 0 (estrictamente tetrasómico) y 1 (estrictamente disómico). Esta asociación se debe a que, en caso de la segregación tetrasómica, el apareamiento de cromosomas en bivalentes o tetravalentes durante la meiosis es al azar y en caso de una segregación disómica, los cromosomas aparean preferentemente con su homólogo.

La doble reducción (DR), representa la frecuencia con que ocurren las dobles reducciones durante la meiosis. Para un marcador centromérico, donde hay una menor probabilidad de recombinación, las proporciones esperadas de cada gameto son:

$$P(aa) = \frac{1 - PP}{6}$$

$$P(ab) = 1 - \frac{1 - PP}{3}$$

$$P(bb) = \frac{1 - PP}{6}$$

En el caso de un marcador alejado del centrómero, aumentan la probabilidad de recombinación, por tanto, las frecuencias esperadas de los posibles gametos se calculan con las siguientes fórmulas:

$$P(aa) = (1 + 2DR) \frac{1 - PP}{6}$$

$$P(ab) = 1 - \frac{1 - PP}{3} - \frac{2DR (1 - PP)}{3}$$

$$P(bb) = (1 + 2DR) \frac{1 - PP}{6}$$

La probabilidad de obtener la población de gametos observada en función de PP es:

$$P(PP) = \left[\frac{1}{6} (1 - PP) \right]^{x_1 + x_2} x \left[1 - \frac{1}{3} (1 - PP) \right]^{x_3}$$

Donde x_1 , x_2 y x_3 son el número de gametos observados aa, bb y ab respectivamente.

La estimación del valor PP se realizó mediante una aproximación de máxima verosimilitud. Se seleccionó un marcador centromérico para cada GL, y la probabilidad en función de PP fue analizada variando en 0.05 en el intervalo 0-1. Y se estimó el valor de PP que maximizara la función de probabilidad. Para establecer un intervalo de confianza (IC), se buscaron los valores hacia arriba y hacia abajo del valor de PP que disminuyera en diez veces dicha probabilidad.

Posteriormente, para estimar el valor de DR para cada GL, se utilizaron los marcadores más lejanos al centrómero y se realizó una aproximación de máxima verosimilitud considerando el PP obtenido anteriormente y variando el DR en intervalos de 0.05. La función de probabilidad que permitía estimar el valor de DR de la población de gametos observada es:

$$P(DR) = C x \left\{ \left[(1 + 2DR) \left(\frac{PP}{6} \right) \right]^{x_1 + x_2} \right\} x \left[1 - \frac{1}{3} (1 - PP) - \frac{2}{3} DR(1 - PP) \right]^{x_3}$$

donde C es coeficiente de combinatoria constante para los datos observados, es decir para x_1 , x_2 y x_3 .

3.8.4 Organización de la diversidad de la población

Las diferencias genéticas entre los individuos dentro de una misma población se estimaron usando el software DARwin6 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2018) y se analizaron con un análisis estadístico *Neighbour-Joining* utilizando el *Simple Matching Dissimilarity Index* (d_{i-j}) entre parejas de loci.

$$d_{i-j} = 1 - \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \frac{m_l}{\pi}$$

donde d_{i-j} es la disimilaridad entre los locus i y j , L es el número de loci y m_l es el número de alelos coincidentes para el locus l . A partir de la matriz de disimilaridad se elaboró un dendograma utilizando el método *weighted Neighbor-Joining*.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Polinización, cultivo in vitro y análisis del nivel de ploidía

En la hibridación sexual MA, de 125 flores polinizadas, se obtuvieron 33 frutos, es decir, utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino, el rendimiento de la fructificación del fruto es bajo, aproximadamente un 26%. De los 33 frutos se obtuvieron 99 semillas pequeñas e intermedias y se rescataron y cultivaron in vitro 99 embriones, de los cuáles germinaron 84 y se obtuvieron 75 plántulas, es decir, el rendimiento de germinación y crecimiento es muy elevado (aproximadamente del 80%). De las 75 plántulas regeneradas 72 fueron triploides, dos diploides y una plántula pentaploide.

En la familia CM, de las 50 flores polinizadas, se recolectaron 35 frutos, por tanto, el rendimiento del cuajado y fructificación fue elevado (70%). Se obtuvieron un total de 230 semillas abortadas y mediante la técnica de rescate y cultivo de embriones in vitro se cultivaron 175 embriones seleccionados por tamaño a partir de los cuales se obtuvieron un total de 137 plantas. Se determinó el análisis del nivel de ploidía de las plantas regeneradas y 136 fueron triploides y una planta diploide. La selección de las semillas por su tamaño en función del tipo de estrategia de hibridación permite seleccionar directamente aquellas que contienen embriones triploides. Este método ha demostrado ser muy eficiente, reduciendo significativamente los trabajos a realizar durante el cultivo in vitro (Aleza *et al.*, 2012a; 2012b).

Hay que tener en cuenta que los autotetraploides han mostrado procesos de esterilidad en muchos casos (Stebbins, 1947) lo que permitiría explicar que durante el proceso de polinización, el cuajado del fruto no fue mayor al 70%.

Para realizar los análisis se prepararon dos placas de 96 pocillos con las extracciones de DNA de las dos progenies obtenidas diluidas a 10 ng/ μ L, en total, 72 híbridos triploides de la familia MA y 92 de la familia CM.

4.2 Análisis mediante marcadores moleculares

Para el análisis de las poblaciones se probaron más de 170 marcadores SSR y SNP de los cuales se usaron un total de 38 marcadores, 25 SSR y 13 SNP (*Tabla 1*) distribuidos a lo largo de los 9 GL que tenían como característica ser heterocigotos para ‘Moncada’ 4x y con alelos diferenciales para los otros dos parentales. El genotipado se realizó con 28 marcadores para MA y 19 para CM que permitieron una diferenciación alélica inequívoca entre ambos parentales y el origen de los gametos diploides que daban lugar a cada híbrido triploide.

El análisis se realizó según Cuenca *et al.* (2011) para los SSR y Cuenca *et al.* (2013) para los SNP con el fin de determinar el RHP. Consiste en obtener los alelos presentes en cada individuo y así conocer los gametos que dieron lugar a la distribución de alelos, pudiendo calcular la cantidad de gametos heterocigotos que provienen del parental tetraploide y analizar, finalmente, cómo transmite su información genética a la descendencia en un cruzamiento.

La búsqueda de marcadores fue compleja, sobre todo en la familia CM debido a su similitud genética. Esto es debido a que la clementina ‘Oroval’ es uno de los parentales del híbrido ‘Moncada’ y la cantidad de fragmentos génicos de clementina integrados en el mandarino y, por tanto, alelos compartidos, es muy elevada. En los GL 4, 6 y 9 de esta familia, únicamente se utilizó un SSR por cada cromosoma. La falta de marcadores que completaran estos GL puede interferir con los valores obtenidos, impidiendo la visualización de posibles desviaciones en otras posiciones del cromosoma o debidas a los marcadores.

En cuanto a los 60 marcadores SSR diseñados, ninguno pudo ser utilizado en el análisis ya que no presentaban las características necesarias, heterocigosis para ‘Moncada’ 4x y, al menos, un alelo diferente en los otros parentales.

4.2.1 Identificación de origen de los gametos diploides

Los resultados, siguiendo el comportamiento esperado, fueron que los gametos diploides procedieran del parental tetraploide ‘Moncada’, que aportaba dos veces más información genética que el parental diploide. Para ilustrarlo, se adjuntan dos ejemplos, del marcador SSR TAA-41 y CI07C07.

En la *Figura 3* se visualizan, para el marcador SSR TAA-41 utilizado en la familia MA, los alelos obtenidos para cada parental y un híbrido triploide. En este caso, ‘Moncada’ 4x presenta dos alelos de 154 nt y 163 nt, mientras que ‘Anana’ muestra un alelo de 138 nt y otro de 147 nt. En el triploide se observa un alelo del parental diploide ‘Anana’ (138 nt) y dos del parental tetraploide, (154 nt y 163 nt), demostrando que los gametos diploides son originados por el parental ‘Moncada’ 4x.

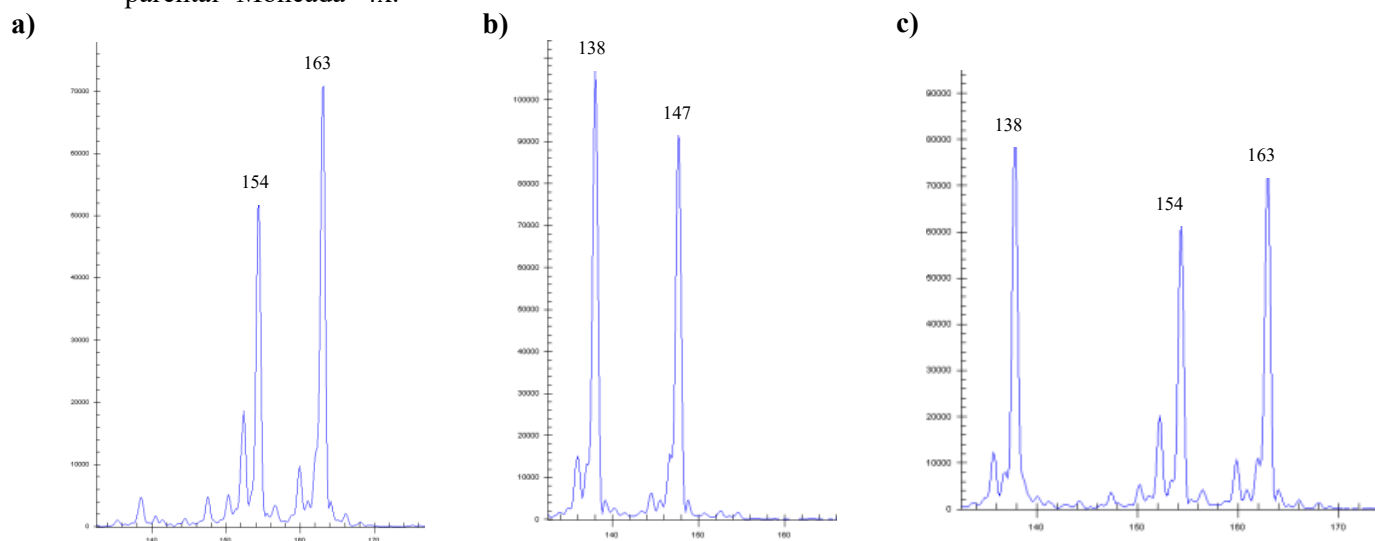


Figura 3. Análisis del marcador SSR TAA-41 en los parentales (a) ‘Moncada’ 4x, (b) ‘Anana’ y (c) en un híbrido triploide

En la *Figura 4* se representan los resultados obtenidos para el marcador SSR CI07C07, utilizado en la familia CM. El parental tetraploide presenta un alelo de 151 nt compartido con la

clementina, y otro de 155 nt. ‘Clemenules’, a su vez, presenta un alelo diferencial respecto a ‘Moncada’ 4x de 149 nt. En el híbrido triploide, por tanto, se puede observar el alelo específico de 149 nt del parental diploide y los dos alelos de 151 nt y 155 nt que proceden del parental tetraploide, demostrado que este último parental es el que produce el gameto 2x que transmite el doble de información genética al híbrido triploide.

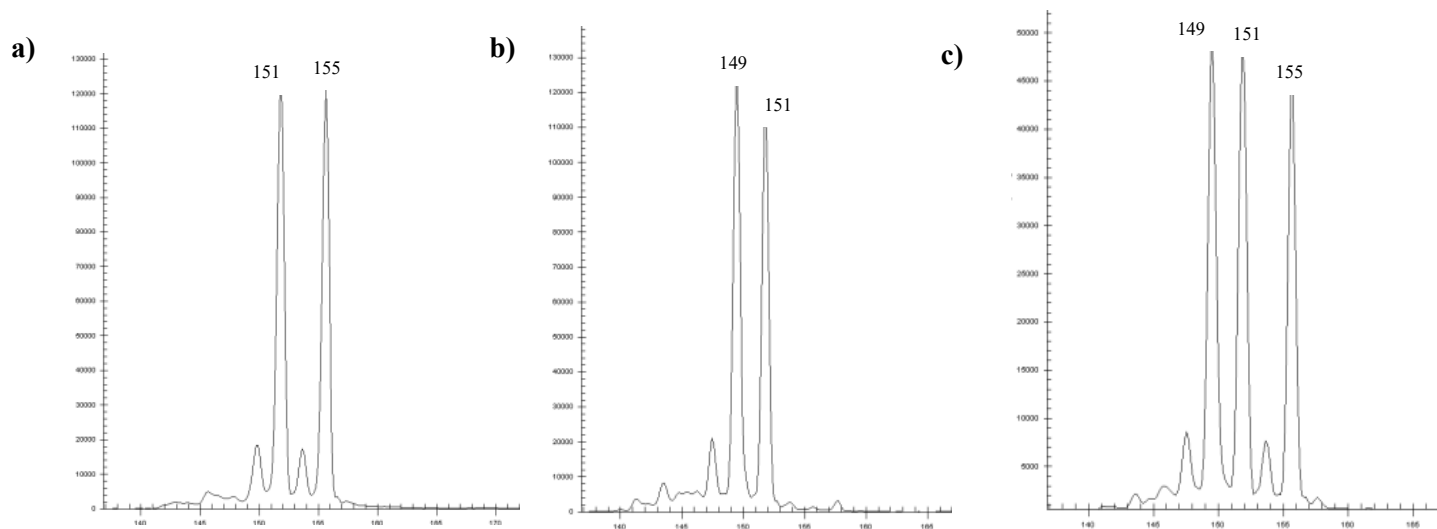


Figura 4. Análisis del marcador SSR CI07C07 en los parentales (a) ‘Moncada’ 4x, (b) ‘Clemenules’ y (c) en un híbrido triploide

Los resultados obtenidos demuestran, como era previsible, que el parental tetraploide origina los gametos diploides en hibridaciones sexuales 2x x 4x y 4x x 2x. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos previos realizados por Aleza *et al.* (2012a; 2012b).

4.2.2 Estimación del coeficiente de asociación preferencial (PP) y doble reducción (DR)

Se estimaron los valores de PP y DR mediante modelos de máxima verosimilitud para cada GL. Ambos valores permiten analizar si los cromosomas han apareado al azar, es decir, si un GL tiene un comportamiento tetrasómico; si, por el contrario, aparean únicamente en bivalentes, en un comportamiento disómico, o si lo hacen de un modo intermedio. El cálculo de PP se realizó utilizando las frecuencias alélicas (aa, ab, y bb) del marcador más cercano al centrómero (*Tabla 2*). En la *Figura 5*, se puede apreciar mediante una representación sencilla, la diferencia entre una herencia tetrasómica, disómica o intermedia en función de PP. En el GL 1 de la hibridación MA, se observa una herencia tetrasómica estricta, es decir, los 4 cromosomas se agruparían formando tetravalentes y la segregación de los cromosomas en la meiosis sería al azar, y, por tanto, el PP es 0. En cambio, en el GL 4 del mismo ceuzamiento, se origina una herencia intermedia, cuyo PP es 0.5. En este caso, hay un cierto grado de apareamiento preferente de cromosomas pero no especialmente marcado. Dado que no hay ningún GL con una herencia disómica estricta, se añade un grupo de ligamiento teórico, GL 0, cuya herencia sería disómica, es decir, los cromosomas se agruparían formando bivalentes y su PP sería de 1, el máximo.

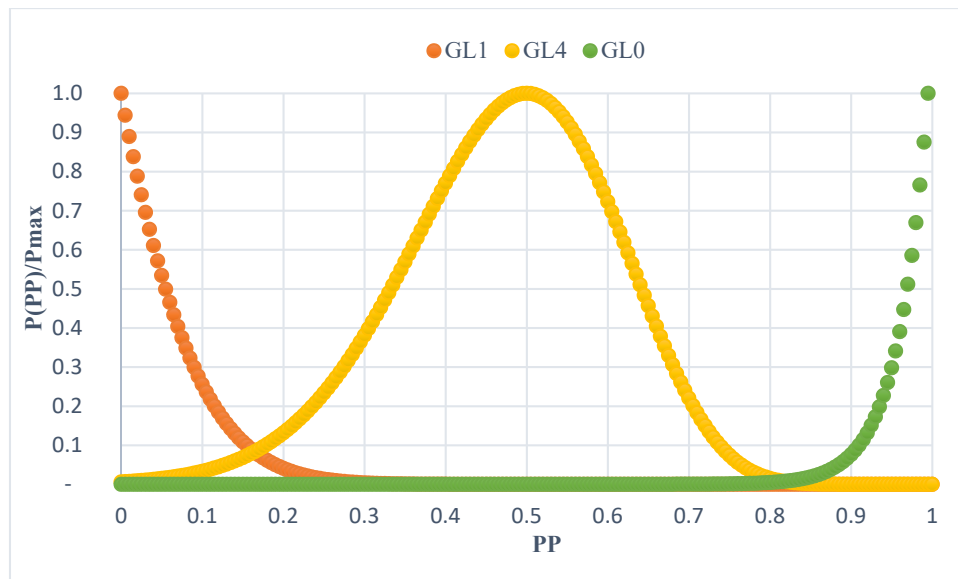


Figura 5. Ejemplo de la estimación de PP mediante el método de máxima verosimilitud de los marcadores centrómicos en GL1 (herencia tetrasómica, PP=0), GL4 (herencia intermedia, PP=0.5) y GL0 (grupo ficticio incluido en la figura para representar una supuesta herencia disómica, PP=1) utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino

**P(PP): Probabilidad en función de PP, Pmax: Probabilidad máxima,
PP: Apareamiento preferente, GL: Grupo de ligamiento**

Para ‘Moncada’ 4x como parental femenino, los valores de PP (*Tabla 2*) se ajustan a una segregación tetrasómica en los GL 1, 2, 5, 6 y 9 (valores entre 0 y 0.085), mientras que en los GL 3 (0.315 ± 0.1), y 8 (0.25 ± 0.1) se observa una herencia intermedia con mayor tendencia hacia la tetrasomía. Sin embargo, el GL 4 (0.5 ± 0.09) presenta una clara herencia intermedia como se puede apreciar en la *Figura 5*.

En el caso de ‘Moncada’ 4x como parental masculino (*Tabla 3*), los valores de PP de todos los cromosomas se ajustan a una herencia tetrasómica con los marcadores utilizados. No obstante, se observa una variación en el GL 5 (0.215 ± 0.05) que presenta una cierta tendencia a una herencia intermedia. Dado que no es un valor demasiado elevado y el marcador molecular analizado no se encuentra localizado cerca del centrómero, sería necesario diseñar nuevos marcadores con las configuraciones alélicas adecuadas y próximos al centrómero para confirmar estos resultados.

La variación en la segregación entre cromosomas es conocida en especies de cítricos doble diploides (híbridos interespecíficos duplicados), cuyo genoma está constituido por un mosaico interespecífico de las cuatro especies ancestrales de los cítricos (cidro, pummelo, mandarino y papada) (Curk *et al.*, 2014; 2015; Wu *et al.*, 2014; 2018). Mandarino ‘Moncada’ es un híbrido interespecífico de clementina (*C. clementina*) y mandarino ‘Kara’ que a su vez es un híbrido interespecífico de satsuma (*C. unshiu*) y mandarino ‘King’ (*C. nobilis*). El genoma de estas tres especies, según los últimos trabajos publicados sobre filogenia de cítricos (Oueslati *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2014; 2018), está constituido por una estructura en mosaico interespecífica mandarino/pummelo lo cual implica que el mandarino ‘Moncada’ también presenta esta interespecificidad mandarino/pummelo en los nueve cromosomas. De hecho, en la mayoría de los GL se ha observado una herencia tetrasómica excepto en el GL 4 en el que se obtuvo una herencia tetrasómica intermedia. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la interespecificidad mandarino/pummelo en el genoma del mandarino ‘Moncada’ presenta poco impacto en el apareamiento de los cromosomas.

Estos resultados son similares a los obtenidos en el trabajo de Aleza *et al.* (2016), donde se estudiaba el modelo de segregación de *C. clementina*, autotetraploide duplicado con colchicina. En este estudio se comprobó que todos los GL presentaban herencia tetrasómica excepto el GL 4, donde había una clara herencia intermedia. Sin embargo, los GL 6 y 8 presentaron unos valores de PP más elevados que los obtenidos en el presente trabajo, pudiendo inferir una herencia intermedia con mayor tendencia a la tetrasomía. La clementina presenta una estructura interespecífica mandarino/pummelo similar al de ‘Moncada’, por tanto, su comportamiento es análogo y corresponde a una segregación tetrasómica excepto en GL 4.

Otro ejemplo, es el caso de un híbrido somático entre mandarino ‘Willowleaf’ (*C. reticulata*) y limón ‘Eureka’ (*C. limon*) es el estudio de segregación realizado por Kamiri *et al.* (2011). Comprobada la presencia de combinaciones alélicas, se descartó la hipótesis de una herencia disómica con un apareamiento preferente de los cromosomas (PP=1) y únicamente en 8 de los 17 loci estudiados pudo verse la presencia de una herencia intermedia, en cuyo caso, los cromosomas no apareaban al azar por completo. Este caso es muy complejo debido a que ambas especies, el mandarino y el limón, son híbridos interespecíficos, ‘Willowleaf’ de mandarino y pummelo y ‘Eureka’ de cidro, pummelo y mandarino, siendo prácticamente el 50% de su genoma cidro, hecho que dificulta el apareamiento entre los cromosomas homeólogos.

En el otro extremo se encuentra la lima ‘Mexicana’ doble diploide obtenida por duplicación espontánea cromosómica a partir de células de la nucela, donde se ha observado que la mayoría de los GL presentan una herencia disómica aunque en el GL 5 se observó una herencia intermedia (Rouiss *et al.*, 2017a). El caso de la lima ‘Mexicana’ es más complejo dado que es un híbrido interespecífico entre dos especies más distanciadas filogenéticamente, cidro y *C. micrantha* (papeda), por tanto la diferencia genética entre ambas es tal que la asociación preferente entre cromosomas homólogos es máxima, limitando la recombinación inespecífica y, por tanto, la diversidad de la población de gametos.

De igual modo, la DR varía entre los GL. Bajo la hipótesis de herencia tetrasómica, DR puede diferir entre marcadores. Esta variabilidad depende del cromosoma en el cual esté ubicado el marcador ya que hay cromosomas que presentan una mayor tendencia a formar multivalentes que originarían valores más elevados de DR (Butruille y Boiteux, 2000) y a la posición del marcador en el cromosoma; la doble reducción es más probable en marcadores ubicados en zonas teloméricas que en aquellos marcadores localizados cerca del centrómero en los que la probabilidad de que haya un evento de recombinación es nula o mucho menos probable (Aleza *et al.*, 2015; Butruille y Boiteux, 2000).

En la familia en la que ‘Moncada’ 4x se utilizó como parental femenino, se observaron valores significativos de DR en los GL 2, 3, 4, 7 y 9, de los cuales, los GL 4, 7 y 9 presentaron valores de DR que junto con el correspondiente intervalo de confianza (IC) incluyen el valor de 1/6 considerado como el máximo valor de DR si se originan tetravalentes y se produce un entrecruzamiento entre el marcador considerado y su centrómero (Haynes y Douches, 1993; Mather, 1936). El cálculo de DR fue significativamente elevado para los GL 2 y 3. Cuando ‘Moncada’ 4x se utilizó como parental masculino, se obtuvieron valores significativos de DR para los GL 2, 3, 4, 5 y 7, de los cuales, los GL 4 y 7, produjeron valores de DR que junto el IC incluyen el máximo valor de DR bajo la hipótesis descrita anteriormente. Además, los GL 2, 3 y 5 presentaron valor elevados de DR. No obstante, los resultados obtenidos utilizando ‘Moncada’ 4x como parental masculino es necesario analizarlos con marcadores mejor ubicados para tener resultados concluyentes (encontrar marcadores con la configuración alélica adecuada y más próximos al centrómero para obtener una mejor estimación de PP que permita calcular con más exactitud los valores de DR para cada GL).

Para las plantas doble diploides en cítricos, el aumento de la DR implica una mayor frecuencia de homocigotos y, por lo tanto, una disminución de la RHP, lo cual implica una reducción de la variabilidad genética y aumento de la endogamia (*inbreeding*) originando una descendencia que será menos parecida al parental tetraploide.

Tabla 2. Estimación de PP y DR en los nueve GL para ‘Moncada’ 4x como parental femenino

GL	Marcador	dC	aa	ab	bb	PP	IC	DR	IC
1	EMA-M30	14.6	15	39	16	0	0-0.02		
1	CI02G08	43.9	11	44	17			0.085	0.025-0.14
2	CAC15	4.3	10	50	12	0.085	0-0.195		
2	TAA41	104	24	38	8			0.25	0.185-0.315
3	CIC 4681-02	2.19	13	54	3	0.315	0.21-0.41		
3	MEST256	73.6	28	39	3			0.47	0.385-0.56
4	CHI-M598	4.8	6	60	6	0.5	0.415-0.59		
4	CI03D12a	73.9	8	57	7			0.125	0.035-0.225
5	MEST104	11.8	14	43	13	0	0-0.04		
5	CIC 2417-04	80.2	15	44	12			0.07	0.015-0.13
6	CI02F12	54.7	9	50	13	0.085	0-0.195		
6	AOC-M290	79.7	15	47	8			0.04	0-0.105
7	CI07C07	1.6	13	45	12	0	0-0.065		
7	MEST107	87.5	11	43	18			0.105	0.05-0.16
8	CI07B05	22.5	9	54	9	0.25	0.145-0.35		
8	CI01F04a	48.3	8	54	9			0	0-0.05
9	CI07F11	4.6	13	42	17	0	0-0.025		
9	CIC 5087-01	38.3	19	40	13			0.165	0.11-0.225

dC: Distancia al centrómero, PP: Apareamiento preferente entre cromosomas, DR: Doble Reducción, IC: Intervalo de confianza

Tabla 3. Estimación de PP y DR en los nueve GL para ‘Moncada’ 4x como parental masculino

GL	Marcador	dC	aa	ab	bb	PP	IC	DR	IC
1	CIBE5720	2.6	11	46	30	0	0-0.015		
1	CI02G08	43.9	21	54	12			0.07	0.015-0.12
2	CI07D05	33.5	15	45	28	0	0-0.01		
2	TAA41	103.9	25	38	24			0.345	0.29-0.395
3	CX0124	19.7	18	43	25	0	0-0.01		
3	CHS-M183	76.7	12	40	35			0.31	0.225-0.365
4	CI03D12a	73.9	26	48	11	0	0-0.02	0.155	0.1-0.205
5	MEST15	6.9	12	65	11	0.215	0.21-0.31		
5	CI07E12	72.3	9	47	28			0.34	0.275-0.41
6	MEST123	85.2	27	52	5	0	0-0.035	0.07	0.02-0.12
7	CI07C07	1.6	19	48	19	0	0-0.015		
7	FLS-M400	50.4	33	46	7			0.2	0.14-0.25
8	CI02A09	43.9	18	57	13	0	0-0.06		
8	CI01F04a	48.3	21	54	10			0.045	0-0.1
9	CI07F11	2.7	21	52	13	0	0-0.025	0.095	0.04-0.145

dC: Distancia al centrómero, PP: Apareamiento preferente entre cromosomas, DR: Doble Reducción, IC: Intervalo de confianza

4.2.3 Estructura genética de las poblaciones de híbridos triploides obtenidas utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino y masculino

Para cada marcador y para cada individuo se calculó la RHP de los híbridos triploides obtenidos utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino y masculino, es decir, se calcularon el número de gametos obtenidos y el número de marcadores para cada valor de RHP para analizar la distribución de la heterocigosidad. A nivel de gameto diploide (*Figura 6a*) la población de híbridos triploides de la familia CM presentó una distribución unimodal mientras que en la población de híbridos triploides obtenida con Moncada 4x como parental femenino se observó una distribución más heterogénea en la cual la mayoría de los gametos diploides presentaron valores de RHP superiores al 40%. Aunque en una frecuencia relativamente baja (menos de cinco gametos diploides), se observaron valores de RHP entre el 5 y el 30%, menores a lo esperado (*Figura 6a*). En cambio, la distribución de la RHP a nivel de marcador en ambas poblaciones de híbridos triploides es unimodal con ligeras diferencias encontrándose todos los valores entre 40 y 80% y siendo ligeramente superiores utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino (*Figura 6b*).

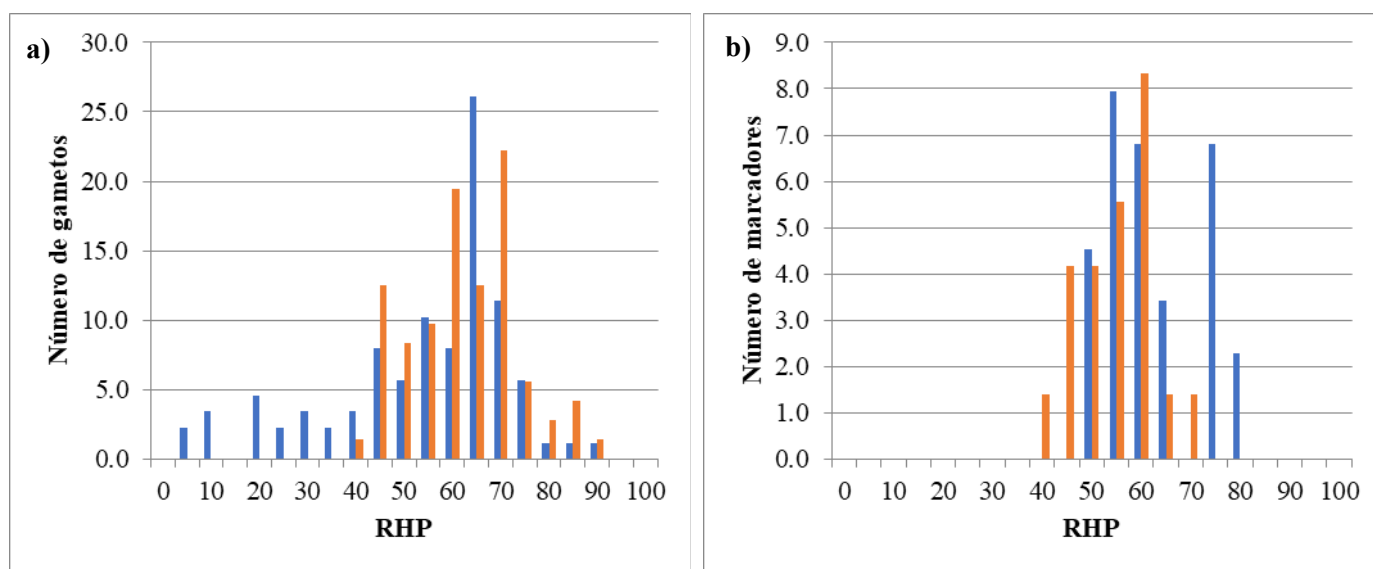


Figura 6. Distribución de la Restitución de la Heterocigosidad Parental (RHP) (a) a nivel de gameto diploide y (b) a nivel de marcador en las poblaciones de híbridos triploides obtenidas con ‘Moncada’ 4x como parental femenino (azul) y masculino (naranja)

A modo de ejemplo y con el objetivo de ilustrar los resultados obtenidos con los marcadores SNP en toda la población de individuos, en la *Figura 7* se encuentran representados los SNP CIC 5950-02 e INVA-P855 utilizados en las poblaciones MA y CM, respectivamente.

En el SNP CIC 5950-02, utilizado en la familia MA (*Figura 7a*), hay 3 grupos distintos de híbridos con tres configuraciones alélicas. El parental femenino ‘Moncada’ 4x, es heterocigoto adenina-guanina (A:G), y el parental masculino ‘Anana’ es homocigoto para adenina (A:A). Los tres grupos híbridos se distinguen según el ángulo que formen en la figura. El grupo amarillo presenta dos alelos G del gameto homocigoto G:G del parental femenino tetraploide y un alelo A del parental femenino diploide (G:G-A). En segundo lugar, el grupo azul corresponde a los híbridos con dos alelos A y un alelo G, que proceden del gameto diploide heterocigoto del parental femenino tetraploide (A:G-A). Por último, el grupo verde son los híbridos con tres

alelos A, dos procedentes del gameto diploide homocigoto A:A del parental tetraploide y uno del parental masculino (A:A-A).

En el caso del SNP INVA-P855 utilizado en la familia CM (Figura 7b), se puede apreciar que ‘Moncada’ 4x es heterocigoto citosina-timina (C:T), ‘Clemenules’ es homocigota para timina (T:T). En la población de híbridos triploides se pueden observar diferentes configuraciones alélicas. Así, según el ángulo que presenten los diferentes grupos, tendrán una configuración alélica determinada, siendo el grupo amarillo el que presenta los tres alelos T, es decir, proviene de gametos diploides homocigotos T:T del parental masculino tetraploide (T:T-T). El grupo azul presenta un alelo C y dos T, uno del parental masculino y otro del femenino, por tanto, procede de un gameto diploide heterocigoto C:T del parental masculino (C:T-T). Por último, el grupo de individuos verde tiene dos alelos C, ambos del parental masculino, y un alelo T del parental femenino diploide, por tanto, el gameto masculino del que procede era homocigoto C:C (C:C-T).

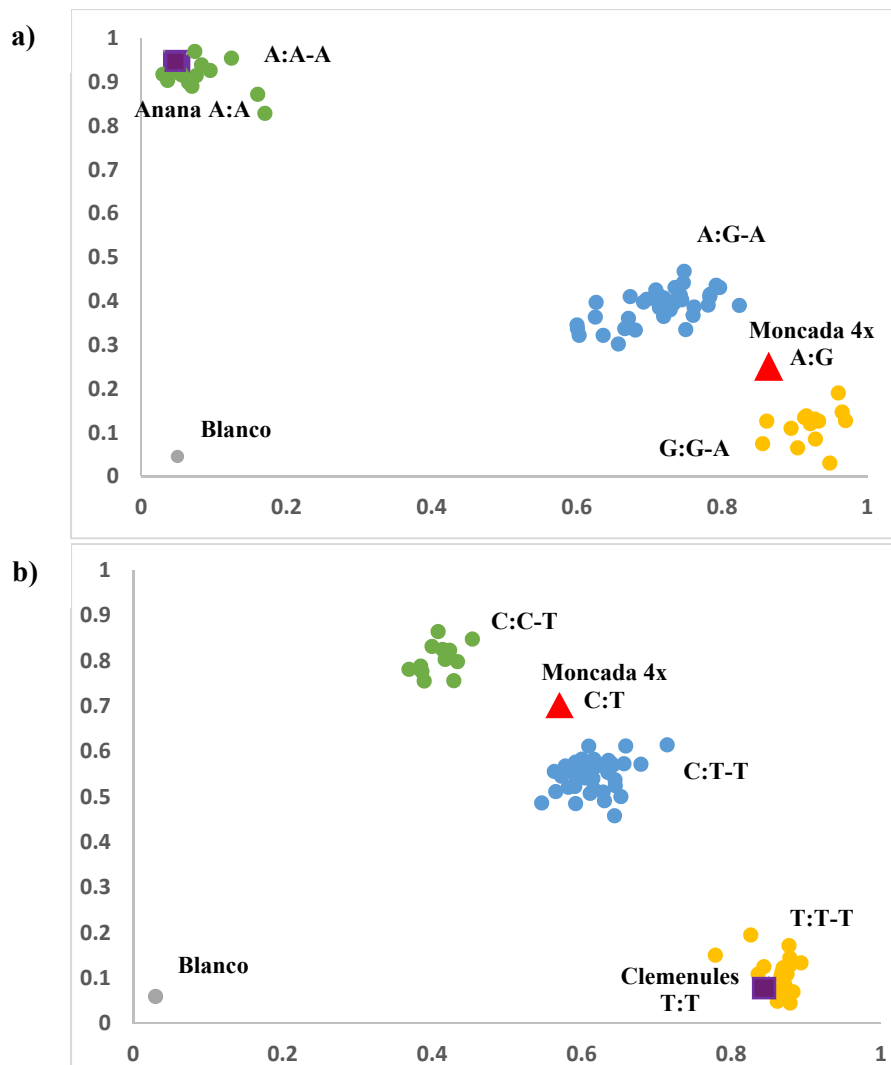


Figura 7. Representación de los resultados obtenidos con los marcadores SNP (a) CIC 5950-02 en ‘Moncada’ 4x x ‘Anana’ y (b) INVA-P855 en ‘Clemenules’ x ‘Moncada’ 4x, donde cada punto corresponde a un híbrido. Los diferentes colores representan grupos de híbridos con la misma configuración alélica

Se analizó la distorsión en la segregación alélica de las dos poblaciones de híbridos triploides para cada marcador utilizado mediante el análisis chi-cuadrado (χ^2) con la corrección de Bonferroni (Tabla 4). Este valor permite conocer los marcadores cuyo resultado en las frecuencias alélicas se alejan de lo esperado, es decir, el número de individuos heterocigotos y homocigotos de cada tipo no se ajustan a lo esperado (1/6 aa, 2/3 ab, 1/6 bb). Los marcadores TAA41, MEST256, CIC4681-02, ATMR-M728 y MEST70 en la población de híbridos triploides obtenidos utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino, y los marcadores CIBE5720, CHS-M183, CI03D12a, CI07E12, MEST123 y FLS-M400 utilizando el genotipo 4x como parental masculino, presentaron distorsión en las segregaciones alélicas ya que el p(valor) obtenido es inferior a 0.05. Las distorsiones observadas en estos marcadores corresponden a la presencia de frecuencias de gametos homocigotos de un tipo significativamente más elevadas que las del otro; por ejemplo, para el marcador TAA-41 la frecuencia de gametos diploides aa fue de 0.343 mientras que la de gametos bb fue de 0.114.

La distorsión en la segregación es un fenómeno que ocurre de forma habitual en las poblaciones de especies vegetales, que se caracteriza por una desviación de las segregaciones mendelianas. La consecuencia que tiene esta desviación es que se reducen las probabilidades de obtener unas configuraciones alélicas determinadas. La obtención de doble haploides ha sido desarrollada como uno de los métodos más rápidos para los programas de mejora con el fin de obtener genotipos tetraploides (Germanà, 2011). La principal desventaja de esta tecnología es que presenta distorsiones en las segregaciones de numerosos genotipos y especies (Bélanger *et al.*, 2016; Taylor e Ingvarsson, 2003; Xu *et al.*, 1997). Se postula que está causada por una presión selectiva sobre ciertas regiones génicas, normalmente en las fases de cultivo de microsporas, regeneración de plantas y diploidización espontánea de plantas haploides. Bélanger *et al.* (2016) estudiaron las distorsiones en la segregación de la cebada, que ocurren normalmente durante la embriogénesis y la regeneración de la planta (Dreissig *et al.*, 2017).

Cuando ‘Moncada’ 4x actúa como parental femenino, las distorsiones de segregación según el test χ^2 , son consistentes en el marcador más distante al centrómero del GL 2 (TAA-41), los tres marcadores del GL 3 (MEST256, CIC4681-02 y ATMR-M728) y el primer marcador de GL 4 (MEST70). Cuando ‘Moncada’ 4x actúa como parental masculino, se ven distorsiones esporádicas en marcadores al azar, pero no se puede asignar una distorsión a una región genómica ya que el número de marcadores utilizado es bajo. Los marcadores se encuentran en GL 1 (CIBE5720), GL 3 (MHS-M183), GL 4 (CI03D12a), GL 5 (CI07E12), GL 6 (MEST123) y GL 7 (FLS-M400).

Para que haya una diferencia en la segregación en un mismo grupo de ligamiento entre ‘Moncada’ 4x actuando como parental femenino y masculino, es necesario que se produzca alguna diferencia durante el ciclo reproductivo. Esta diferencia puede ocurrir durante el proceso meiótico en el cual se obtengan megasporas y microsporas o durante el proceso fecundativo. Es probable que la selección de los gametos sea el factor predominante que determine la distorsión en la segregación. Dado que las distorsiones aparecen en ambas familias, la selección se da tanto a nivel de óvulo como de polen, resultado de mecanismos de aborto de gametos, competición de polen o incompatibilidad gametofítica (Ollitrault *et al.*, 2012).

Tabla 4. Frecuencia de la restitución de la Heterocigosidad Parental para cada marcador en los híbridos triploides y el análisis de la segregación mendeliana (chi-cuadrado)

Marcador	GL	dC	Moncada 4x femenino			Marcador	GL	dC	Moncada 4x masculino		
			χ^2	p (valor)	RHP				χ^2	p (valor)	RHP
CI02G08	1	43.9	1.286	0.257	0.611	CI02G08	1	43.9	2.455	0.117	0.621
EMA-M30	1	14.6	0.032	0.857	0.557	CIBE5720	1	2.6	8.805	0.003	0.529
CIC5950	1	30.8	0.034	0.853	0.58	CI02D09	2	43.5	0.421	0.516	0.553
Ci02D09	2	43.5	0.758	0.384	0.542	CI07D05	2	33.5	3.930	0.047	0.511
CAC15	2	4.3	0.182	0.670	0.694	TAA41	2	103.9	0.020	0.886	0.437
CIC3712-01	2	57.6	0.758	0.384	0.542	INVA-P855	3	60.4	1.200	0.273	0.655
TAA41	2	103.9	8	0.005	0.543	CX0124	3	19.7	1.140	0.286	0.500
MEST256	3	73.6	20.161	0.000	0.557	CHS-M183	3	76.7	11.255	0.001	0.460
CIC4681-02	3	2.2	6.250	0.012	0.771	Ci03D12a	4	73.9	6.081	0.014	0.565
ATMR-M728	3	51.3	6.259	0.012	0.625	MEST15	5	6.9	0.043	0.835	0.739
MEST70	4	11.9	4.765	0.029	0.761	CMS30	5	8.2	1.455	0.228	0.500
CHI-M598	4	4.8	0	1	0.833	CI07E12	5	72.3	9.757	0.002	0.560
CI06A02	4	46.3	0.529	0.467	0.754	MEST123	6	85.2	15.125	0	0.619
CIC 0446-01	4	61.6	1.923	0.166	0.817	FLS-M400	7	50.4	16.900	0	0.535
CI03D12a	4	73.9	0.067	0.796	0.792	CI03B07	7	13.0	0.154	0.695	0.639
MEST104	5	11.8	0.037	0.847	0.614	CI07C07	7	1.6	0	1	0.558
CiC5842-02	5	48.7	0	1	0.514	Ci01F04a	8	48.3	3.903	0.048	0.635
CiC2417-04	5	80.2	0.333	0.564	0.62	Ci02A09	8	44.0	0.806	0.369	0.648
CI02F12	6	54.7	0.727	0.394	0.694	CI07F11	9	2.7	1.882	0.170	0.605
AOC-M290	6	79.7	2.130	0.144	0.671						
MEST107	7	87.5	1.690	0.194	0.597						
CI03B07	7	12.5	0.862	0.353	0.58						
CI07C07	7	1.6	0.040	0.841	0.643						
CI01F04a	8	48.3	0.059	0.808	0.761						
CI07B05	8	22.5	0	1	0.75						
CI02C09	8	40.8	0.360	0.549	0.648						
CIC5087-01	9	38.3	1.125	0.289	0.556						
CI07F11	9	4.7	0.533	0.465	0.583						

GL: grupo de ligamiento, dC: distancia al centrómero, RHP: Restitución de la Heterocigosidad Parental

En la *Tabla 5* se presentan los valores de RHP obtenidos para las dos poblaciones utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino y masculino. Con este valor se puede inferir la frecuencia de gametos heterocigotos que ha producido ‘Moncada’ 4x y, así, analizar su modo de segregación. A nivel femenino se obtuvo un valor poblacional de RHP del 65% mientras que a nivel masculino el valor de RHP promedio obtenido fue del 58%. Comparando los valores de RHP promedio por GL entre mandarino ‘Moncada’ 4x utilizado como parental femenino y masculino, las mayores diferencias las encontramos en los GL 3 y 4 que son los que presentaron valores de PP más elevados, ajustándose a un modelo de segregación intermedia en ambos GL aunque mucho más acentuado en el GL 4. En la población de híbridos triploides obtenidos con ‘Moncada’ 4x como parental femenino, la RHP osciló entre el 56.9% para el GL 9 y el 71.9% para el GL 8 mientras que en la población obtenida con ‘Moncada’ 4x como parental masculino, la RHP varió entre el 55% para el GL 2 y el 64.2% para el GL 8.

Tabla 5. Restitución de la Heterocigosidad Parental, grupos diferenciados entre genotipos analizados y distancia genética en ‘Moncada’ 4x utilizado como parental femenino y masculino

GL	Moncada 4x femenino					Moncada 4x masculino				
	RHP	RHP S D	G/N	Av D	Av D CI	RHP	RHP S D	G/N	Av D	Av D CI
GL1	0.583	0.027	0.238	0.331	0.009	0.575	0.065	0.114	0.327	0.007
GL2	0.580	0.076	0.472	0.328	0.007	0.500	0.059	0.295	0.384	0.007
GL3	0.651	0.110	0.486	0.328	0.007	0.538	0.103	0.279	0.346	0.006
GL4	0.791	0.035	0.306	0.195	0.007	0.565	-	0.059	0.338	0.010
GL5	0.583	0.059	0.236	0.335	0.009	0.599	0.124	0.250	0.314	0.006
GL6	0.683	0.016	0.139	0.290	0.009	0.619	-	0.060	0.281	0.009
GL7	0.607	0.033	0.250	0.324	0.009	0.577	0.055	0.250	0.317	0.007
GL8	0.719	0.062	0.250	0.254	0.009	0.642	0.009	0.136	0.310	0.007
GL9	0.569	0.020	0.153	0.342	0.010	0.605	-	0.058	0.321	0.010
Total	0.650	0.096	1	0.280	0.003	0.580	0.043	1	0.335	0.003

GL: Grupo de ligamiento, RHP: Restitución de la Heterocigosidad Parental, RHP SD: Desviación típica de la Restitución de la Heterocigosidad, G/N: número de genotipos sobre el total identificados, Av D: Media ponderada de la distancia genética, Av D CI: Intervalo de confianza con $\alpha = 0.05$ de la distancia genética

4.2.4 Variabilidad genotípica

Con todos los marcadores analizados en cada familia, ha sido posible diferenciar todos los híbridos triploides ($G/N=1$), es decir, se ha podido analizar cada híbrido como un individuo independiente. (Tabla 5). En cambio, con los marcadores analizados en cada GL solo se han diferenciado entre un 14% (en el caso del GL 9) y un 49% (GL 3) de los híbridos correspondientes a la familia MA y entre un 11% (GL 1) y un 30% (GL 2) en los híbridos de CM.

Se han calculado las distancias genéticas ente los híbridos triploides correspondientes a las dos familias mediante un análisis de disimilaridad, obteniendo una distancia genética media a nivel poblacional de 0.295 ± 0.003 utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino y 0.335 ± 0.003 utilizando ‘Moncada’ 4x como parental masculino. Además, si comparamos los valores de distancia genética entre las dos poblaciones a nivel de GL, los valores obtenidos también son muy parejos a excepción del GL 4 (0.338 ± 0.010) de ‘Moncada’ 4x como parental femenino donde la diferencia es significativamente mayor a la observada en el mismo GL de la otra población (0.195 ± 0.007). Estas diferencias son debidas a que en el GL 4 de la población obtenida con ‘Moncada’ 4x como parental masculino se obtuvieron los valores más elevados de RHP (0.791 ± 0.035). A nivel global, los resultados obtenidos indican que la distancia genética entre las dos poblaciones es similar, aunque se observan diferencias significativas en el GL 4. Es decir, a nivel genético no hay diferencia entre ambas familias de híbridos obtenidas utilizando ‘Moncada’ 4x como parental femenino o masculino.

Para visualizar las estructuras genéticas de las dos poblaciones se han incorporado los dendogramas obtenidos a partir de los datos de disimilaridad entre los híbridos triploides MA (Figura 8a) y los híbridos CM (Figura 8b). En estas figuras se puede comprobar la diferenciación de todos los genotipos y que las distancias genéticas de todos los híbridos triploides respecto al parental ‘Moncada’ 4x son inferiores a las presentadas respecto a los otros parentales, mandarino ‘Anana’ y clementina ‘Clemenules’. No obstante, la estructura genética de la población de híbridos triploides obtenidos con mandarino ‘Moncada’ 4x como parental femenino, es más homogénea y compacta que la obtenida con ‘Moncada’ 4x como parental masculino, en la que se pueden llegar a identificar tres grupos principales. Esta diferencia probablemente es debida a que esta última población se ha analizado con un número más

reducido de marcadores moleculares. Respecto a los parentales diploides utilizados, mandarina ‘Anana’ y clementina ‘Clemenules’, la distancia genética del primero respecto a los híbridos triploides es mayor que la presentada por el segundo, ya que clementina es uno de los parentales del mandarina ‘Moncada’, compartiendo el 50% de la información genética.

Estos resultados permiten concluir que los híbridos triploides obtenidos en hibridaciones sexuales 2x x 4x y 4x x 2x presentan una estructura genética más parecida al parental tetraploide que produce los gametos diploides. Aquellos individuos que presenten una mayor heterocigosidad en promedio, serán más similares a ‘Moncada’ 4x.

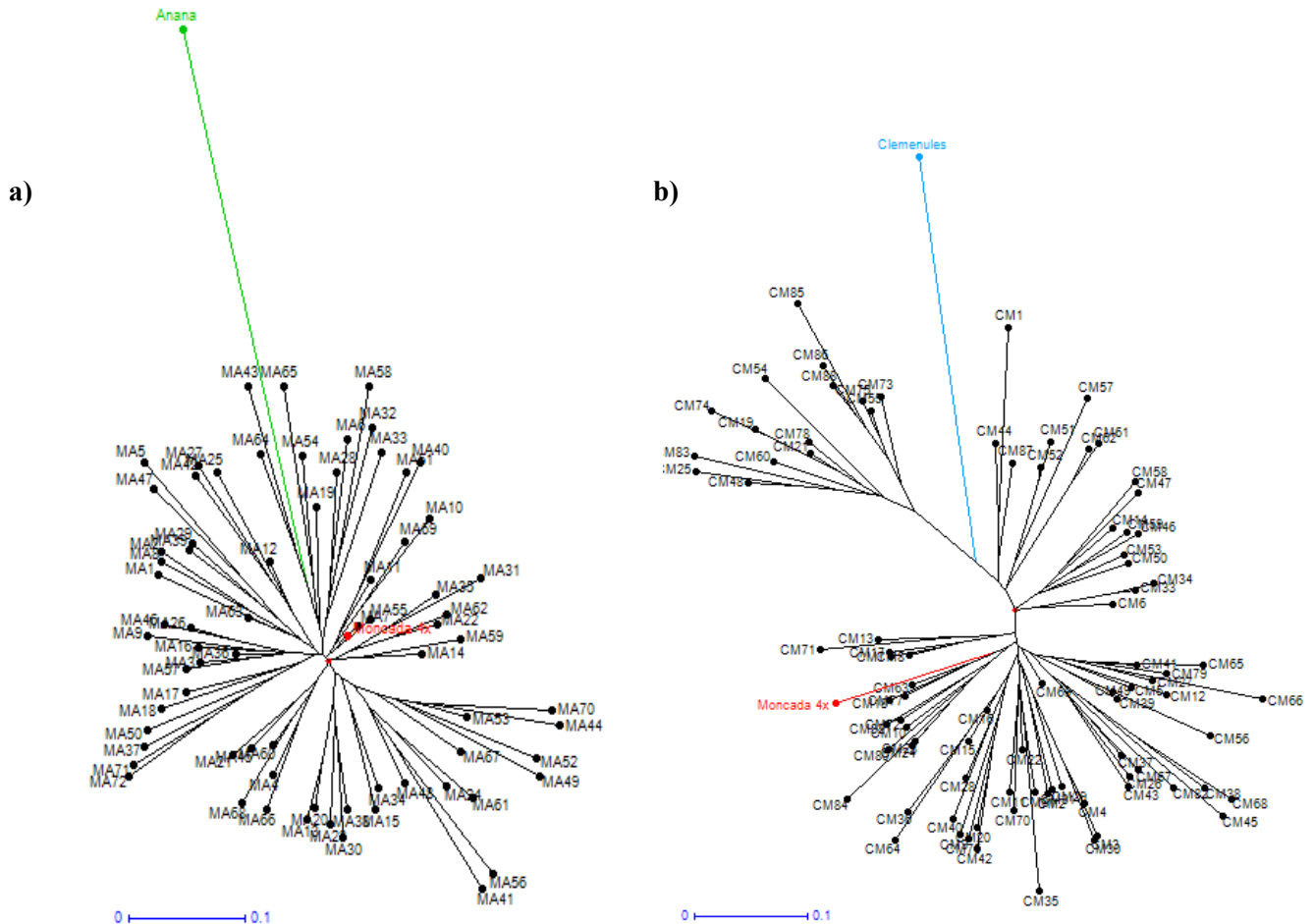


Figura 8. Dendrogramas correspondiente al análisis genético realizado con marcadores SSR y SNP obtenido mediante el cálculo del Simple Matching Dissimilarity Index y construcción del árbol mediante Weighted Neighbour-Joining de dos poblaciones de híbridos triploides regeneradas a partir de los cruzamientos a) ‘Moncada’ 4x x ‘Anana’ y b) ‘Clemenules’ x ‘Moncada’ 4x

4.3 Implicaciones en los programas de mejora genética de cítricos

El interés en los genotipos poliploides como herramienta genética ha ido incrementando en los últimos años en programas de mejora genética basados en hibridación sexual combinado con métodos de selección. El estudio del origen de los gametos diploides procedentes del parental tetraploide, así como los mecanismos meióticos (que influyen enormemente en la estructura de las poblaciones de híbridos triploides) es de gran interés para seleccionar las estrategias más adecuadas para la obtención de nuevos híbridos con determinadas características.

Un ejemplo para ilustrar la importancia del conocimiento del modo de segregación cromosómica de las plantas tetraploides en cítricos es la susceptibilidad a la enfermedad de la

mancha marrón de las mandarinas causada por el hongo *Alternaria alternata* pv. citri (ABS, del inglés *Alternaria Brown Spot*). En trabajos previos se ha demostrado que la susceptibilidad a ABS está controlada por un alelo dominante (A) de un solo gen. Por tanto, las variedades resistentes presentan los dos alelos recesivos (aa), mientras que las variedades susceptibles pueden presentar un alelo de susceptibilidad (Aa) o dos (AA) (Cuenca *et al.*, 2013).

Aunque el mandarino ‘Moncada’ no es una variedad susceptible a *Alternaria*, a modo de ejemplo y con los resultados obtenidos en este trabajo y utilizando un parental diploide resistente (aa), se analizan las consecuencias que tendría sobre la descendencia la dirección de un cruzamiento con ‘Moncada’ 4x. Suponiendo que el locus de susceptibilidad a ABS se encontrara ubicado en el GL 4 y como se ha comprobado que presenta una herencia intermedia (PP=0.5 con un IC=[0.415-0.59]), utilizando mandarino ‘Moncada’ 4x como parental femenino la RHP promedio es del 79.1%, lo cual quiere decir que el 79% de los híbridos triploides serían Aa (susceptibles a *Alternaria*) y del restante 21%, la mitad serían susceptibles (AA) y la otra mitad resistentes (aa), obteniendo un total de 89.5% de los híbridos susceptibles al hongo y un 10.5% resistentes. En el caso del mismo GL pero habiendo utilizado ‘Moncada’ 4x como parental masculino, la RHP promedio es del 56.5% (Aa) lo cual implicaría que el 21.75% serían homocigotos AA y el otro 21.75% homocigotos aa. Por lo tanto, utilizando esta estrategia se obtendría un 78.25% de híbridos triploides susceptibles a *Alternaria* y un 21.75% resistentes. Estos resultados permitirían indicar, para este carácter en concreto y a modo de ejemplo, que la estrategia de obtención de híbridos triploides utilizando ‘Moncada’ 4x como parental masculino es más eficiente para la obtención de híbridos triploides resistentes a *Alternaria* que la estrategia en la cual ‘Moncada’ se utilizara como parental femenino.

Por tanto, dependiendo del grupo de ligamiento en el que se encuentre el carácter de interés y la dirección del cruzamiento, pueden obtenerse unas frecuencias en la descendencia significativamente diferentes y pueden diseñarse programas de mejora de cítricos para optimizar los procesos de obtención y selección.

5 CONCLUSIÓN

Este trabajo ha permitido caracterizar el modelo de segregación cromosómica del mandarino ‘Moncada’ 4x en cada uno de sus GL actuando como parental femenino y masculino. De forma genérica, predomina una segregación tetrasómica típica de un genotipo doble diploide, sin embargo, existe una variación entre la segregación de ‘Moncada’ 4x utilizada como parental femenino. En el cruzamiento ‘Moncada’ 4x x ‘Anana’, se observa un GL (GL 4) con una clara herencia intermedia y dos (GL 3 y 8) con herencia intermedia con tendencia a la tetrasomía. En cambio, en el cruzamiento ‘Clemenules’ x ‘Moncada’ 4x, donde ‘Moncada’ 4x actúa como parental masculino, únicamente GL 5 muestra una herencia intermedia con tendencia a la tetrasomía. Por tanto, se puede concluir que no solo existe una diferencia en el modo de herencia de cada especie y en cada uno de sus cromosomas sino que dependiendo de la dirección del cruzamiento, la segregación puede sufrir variaciones debido a diferentes procesos de incompatibilidad de gametos.

Estos resultados permiten estudiar los mecanismos de segregación de genotipos con diversos niveles de ploidía, y establecer a su vez, una base para definir nuevas estrategias en programas de mejora genética de cítricos, teniendo como objetivo utilizar especies tetraploides para la obtención de híbridos triploides, de gran interés en el mercado global de productos de consumo en fresco. Además, permitiría obtener y seleccionar, a nivel genético, individuos con un genotipo determinado que expresara unos caracteres de interés.

Actualmente, en el campo de la Genética, las tecnologías *Next Generation Sequencing* (NGS) avanzan con celeridad y permitirían realizar estudios de segregación cromosómica de plantas poliploides de cítricos obteniendo una información mucho más precisa de los fenómenos que ocurren, acompañadas de nuevos sistemas bioinformáticos de análisis de datos. No obstante, los marcadores moleculares siguen vigentes en la vida cotidiana de los laboratorios para el estudio de las variaciones genéticas en los seres vivos que pueden ayudar a esclarecer sus mecanismos moleculares y, por tanto, conocer cómo podrían mejorarse genéticamente para, finalmente, poder obtener nuevos bienes y productos de interés.

6 BIBLIOGRAFÍA CITADA

- AGUSTÍ, M. (1999). *Citricultura*. Madrid: Mundi-Prensa.
- AHMAD, R., STRUSS, D., Y SOUTHWICK, S. M. (2003). Development and Characterization of Microsatellite Markers in Citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 128(4), 584–590.
- ALEZA, P., CUENCA, J., HERNÁNDEZ, M., JUÁREZ, J., NAVARRO, L., Y OLLITRAULT, P. (2015). Genetic mapping of centromeres in the nine Citrus clementina chromosomes using half-tetrad analysis and recombination patterns in unreduced and haploid gametes. *BMC Plant Biology*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0464-y>
- ALEZA, P., CUENCA, J., JUÁREZ, J., NAVARRO, L., Y OLLITRAULT, P. (2016). Inheritance in doubled-diploid clementine and comparative study with SDR unreduced gametes of diploid clementine. *Plant Cell Reports*, 35(8), 1573–1586. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1972-4>
- ALEZA, P., CUENCA, J., JUAREZ, J., PINA, J. A., Y NAVARRO, L. (2010). “Garbí” Mandarin : A New Late-maturing Triploid Hybrid. *HortScience*, 45(1), 139–141.
- ALEZA, P., FROELICHER, Y., SCHWARZ, S., AGUSTÍ, M., HERNÁNDEZ, M., JUÁREZ, J., LURO, F., MARILLON, R., NAVARRO, L., Y OLLITRAULT, P. (2011). Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Annals of Botany*, 108(1), 37–50. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr099>
- ALEZA, P., JUÁREZ, J., CUENCA, J., HERNÁNDEZ, M., OLLITRAULT, P., Y NAVARRO, L. (2012a). Extensive citrus triploid breeding program by 2x×4x sexual hybridizations. *Acta Horticulturae*, 961, 67–72. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.961.5>
- ALEZA, P., JUÁREZ, J., HERNÁNDEZ, M., OLLITRAULT, P., Y NAVARRO, L. (2012b). Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on 4x × 2x sexual hybridisations. *Tree Genetics and Genomes*, 8(6), 1293–1306. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0515-6>
- ALEZA, P., JUÁREZ, J., HERNÁNDEZ, M., PINA, J. A., OLLITRAULT, P., Y NAVARRO, L. (2009a). Recovery and characterization of a Citrus clementina Hort . ex Tan . Citrus genome sequence. *BMC Plant Biology*, 17, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-110>
- ALEZA, P., JUÁREZ, J., OLLITRAULT, P., Y NAVARRO, L. (2009b). Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant Cell Reports*, 28(12), 1837–1846. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0783-2>
- BARKLEY, N. A., ROOSE, M. L., KRUEGER, R. R., Y FEDERICI, C. T. (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 1519–1531. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0255-9>
- BARRETT, H. C., Y RHODES, A. M. (1976). A Numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. *Systematic Botany*, 1(2), 105–136. <https://doi.org/10.2307/2418763>
- BÉLANGER, S., CLERMONT, I., ESTEVES, P., Y BELZILE, F. (2016). Extent and overlap of

- segregation distortion regions in 12 barley crosses determined via a Pool-GBS approach. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(7), 1393–1404. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2711-5>
- BUTRUILLE, D. V., Y BOITEUX, L. S. (2000). Selection-mutation balance in polysomic tetraploids: impact of double reduction and gametophytic selection on the frequency and subchromosomal localization of deleterious mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 6608–6613. <https://doi.org/10.1073/pnas.100101097>
- CAMERON, J. W., Y BURNETT, R. H. (1978). Use of sexual tetraploids seed parents for production of triploid citrus hybrids. *HortSci*, 13, 167–169.
- CAMERON, J. W., Y FROST, H. B. (1968). Genetic, breeding and nucellar embryony. In *The citrus industry, vol 1*. (pp. 325–370). University of California, Riverside.
- CHEN, C., Y GMITTER, F. G. (2013). Mining of haplotype-based expressed sequence tag single nucleotide polymorphisms in citrus. *BMC Genomics*, 14(746).
- CHEN, C., LYON, M. T., MALLEY, D. O., FEDERICI, C. T., GMITTER, J., GROSSER, J. W., CHAPARRO, J.X., ROOSE, M.L., Y GMITTER, F. G. (2008). Origin and frequency of 2 n gametes in Citrus sinensis x Poncirus trifoliata and their reciprocal crosses. *Plant Science*, 174, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.08.005>
- COMAI, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 836–846. <https://doi.org/10.1038/nrg1711>
- CUENCA, J., ALEZA, P., GARCIA-LOR, A., OLLITRAULT, P., Y 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(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01948>
- CUENCA, J., ALEZA, P., JUAREZ, J., GARCÍA-LOR, A., FROELICHER, Y., NAVARRO, L., Y OLLITRAULT, P. (2015). Maximum-likelihood method identifies meiotic restitution mechanism from centromeric loci : application in citrus. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep09897>
- CUENCA, J., ALEZA, P., NAVARRO, L., Y OLLITRAULT, P. (2013). Assignment of SNP allelic configuration in polyploids using competitive allele-specific PCR : Application to citrus triploid progeny. *Annals of Botany*, 111, 731–742. <https://doi.org/10.1093/aob/mct032>
- CUENCA, J., FROELICHER, Y., ALEZA, P., JUÁREZ, J., NAVARRO, L., Y OLLITRAULT, P. (2011). Multilocus half-tetrad analysis and centromere mapping in citrus: Evidence of SDR mechanism for 2n megagametophyte production and partial chiasma interference in mandarin cv Fortune. *Heredity*, 107(5), 462–470. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.33>
- CUENCA, J., OLLITRAULT, P., ALEZA, P., JUAREZ, J., Y NAVARRO, L. (2010). Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x x 2x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. *Plant Cell Reports*, 1023–1034. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0888-7>
- CURK, F., ANCILLO, G., GARCIA-LOR, A., LURO, F., PERRIER, X., JACQUEMOUD-COLLET, J. P., NAVARRO, L., Y OLLITRAULT, P. (2014). Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in Citrus species: Analysis of chromosome 2. *BMC Genetics*, 15(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0152-1>
- CURK, F., ANCILLO, G., OLLITRAULT, F., PERRIER, X., JACQUEMOUD-COLLET, J. P., GARCIA-LOR, A., NAVARRO, L., Y OLLITRAULT, P. (2015). Nuclear species-diagnostic SNP markers mined from 454 amplicon sequencing reveal admixture genomic structure of modern Citrus varieties. *PLoS ONE*, 10(5), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125628>
- CURK, F., Y NAVARRO, L. (2016). Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Annals of Botany*, 117, 565–583. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw005>
- CURTOLO, M., CRISTOFANI-YALY, M., GAZAFFI, R., TAKITA, M. A., FIGUEIRA, A., Y MACHADO, M. A. (2017). QTL mapping for fruit quality in Citrus using DArTseq markers. *BMC Genomics*, 18(289), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3629-2>

- DREISSIG, S., FUCHS, J., HIMMELBACH, A., MASCHER, M., Y HOUBEN, A. (2017). Sequencing of Single Pollen Nuclei Reveals Meiotic Recombination Events at Megabase Resolution and Circumvents Segregation Distortion Caused by Postmeiotic Processes. *Frontiers in Plant Science*, 8(September). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01620>
- ELSHIRE, R. J., GLAUBITZ, J. C., SUN, Q., POLAND, J. A., KAWAMOTO, K., BUCKLER, E. S., Y 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>
- ESEN, A., Y SOOST, R. K. (1971). Unexpected triploids in Citrus: their origin, identification and possible use. *Heredity*, 62, 329–333.
- ESEN, A., SOOST, R. K., Y GERACI, G. (1978). Seed set, size, and development after 4x X 2x and 2x X 4x crosses in citrus. *Euphytica*, 27, 283–294.
- ESSELINK, G. D., NYBOM, H., Y VOSMAN, B. (2004). Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting — peak ratios) method. *Theor Appl Genet*, 109, 402–408. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1645-5>
- FANG, D. Q., ROOSE, M. L., KRUEGER, R. R., Y FEDERICI, C. T. (1997). Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes , RFLPs , and inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet*, 95, 211–219.
- FATTA DEL BOSCO, S., MATRANGA, G., Y GERACI, G. (1992). Micro and macrosporogenesis of two triploid hybrids of citrus. In *Proceedings of 7th international citrus congress, vol 1* (pp. 122–124). , International Society of Citriculture, Acireale, Italy.
- FEDERICI, C. T., FANG, D. Q., SCORA, R. W., Y ROOSE, M. L. (1998). Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 812–822.
- FILIPPI, C. V., AGUIRRE, N., RIVAS, J. G., ZUBRZYCKI, J., PUEBLA, A., CORDES, D., MORENO, M., FUSARI, C.M., ÁLVAREZ, D., HEINZ, R.A., HOPP, H.E., PANIEGO, N.B., Y LIA, V. V. (2015). Population structure and genetic diversity characterization of a sunflower association mapping population using SSR and SNP markers. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0360-x>
- FROELICHER, Y., DAMBIER, D., BASSENE, J. B., COSTANTINO, G., LOTFY, S., DIDOUT, C., BEAUMONT, V., BROTTIER, P., RISTERUCI, A.M., LURO, F., Y OLLITRAULT, P. (2008). Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 119–122. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01893.x>
- GALLAIS, A. (2003). *Quantitative Genetics and Breeding methods in Autopolyploid plants*. (INRA, Ed.) (1^a). Paris.
- GARCIA-LOR, A., ANCILLO, G., NAVARRO, L., Y OLLITRAULT, P. (2013). Citrus (Rutaceae) SNP Markers Based on Competitive Allele-Specific PCR; Transferability Across the Aurantioideae Subfamily. *Applications in Plant Sciences*, 1(4), 1200406. <https://doi.org/10.3732/apps.1200406>
- GARCÍA-LOR, A., LURO, F., NAVARRO, L., Y OLLITRAULT, P. (2012). Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: A perspective for genetic association studies. *Molecular Genetics and Genomics*, 287(1), 77–94. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0658-4>
- GARCIA-LOR, A., LURO, F., OLLITRAULT, P., Y NAVARRO, L. (2015). Genetic diversity and population structure analysis of mandarin germplasm by nuclear , chloroplastic and mitochondrial markers. *Tree Genetics and Genomes*, 11(123). <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0951-1>
- GERMANÀ, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 283–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>
- GOIS, I. B., BORÉM, A., CRISTOFANI-YALY, M., DE RESENDE, M. D. V., AZEVEDO, C.F., BASTIANEL, M., NOVELLI, V.M., Y MACHADO, M.A. (2016). Genome wide selection in Citrus breeding. *Genetics and Molecular Research*, 15(4), 1–14. <https://doi.org/10.4238/gmr15048863>

- GROSSER, J. W., Y GMITTER, F. G. (2011). Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: Applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 343–357. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9823-4>
- GROSSER, J. W., LEE, D. H., CHEN, C., VASCONCELLOS, M., Y GMITTER, F. G. (2010). Production of New Allotetraploid and Autotetraploid Citrus Breeding Parents : Focus on Zipperskin Mandarins. *HortScience*, 45(8), 1160–1163.
- GROSSER, J. W., OLLITRAULT, P., Y OLIVARES-FUSTER, O. (2000). Invited review: Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 36(6), 434–449. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0080-9>
- GROVER, A., Y SHARMA, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: Past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290–302. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.959891>
- GULSEN, O., Y ROOSE, M. L. (2001). Chloroplast and Nuclear Genome Analysis of the Parentage of Lemons. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126(2), 210–215.
- HAYNES, K. G., Y DOUCHES, D. S. (1993). Estimation of the coefficient of double reduction in the cultivated tetraploid potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(6–7), 857–862. <https://doi.org/10.1007/BF00225029>
- HERRERO, R. (1996). Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae . I . Intraspecies and intragenus genetic variability. *Genet, Theor Appl*, 599–609.
- JACKSON, R. C., Y JACKSON, J. W. (1996). SEGREGATION IN AUTOTETRAPLOIDS : PREDICTION from meiotic configurations. *American Journal of Botany*, 83(6), 673–678.
- KAMIRI, M., STIFT, M., SRAIRI, I., COSTANTINO, G., MOUSSADIK, A. EL, HMYENE, A., BAKRY, F., OLLITRAULT, P., Y FROELICHER, Y. (2011). Evidence for non-disomic inheritance in a Citrus interspecific tetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon* using SSR markers and cytogenetic analysis. *Plant Cell Reports*, 30(8), 1415–1425. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1050-x>
- KIJAS, J. M. H., THOMAS, M. R., FOWLER, J. C. S., Y ROOSE, M. L. (1997). Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(5), 701–706. <https://doi.org/10.1007/s001220050468>
- KRUG, C. A. (1943). Chromosome Numbers in the Subfamily Aurantioideae with Special Reference to the Genus Citrus. *Botanical Gazette*, 104(4), 602–611. <https://doi.org/10.1086/335173>
- LACADENA, J.-R. (1996). *Citogenética* (Primera Ed). Madrid: Editorial Complutense.
- LI, X., XIE, R., Y LU, Z. (2010). The Origin of Cultivated Citrus as Inferred from Internal Transcribed Spacer and Chloroplast DNA Sequence and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprints. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 135(4), 341–350.
- LIANG, G., XIONG, G., GUO, Q., HE, Q., Y LI, X. (2007). AFLP Analysis and the Taxonomy of Citrus. *Plant Genetic Resources*, 137–142.
- LIU, Y., HEYING, E., Y TANUMIHARDJO, S. A. (2012). History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530–545. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00201.x>
- LOTFY, S., LURO, F., CARREEL, F., FROELICHER, Y., RIST, D., Y OLLITRAULT, P. (2003). Application of Cleaved Amplified Polymorphic Sequence Method for Analysis of Cytoplasmic Genome among Aurantioideae Intergeneric Somatic Hybrids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 128(2), 225–230.
- LURO, F., MADDY, F., JACQUEMOND, C., FROELICHER, Y., MORILLON, R., Y RIST, D. (2004). Identification and Evaluation of Diplogyny in Clementine (*Citrus clementina*) for Use in Breeding. *XIth Eucarpia Symp. on Fruit Breed, and Genetics.*, 841–848.
- MATHER, K. (1936). Segregation and Linkage in autotetraploids. *Galton Laboratory, University College*.

- MINAMIKAWA, M. F., NONAKA, K., KAMINUMA, E., KAJIYA-KANEGAE, H., GOTO, S., YOSHIOKA, T., IMAI, A., HAMADA, H., HAYASHI, T., MATSUMOTO, S., KATAYOSE, Y., TOYODA, A., FUJIYAMA, A., YASUKAZU, N., SHIMIZU, T., Y HAYASHI, T. (2017). Genome-wide association study and genomic prediction in citrus : Potential of genomics-assisted breeding for fruit quality traits. *Scientific Reports*, 7(4721). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05100-x>
- MOK, D. W. S., Y PELOQUIN, S. J. (1975). The inheritance of three mechanisms of diplandroid (2n Pollen) formation in diploid potatoes. *Heredity*, 35(3), 295–302.
- MULLER, H. J. (1914). A new mode of segregation in Gregory's Tetraploid Primulas. *The American Naturalist*, XLVIII, 508–512.
- MURASHIGE, T., Y SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- NICOLOSI, E., DENG, Z. N., GENTILE, A., LA MALFA, S., CONTINELLA, G., Y TRIBULATO, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet*, 100, 1155–1166.
- OLLITRAULT, F., TEROL, J., PINA, J. A., NAVARRO, L., TALON, M., Y OLLITRAULT, P. (2010). Development of SSR markers from Citrus clementina (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in Citrus. *American Journal of Botany*, 97(11), 124–129. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000280>
- OLLITRAULT, P., JACQUEMOND, C., DUBOIS, C., Y LURO, F. (2003). Citrus. In *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants* (1st Editio, p. 26).
- OLLITRAULT, P., Y NAVARRO, L. (2012). Citrus. In *Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding Vol 8* (pp. 623–662). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_16.
- OLLITRAULT, P., TEROL, J., CHEN, C., FEDERICI, C. T., LOTFY, S., HIPPOLYTE, I., OLLITRAULT, F., BÉRARD, A., CHAUVEAU, A., CUENCA, J., COSTANTINO, G., KACAR, Y., MU, L., GARCÍA-LOR, A., FROELISCHER, Y., ALEZA, P., BOLAND, A., BILLOT, C., NAVARRO, L., LURO, F., ROOSE, M.K., GMITTER, F.K., TALON, M., Y BRUNEL, D. (2012). A reference genetic map of C. clementina hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-593>
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. (n.d.). FAO. Consultado el 15 de Mayo, 2018 en <http://www.fao.org/home/es/>
- OUESLATI, A., SALHI-HANNACHI, A., LURO, F., VIGNES, H., MOURNET, P., Y 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>
- PENJOR, T., YAMAMOTO, M., UEHARA, M., IDE, M., Y MATSUMOTO, N. (2013). Phylogenetic Relationships of Citrus and Its Relatives Based on matK Gene Sequences. *PLoS ONE*, 8(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062574>
- PERRIER, X., Y JACQUEMOUD-COLLET, J.-P. (2018). DARwin6. Consultado el 2 de Junio en <http://darwin.cirad.fr/>
- PHYTOZOME. (n.d.). Consultado el 25 de Marzo, 2018 en <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>
- PRIMER3. (n.d.). Consultado el 25 de Marzo, 2018 en <http://primer3.ut.ee/>
- RAMSEY, J., Y SCHEMSKE, D. W. (2002). Neopolyploidy in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 589–639. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150437>
- ROOSE, M. L. (1988). Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in citrus breeding and systematics. *Citriculture : Proceedings of the Sixth International Citrus Congress*.
- ROUISS, H., BAKRY, F., FROELICHER, Y., NAVARRO, L., ALEZA, P., Y OLLITRAULT, P. (2017a). Origin of C. latifolia and C. aurantiifolia triploid limes: the preferential disomic

- inheritance of doubled-diploid 'Mexican' lime is consistent with an interploid hybridization hypothesis. *Annals of Botany*, (November), 1–7. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx179>
- ROUISS, H., CUENCA, J., NAVARRO, L., OLLITRAULT, P., Y ALEZA, P. (2017b). Tetraploid citrus progenies arising from FDR and SDR unreduced pollen in 4x X 2x hybridizations. *Tree Genetics y Genomes*. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1094-8>
- ROUISS, H., CUENCA, J., NAVARRO, L., OLLITRAULT, P., Y ALEZA, P. (2017c). Unreduced Megagametophyte Production in Lemon Occurs via Three Meiotic Mechanisms , Predominantly Second-Division Restitution. *Frontiers in Plant Science*, 8(1211). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01211>
- RUIZ, C., Y ASINS, M. J. (2003). Comparison between Poncirus and Citrus genetic linkage maps. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 826–836. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1095-x>
- RUIZ, C., BRETO, M. P., Y ASINS, M. J. (2000). A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica*, 112, 89–94.
- SANFORD, J. C., MOORE, J. N., Y JANICK, J. (1983). Ploidy manipulations. In J. N. Moore y J. Janick (Eds.), *Methods in fruit breeding* (pp. 100–123). West Lafayette: Purdue University Press.
- SCORA, R. W. (1975). On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102(6), 369–375.
- STARRANTINO, A., Y RECUPERO, G. (1981). Citrus hybrids obtained in vitro from 2x females X 4x males. In *Proceedings 4th International Citrus Congress. International Society of Citriculture* (pp. 31–32). Tokyo, Japan.
- STEBBINS, G. L. (1947). Types of Polyploids: Their Classification and Significance. *Advances in Genetics*, 1(C), 403–429. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60490-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60490-3)
- STIFT, M., BERENOS, C., KUPERUS, P., Y VAN TIENDEREN, P. H. (2008). Segregation models for disomic, tetrasomic and intermediate inheritance in tetraploids: A general procedure applied to rorippa (yellow cress) microsatellite data. *Genetics*, 179(4), 2113–2123. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.085027>
- SWINGLEY, W. (1943). The botany of Citrus and its wild relatives in the orange subfamily (family Rutaceae, subfamily Aurantioideae). *University of California Press*.
- SWINGLEY, W., Y REECE, P. (1967). The botany of Citrus and its wild relatives. In W. Reuther, H. Webber, y L. Batchelor (Eds.), *The Citrus Industry, Vol 1*. (pp. 190–430). Berkeley, USA.
- SYBENGA, J. (1996). Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist? *Genome*, 39(6), 1176–1184. <https://doi.org/10.1139/g96-148>
- TANAKA, T. (1977). Fundamental discussion of Citrus classification. *Studia Citologica*, 14, 1–6.
- TAYLOR, D. R., Y INGVARSSON, P. K. (2003). Common features of segregation distortion in plants and animals. *Genetica*, 117(1), 27–35. <https://doi.org/10.1023/A:1022308414864>
- TEROL, J., CONESA, A., COLMENERO, J. M., CERCOS, M., TADEO, F., AGUSTÍ, J., ALOS, E., ANDRÉS, F., SOLER, G., BRUMOS, J., IGLESIAS, D.J., GÖTZ, S., LEGAZ, F., ARGOUT, X., COURTOIS, B., OLLITRAULT P., DOSSAT, C., MORILLON, R., Y WINCKER, P., TALON, M. (2007). Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC Genomics*, 22, 1–22. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-31>
- TEROL, J., NARANJO, M. A., OLLITRAULT, P., Y TALON, M. (2008). Development of genomic resources for Citrus clementina: Characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. *BMC Genomics*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-423>
- TORRES, A. M. ., SOOST, R. K., Y DIEDENHOFEN, U. (1978). Leaf isozymes as genetic markers in citrus. *American Journal of Botany*, 65(8), 869–881. Consultado en <http://www.jstor.org/stable/2442183>
- GENERALITAT VALENCIANA. (2018). Institut Valencià de Competitivitat Empresarial. Consultado el 10 de Junio. 2018, en www.ivace.es

- WEBER, J. L., Y MAY, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44(3), 388–396. Consultado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2916582> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1715443>
- WENDEL, J., Y DOYLE, J. (2005). *Polyploidy and evolution in plants* (Plant dive). Wallingford, UK.
- WU, G. A., PROCHNIK, S., JENKINS, J., SALSE, J., HELLSTEN, U., MURAT, F., PERRIER, X., RUIZ, M., SCALABRIN, S., TEROL, J., TAKITA, M.A., LABADLE, K., POULAIN, J., COULOUX, A., JABBARI, K., CATTONARO, F., DEL FABBRO, C., PINOSIO, S., ZUCCOLO, A., CHAPMAN, J., GRIMWOOD, J., TADE, F.R., ESTORNELL, L.H., MUÑOZ-SANZ, J.V., IBAÑEZ, V., HERRERO-ORTEGA, A., ALEZA, P., PÉREZ-PÉREZ, J., RAMÓN, D., BRUNEL, D., LURO, F., CHEN, C., FARMERIE, W.G., DESANY, B., KODIRA, C., MOHIUDDIN, M., HARKINS, T., FRIEDRIKSON, K., BURNS, P., LOMSADZE, A., BOEODOVSKY, M., REFORGIATO, G., FREITAS-ASTÚA, J., QUETIER, F., NAVARRO, L., ROOSE, M., WINCKER, P., SCHMUTZ, J., MOEHANTE, M., MACHADO, M.A., TALON, M., JAILLON, O., OLLITRAULT, P., GMITTER, F., Y ROKHSAR, D. (2014). Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology*, 32(7), 656–662. <https://doi.org/10.1038/nbt.2906>
- WU, G. A., TEROL, J., IBANEZ, V., LÓPEZ-GARCÍA, A., PÉREZ-ROMÁN, E., BORREDÁ, C., 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. JR, ROKHSAR, D.S., Y TALON, M. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*, 554(7692), 311–316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>
- XU, Y., ZHU, L., XIAO, J., HUANG, N., Y MCCOUCH, S. R. (1997). Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics*, 253(5), 535–545. <https://doi.org/10.1007/s004380050355>
- YU, Y., CHEN, C., Y GMITTER, F. G. (2016). QTL mapping of mandarin (*Citrus reticulata*) fruit characters using high-throughput SNP markers. *Tree Genetics y Genomes*. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1034-7>