



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

**Análisis del nivel de ploidía y estructura genética de
gametos de mandarino**

Tesis doctoral

Presentada por

Miguel Fernando Garavello

Directores

Dr. Pablo Aleza Gil

Dr. José Cuenca Ibáñez

Tutor

Dr. Alejandro Atares Huerta

Valencia, mayo 2020

Agradecimientos institucionales

- Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por otorgarme la beca de formación doctoral que permitió mis estudios en España.
- A la Estación Experimental Agropecuaria Concordia del INTA, que me apoyó en la decisión de la realización de mi tesis doctoral en el extranjero.
- Al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), por permitirme realizar mis estudios en su “casa” y facilitarme los medios necesarios para llevarlos a cabo.

Agradecimientos personales

A mis directores Pablo y José por aceptarme como parte de su equipo de trabajo para realizar mi tesis doctoral. En especial por su tiempo, apoyo, paciencia, motivación, y dedicación para que pueda concluir esta etapa de mi vida.

A Luis Navarro, por sus constructivos aportes y consejos que me permitieron la culminación de mi tesis.

A mi tutor Alejandro Atares por guiarme y hacerme las cosas más fáciles con los intríngulis de la plataforma de la UPV.

A toda la gente que está o ha estado acompañando mi día a día en el laboratorio y en el campo, brindándose enteros para que lleve adelante mi tesis doctoral de la mejor manera posible, y sobre todo por hacerme sentir como “uno miembro más” de su grupo de trabajo.

A María, Cloti, Carmen, Marga por facilitarme el trabajo en el laboratorio, por su ayuda incondicional y sobre todo por el excelente ambiente de trabajo y tertulias compartidas.

A Pepe, Ferran, Diego por facilitarme las tareas de campo y en el invernadero, pero sobre todo por estar siempre listos para darme una mano incondicional en la organización de eventos sociales que fueron fundamentales para estrechar lazos de amistad con el grupo.

A Andrés, por esa capacidad de aguante para dar solución a mis incesables inconvenientes técnicos, pero más aún por su paciencia, oído e insumos que consumí durante mi transitar por el IVIA.

A Rafa, Vero, Luis G., Luis R., por esas invalorable charlas de pasillo imprescindibles para el espíritu y la mente que permiten desconectar del día a día y retomar la rutina con energías renovadas.

Al incansable orador Pepe Guerri, por compartir interminables historias y algunas sapiencias, siempre con buen humor, dando aliento y consejos para llevar adelante con éxito mis estudios.

A Karelia, Maru, Mari Carmen por su invalorable colaboración e incondicional disposición de su tiempo y laboratorio de Biotecnología para agilizar mis ensayos.

Y muy especialmente a mi familia que me acompañó incondicionalmente en esta etapa de mi vida con paciencia, ayuda y comprensión.

Resumiendo, a todos quiero decirles que *“las palabras jamás alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma”*.

Resumen

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

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

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

En esta tesis, se ha utilizado por primera vez la citometría de flujo para determinar el nivel de ploidía de poblaciones de granos de polen de diferentes especies diploides, triploides y tetraploides de cítricos, demostrando que los granos de polen maduros son binucleados. Los granos de polen de genotipos diploides mostraron dos picos perfectamente definidos con diferentes intensidades de fluorescencia, correspondiendo el primer pico a la población

de núcleos vegetativos y el segundo, a los núcleos generativos. Únicamente se han identificado dos excepciones con picos adicionales en sus histogramas; el tangor `CSO` y la lima `Mexicana`. El tangor `CSO` mostró un pico adicional de fluorescencia equivalente a la suma de los valores fluorescencia de los núcleos vegetativos y generativos, lo que sugiere que los núcleos permanecen unidos después de su aislamiento de los granos de polen mediante el método de ruptura y aislamiento; y corroborado posteriormente mediante marcadores moleculares, ya que las tres poblaciones de núcleos presentan el mismo origen genético. Sin embargo, en la lima `Mexicana` se han identificado por primera vez en cítricos gametos no reducidos de polen mediante citometría de flujo. Las poblaciones de granos de polen de genotipos triploides no evidenciaron picos claros y definidos en los histogramas obtenidos-, mientras que los genotipos tetraploides revelaron dos poblaciones de núcleos, una de núcleos vegetativos y la otra de núcleos generativos, con el doble de intensidad de fluorescencia que sus núcleos homólogos en los genotipos diploides.

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

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

Con la puesta a punto de la metodología combinada para individualizar y amplificar núcleos haploides para su posterior análisis con múltiples marcadores moleculares, se estudiaron por primera vez eventos de recombinación y distorsiones de la segregación (SD) en núcleos de granos de polen haploides. El análisis de los eventos de recombinación se realizó en el cromosoma 1 del limón 'Eureka', revelando la presencia de hasta cinco eventos en un brazo y cuatro en el otro brazo, con un promedio 1,97 puntos de recombinación por gameto. Asimismo, cinco muestras mostraron ausencia de eventos de recombinación para los marcadores moleculares utilizados. La SD se analizó en una población de núcleos de granos de polen individualizados del tangor 'CSO' y una población de plantas ('RTSO') que se obtuvo a partir del cruzamiento entre el tangor 'RTO' como parental femenino y el tangor 'CSO' como parental masculino. La SD obtenida en los núcleos de granos de polen del tangor 'CSO' fue ligeramente menor (13.8%) respecto a la observada en la población de plantas 'RTSO' (20.7%). Ambas poblaciones mostraron SD sincronizada en el grupo de ligamiento (GL) 2, mientras que el GL 7 solo mostró una SD en la población de plantas 'RTSO'. Se distinguieron mecanismos de selección gametofítica masculina en la población de núcleos de granos de polen, mientras que en la población de plantas se observaron mecanismos de selección gametofítica y/o selección zigótica. Estos resultados demuestran que esta metodología es eficiente para realizar estudios genéticos con un gran número de marcadores moleculares sin la necesidad de generar poblaciones. Además, podría permitir la realización de proyectos de secuenciación en especies altamente heterocigóticas como los cítricos evitando la obtención de haplotipos a través de técnicas de cultivo *in vitro*.

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

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

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

Resum

Un dels principals objectius dels programes de millora genètica de mandariners és generar noves varietats que no produïsquen llavors ni induïsquen la formació de llavors en altres varietats per pol·linització creuada, com és el cas dels híbrids triploides. La manipulació del nivell de ploidia és una estratègia fonamental per a l'obtenció d'híbrids triploides de mandariner sense llavors, que es poden obtenir a partir d'hibridacions entre dos genotips diploides, com a conseqüència de la formació de gàmetes no reduïts diploides, o mitjançant hibridacions entre parentals diploides i tetraploides.

En cítrics, la citometria de flux s'ha emprat per a determinar la grandària del genoma i per a determinar el nivell de ploidia de plantes regenerades mitjançant tècniques de cultiu in vitro e hibridacions sexuals. No obstant això, no s'ha aplicat fins al moment per a l'anàlisi del nivell de ploidia de grans de pol·len madurs de genotips diploides i euploides, a causa de la inexistència d'una metodologia apropiada d'extracció de nuclis. D'altra banda, Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) és una metodologia que permet, a partir de poblacions o subpoblacions de nuclis de grans de pol·len, el seu aïllament i classificació segons el seu nivell de ploidia per a la seua posterior anàlisi genètica amb marcadors moleculars. No obstant això, les anàlisis genètiques amb marcadors moleculars es troben limitats per l'escassa quantitat d'ADN que posseeixen els nuclis individualitzats. Una opció per a solucionar aquest problema és l'ús de kits de Whole Genome Amplification (WGA) que permeten generar major quantitat d'ADN a partir del contingut d'un sol nucli. La utilització conjunta d'aquestes dues metodologies mai s'ha aplicat en cítrics i la seua implementació permetria generar nou coneixement sobre la seua biologia reproductiva i la seua aplicació en els programes de millora genètica.

Les hibridacions sexuals $2x \times 4x$ i $4x \times 2x$ són dues estratègies que permeten obtenir elevades poblacions d'híbrids triploides. Les estructures genètiques d'aquests híbrids depenen en gran manera dels models de segregació cromosòmica dels parentals tetraploides, ja que influeixen en la transmissió de l'heterocigotitat parental al gàmet diploide. Existeixen dos models extrems de segregació de plantes tetraploides, disòmic i tetrasòmic, encara que també s'han descrit models de segregació intermèdia. En aquest sentit, és clau realitzar estudis amb marcadors moleculars que permeten determinar els models de segregació dels parentals tetraploides utilitzats en els programes de millora genètica de mandariner per a optimitzar i seleccionar les estratègies més eficients per a l'obtenció d'híbrids triploides amb determinades característiques.

En aquesta tesi, s'ha utilitzat per primera vegada la citometria de flux per a determinar el nivell de ploidia de poblacions de grans de pol·len de diferents espècies diploides, triploides i tetraploides de cítrics, demostrant que els grans de pol·len madurs són binucleats. Els grans de pol·len de genotips diploides van mostrar dos pics perfectament definits amb diferents intensitats de fluorescència, corresponent el primer pic a la població de nuclis vegetatius i el segon, als nuclis generatius. Únicament s'han identificat dues excepcions amb pics addicionals en els seus histogrames; el tangor 'CSO' i la llima 'Mexicana'. El tangor 'CSO' va mostrar un pic addicional de fluorescència equivalent a la suma dels valors de fluorescència

dels nuclis vegetatius i generatius, la qual cosa suggereix que els nuclis romanen units després del seu aïllament dels grans de pol·len mitjançant el mètode de ruptura i aïllament; i corroborat posteriorment mitjançant marcadors moleculars, ja que les tres poblacions de nuclis presenten el mateix origen genètic. No obstant això, en la llima `Mexicana´ s'han identificat per primera vegada en cítrics gàmetes no reduïts de pol·len mitjançant citometria de flux. Les poblacions de grans de pol·len de genotips triploides no van evidenciar pics clars i definits en els histogrames obtinguts, mentre que els genotips tetraploides van revelar dues poblacions de nuclis, una de nuclis vegetatius i l'altra de nuclis generatius, amb el doble d'intensitat de fluorescència que els seus nuclis homòlegs en els genotips diploides.

Una vegada posada punt una metodologia per a determinar el nivell de ploidia dels nuclis de grans de pol·len, utilitzant la tècnica FACS, es van aïllar individualment els nuclis de les poblacions identificades amb l'objectiu d'analitzar l'origen i l'estructura genètica dels nuclis dels grans de pol·len de genotips diploides i tetraploides i identificar els mecanismes implicats en la formació de gàmetes no reduïts de llima `Mexicana´, mitjançant l'amplificació del genoma de cada nucli utilitzant un kit de WGA i la seua posterior anàlisi amb marcadors moleculars de tipus Simple Sequence Repeat (SSR) i Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Inicialment es van aïllar nuclis de les tres poblacions identificades en l'histograma del tangor `CSO´ i es va demostrar la presència d'un sol al·lel, confirmant que corresponen a nuclis de grans de pol·len reduïts (normals). Aquests resultats són de gran importància per a una correcta interpretació dels histogrames, la qual cosa ens permet afirmar que la presència d'un segon (o tercer) pic en les poblacions de grans de pol·len no correspon amb la presència de grans de pol·len no reduïts.

L'ús combinat de FACS i WGA es va mostrar com una metodologia vàlida i adequada per a la individualització i amplificació genòmica de nuclis haploides de grans de pol·len de genotips diploides, permetent el seu posterior genotipat amb marcadors SSR i SNP. Posteriorment, aquesta metodologia es va utilitzar temptativament per a identificar el mecanisme implicat en la formació de gàmetes no reduïts de pol·len de llima `Mexicana´ i per a estudiar la manera de segregació cromosòmica de les plantes tetraploides. Per a això, i com a control, es van aïllar i van amplificar nuclis de fulles de genotips diploides que es van analitzar amb diferents marcadors heterozigots. Els resultats obtinguts a partir dels nuclis diploides de fulla van evidenciar una amplificació desbalanceada cap a un dels dos al·lells i per tant no amplificant els al·lells corresponents en la proporció esperada (1:1). Aquests resultats indiquen que aquesta metodologia no és adequada per a la realització d'estudis genètics amb nuclis no haploides.

Amb la posada a punt de la metodologia combinada per a individualitzar i amplificar nuclis haploides per a la seua posterior anàlisi amb múltiples marcadors moleculars, es van estudiar per primera vegada esdeveniments de recombinació i distorsions de la segregació (SD) en nuclis de grans de pol·len haploides. L'anàlisi dels esdeveniments de recombinació es va realitzar en el cromosoma 1 de la llima `Eureka´, revelant la presència de fins a cinc esdeveniments en un braç i quatre en l'altre braç, amb una mitjana 1,97 punts de recombinació per gàmeta. Així mateix, cinc mostres van mostrar absència d'esdeveniments de recombinació per als marcadors moleculars utilitzats. L'SD es va analitzar en una població

de nuclis de grans de pol·len individualitzats del tangor `CSO` i una població de plantes (`RTSO`) que es va obtenir a partir del creuament entre el tangor `RTO` com a parental femení i el tangor `CSO` com a parental masculí. L'SD obtinguda en els nuclis de grans de pol·len del tangor `CSO` va ser lleugerament menor (13.8%) respecte a l'observada en la població de plantes `RTSO` (20.7%). Totes dues poblacions van mostrar SD sincronitzada en el grup de lligament (GL) 2, mentre que el GL 7 només va mostrar una SD en la població de plantes `RTSO`. Es van distingir mecanismes de selecció gametofítica masculina en la població de nuclis de grans de pol·len, mentre que en la població de plantes es van observar mecanismes de selecció gametofítica i/o selecció zigòtica. Aquests resultats demostren que aquesta metodologia és eficient per a realitzar estudis genètics amb un gran nombre de marcadors moleculars sense la necessitat de generar poblacions. A més, podria permetre la realització de projectes de seqüenciació en espècies altament heterocigòtiques com els cítrics evitant l'obtenció de haplotipos a través de tècniques de cultiu *in vitro*.

L'obtenció de dues poblacions d'híbrids triploides generades amb el mandariner `Moncada` tetraploide en hibridacions $2x \times 4x$ i $4x \times 2x$ ens ha permès estudiar els models de segregació cromosòmica a nivell masculí i femení d'un mateix genotip. Com a parental femení, va presentar un model de segregació tetrasòmica completa en set dels nou GLs (GL1, GL2, GL3, GL5, GL6, GL7, i GL9). No obstant això, en el GL8 es va observar un model d'herència intermèdia amb tendència cap a la tetrasomia, mentre que el GL4 va mostrar una clara herència intermèdia. Com a parental masculí, set dels GL es van ajustar a un model de segregació tetrasòmica, excepte en els GL 5 i 6 que van presentar models de segregació intermedis. Aquestes variacions en la manera de segregació a nivell de GL segons la direcció de les hibridacions tenen importants implicacions en els programes de millora genètica. Depenent en quin GL es trobe un gen que controle un caràcter d'interès, la regulació genètica del caràcter i la direcció del creuament, la segregació obtinguda en la descendència serà diferent.

A més, el mandariner `Moncada` $4x$ va presentar valors significatius de DR. Com a parental femení es van observar valors significatius en cinc GLs (GL2, GL3, GL4, GL7 i GL9) i com a parental masculí en sis GLs (GL2, GL3, GL4, GL5, GL6 i GL7). La producció de valors més elevats de homocigositat podria ser útil per als programes de millora genètica de mandariner dirigits a l'obtenció d'híbrids triploides a causa del potencial efecte de "neteja" que pot tindre la DR en revelar al·lels nocius o deleteris per a la selecció i augmentar les configuracions al·lèliques estranyes però favorables que poden detectar-se mitjançant marcadors moleculars.

El coneixement generat en aquesta tesi doctoral sobre l'anàlisi del nivell de ploidia i individualització de nuclis de grans de pol·len de genotips diploides, triploides i tetraploides de cítrics mitjançant FACS i posterior amplificació genòmica per al seu genotipat amb marcadors SSR i SNP, així com el coneixement dels models de segregació cromosòmica del mandariner `Moncada` $4x$ permetrà un desenvolupament més eficient dels programes de millora genètica de cítrics amb l'objectiu d'obtenir noves varietats d'elit sense llavors per al mercat de consum en fresc. De fet, els resultats obtinguts s'estan aplicant actualment, i suposen un punt de partida per a realitzar nous treballs de recerca.

Abstract

One of the main objectives of mandarin breeding programs is to generate new varieties that neither produce seeds nor induce seed formation in other varieties by crossed pollination, as with triploid hybrids. Ploidy manipulation is a fundamental strategy to obtain mandarin triploid hybrids without seeds, which can be achieved by hybridisations between two diploid genotypes as a result of non-reduced diploid gamete formation, or between diploid and tetraploid parentals.

In citrus, flow cytometry has been employed to determine not only genome size, but also the ploidy level of regenerated plants by *in vitro* culture techniques and sexual hybridisations. Nevertheless, flow cytometry has not yet been applied to analyse the ploidy level of mature pollen grains of diploid and euploid genotypes because no suitable nuclei extraction methodology exists. Moreover, the Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) methodology isolates and classifies populations or pollen grain nuclei subpopulations according to their ploidy level to then submit them to genetic analyses with molecular markers. Nonetheless, genetic analyses with molecular markers are limited due to the small amount of DNA that individual nuclei possess. One option to overcome this problem is to use Whole Genome Amplification (WGA) kits that can obtain more DNA from the content of a single nucleus. The joint use of both these methodologies has never been applied to citrus, and its implementation will generate new knowledge about their reproductive biology and application in genetic improvement programs.

2x X 4x and 4x X 2x sexual hybridisations are two strategies that allow to recover large populations of triploid hybrids. To a great extent, the genetic structures of these hybrids depend on the chromosome segregation models of tetraploid parentals as they influence the parental heterozygosity transmission to diploid gametes. Two extreme tetraploid plant segregation models exist, disomic and tetrasomic, and intermediate segregation models have also been described. Therefore, it is key to conduct studies with molecular markers to determine the segregation models of the tetraploid parents employed in mandarin breeding programs to optimise and select the most efficient strategies to obtain triploid hybrids with certain characteristics.

In this thesis, flow cytometry has been used for the first time to determine the ploidy level of pollen grain populations from different diploid, triploid and tetraploid citrus species to demonstrate that mature pollen grains are binucleate. The pollen grains of diploid genotypes show two perfectly defined peaks with different fluorescence intensities: the first peak corresponds to the vegetative nuclei population and the second to generative nuclei. Only two exceptions have been identified with additional peaks in their histograms; 'CSO' tangor and 'Mexican' lime. 'CSO' tangor shows another equivalent fluorescence peak to the sum of the fluorescence values of vegetative and generative nuclei, which suggests that nuclei continue to bind after being isolated from pollen grains via the rupture and isolation method. This was later corroborated by molecular markers because the three nuclei populations are of the same genetic origin. Nonetheless, non-reduced pollen

gametes were identified in citrus for the first time in 'Mexican' lime by flow cytometry. The pollen grain populations of triploid genotypes evidenced no clear well-defined peaks in the obtained histograms, whereas two nuclei populations were revealed with tetraploid genotypes, one vegetative nuclei population and another generative nuclei population, with 2-fold higher fluorescence intensity than their homologous nuclei in the diploid genotypes.

After setting up the methodology to determine the ploidy level of pollen grain nuclei by FACS, the nuclei of the identified populations were individually isolated to analyse the origin and genetic structure of the pollen grain nuclei of both the diploid and tetraploid genotypes, and to identify the mechanisms involved in non-reduced 'Mexican' lime gamete formation by amplifying the genome of each nucleus with a WGA kit to then be analysed by Simple Sequence Repeat- (SSR) and Single Nucleotide Polymorphism- (SNP) molecular markers. Initially, the nuclei of the three populations identified on the 'CSO' tangor histogram were isolated, and the presence of a single allele was demonstrated, which confirmed that they corresponded to (normal) reduced pollen grain nuclei. These results are most important to correctly interpret histograms and enable us to state that the presence of a second (or third) peak in pollen grain populations does not correspond to the presence of non-reduced pollen grains.

The combined use of FACS and WGA is an adequate methodology for the individualisation and whole genome amplification of haploid pollen grain nuclei of diploid genotypes because it allows subsequent genotyping with SSR and SNP markers. Later this methodology was used to tentatively identify the mechanism involved in the formation of non-reduced 'Mexican' lime pollen gametes, and to study the segregation pattern of tetraploid plants. To this end, and as a control, the nuclei of leaves from diploid genotypes were isolated and amplified, which were analysed with different heterozygote markers. The results obtained from diploid leaf nuclei evidenced an unbalanced amplification towards one of the two alleles, thus the corresponding alleles were not amplified in the expected proportion (1:1). These results indicate that this methodology is not suitable for conducting genetic studies with non-haploid nuclei.

After setting up the combined methodology to individualise and amplify haploid nuclei to then analyse them with many molecular markers, recombination events and segregation distortions (SDs) were studied for the first time in haploid pollen grain nuclei. The analysis of recombination events was carried out in chromosome 1 of 'Eureka' lemon, which revealed the presence of up to five events on one arm and four on the other, with an average of 1.97 recombination points per gamete. Five samples showed that recombination events were absent for the employed molecular markers. The SD was analysed in a population of pollen grains that were individualised from 'CSO' tangor and a plant population ('RTSO') obtained by a cross between 'RTO' tangor as female parent and 'CSO' tangor as male parent. The SD obtained from the pollen grain nuclei population of 'CSO' tangor was slightly lower (13.8%) than that observed in the 'RTSO' plant population (20.7%). Both populations showed a synchronised SD in the linkage groups 2 (LG2), whereas LG7 only displayed one SD in the 'RTSO' plant population. Gametophytic selection mechanisms were observed in the pollen grain nuclei population, while gametophytic selection and/or zygotic

selection mechanisms were noted in the plant population. These results reveal that this methodology is efficient for conducting genetic studies using a large number of molecular markers without having to recover progenies. It could also allow sequencing projects to be undertaken in highly heterozygotic species like citrus to avoid obtaining haplotypes by *in vitro* culture techniques.

The recovery of two different triploid hybrid populations generated with the tetraploid 'Moncada' mandarin in 2x X 4x and 4x X 2x sexual hybridisations enabled us to study chromosomal segregation models of the same genotype acting as male or female parent. As a female parent, it presented a complete tetrasomic segregation model in seven of the nine GLs (GL1, GL2, GL3, GL5, GL6, GL7 and GL9). However, an intermediate inheritance model was observed in GL8 with a tendency towards tetrasomy, while GL4 displayed clear intermediate inheritance. As a male parent, seven GLs matched a tetrasomic segregation model, save in GL5 and GL6, which presented intermediate segregation models. These variations in GL segregation according to the direction of hybridisations have major implications for genetic breeding programs. Depending on which GL a gene is found in, which controls not only a character of interest, but also the genetic regulation of the character and the direction of the cross, the segregation obtained in the progenies will differ.

Moreover, the tetraploid 'Moncada' mandarin displayed important double reduction (DR) values. Significant values were also observed as female parent in five GLs (GL2, GL3, GL4, GL7 and GL9) and in six GLs (GL2, GL3, GL4, GL5, GL6 and GL7) as male parent. The production of higher levels of homozygosity could be useful in triploid mandarin breeding for the potential cleaning effect that DR can have by revealing deleterious alleles to selection. DR also could increase the accumulation of rare but favorable allelic configurations through selection with molecular markers.

Knowledge acquired in this doctoral thesis on the ploidy level analysis and individualisation of pollen grain nuclei of diploid, triploid and tetraploid citrus genotypes by FACS, followed by WGA and genotyping with SSR and SNP markers, as well as knowledge about the segregation patterns of tetraploid 'Moncada' mandarin, will allow citrus breeding programs to be more efficiently run with the objective to recover new elite seedless varieties for the fresh-fruit market. In fact, the obtained results are presently being applied and act as a starting point to conduct new research works.

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Importancia económica de los cítricos	1
1.2	Taxonomía, origen y distribución.....	2
1.3	Biología reproductiva de cítricos.....	3
1.3.1	Morfología floral	3
1.3.2	Granos de polen	4
1.3.3	Óvulos.....	5
1.3.4	La doble fecundación	5
1.3.5	Apomixis.....	6
1.3.6	Autoincompatibilidad.....	7
1.3.7	Esterilidad masculina y femenina.....	8
1.4	Problemática de los programas de mejora genética de mandarina	9
1.5	Estrategias de mejora genética en mandarina.....	11
1.5.1	Hibridación sexual	12
1.5.1.1	Hibridación sexual a nivel diploide.....	12
1.5.1.2	Hibridación sexual a nivel triploide	13
1.6	Poliploidía en cítricos	14
1.6.1	Poliploidización sexual	15
1.6.2	Formación de gametos diploides a partir de genotipos tetraploides	17
1.7	Herramientas biotecnológicas para el análisis del nivel de ploidía y genotipado de granos de polen de cítricos	18
1.7.1	Citometría de flujo	18
1.7.1.1	Aplicaciones en plantas	18
1.7.1.2	Problemática de la extracción de núcleos intactos de granos de polen para el análisis del nivel de ploidía.....	20
1.7.2	Genotipado de granos de polen individualizados con marcadores moleculares.....	22
1.7.2.1	Técnicas de individualización y extracción de ADN de granos de polen ..	22
1.7.2.2	Técnicas utilizadas en el genotipado de granos de polen	24
1.7.3	Marcadores moleculares.....	25
2.	Objetivos.....	28
3.	Capítulos	31
CAPITULO I	33

Assessing Ploidy Level Analysis and Single Pollen Genotyping of Diploid and Euploid Citrus Genotypes by Fluorescence-Activated Cell Sorting and Whole-Genome Amplification	33
--	----

CAPITULO II 57

Analysis of crossover events and allele segregation distortion in interspecific citrus hybrids by single pollen genotyping.....	57
---	----

CAPITULO III 119

Male and female inheritance patterns in tetraploid 'Moncada' mandarin ...	119
---	-----

4. *Discusión General* 197

5. *Conclusiones generales*..... 207

6. *Bibliografía* 209

Índice de Tablas

Table I-I Citrus genotypes used to measure the relative DNA content of pollen grains by flow cytometry.....	39
Table I-II Information about the molecular markers used in citrus pollen grain and leaf nuclei genotyping, including GenBank accession numbers, genetic distances, noted alleles and bibliographic references.	42
Table I-III Results by linkage group (LG) and molecular marker of the diploid genotype `CSO` for populations of vegetative nuclei 1V, generative nuclei 1G and attached nuclei 1VG.	50
Table II-I Information about molecular markers used for genotyping `CSO` tangor pollen nuclei, `RTSO` progeny and its parents, indicating accession number in Gene Bank or Phytozome, position in the reference clementine genetic map, noted alleles and reference.....	65
Table II-II Information about molecular markers used for genotyping `Eureka` lemon pollen nuclei, indicating accession number in Gene Bank or Phytozome, position in the reference clementine genetic map, noted alleles and reference.	66
Table II-III Number of observed crossover events on each arm of chromosome 1 based on analysis of haploid pollen nuclei from `Eureka` lemon using twelve SSR and SNP markers.	70
Table II-IV Multilocus configuration of the haploid pollen nuclei population from `Eureka` lemon analyzed with twelve SSR and SNP markers located on both arms of chromosome 1. Light red indicates the presence of alleles inherited from citron, and green indicates those from sour orange.	72
Table II-V Analysis of Mendelian allelic segregation (Chi-square test) for `CSO` tangor pollen nuclei population and `RTSO` progeny.	74
Table III-I Primer sequences of the new SNP markers developed in this paper for use in KASPar™ assay.....	126
Table III-II Information about molecular markers used for genotyping diploid gametes originated by tetraploid `Moncada` mandarin as male and female parent, indicating accession number in Gene Bank or Phytozome, position in the reference clementine genetic map, noted alleles in `Moncada` and reference.	127

Table III-III Estimation of parental heterozygosity restitution (PHR) frequency by diploid 'Moncada' ovules for each marker in triploid hybrids obtained from MA population and analysis of Mendelian allelic segregation (Chi-square test).....	132
Table III-IV Estimation of parental heterozygosity restitution (PHR) frequency by diploid 'Moncada' pollen for each marker in triploid hybrids recovered from CM population and analysis of Mendelian allelic segregation (Chi-square test).....	133
Table III-V Estimation of the parental heterozygosity restitution for each LG, differentiated groups between genotypes analyzed and genetic distance in triploid populations arising from tetraploid 'Moncada' as male and female parent.	136
Table III-VI Estimation of Preferential Pairing (PP) and Double Reduction (DR) rate for tetraploid 'Moncada' mandarin as female parent for markers located close and far from the centromere within each of the nine LGs.....	141
Table III-VII Estimation of Preferential Pairing (PP) and Double Reduction (DR) rate for tetraploid 'Moncada' mandarin as male parent for markers located close and far from the centromere within each of the nine LGs.	142

Índice de Tablas Suplementarias

Supplementary Table II.I Genotyping of 'CSO' haploid pollen nuclei with SSR and SNP markers distributed across the nine linkage groups of reference.	81
Supplementary Table II.II Genotyping of 'RTO' diploid progeny with SSR and SNP markers distributed across the nine linkage groups of reference clementine.	91
Supplementary Table III.I Genetic configuration of diploid gametes produced by tetraploid 'Moncada' mandarin used as male parent	147
Supplementary Table III.II Genetic configuration of diploid gametes produced by tetraploid 'Moncada' mandarin used as female parent.	173

Índice de Figuras

Figura 1. Ilustración de las partes constitutivas y disposición en una flor de lima ‘Mexicana’.	4
Figura 2. Ilustración del proceso de doble fecundación a) germinación del grano polen y crecimiento del tubo polínico a través del pistilo hasta alcanzar el óvulo, b) atracción del tubo polinico por las sinérgidas, donde detiene su crecimiento, previa diferenciación de los dos núcleos generativos, c) proceso de la doble fecundación, una célula se fusiona con la celula central que contiene lo núcleos polares y la otra se fusiona con la ovocélula (Adaptado de Berger et al., 2008).	6
Figure I-I Distribution of representative frequencies and images showing the heterogeneity of pollen diameters in three citrus genotypes: a-b: ‘Corsican’ citron, c-d: ‘Fortune’ mandarin, e-f: ‘Mexican’ lime. Scale bars, 30 µm.....	44
Figure I-II Flow cytometric histograms of DAPI-stained leaf nuclei of the haploid control plant IVIA-638 (a) and the diploid control plant IVIA-039 (b) of clementine.....	45
Figure I-III Flow cytometric measurements of DAPI-stained leaf and pollen nuclei of diploid citrus genotypes: a. ‘CSO’ tangor leaf. b. ‘Moncada’ mandarin pollen. c. ‘CSO’ tangor pollen. d. ‘Mexican’ lime leaf. e. ‘Mexican’ lime pollen. Inserts in c show examples of flow sorted pollen nuclei of the corresponding histogram peaks of ‘CSO’ tangor. V, G and VG represent vegetative, generative and vegetative plus generative pollen nuclei, respectively. Please note that the histograms of ‘CSO’ tangor and ‘Mexican’ lime were recorded on different days with different cytometer settings resulting in a variation in the peak positions when both genotypes are compared with each other.	47
Figure I-IV Flow cytometric measurements of leaf and pollen nuclei of ‘Eureka’ lemon. a. Diploid ‘Eureka’ lemon leaf, b. Pollen of diploid ‘Eureka’ lemon. c. Pollen of tetraploid ‘Eureka’ lemon.....	48
Figure I-V Representative dispersion diagram of PCR products of the foliar nuclei amplified with the WGA kit of the four diploid genotypes analyzed.....	52
Figure II-I Representative dispersion diagram of PCR products obtained with CIC5087-01 SNP marker of haploid pollen grains nuclei amplified with WGA kit from the ‘CSO’ diploid genotype	68
Figure II-II Electropherograms of a diploid hybrid recovered from hybridization between ‘RTO’ diploid tangor as female parent and the ‘CSO’ diploid tangor as male parent with CX06F23 SSR marker.	69

Figure II-III Recombination frequency along chromosome 1 determined by haploid pollen nuclei genotyping of 'Eureka' lemon. Red point Indicated relative position of centromere according to Aleza et al., (2015).	73
Figure II-IV Neighbor-Joining tree obtained from allelic data of 'CSO' pollen nuclei population (red), and the male gametes from 'RTSO' progeny (green).	76
Figure III-I Electroferograms obtained using the CI01F04a SSR marker in: a) tetraploid 'Moncada', b) diploid 'Anana', c) triallelic triploid hybrid MA14, d) triploid hybrid MA50 with allelic dose correction using 199/210 ratio from MA14 as a baseline.	131
Figure III-II Distribution of PHR at the gamete level in the diploid gametes produced by tetraploid 'Moncada' mandarin used as female (red) or male parent (blue).	134
Figure III-III Distribution of PHR at the marker level in the diploid gametes originated by tetraploid 'Moncada' mandarin as female (red) and male parent (blue).	134
Figure III-IV Dendrograms corresponding to the genetic analysis performed with SSR and SNP markers obtained by calculating the Simple Matching Dissimilarity Index and construction of the tree by Weighted Neighbor-Joining of two populations of triploid hybrids regenerated from crosses a) tetraploid 'Moncada' x 'Anana' and b) 'Clemenules' x tetraploid 'Moncada'. The red circle highlights the position of tetraploid 'Moncada'. The green circle highlights the group of hybrids furthest from tetraploid 'Moncada'.	137

Listado de abreviaciones

CM:	Hybridization between `Clemenules´ mandarin and `Moncada´ mandarin.
COs:	Crossovers
CSO:	Diploid hybrid tangor (<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus sinensis</i>)
DAPI:	4',6-diamidino- 2-phenylindole
DNA:	Deoxyribonucleic acid
DR:	Double Reduction
FACS:	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDR:	First Division Restitution
GIS:	Gametophytic Incompatibility System
GL:	Grupo de Ligamiento
IVIA:	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
LGs:	Linkage Groups
MA:	Hybridization between `Moncada´ mandarin and `Anana´ mandarin.
MDA:	Multiple Displacement Amplification
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PHR:	Parental Heterozygosity Restitution
PP:	Preferential Pairing
RTO:	Diploid hybrid tangor (<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i>)
RTSO:	Hybridization between `RTO´ tangor and `CSO´ tangor.
SD:	Segregation Distortion
SDR:	Second Division Restitution
SI:	Self-incompatibility
SNP:	Single Nucleotide Polymorphisms
SSR:	Simple Sequence Repeats
WGA:	Whole Genome Amplification

1. Introducción

1.1 Importancia económica de los cítricos

Los cítricos se cultivan en un cinturón que abarca del Ecuador hasta los 40° de latitud hacia ambos lados, norte y sur. Las zonas aptas para su cultivo corresponden a regiones tropicales y subtropicales que presenten condiciones de suelo y clima favorables (Saunt, 1990).

Los cítricos son de gran importancia económica a nivel mundial, con una producción total de más de 124 millones de toneladas y una superficie cultivada de 9,2 millones de hectáreas en 2017. Los principales países productores son China, Brasil, India, Estados Unidos y España (FAO, 2019).

Desde el punto de vista agronómico, se pueden diferenciar cuatro grupos varietales: naranjos dulces, mandarinos, limones / limas y pomelos. La producción mundial está liderada por naranjos dulces, con 66 millones de toneladas (26,5%) seguida de mandarinos, con 32 millones de toneladas (53,9%), limones / limas, con 15 millones de toneladas (12,9%) y pomelos, con 8 millones de toneladas (6,7%).(FAO, 2019).

Aproximadamente un 20% de la producción de cítricos se procesa, principalmente naranjos dulces para la producción de zumo. Los principales países productores de zumo son Brasil y Estados Unidos, que producen más del 65% del mercado mundial. En relación con los mandarinos, más del 95% de la producción mundial se destina al consumo fresco (FAO, 2019).

España produjo 7,5 millones de toneladas de cítricos en 2018, con una superficie cultivada de más de 290.000 hectáreas, produciendo principalmente naranjos dulces (52%) y mandarinos (32%). España exporta el 41,5 % de la producción de cítricos, siendo el primer exportador mundial (MAPA, 2019).

La Comunidad Valenciana es el primer productor de cítricos español con 4 millones de toneladas, lo que representa aproximadamente el 54% de la producción total de cítricos, con una superficie cultivada de más de 160.000 hectáreas (MAPA, 2019). Su producción está liderada por naranjos dulces (51,9%) y mandarinos (48,1%). Dentro del grupo de los naranjos dulces, el 84% de la producción se basa en naranjas de tipo Navel seguido de Sanguinas (13%), Valencias y Blancas (3%). Respecto al grupo de los mandarinos, el 66% de la producción corresponde a las Clementinas, el 24% a híbridos del tipo mandarino y el 10% a Satsumas (MAPA, 2019).

1.2 Taxonomía, origen y distribución

El género *Citrus* pertenece a la familia *Rutaceae* (orden Geraniales, suborden Geranineae). Esta familia comprende seis subfamilias, dentro de la cuales se encuentra la subfamilia *Aurantioideae* que se divide en dos tribus, *Clauseneae* y *Citreae*. A su vez, la tribu *Citreae* se divide en tres subtribus, donde destaca la subtribu *Citrinae* que comprende los géneros *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Clymenia*, *Fortunella*, *Poncirus* y *Citrus*, que son los seis géneros considerados cítricos verdaderos (Swingle and Reece, 1967). Los portainjertos más comúnmente cultivados pertenecen al género *Poncirus* y sus híbridos, fundamentalmente con especies del género *Citrus* como los Citranges (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osb.), Citrumelos (*P. trifoliata* x *C. paradisi* Macf.) o Citrandarines (*P. trifoliata* x *C. reticulata* Blanco.), mientras que el género *Citrus* abarca las variedades más cultivadas a nivel comercial.

Es de destacar el desacuerdo taxonómico en la clasificación botánica de los cítricos, debido a su amplia diversidad morfológica, compatibilidad sexual entre especies y la apomixis parcial que presentan muchos genotipos. Son comúnmente aceptados dos sistemas diferentes de clasificación, el propuesto por Swingle (1946) y Swingle y Reece (1967), que reconocen 16 especies en el género *Citrus* y el sistema de Tanaka (1977), que incluye 162 especies. Ninguno de estos dos sistemas de clasificación está bien adaptado a la realidad, pero el sistema de Tanaka es el que mejor se ajusta a las características agronómicas de los distintos grupos y es el que generalmente se utiliza en los principales bancos de germoplasma de cítricos (Krueger and Navarro, 2007).

Estudios realizados mediante taxonomía numérica (Scora, 1975; Barrett and Rhodes, 1976; Mabberley, 1997) y con marcadores moleculares (Herrero et al., 1996; Federici et al., 1998; Nicolosi et al., 2000; Luro et al., 2001) sugieren que los cítricos actuales se originaron a partir de tres especies ancestrales: cidro (*C. medica* L.), mandarino (*C. reticulata*) y zamboa (*C. maxima* (Burm) Merr.). Estudios más recientes corroboran esta teoría e indican que los cítricos actuales se originaron a partir de estas tres especies ancestrales y añaden una más, el *C. micrantha* Wester (García-Lor et al., 2012, 2013a; Ollitrault et al., 2012b; Wu et al., 2014, 2018; Carbonell-Caballero et al., 2015). Durante la evolución y a partir de sucesivas hibridaciones entre estas cuatro especies ancestrales se originaron las actuales especies secundarias de los cítricos, limas (*C. aurantifolia* Christm. Swing.), limones (*C. limon* (L.) Burm.), naranjos amargos (*C. aurantium* L.) y dulces (*C. sinensis*) y pomelos (*C. paradisi*), así como otras variedades de mandarino (*C. reticulata*) e híbridos de mandarinos con gran importancia económica como los tangores (naranja dulce x mandarino) y los tangelos (mandarino x pomelo). La mayoría de las especies secundarias proceden de un único híbrido original, que se ha perpetuado mediante propagación vegetativa y apomixis. La variabilidad fenotípica en estas especies se ha originado por mutaciones espontáneas en campo y como consecuencia la variabilidad genética intraespecífica existente es muy baja y además presentan elevada heterocigosidad (García-Lor et al. 2012, 2013b), lo que en la práctica impide la realización de programas de mejora genética mediante hibridación sexual. Una

excepción es el grupo de los mandarinos en el cual se ha observado una amplia variabilidad genética (García-Lor et al. 2015), que ha permitido el establecimiento de programas de mejora genética mediante hibridación sexual (Starrantino and Recupero, 1982; Ollitrault and Navarro, 2012a; Grosser et al., 2015; Navarro et al., 2015) mientras que la mayoría de las variedades de limón, pomelo, naranja dulce, satsumas y clementinas se han obtenido fundamentalmente mediante la selección de mutaciones espontáneas (Saunt, 1990).

1.3 Biología reproductiva de cítricos

1.3.1 Morfología floral

La morfología floral de los cítricos fue descrita minuciosamente por Shneider y Cameron y Frost en 1968, cuyo trabajo sigue vigente hasta hoy. Las flores de los cítricos son generalmente hermafroditas (Figura 1) y se presentan aisladas o agrupadas en racimos. Se distinguen cuatro verticilos: cáliz, corola, androceo y gineceo. El cáliz está compuesto por cinco sépalos de color verde unidos en su base y libres en sus extremos. La corola, está formada en general por cinco pétalos que se alternan con los sépalos. Los pétalos son de color blanco, aunque en algunos genotipos pueden presentar una coloración rosácea, son gruesos, coriáceos quizás de aspecto brillante o ceroso que envuelven al androceo y gineceo (Shneider, 1968).

El androceo está compuesto por los estambres, su número oscila entre 20 y 40 dependiendo de la especie. Los filamentos de los estambres son de color blanco, se encuentran parcialmente unidos y cada uno posee una antera con dos tecas y dos lóculos por cada teca. Dentro de los lóculos, rodeadas por el tapete, se encuentran las células madre de las microsporas responsables de la producción de los granos de polen. En variedades que desarrollan polen defectuoso, el color de la antera puede ser considerablemente más claro, mientras que las anteras que no contienen polen son de color crema pálido o blanco y, por lo general, no se produce su dehiscencia. Las anteras se disponen rodeando el gineceo a nivel del estigma o muy próximo a él. Justo dentro y por encima del punto de unión de los estambres está ubicado el disco nectarífero (Schneider, 1968).

El gineceo se encuentra apoyado sobre el disco nectarífero, representado por el pistilo, donde se reconocen tres componentes: ovario, estilo y estigma. El ovario por lo general está compuesto por 10 carpelos, aunque su número puede variar de 8 a 14. En el ángulo interno del lóculo de cada carpelo se desarrolla la placenta, que contiene los óvulos. El estilo es cilíndrico, en el cual se observan tantos canales como lóculos en el ovario. El estigma es relativamente grande, de forma similar a una esfera, y se encuentra situado en el extremo del estilo (Cameron and Frost, 1968).

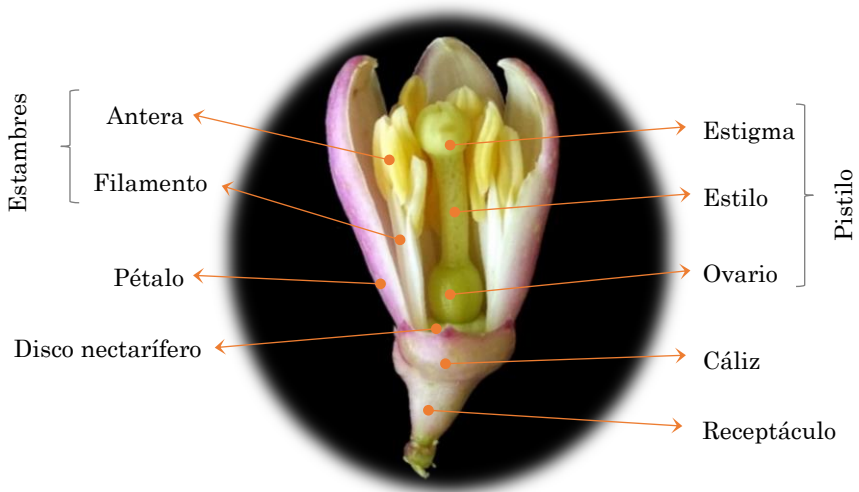


Figura 1. Ilustración de las partes constitutivas y disposición en una flor de lima `Mexicana`.

1.3.2 Granos de polen

El polen contiene los gametos masculinos y en el interior de cada uno de ellos podemos diferenciar generalmente una célula vegetativa y otra generativa. Acorde a la cantidad de células que posea el grano de polen maduro antes de su germinación se los clasifica en binucleado (una célula vegetativa y una generativa) y trinucleado (una célula vegetativa y dos células generativas) (McCormick, 2004). La diferenciación de las células vegetativas y generativas se produce en la primera división mitótica de las microsporas, generando dos células estructural y funcionalmente diferentes. Este proceso de diferenciación es acompañado de una división asimétrica, que divide la célula madre en dos células de tamaño desigual (Sax, 1935; La Cour, 1949; Tanaka, 1997). La célula vegetativa tiene un núcleo poco condensado con un gran número de orgánulos y de mayor tamaño que la generativa y acumula reservas que intervienen en la formación y crecimiento del tubo polínico. Por el contrario, la célula generativa posee un núcleo condensado y con pocos orgánulos; su función principal es la replicación del ADN para la formación de los gametos (McCormick, 1993, 2004; Alonso Peña, 2011).

La protección de los granos de polen maduros está asegurada por la presencia de una pared muy resistente denominada esporodermis. En esta pared se diferencian dos capas densas, la exina y la intina. La exina es la capa externa del grano de polen que está constituida por esporopolenina, un polímero de carotenos y sus ésteres. En la exina hay aperturas, denominados poros de germinación, que están presentes en número y posiciones variables. Tienen la doble función de permitir la salida del tubo polínico y favorecer los cambios de volumen del polen acorde a la humedad. El tamaño del grano de polen y en especial de la

estructura y la ornamentación de la superficie de la exina es característico de cada especie y pueden usarse para la clasificación de plantas. La intina es la capa más interna de la pared del grano de polen que rodea al protoplasma. Es delicada y poco resistente; está constituida de celulosa y pectina. Esta capa presenta un engrosamiento a la altura de los poros de germinación del grano de polen (Erdtman, 1986).

En la mayoría de los cítricos los granos de polen son binucleados (Cameron and Frost, 1968; Graham, 1997), presentan una estructura subreticular y de forma predominante globosa o elipsoide con cuatro poros de germinación (Frost and Soost, 1968; Kozaki and Hirai, 1981; Yinmin et al., 1981; Recupero and Starrantino, 1982; Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996). Los tamaños de los granos de polen pueden variar según la especie, pero en su mayoría oscilan entre 25 y 35 μm (Kozaki and Hirai, 1981; Yinmin et al., 1981; Recupero and Starrantino, 1982), aunque también se han observado granos de polen con tamaños excepcionalmente más grandes (Kozaki and Hirai, 1981; Honsho et al., 2016).

1.3.3 Óvulos.

Los óvulos son anátropos, con placentación axilar, organizados en dos filas a lo largo de las membranas loculares en la zona donde convergen con el eje central. Al madurar, quedan compuestos por el micrópilo, el funículo, la nucela, un saco embrionario con siete células con ocho núcleos y dos tegumentos (interior y exterior) que envuelven la nucela. El micrópilo es el orificio que tienen los tegumentos del óvulo por el cual pasa el tubo polínico del grano de polen durante el proceso de la fecundación. El funículo es un cordón que une la placenta con la base del óvulo. Cumple la función de comunicación para el transporte de los nutrientes necesarios para el desarrollo del óvulo (Cameron and Frost, 1968).

La nucela es una masa de células que están protegidas por el tegumento interior y actúan como tejido nutritivo del endospermo y a medida que se desarrolla el óvulo, las células de la nucela se van absorbiendo y desapareciendo con la expansión del endospermo. A partir de las células de la nucela, mediante un proceso de embriogénesis adventicia (apomixis), se originan embriones nucelares. Este proceso se produce únicamente en los genotipos apomícticos que son los que producen semillas poliembriónicas (Schneider, 1968) mientras que los genotipos no apomícticos producen semillas monoembriónicas que contienen un único embrión de origen sexual.

1.3.4 La doble fecundación

Este fenómeno fue descrito por primera vez en *Lilium martagon* y *Fritillaria tenella* por Sergius Nawaschin en 1898 (Nawaschin, 1898; Raghavan, 2003). Para que se lleve a cabo, es necesario en primer lugar que un grano de polen maduro compatible se deposite en el estigma receptivo de la flor, se adhiera, hidrate y germine (Figura 2a). El tubo polínico crece a través del estilo guiado por señales emitidas por los tejidos de la flor (Weterings and Russell, 2004). Es en esta fase donde las especies con granos de polen binucleados, como la mayoría de los cítricos (Frost and Soost, 1968; Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996), el

núcleo vegetativo es el responsable del crecimiento del tubo polínico y el núcleo generativo haploide se divide en dos (Figura 2b), uno de ellos fecunda a la ovocélula para dar origen al cigoto diploide, mientras que el segundo se fusiona con los dos núcleos polares que posteriormente originarán el endospermo (Figura 2c) que presenta un nivel de ploidía triploide (Dumas and Rogowsky, 2008; Bleckmann et al., 2014). En cítricos, en los híbridos triploides el nivel de ploidía del endospermo varía según el tipo de estrategia utilizada para la obtención de los híbridos. En este sentido, se obtienen embriones triploides con endospermos pentaploides en hibridaciones $2x \times 2x$, mientras que en hibridaciones $2x \times 4x$ se obtienen embriones triploides con endospermos tetraploides (Esen and Soost, 1971b, 1971a, 1973, 1977). La fecundación estimula el desarrollo de los tegumentos del óvulo, originando la cubierta interior o tegmen y la cubierta exterior o testa (Schneider, 1968).

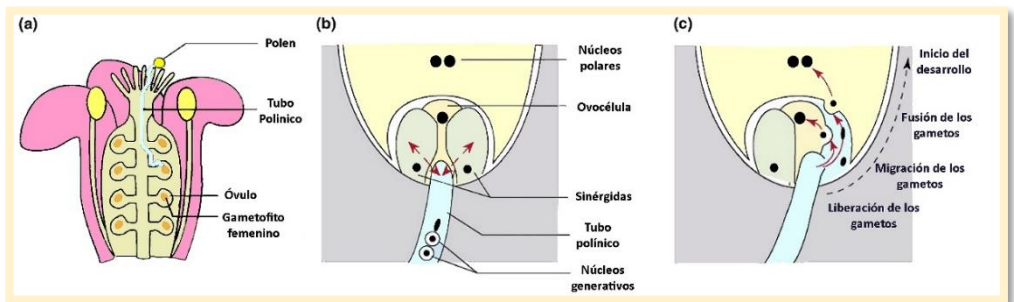


Figura 2. Ilustración del proceso de doble fecundación a) germinación del grano polen y crecimiento del tubo polínico a través del pistilo hasta alcanzar el óvulo, b) atracción del tubo polínico por las sinérgidas, donde detiene su crecimiento, previa diferenciación de los dos núcleos generativos, c) proceso de la doble fecundación, una célula se fusiona con la célula central que contiene los núcleos polares y la otra se fusiona con la ovocélula (Adaptado de Berger et al., 2008).

1.3.5 Apomixis

El término apomixis se emplea para indicar un tipo de reproducción asexual que se produce durante la formación de las semillas, denominada agamosperma (Bicknell, 2004). El mecanismo apomítico característico de los cítricos es la embriónía adventicia, y se produce cuando los embriones se forman sin que ocurra meiosis ni fecundación, desarrollándose exclusivamente por divisiones mitóticas a partir de las células de la nucela. Las plantas generadas a través de este sistema son genéticamente idénticas a la planta madre (Koltunow, 1993). En las semillas de los genotipos apomíticos los procesos sexual y apomítico ocurren en el mismo óvulo (Koltunow, 1993), produciendo semillas con un embrión de origen sexual y uno o varios de origen nucelar. Estas semillas se las conoce comúnmente con el nombre de semillas poliembriónicas. En cítricos la mayoría de los genotipos son apomíticos excepto las zamboas, los cidros y algunos genotipos de mandarina como las clementinas. Recientemente, Wang et al. (2017) identificaron que la inserción de un transposón tipo MITE (miniature inverted-repeat transposable element) en la región promotora del gen CitRWP segregaba con el carácter de apomixis a partir del

fenotipado de un elevado número de poblaciones segregantes, aunque los autores no han demostrado la función del gen.

En las semillas poliembriónicas, los embriones nucelares pueden comenzar su desarrollo antes de la fertilización (Wakana and Uemoto, 1987). En la formación del embrión maduro intervienen varios factores determinantes, siendo los principales el momento de embriogénesis nucelar y la ubicación de los embriones dentro del saco embrionario, ya que afectan directamente a la competencia por nutrientes y el espacio disponible (Frost and Soost, 1968; Koltunow, 1993). El embrión zigótico, al ubicarse más próximo a la región del micrópilo que los embriones nucelares queda desfavorecido, impidiendo su pleno desarrollo.

En los cítricos, la embrionía adventicia ha posibilitado la conservación de mutaciones espontáneas e híbridos naturales (Cameron and Frost, 1968), y es una característica muy destacada para la producción de plantas de portainjertos en los viveros de cítricos ya que posibilita obtener un gran número de plantas con las mismas características que la planta madre de forma sencilla. La embrionía nucelar se utilizó para la obtención de plantas libres de patógenos en un gran número de genotipos, ya que la gran mayoría de patógenos no se transmiten mediante el proceso de embriogénesis, hasta la aparición de la técnica del microinjerto *in vitro* de ápices caulinares (Navarro et al., 1975). Además, en las semillas de los genotipos apomícticos se produce espontáneamente la duplicación del número de cromosomas en células de la nucela. Esta característica permite la identificación de plántulas tetraploides de una forma sencilla que posteriormente cuando pierdan las características juveniles podrán ser utilizadas como parentales para la obtención de híbridos triploides mediante hibridación sexual (Cameron and Frost, 1968; Aleza et al. 2011).

1.3.6 Autoincompatibilidad

La autoincompatibilidad (SI, del inglés: Self-incompatibility) es uno de los mecanismos que ha evolucionado para fomentar la alogamia en plantas con flores y se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir semillas después de la autopolinización (de Nettancourt, 1977). La SI desempeña un rol importante para asegurar el éxito evolutivo de las plantas con flores, siendo un fenómeno genéticamente controlado. En muchos casos, está controlada por un solo *locus* conocido como '*locus S*', compuesto por un gran número de alelos (Newbigin et al., 1993). En todos los casos donde se observa este fenómeno, los granos de polen llegan al estigma de la misma planta o plantas genéticamente relacionadas, siendo incapaces de realizar la fecundación del óvulo y por lo tanto la producción de semillas (Newbigin et al., 1993). En la SI se describen dos sistemas fisiológicos: gametofítico y esporofítico.

En el SI gametofítico, el polen incompatible germina en la superficie del estigma, penetra en el estigma y crece por el estilo, en donde en algún momento detiene su crecimiento. Sin embargo, en el SI esporofítico el crecimiento del tubo polínico generalmente se detiene en la superficie del estigma. La compatibilidad del grano de polen depende del reconocimiento

entre las proteínas que se encuentran en la esporodermis de los granos de polen y los receptores del estigma (Newbigin et al., 1993).

Asimismo, existen mecanismos de SI asociados a la morfología floral donde se distinguen la incompatibilidad homomórfica y heteromórfica. En la incompatibilidad homomórfica no es posible distinguir diferencias morfológicas en la flores entre cruzamientos compatibles e incompatibles, mientras que en las heteromórficas la incompatibilidad está asociada a diferencias en el tamaño y forma de las flores, especialmente en lo referente a sus órganos sexuales (Gibbs, 1986).

En los cítricos la SI está presente en la mayoría de las zamboas (Yamamoto et al., 2006; Ngo et al., 2010), clementinas con la excepción de la clementina 'Monreal' y otros híbridos de mandarino como por ejemplo 'Fortune' (*C. clementina* x posiblemente (*C. paradisi* x *C. reticulata*)), 'Minneola' (*C. paradisi* x *C. reticulata*), 'Page' ((*C. paradisi* x *C. reticulata*) x *C. clementina*) y 'Nova' (*C. clementina* x ((*C. paradisi* x *C. reticulata*)) entre otros (Yamamoto et al., 2006; Distefano et al., 2009a, 2009b; Zhang et al., 2018). También se ha descrito en algunos genotipos de limón como 'Xiangshui' y 'Kagzi Kalan' (Zhang et al., 2012, 2018; Kakade et al., 2017). El sistema de autoincompatibilidad presente en los cítricos es homomórfico y de tipo gametofítico (Soost, 1965; Ollitrault et al., 2007). En un estudio reciente Liang et al. (2020) han demostrado que este sistema es S-RNasa dependiente, en el cual identificaron que cada S-RNasa está vinculada aproximadamente hasta a nueve genes *SLF* (S-Locus F-box genes).

1.3.7 Esterilidad masculina y femenina

La esterilidad es la incapacidad de una planta para producir gametos o cigotos viables para la fecundación. Las causas que provocan la esterilidad generalmente están asociadas a la falta de homología entre los genomas, alteraciones cromosómicas y a genes que afectan los órganos reproductores (Iwamasa, 1966; Ollitrault et al., 2007; Yamamoto, 2014).

Iwamasa (1966) y Ollitrault et al. (2007) resumieron las diferentes alteraciones cromosómicas implicadas en la esterilidad masculina a nivel diploide en cítricos. La asinápsis está controlada genéticamente en 'Mukaku Yuzu' (*C. junos* Sieb. ex Tan.) o puede ser inducida por bajas temperaturas en limón 'Eureka' y lima 'Mexicana' (Nakamura, 1943; Iwamasa and Iwasaki, 1962; Iwamasa, 1966; Yamamoto, 2014). Las translocaciones recíprocas son la principal causa de esterilidad en naranjo dulce 'Valencia' mientras que las inversiones cromosómicas son un motivo de esterilidad parcial en lima 'Mexicana' (Iwamasa, 1966). Otras causas de esterilidad masculina son el aborto de las anteras en los híbridos de mandarina satsuma y la degeneración temprana de las células madre de polen en el naranjo dulce 'Washington Navel' y lima 'Tahiti' (*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tan.).

La esterilidad femenina en cítricos también se debe a diferentes causas. En el mandarino 'Mukaku Kishu', mutación del mandarino *C. kinokuni* Hort. ex Tan., está controlada por dos genes principales, donde la esterilidad y la fertilidad son dominantes y recesivas respectivamente (Nesumi et al., 2000; Yamamoto, 2014). Por otra parte, los naranjos dulces del grupo Navel y el mandarino satsuma tienen una fuerte esterilidad femenina asociada a

la degeneración del saco embrionario (Osawa, 1912; Yamamoto, 2014). Además, es probable que ocurran aberraciones cromosómicas en el saco embrionario como en el caso de la esterilidad masculina (Ollitrault et al., 2007).

1.4 Problemática de los programas de mejora genética de mandarino

Desde tiempos remotos se realiza mejora genética para la obtención de nuevas variedades de cítricos y de sus especies relacionadas mediante la identificación y selección de genotipos superiores. Sin embargo, los programas sistemáticos de mejora genética orientados a la obtención de nuevas variedades comenzaron en Florida en 1893 cuando W.T. Swingle y H. J. Webber realizaron las primeras hibridaciones sexuales dirigidas y posteriores selecciones (Traub and Robinson, 1937; Cooper et al., 1962; Davies and Albrigo, 1994; McCollum, 2007). A comienzos del siglo XX, los programas de mejora genética se extendieron por todo el mundo, a países como México, Brasil, Chile, Argentina, España, Italia, Japón, China, India, Australia y Nueva Zelanda, entre otros (Traub and Robinson, 1937). Desde entonces se han abarcado una gran variedad de objetivos (Traub and Robinson, 1937; Navarro et al., 2002; McCollum, 2007; Castle, 2010; Fabroni et al., 2012; Aleza, 2015b; Omura and Shimada, 2016) pero todos ellos tienen en común la obtención de nuevos genotipos capaces de satisfacer las necesidades del mercado, además de presentar tolerancia o resistencia a factores bióticos y abióticos para garantizar mayores ingresos a los productores (Roose et al., 2000; Recupero et al., 2005; McCollum, 2007; Navarro et al., 2015; Omura and Shimada, 2016).

Difieren, a su vez, entre variedades y portainjertos. Para las variedades, los programas de mejora genética tienen como objetivo principal mejorar atributos específicos según el grupo varietal, es decir, naranjos dulces, mandarinos, zamboas, pomelos y limones. Debido a la baja diversidad genética encontrada dentro del grupo de los naranjos dulces, clementinos, satsumas y limones (Curk et al., 2015; Garcia-Lor et al., 2013b; Wu et al., 2018) la principal estrategia para la obtención de nuevas variedades es la identificación y selección de mutaciones espontáneas en aspectos relacionados con el color y época de maduración, ya que son atributos que el agricultor puede identificar fácilmente en campo (Gmitter et al., 2009; Ollitrault and Navarro, 2012a; Cuenca et al., 2018).

En los programas de mejora genética de mandarino en particular, los objetivos están enfocados en la obtención de nuevas variedades que produzcan frutos de excelente calidad organoléptica, que no produzcan semillas en ninguna circunstancia, que maduren durante toda la campaña de producción y que presenten un buen comportamiento postcosecha. La definición de calidad organoléptica se refiere a frutos fáciles de pelar y de alta calidad interna y externa (buena relación azúcar/acidez, aspecto y color atractivo, aroma)(McCollum, 2007; Ollitrault et al., 2008; Cuenca et al., 2015b; Navarro et al., 2015; Omura and Shimada, 2016). No obstante, esta definición puede variar en gran medida dependiendo de los consumidores ya que sus preferencias varían de una región cítrica a otra, razón por la cual, los mejoradores de cítricos deben esforzarse en la obtención de una

amplia gama de variedades que puedan satisfacer estas necesidades tan diversas. Recientemente se ha centrado la atención en las cualidades de los cítricos sobre la salud, apuntando a aquellos que poseen efectos beneficiosos mediante la producción de grupos de metabolitos secundarios como las antocianinas (Butelli et al., 2012, 2017).

Asimismo, los productores de cítricos se enfrentan a nivel mundial con crecientes limitaciones bióticas y, por lo tanto, los programas de mejora se tienen que centrar también en obtener nuevas variedades resistentes a enfermedades que causan considerables daños en la producción como el Huanglongbing (HLB) en Asia, Sudáfrica, Brasil, Florida y recientemente en Argentina y Paraguay (Ollitrault and Navarro, 2012b; Outi et al., 2014; Fariña, 2017; Cuenca et al., 2018; SENASA, 2020). El HLB es causado por la α -proteobacteria *Candidatus Liberibacter* que se aloja en el floema de las plantas infectadas causando pérdida de la calidad de los frutos y mermas en la producción. Está enfermedad es transmitida por dos psílidos que actúan como vectores: *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae*. El principal vector de esta enfermedad en gran parte de África es *T. erytreae*, mientras que en el norte de África, Asia y América lo es *D. citri* (Bové, 2006, 2014; Lopes et al., 2010).

Otro ejemplo es la Mancha Marrón de los cítricos, que es una enfermedad fúngica causada por *Alternaria alternata* pv. *citri*. Este hongo produce una toxina que afecta a los frutos, hojas y brotes de los mandarinos. Los frutos afectados presentan depresiones necróticas de tamaño variable y pústulas suberosas en la corteza que deprecian comercialmente la fruta para su consumo en fresco. Cuando las infecciones afectan a los frutos jóvenes en primavera, muchos sufren una abscisión prematura, lo que reduce notablemente la producción. Es un problema para algunos cultivares como 'Murcott', 'Fortune', 'Nova' en varios países como España, Argentina, Uruguay, Australia, Brasil entre otros (Peres et al., 2003; Ollitrault and Navarro, 2012b; Cuenca et al., 2013b, 2018). Recientemente, se han desarrollado marcadores moleculares asociados al locus de susceptibilidad a *Alternaria* (Cuenca et al., 2013b, 2016) que se están utilizando rutinariamente en los programas de mejora genética de cítricos a nivel internacional para seleccionar parentales e híbridos obtenidos en hibridaciones sexuales dirigidas.

En este sentido, otra enfermedad importante es la Mancha Negra (Black Spot) causada por el hongo *Phyllosticta citricarpa* que afecta principalmente a los frutos, aunque también puede llegar a afectar hojas y tallos. Los síntomas pueden presentar gran variación dependiendo de la fase fenológica y condiciones climáticas. En todos los casos se observan puntuaciones deprimidas que pueden variar de color rosa a marrón, y en ocasiones pueden tener puntuaciones negras (picnidios) en el centro. Esta enfermedad puede producir la caída o imperfecciones en la fruta que conducen a mermas de rendimiento y calidad. Posee un gran impacto en el comercio de los cítricos, particularmente en la Unión Europea que tiene tolerancia cero para la fruta sintomática. Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida afectando regiones de América del Sur, Sudáfrica, Asia, Australia y Estados Unidos (Kotzé, 1981; Fourie et al., 2016; Tran et al., 2016).

También se destacan otras enfermedades bacterianas como la Clorosis Variegada de los cítricos y el Cancro de los cítricos. La Clorosis Variegada de los cítricos es causada por la

proteobacteria *Xylella fastidiosa* que se distribuye por el xilema de las plantas infectadas. Los síntomas que causa son clorosis foliar, defoliación, decaimiento general de la planta y disminución en el tamaño de los frutos generando pérdidas de rendimiento y calidad. Esta enfermedad es transmitida por numerosos hemípteros de la familia *Cicadellidae* y tiene un gran número de hospedantes además de los cítricos. Se ha citado hasta el momento para cítricos en Brasil, Argentina y Costa Rica (Brlansky et al., 1993; Olga et al., 1993; Aguilar et al., 2005; Nunney et al., 2014; Gabriel et al., 2020).

El Cancro o Cancrosis de los cítricos está causado por la bacteria *Xanthomonas citri* pv. *citri*, y su distribución abarca la mayoría de las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Afecta a casi todas las partes aéreas del árbol; hojas, ramas jóvenes y frutos (Timmer et al., 1996; Schubert et al., 2001). Esta enfermedad se caracteriza por presentar lesiones protuberantes (cancros). Si la enfermedad afecta de forma grave puede producir defoliación, caída de la fruta, o muerte de la planta. En casos menos severos las frutas afectadas disminuyen o pierden su valor comercial (Graham, 1991). El Cancro de los cítricos se propaga principalmente por la lluvia, que combinada con el viento o las tormentas tropicales, provocan lesiones por las cuales penetra el inóculo (Gottwald and Irey, 2007; Gabriel et al., 2020).

En este contexto, se han establecido rangos de susceptibilidad varietal para un gran número de estas enfermedades, lo que facilita la selección de parentales tolerantes/resistentes para su utilización en los programas de mejora genética de cítricos (Ollitrault and Navarro, 2012b; Cuenca et al., 2013b, 2016).

1.5 Estrategias de mejora genética en mandarino.

Las principales estrategias utilizadas en la mejora genética de cítricos se basan en la modificación de variedades élite preexistentes o en la creación de nuevas variedades. Las metodologías más importantes utilizadas para la modificación de variedades preexistentes son la identificación y selección de mutaciones espontáneas en campo (Graça and Louzada, 2004; Ollitrault and Navarro, 2012a; Henrique et al., 2016; Rodrigo et al., 2019), la selección de plántulas nucelares (Nishiura, 1967; Starrantino, 1996; Omura and Shimada, 2016), la inducción de mutaciones mediante agentes químicos o físicos (Hensz, 1971; Vardi et al., 1993; Roose and Williams, 2007; Montañola et al., 2015), la inducción de variantes somaclonales (Grosser et al., 2007), la hibridación somática especialmente dirigida hacia la regeneración de híbridos (Grosser et al., 2000, 2010; Grosser and Gmitter Jr, 2011), la transformación genética (Gmitter et al., 1992, 2009, Peña et al., 2001, 2008; Pons et al., 2011; Soler et al., 2019) y la edición genómica (Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013; Jia and Wang, 2014; Peng et al., 2017).

Por otra parte, la hibridación sexual a nivel diploide y triploide es una metodología que permite la creación de nuevas variedades y es ampliamente utilizada en diferentes programas de mejora genética de mandarinos a nivel mundial (Anderson, 2000; Roose et al., 2000; Williams and Roose, 2004; Recupero et al., 2005; McCollum, 2007; Aleza et al.,

2010a; Cuenca et al., 2010; Fabroni et al., 2012; Anderson and Garavello, 2013; Navarro et al., 2015; Russo et al., 2016; Omura and Shimada, 2016).

1.5.1 Hibridación sexual

En el género *Citrus* y afines los genotipos diploides son los más habituales, siendo $x=9$ el número básico de cromosomas (Krug, 1943); aunque se han inducido o encontrado ocasionalmente euploides y aneuploides, siendo los triploides y tetraploides las variantes euploides más comunes (Lee, 1988). La hibridación sexual clásica presenta importantes limitaciones como consecuencia de la compleja biología reproductiva (Navarro et al., 2005, 2015; Gmitter et al., 2009), elevada heterocigosidad (Gmitter et al., 2009; Ollitrault et al., 2012a; Wu et al., 2018), esterilidad masculina y femenina, y auto e inter incompatibilidad entre algunos genotipos, lo que limita la posibilidad de ser utilizados como parentales en determinadas hibridaciones sexuales. Una vez obtenidos los híbridos, éstos presentan un prolongado periodo juvenil y necesitan un periodo de transición hasta la fase reproductiva que puede durar más de seis años (Krajewski and Rabe, 1995), aunque depende mucho del genotipo. Esta característica de las plantas juveniles de cítricos es uno de los problemas más importantes de los programas de mejora genética basados en hibridación sexual. Además, todavía existe una falta importante de conocimiento en los mecanismos genéticos que controlan los principales atributos relacionados con la calidad de los frutos y otros aspectos agronómicos.

La ausencia de semillas en los frutos de mandarino es una característica muy valorada por los consumidores. Por lo tanto, la obtención de nuevas variedades sin semillas es actualmente uno de los principales objetivos en los programas de mejora genética de todo el mundo, tanto a nivel diploide como triploide (Gmitter et al., 1990; Recupero et al., 2005; Ollitrault et al., 2007; Roose and Williams, 2007; Aleza et al., 2010a, 2010b; Cuenca et al., 2010; Navarro et al., 2015).

1.5.1.1 Hibridación sexual a nivel diploide

La hibridación sexual se utiliza principalmente para la diversificación genética en mandarinos. La mayoría de los híbridos diploides obtenidos son fértiles y, por lo tanto, producen semillas lo que influye negativamente en su aceptación por parte de los consumidores. La selección de genotipos sin semillas de alta calidad y productivos requiere la evaluación de progenies extremadamente grandes. La ausencia de semillas en estos híbridos se basa principalmente en la esterilidad masculina o en la autoincompatibilidad. En este sentido los genotipos autoincompatibles, como la mayoría de las clementinas, si son cultivados cerca de otros genotipos compatibles, sus frutos contendrán semillas como consecuencia de la polinización cruzada.

En el pasado un gran número de variedades importantes se originaron a partir de hibridaciones diploides entre parentales desconocidos, como es el caso de las clementinas,

satsumas y los mandarinos 'Ponkan' e 'Imperial' y de los tangors 'Ellendale', 'Ortanique' 'Murcott' y 'Nadorcott' (Hodgson, 1968; Nadori, 2004). En programas de mejora genética de diversos países también se han obtenido varios híbridos diploides con cierta relevancia comercial como los mandarinos 'Fortune', 'Nova', 'Kinnow', 'Kara', 'Minneola', 'Primosole', 'Gold Nugget' y 'Kiyomi' (Robinson, 1931; Hodgson, 1968; Tribulato and La Rosa, 1993; Roose et al., 2000).

1.5.1.2 Hibridación sexual a nivel triploide

En la meiosis de las plantas triploides se originan asociaciones multivalentes y como consecuencia se producen gametos con distintas dotaciones cromosómicas que reducen la viabilidad de los mismos (Cameron and Frost, 1968; Fabroni et al., 2012). 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. Además, son una alternativa interesante desde el punto de vista ecológico ya que no es necesario realizar tratamientos insecticidas contra las abejas, responsables de la polinización cruzada en cítricos, evitando la dispersión de productos químicos al medio ambiente.

Desde los años setenta del pasado siglo se conocía que podían obtenerse híbridos triploides de cítricos en polinizaciones $2x \times 4x$, $4x \times 2x$ y $2x \times 2x$ (Esen and Soost, 1971a; Cameron and Burnett, 1978; Esen et al., 1979). Se ha comprobado posteriormente que la obtención de híbridos triploides en cruzamientos entre parentales diploides está causada principalmente por la formación de gametos femeninos no reducidos (gametos $2n$) (Aleza et al., 2010a; Cuenca et al., 2013b, 2015b; Aleza, 2015b; Rouiss et al., 2017b). No obstante, estas observaciones no pudieron aplicarse en programas de mejora hasta que se avanzó en el desarrollo de las técnicas biotecnológicas para el rescate y cultivo *in vitro* de los embriones triploides, el desarrollo de un método simple para el análisis del nivel de ploidía mediante citometría de flujo y para la obtención de nuevos parentales tetraploides (Aleza et al., 2009b, 2010b, 2011, 2012b, 2012a). La obtención de híbridos triploides mediante hibridaciones sexuales entre parentales femeninos diploides no apomícticos y parentales masculinos tetraploides ($2x \times 4x$) es una estrategia que también se ha utilizado ampliamente (Starrantino and Recupero, 1982; Aleza et al., 2012a). Las plantas tetraploides se pueden identificar en semilleros de genotipos apomícticos originadas a partir de la duplicación espontánea del número de cromosomas en células de la nucela (Aleza et al., 2011), por hibridación somática (Grosser et al., 2000, 2010) o mediante la utilización de productos químicos como la colchicina u orizalina (Aleza et al., 2009a). Esta última metodología permite la obtención de plantas tetraploides estables de genotipos no apomícticos que pueden ser utilizados como parentales femeninos en hibridaciones $4x \times 2x$. Esta estrategia es la que presenta la eficiencia más elevada para la obtención de híbridos triploides en comparación con las otras dos (Aleza et al., 2012b).

En los últimos años se han introducido en el mercado varios híbridos triploides procedentes de diferentes programas de mejora. Entre ellos se encuentran los híbridos triploides `Garbí`, `Safor` y `Alborea` del programa de mejora del IVIA en España (Aleza et al., 2010a; Cuenca et al., 2010; Aleza, 2015b); `Shasta Gold®`, `Tahoe Gold®` y `Yosemite Gold®` del programa de Riverside, California (Roose et al., 2002; Williams and Roose, 2004); `Tacle`, `Clara`, `Mandared`, `Mandalate` y `Lemox` del Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura di Acireale en Italia (Starrantino and Recupero, 1982; Recupero et al., 2005).

1.6 Poliploidía en cítricos

Las plantas poliploides son el resultado de la multiplicación del genoma, con un incremento en el número de cromosomas característico de la especie (Ramsey and Schemske, 2002; Barker et al., 2016). Se considera a la poliploidía una de las principales fuerzas evolutivas en plantas, siendo una de las causas de su diversificación y diferenciación (Otto and Whitton, 2000; Gallais, 2003). Fundamentalmente, las diferencias de las plantas poliploides respecto a sus progenitores radica en sus características morfológicas y fisiológicas (Ramsey, 2007; Dewitte et al., 2009).

Durante mucho tiempo, la mayoría de los autores consideraron que la duplicación cromosómica (poliploidización somática) era el mecanismo principal de formación de plantas poliploides (Stebbins, 1971). No obstante, posteriormente se observó que la poliploidización sexual mediante gametos no reducidos era un fenómeno más frecuente (Harlan and DeWet, 1975), siendo el principal mecanismo de formación de poliploides en numerosas especies de plantas (Wu et al., 2001; Carputo et al., 2003; Ramsey, 2007; Stift et al., 2008; Dewitte et al., 2009; Honsho et al., 2016).

La primera referencia sobre plantas poliploides en cítricos fue realizada por Longley (1925) e identificó una planta tetraploide silvestre de *F. hindsii*. Posteriormente se han descrito otros poliploides naturales como la lima triploide `Tahiti`, diferentes plantas tetraploides de *P. trifoliata*, *Clausena harmandiana* y *Clausena excavata*, así como una planta hexaploide de *Glycosmis pentaphylla* (Krug, 1943; Ollitrault et al., 2008).

Los cítricos presentan dos mecanismos diferenciados responsables de la formación de poliploides naturales: somático y sexual. La poliploidización somática ocurre mediante la duplicación espontánea del número de cromosomas en células de la nucela en genotipos apomícticos (Barrett and Hutchison, 1978; Lee, 1988), mediante tratamientos con agentes químicos antimitóticos (Aleza et al., 2009a) o por hibridación somática (Grosser et al., 2000; Dambier et al., 2011), mientras que poliploidización sexual se origina a través de la producción de gametos no reducidos. La explotación de la poliploidía en el ámbito de la mejora genética de mandarinos se ha convertido en una herramienta básica para la obtención de nuevas variedades (Ollitrault et al., 2008; Cuenca et al., 2011, 2015b, Kamiri et al., 2011, 2018, Aleza et al., 2012a, 2016; Rouiss et al., 2017a).

1.6.1 Poliploidización sexual

El proceso de la meiosis conlleva una replicación del ADN seguida de dos divisiones del número de cromosomas que originan células con la mitad de los cromosomas que la célula madre. En la primera división meiótica los cromosomas homólogos se separan mientras que en la segunda división meiótica se separan las cromátidas hermanas. Los gametos no reducidos se originan a partir de alteraciones meióticas denominadas 'Meiotic Nuclear Restitution', descritas por primera vez por Rosenberg (1927), habiéndose profundizado en los últimos años en el conocimiento de este proceso complejo (Cai and Xu, 2007). Varias alteraciones meióticas relacionadas con la formación y función del huso acromático y citocinesis conducen a la formación de gametos no reducidos en plantas. Hasta el momento se han caracterizado siete mecanismos principales: PRD (Premeiotic Doubling), PMD (Postmeiotic Doubling), FDR (First-Division Restitution), RMI (chromosome Replication during the Meiotic Interphase), SDR (Second-Division Restitution), IMR (Indeterminate Meiotic Restitution) y Aposporia (Peloquin et al., 1989; Lim et al., 2001; Dewitte et al., 2012). FDR y SDR se consideran los mecanismos predominantes en la formación de gametos no reducidos (Bretagnolle and Thompson, 1995; Tavoletti et al., 1996; Cai and Xu, 2007; Cuenca et al., 2011; Aleza et al., 2016; Rouiss et al., 2017a). El fallo de la primera (FDR) o la segunda división (SDR) meiótica originan la formación de núcleos con el número de cromosomas no reducidos. Si la primera división meiótica falla en la anafase I, todos los cromosomas permanecen en la placa ecuatorial para formar un solo núcleo de restitución con el mismo número de cromosomas que la célula madre, que generalmente experimenta con normalidad la segunda división meiótica. Este fallo se caracteriza por una no división del número de cromosomas (como en la mitosis) y la formación de dos núcleos con un número cromosómico no reducido. En el caso de SDR, la primera división meiótica se produce normalmente, pero se origina un fallo en la anafase II de la segunda división meiótica, lo que resulta en dos núcleos con cromosomas no reducidos (Cai and Xu, 2007). Por lo tanto, un gameto no reducido originado por FDR contiene cromátidas no hermanas, mientras que un gameto no reducido generado a través de SDR contiene dos cromátidas hermanas (Tang and Luo, 2002; Cuenca et al., 2011).

Estos dos mecanismos presentan distintas consecuencias genéticas y afectan directamente a la transmisión de la heterocigosidad parental. Los gametos no reducidos formados por FDR, en ausencia de eventos de recombinación, presentan el 100% de la heterocigosidad parental. Sin embargo, si tiene lugar un evento de recombinación, la heterocigosidad parental varía del 100% para *loci* próximos al centrómero hasta el 50% para *loci* teloméricos, bajo la hipótesis de interferencia total (Cuenca et al., 2011). Por otra parte, SDR origina gametos con 0% de restitución de la heterocigosidad parental en ausencia de eventos de recombinación mientras que si se origina un evento de recombinación, la heterocigosidad parental puede variar de 0% para *loci* próximos al centrómero hasta el 100% para *loci* teloméricos bajo la hipótesis de interferencia total (Cuenca et al., 2011).

La frecuencia de los gametos no reducidos está controlada por factores genéticos y ambientales. Se ha descrito en varias especies vegetales la influencia del control genético en la formación de gametos no reducidos, como en *Medicago sativa*, *Trifolium pretense* y *Solanum tuberosum* (Mok and Peloquin, 1975; Parrott et al., 1985; Tavoletti et al., 1996; Carputo et al., 2003). Además, se observó que los híbridos interespecíficos e intergenéricos producen gametos no reducidos con mayor frecuencia que sus parentales (Ramsey and Schemske, 1998; Mason et al., 2011). Por otra parte, las condiciones ambientales pueden afectar la producción de gametos no reducidos al interferir en los procesos celulares asociados a la meiosis (Ramsey and Schemske, 1998). El método más frecuentemente utilizado para inducir gametos no reducidos es alternar ciclos controlados de temperaturas altas y bajas (Mason et al., 2011; De Storme et al., 2012; Van de Peer et al., 2017). Asimismo, se observó que la formación de gametos no reducidos es específica del sexo, lo que lleva probablemente a un mecanismo diferente para cada sexo (Bretagnolle and Thompson, 1995).

En los cítricos, la formación de gametos no reducidos es un fenómeno relativamente frecuente (Esen and Soost, 1971b; Luro et al., 2004; Aleza et al., 2015a; Cuenca et al., 2015b; Rouiss et al., 2017b, 2017a). Cuenca et al. (2015b) demostraron que SDR es el mecanismo fundamental en mandarinos a nivel de óvulo. Posteriormente Rouiss et al. (2017b) demostró la coexistencia de diferentes mecanismos en limón también a nivel de óvulo, siendo el más abundante SDR, seguido de FDR y se demostró por primera vez en cítricos un nuevo mecanismo, PMD.

Sin embargo, en cítricos se han descrito muy pocos casos sobre la formación de gametos no reducidos de polen. Luro et al. (2004) indicó que la producción de gametos no reducidos de polen es un fenómeno muy poco frecuente (menor al 2%). Posteriormente, Honsho et al. (2012, 2016) identificaron la presencia de granos de polen gigantes en el mandarino 'Nishiuchi Konatsu' (*C. tamurana* Hort. ex Tanaka). Estos granos de polen se aislaron manualmente y se analizaron mediante PCR Multiplex con un número reducido de marcadores SSR y concluyeron que FDR era el mecanismo implicado en la formación de los gametos no reducidos. Recientemente, Rouiss et al. (2017b) obtuvieron híbridos tetraploides a partir de hibridaciones sexuales $4x \times 2x$ y demostraron que SDR y FDR son los mecanismos responsables con una mayor frecuencia de FDR sobre SDR (64,1% vs. 17,2%). Estos resultados indican que se originan gametos no reducidos de polen con cierta frecuencia en cítricos. Sin embargo, no existe actualmente una metodología rápida y eficiente que permita su identificación sin la necesidad de regenerar plantas. En este sentido, desarrollar una metodología que permita el análisis del nivel de ploidía de poblaciones de granos de polen de diferentes genotipos facilitará la identificación de genotipos capaces de producir granos de polen no reducidos para su posterior utilización como parentales masculinos en los programas de mejora genética de mandarinos dirigidos a la obtención de híbridos triploides.

1.6.2 Formación de gametos diploides a partir de genotipos tetraploides

Los autopoliploides y alopoliploides presentan una clara diferenciación entre ellos, aunque ambos posean múltiples conjuntos de cromosomas. Los autopoliploides son el resultado de la variación del nivel de ploidía dentro de una misma especie, por lo que los cromosomas son del mismo tipo y tienen el mismo origen. En cambio, los alopoliploides hacen referencia a la asociación de dos genomas diferenciados a través del proceso de hibridación y posterior duplicación cromosómica, por lo tanto, el tipo y origen de los cromosomas que presentan es diferente (Gallais, 2003; Zielinski and Mittelsten Scheid, 2012; Meirmans and Van Tienderen, 2013). Una consecuencia inmediata de la poliploidía es un cambio en la frecuencia de segregación de los alelos (Comai, 2005).

Existen dos modelos extremos en la producción de gametos diploides por las plantas tetraploides; segregación disómica en alotetraploides y tetrasómica en autotetraploides (Stebbins, 1947; Stift et al., 2008; Sybenga, 2012). Los alotetraploides contienen dos sets de cromosomas homeólogos. Durante la meiosis cada cromosoma se empareja con su homeólogo formando únicamente bivalentes (Stebbins, 1947; Sybenga, 2012). Esto genera gametos interespecíficos 100% heterocigóticos, originando una segregación disómica (Stift et al., 2008). Por el contrario, los cuatro cromosomas homólogos de los autotetraploides tienen la misma oportunidad de aparearse durante la meiosis produciendo asociaciones multivalentes y por lo tanto una segregación polisómica (Jackson and Jackson, 1996; Sybenga, 1996; Hauber et al., 1999). La transmisión de la heterocigosidad de una planta autotetraploide a su gameto diploide depende de la doble reducción, que se define como la probabilidad de que dos cromátidas hermanas estén presentes en el mismo gameto (Marsden et al., 1987). La frecuencia de la doble reducción oscila entre 0 (segregación aleatoria de cromosomas), $1/7$ (segregación aleatoria de cromátidas) y $1/6$ (segregación máxima equational) (Muller, 1914; Mather, 1935). El valor medio de restitución de la heterocigosidad parental puede oscilar entre $2/3$ y $5/9$ en caso de segregación aleatoria de cromosomas y segregación máxima equational, respectivamente. No obstante, alo y autotetraploides son dos posiciones extremas ya que en genotipos cuyos parentales mantengan cierto grado de homología que evite una asociación cromosómica preferencial, pueden ocurrir modelos de segregación intermedia entre disómico y tetrasómico (Stebbins, 1947; Sybenga, 1996; Stift et al., 2008; Jeridi et al., 2012).

En cítricos se han publicado diferentes trabajos sobre los modelos de segregación de plantas tetraploides. Rouiss et al. (2018) demostraron que la lima 'Mexicana' tetraploide (híbrido interespecífico entre *C. micrantha* y cidro, dos especies alejadas genéticamente) mostró un modelo de segregación predominantemente disómico. Resultados similares se han obtenido al analizar los gametos diploides del híbrido tetraploide interespecífico citrange 'Carrizo' (*P. trifoliata* x *C. sinensis*, especies claramente diferenciadas filogenéticamente) (datos no publicados). Existen otros trabajos en los cuales se observaron modelos de segregación intermedios. Por ejemplo, Kamiri et al. (2011) observaron que un híbrido somático entre limón y mandarino presentó una herencia intermedia con una tendencia preferencial hacia la tetrasomía, mientras que un híbrido somático intergenérico entre

Poncirus y mandarino mostró una herencia intermedia con mayor tendencia a la disomía (Kamiri et al., 2018). Asimismo, Aleza et al. (2016a) analizaron el modelo de segregación de una planta tetraploide de clementina 'Clemenules' e identificaron una segregación tetrasómica, aunque en tres grupos de ligamientos (GL) se observó una segregación intermedia y para un grupo de ligamiento se evidenció una fuerte tendencia hacia la disomía.

Estos resultados indican que los modelos de segregación de las plantas tetraploides de cítricos están tremendamente influenciados por la constitución filogenética de los parentales que originaron las plantas diploides a partir de las cuales se obtuvieron las tetraploides, además de observarse cierta variación en diferentes grupos de ligamiento. No obstante, no se han realizado trabajos sobre las diferencias en los modelos de segregación de plantas tetraploides cuando el mismo genotipo se utiliza como parental masculino y femenino. Como se desprende de todo lo expuesto anteriormente, el conocimiento del impacto que estos diferentes modelos de segregación pueden tener en la estructura genética de los gametos diploides es importante para el desarrollo de programas de mejora genética de mandarino basados en hibridaciones sexuales interploides.

1.7 Herramientas biotecnológicas para el análisis del nivel de ploidía y genotipado de granos de polen de cítricos

1.7.1 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una plataforma tecnológica que originalmente se desarrolló para el análisis de células sanguíneas (Galbraith, 2010). El citómetro de flujo cuantifica y registra las señales de dispersión de luz y fluorescencia como propiedades paramétricas de cada célula teñida con un determinado fluorocromo, recolectando simultáneamente múltiples ángulos de dispersión y múltiples componentes espectrales, al mismo tiempo que clasifica cada célula en grupos similares. Se ha utilizado para diversas aplicaciones como el inmunofenotipado, análisis del nivel de ploidía, conteo celular y expresión de genes, entre otras (Robinson and Grégori, 2007). Lo destacado de esta técnica es que las medidas se hacen individualmente sobre cada partícula de la suspensión, y no como valor medio de la población. Esto posibilita la clasificación y separación física, de células individuales en poblaciones homogéneas mediante el uso de clasificadores de células integrados al citómetro de flujo, denominados FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Las separaciones de células o poblaciones celulares homogéneas se realizan con el objetivo de llevar a cabo posteriores ensayos bioquímicos, moleculares o de diferenciación celular (Doležel et al., 2007; Galbraith, 2010).

1.7.1.1 Aplicaciones en plantas

Inicialmente la citometría de flujo se utilizó en la investigación biomédica y debido a los costes relativamente altos para el análisis de las muestras, su aplicación en plantas fue muy

lenta. El primer registro documentado en plantas se realizó a principios de la década de 1970 en *Vicia faba* (Heller, 1973), aunque este trabajo no tuvo relevancia dentro de la comunidad científica. La falta de interés se debió a que la metodología empleada no se pudo generalizar de forma eficiente a otras especies de plantas superiores (Doležel et al., 2007; Galbraith, 2010). En la década de 1980 se retomó su aplicación, pero no fue hasta los inicios de la década de 1990 cuando su utilización se extendió considerablemente (Doležel et al., 2007). La lenta aplicación de esta metodología en células vegetales estaba condicionada, además de las razones económicas, por la dificultad en la preparación de las muestras debido a la rigidez de la pared celular que mantenían unidas las células, generando estructuras complejas que no se podían analizar en los citómetros y, además, eran un obstáculo para la penetración de los reactivos utilizados en la preparación de las muestras. Las investigaciones se centraron en la eliminación de la pared celular utilizando diferentes enzimas hidrolíticas (celulasas, pectinasas) en un medio osmótico inerte para la obtención de protoplastos. Logrado esto, se demostró que el ADN de los protoplastos se podía teñir con el colorante Hoechst 33342 (Puite and Ten Broeke, 1983), aunque los histogramas obtenidos no eran de suficiente calidad (Galbraith and Shields, 1982; Puite and Ten Broeke, 1983; Doležel and Bartos, 2005).

A raíz de estos resultados surgió un nuevo enfoque, que consistió en el análisis de núcleos intactos, los cuales se liberaban por lisis de los protoplastos en presencia de un detergente en un medio hipotónico, lo que posibilitó la obtención de histogramas de alta calidad (Galbraith et al., 1983; Doležel et al., 2007). Debido al éxito, se estimuló la investigación llegando al desarrollo de un método simple de preparación de la muestra. Esto implicó una manipulación mínima de los materiales biológicos, mediante la obtención de una solución homogénea de fácil filtrado que elimina los desechos que obstruyen el sistema de flujo y/o interfieren en la obtención de histogramas claros. Asimismo, se consiguió la tinción del ADN de los núcleos con fluorocromos específicos. Este método presentó, además de la rapidez de preparación de la muestra, la ventaja de ser aplicable a diferentes tipos de tejidos de la planta (Sliwiska et al., 2005; Doležel et al., 2007; Sliwiska, 2018). La capacidad de la técnica en la determinación del contenido de ADN fomentó su uso en una amplia gama de aplicaciones, que incluyen la estimación del tamaño del genoma, determinación del nivel de ploidía y la cinética del ciclo celular (Doležel and Bartos, 2005; Doležel et al., 2007). Este desarrollo se acompañó con un aumento del número y especificidad de los colorantes empleados en la citometría de flujo. Éstos se pueden clasificar, en términos generales, en tres categorías de fluorocromos: (I) colorantes de ácidos nucleicos (4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI, yoduro de propidio, PI, y colorante Hoechst), (II) colorantes proteicos, que incluyen marcadores fluorescentes para anticuerpos (fluoresceína, aloficocianina, rojo Texas) y (III) sondas funcionales para el monitoreo *in situ* de la actividad celular (tintes de cianina y oxonol).

Generalmente, las hojas son el órgano de la planta que se utiliza para el análisis del nivel de ploidía mediante citometría de flujo (Doležel et al., 2007; Kron et al., 2007; Bourge et al.,

2018), aunque con menor frecuencia se suelen utilizar semillas (Sliwinska et al., 2005; Sliwinska, 2018), raíces y tallos (Bourge et al., 2018; Sliwinska, 2018). En algunas especies leñosas y herbáceas, se han utilizado granos de polen maduros (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Pichot and El Maâtaoui, 2000; Pan et al., 2004; Kron and Husband, 2012; Dreissig et al., 2017) fundamentalmente para detectar gametos masculinos no reducidos (Dewitte et al., 2009; Kron and Husband, 2015; Sora et al., 2016; Kreiner et al., 2017), como se ha descrito en diferentes especies de angiospermas (Van Tuyl et al., 1989; Pan et al., 2004; Kron and Husband, 2012; Chung et al., 2013).

En cítricos, la citometría de flujo se ha utilizado para determinar el tamaño del genoma (Ollitrault and Michaux-Ferrière, 1992) y es fundamental en los programas de mejora genética basados en hibridación sexual dirigidos a la obtención de híbridos triploides, ya que se utiliza de una forma rutinaria para realizar este tipo de análisis (Ollitrault et al., 1996a, 1999, Aleza et al., 2009b, 2012a, 2012b). También se ha utilizado para el estudio del nivel de ploidía de protoplastos empleados para la obtención de híbridos somáticos (Ollitrault et al., 1999, 2000; Grosser et al., 2000). Sin embargo, hasta el momento no se ha podido aplicar para el estudio del nivel de ploidía de granos de polen de cítricos, debido fundamentalmente a la dificultad que presenta la extracción de núcleos intactos.

1.7.1.2 Problemática de la extracción de núcleos intactos de granos de polen para el análisis del nivel de ploidía

La citometría de flujo se ha convertido en una metodología básica para estimar el tamaño de genomas y el nivel de ploidía a partir de tejidos somáticos ya que la preparación de las muestras es simple y rápida (Galbraith et al., 1983; Doležel et al., 2007; Aleza et al., 2009b; Navarro et al., 2015). En cambio, su aplicación para analizar directamente el nivel de ploidía de los granos de polen es poco común, debido a los desafíos técnicos que conlleva la extracción de los núcleos intactos (Pan et al., 2004; Kron et al., 2007) relacionado con el pequeño tamaño de los granos de polen y la composición rígida de la exina que protege al contenido celular (Chen et al., 2008b; Dreissig et al., 2015).

La importancia de la extracción de los núcleos de los granos de polen, en lugar de utilizar el polen intacto, es debido a dos razones principales. La primera es que la disposición de los núcleos dentro del grano de polen junto con la autofluorescencia y/o la tinción no específica de la exina generan picos de fluorescencia de pobre resolución o superpuestos que no se corresponden al contenido de ADN nuclear del grano de polen; y la segunda, las limitaciones que presentan algunos equipos de citometría de flujo para medir partículas de gran tamaño como los granos de polen (Suda et al., 2007).

Se han utilizado diferentes metodologías para la extracción de los núcleos de los granos de polen: (i) congelar los granos de polen en una solución tampón de extracción de núcleos y posterior triturado con una cuchilla afilada (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990), (ii) germinar los granos de polen y luego cortar/machacar con una cuchilla afilada los tubos

polínicos para liberar los núcleos en un medio de extracción (Pichot and El Maâtaoui, 2000; Sugiura et al., 2000), (iii) romper las paredes celulares mediante el estallido de los granos de polen en soluciones hipotónicas (Zhang et al., 1992a; Dewitte et al., 2006, 2009) y (iv) sonicación de los granos de polen en presencia de una solución de extracción de núcleos (Pan et al., 2004). Todos estos métodos, en general, presentaron una mayor eficiencia en comparación con la metodología habitual utilizada en los tejidos somáticos. El inconveniente de estas dos últimas metodologías (sonicación y estallidos en soluciones hipotónicas) es el gran número de pasos que conllevan, con un tiempo de ejecución prolongado, y con una calidad variable de los histogramas según la especie.

Recientemente se ha desarrollado una metodología práctica y eficiente para la ruptura de la pared celular de los granos de polen (Kron and Husband, 2012). Esta técnica se ha validado en un amplio número de especies con excelentes resultados en la calidad de los histogramas. El método de extracción de núcleos consiste en suspender el polen en una solución tampón y pasarlo a través de dos filtros: un prefiltro, que elimina las impurezas de mayor tamaño y permite el paso de los granos de polen, y un segundo filtro de ruptura que recoge el polen. En este segundo filtro, los granos de polen se frotran con una varilla de plástico o vidrio para facilitar su ruptura y posterior liberación de los núcleos. Luego con la ayuda del tampón de tinción, se recolectan directamente los núcleos teñidos en un tubo para ser analizados en el citómetro.

Simultáneamente con las técnicas de extracción de núcleos, se han abordado diferentes objetivos como consecuencia del análisis del nivel de ploidía de granos de polen mediante citometría de flujo: (I) identificación de genotipos que producen gametos no reducidos de polen (Van Tuyl et al., 1989; Pichot and El Maâtaoui, 2000; Pan et al., 2004; Van Laere et al., 2009), (II) estudiar el efecto de determinados productos químicos y estreses térmicos en la frecuencia de formación de gametos no reducidos (Akutsu et al., 2007; Van Laere et al., 2009); y (III) para la realización de estudios más básicos relacionados con las diferentes etapas meióticas involucradas en el desarrollo de los granos de polen (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Stehlik et al., 2007; Hirano and Hoshino, 2009).

En cítricos, no hay antecedentes de su aplicación en polen, debido a la inexistencia de un método eficiente para la extracción de los núcleos de los granos de polen maduros. El desarrollo de una metodología que posibilite el estudio del nivel de ploidía de los granos de polen mediante citometría de flujo abre nuevas vías de investigación que se pueden aplicar directamente en los programas de mejora genética mediante hibridación sexual enfocados a la obtención de híbridos triploides, ya que permitiría la identificación de parentales productores de polen no reducido, estudiar la influencia de las condiciones ambientales en la frecuencia de formación de granos de polen no reducidos, así como determinar los niveles de ploidía de los granos de polen producidos por genotipos triploides y tetraploides.

1.7.2 Genotipado de granos de polen individualizados con marcadores moleculares

El polen tiene un papel fundamental en la reproducción de las plantas superiores, ya que es uno de los responsables del flujo de genes entre plantas. Los estudios genéticos de granos de polen individualizados son limitados debido a razones asociadas a su tamaño extremadamente pequeño que dificultan la manipulación y a su pared externa (exina) que dificulta la extracción del ADN de los núcleos para posteriores análisis (Chen et al., 2008b; Suyama, 2011; Dreissig et al., 2015). Sin embargo, los avances significativos en las técnicas de biología molecular han facilitado la manipulación de granos de polen individualizados y el análisis genético con marcadores moleculares, principalmente SSR y/o SNP (Suyama, 2011). Asimismo, como consecuencia de la limitada cantidad de ADN en los núcleos de los granos de polen el número de *loci* que pueden ser analizados es muy limitado. Los kits de amplificación genómica (WGA: Whole Genome Amplification) surgieron como una herramienta para dar solución a este problema. Con su aplicación se pueden generar, partiendo del contenido de ADN de una sola célula, cantidades suficientes para realizar múltiples análisis con marcadores moleculares (de Bourcy et al., 2014). El genotipado de granos de polen individualizados permitiría lograr avances en diferentes áreas de investigación como la interacción entre insectos y la polinización, genómica y también en los programas de mejora genética (Suyama, 2011).

1.7.2.1 Técnicas de individualización y extracción de ADN de granos de polen

Un protocolo básico para el aislamiento y extracción de ADN de los núcleos de los granos de polen se desarrolló a mediados de la década de 1990 en polen fosilizado de *Abies spp.* (Suyama et al., 1996). Lo que motivó el desarrollo de esta técnica fue la dificultad que presentaba la identificación morfológica de los granos de polen fosilizados, junto a la necesidad de contar con una herramienta que permitiera su identificación taxonómica inequívoca. La técnica consta de diferentes pasos: primero, el aislamiento de los granos de polen en una lupa binocular con la ayuda de una punta de pipeta; segundo, la ruptura de la pared del grano de polen bajo un microscopio óptico, aplastando el grano de polen con la punta de una pipeta contra la pared de un microtubo en presencia de una solución tampón, seguido de su incubación para lograr la liberación del ADN al medio (Suyama et al., 1996).

Desde entonces, se han realizado variantes del método original con diferentes modificaciones. Entre ellas, encontramos la manipulación mediada por láser, en la cual el grano de polen es microperforado y luego colectado en un microtubo para su posterior análisis (Matsunaga et al., 1999). Esta técnica genera un resultado efectivo, pero con la desventaja de la necesidad de contar con un complejo y específico instrumental. Por otra parte, se abordaron alternativas más simples como la fabricación de pipetas de vidrio modificadas para facilitar su manipulación (Parducci et al., 2005), el uso de pinzas especiales para facilitar y agilizar la individualización de los granos de polen (Chen et al., 2008b; Lu et

al., 2015) o modificaciones en las condiciones de trabajo para mejorar la calidad de los procesos y garantizar mejores resultados (Suyama, 2011). Si bien estos métodos presentan mejoras respecto al método original, tienen la limitación de no ser completamente reproducibles, dependiendo de las habilidades del operario para la obtención de altos rendimientos en la extracción del ADN.

En cambio, con los avances de las técnicas de citometría de flujo en la extracción de núcleos intactos de granos de polen, la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) se presenta como una alternativa con una gran capacidad operativa (Carter et al., 2013; Dreissig et al., 2015, 2017). La ventaja de esta técnica radica principalmente en que la identificación y separación de núcleos individualizados dentro de poblaciones o subpoblaciones de la muestra se realiza por un sistema óptico (Robinson and Grégori, 2007; Carter et al., 2013) en función del nivel de fluorescencia en los histogramas, lo cual asegura determinar el nivel de ploidía y/o tipo de núcleo (vegetativo o generativo) aislados de los granos de polen. Esta técnica se aplicó con éxito para el aislamiento de núcleos de granos de polen de cebada (*Hordeum vulgare*) (Dreissig et al., 2015, 2017).

En cítricos son escasos los antecedentes de individualización y extracción de ADN de granos de polen. Un estudio relativamente reciente centró su interés en la producción de granos de polen no reducidos del mutante 'Nishiuchi Konatsu' del cv. 'Hyuganatsu' (*C. tamurana*). La investigación se enfocó en el aislamiento de granos de polen gigantes, con tamaños mayores a 42 μm , producidos en gran número por este genotipo (Honsho et al., 2016). La técnica utilizada es una variante a la propuesta por Suyama et al. (1996). Esta metodología consiste en germinar los granos de polen en un medio de cultivo con el fin de superar los problemas asociados a su pared rígida de los granos de polen; posteriormente se aísla el grano de polen de interés bajo un estereoscopio con un pelo de cabello humano unido a la punta de una pipeta Pasteur para facilitar su manipulación; seguidamente introducir el grano de polen germinado en un microtubo que contiene una solución tampón de extracción de núcleos, y por último se incuba para lograr la liberación del ADN al medio. Esta técnica se presenta efectiva para la manipulación de granos de polen gigantes, pero su aplicación en otros genotipos de cítricos está condicionada por la necesidad de manipulación de granos de polen de menor tamaño. Por ejemplo los mandarinos en general producen granos de polen que oscilan entre 26 y 32 μm (Kozaki and Hirai, 1981). Además, no se tiene la certeza del nivel de ploidía del grano de polen aislado hasta su análisis. El desarrollo de una técnica para el aislamiento y extracción del ADN de los granos de polen cítricos basada en la tecnología de FACS presenta un gran potencial para resolver los problemas de manipulación asociados al pequeño tamaño de los granos de polen presentes en las diferentes especies de *Citrus*, a su pared rígida (exina), nivel de ploidía y tipo de núcleo que se aísla.

1.7.2.2 Técnicas utilizadas en el genotipado de granos de polen

Independientemente de la técnica de extracción de ADN de los núcleos de los granos de polen, todas presentan la misma problemática, la limitada cantidad de ADN para el genotipado de los mismos. Para solventar este problema surgieron diferentes aproximaciones. En algunos casos se optó por utilizar directamente el ADN disponible de la extracción de los núcleos de los granos de polen para realizar un único análisis con un solo marcador o un número reducido de marcadores mediante Multiplex.

El empleo de un único marcador molecular se ha utilizado en caña de azúcar (*Saccharum spp.*) (Lu et al., 2015) y en patata (*Solanum spp.*) (Aziz et al., 1999) para el estudio de segregaciones alélicas y para relacionar genes de interés en los parentales masculinos utilizados en las hibridaciones sexuales, respectivamente. Sin embargo, estos estudios tienen los inconvenientes del elevado número de granos de polen individualizados que se necesitan, la limitada información que se obtiene y además no permiten la realización de estudios genéticos más complejos.

La PCR Multiplex se utilizó para estudiar la diversidad de especies polinizadoras que visitan los insectos polinizadores del castaño (*Castanea crenata*) llegando a utilizar hasta once marcadores moleculares en la misma PCR (Hasegawa et al., 2015); también se empleó para realizar estudios de polinización, evolución y genealogía en *Magnolia obovata* con marcadores SSR (Matsuki et al., 2007). Recientemente se ha utilizado para la identificación de gametos no reducidos en polen de híbridos diploides y triploides del género *Annona*, empleando únicamente dos marcadores SSR (Martin et al., 2019). Estas aproximaciones, aunque resultaron efectivas para estos estudios, están limitadas por el reducido número de marcadores que se pueden utilizar. En cítricos, Honsho et al., (2016) aislaron manualmente granos de polen de mandarino 'Hyuganatsu' (*C. tamurana*) en un microtubo con una solución tampón de extracción de ADN. Posteriormente mediante una reacción PCR Multiplex con 6 marcadores SSR intentaron determinar el mecanismo implicado en la formación de gametos no reducidos. Sin embargo, el porcentaje de muestras que amplificaron fue muy bajo (28.1%), el número de marcadores moleculares que utilizaron fue también muy bajo y además la mayoría de los marcadores no estaban localizados próximos al centrómero. Todo esto permite suponer que los resultados obtenidos son cuestionables.

Otra opción para el genotipado de los granos de polen es la utilización de kits WGA, ya que permiten generar μg a partir de fg o pg del ADN de una sola célula. Uno de los primeros kits WGA utilizados para la amplificación genómica de ADN de granos de polen fue el I-PEP (Improvement Pimer-Extension Preamplication) (Matsunaga et al., 1999) que se utilizó para estudiar los genes relacionados con la determinación del sexo de la planta dioica *Silene latifolia*. Este kit se basa en el uso de un mix de polimerasas para la amplificación el genoma mediante PCR. La principal desventaja que posee es la limitada longitud de los fragmentos de ADN que genera (<400 pb) (Lasken and Egholm, 2003). Una variante mejorada del

método anterior es el LL-DOP-PCR (Long products from low DNA quantities degenerate-oligonucleotide-primed PCR). Esta técnica se aplicó con éxito en la amplificación del genoma de granos de polen de *Magnolia obovata*, con la obtención de productos amplificados que permitieron la secuenciación del ADN de cloroplastos (Matsuki et al., 2007). La ventaja de esta técnica respecto a la I-PEP es que genera fragmentos de ADN más largos (entre 500 a 10.000 bp) aunque presenta la desventaja de una cobertura desigual del genoma (Lasken and Egholm, 2003).

Una metodología utilizada recientemente es la MDA (Multiple Displacement Amplification), cuya principal característica es la producción de productos de amplificación del genoma de alta calidad (de Bourcy et al., 2014; Gawad et al., 2016). Está basada en la utilización de una polimerasa de alta procesividad (Φ 29) que amplifica el ADN isotérmicamente a 30°C con gran actividad de desplazamiento extendiéndose desde sitios seleccionados al azar. Además, la ADN polimerasa Φ 29 genera productos de amplificación largos, aproximadamente unas 70.000 bp, de gran utilidad para la generación de sondas, el análisis de variantes de un solo nucleótido y secuenciación (Lasken and Egholm, 2003). El éxito de la metodología MDA aplicada a núcleos de granos de polen individualizados se demostró en un estudio realizado en cebada en el cual se combinó la técnica FACS con la metodología MDA de amplificación del genoma, permitiendo el posterior análisis de las muestras con múltiples marcadores SNP (Dreissig et al., 2015).

En cítricos no existen antecedentes del uso del FACS ni del kit de amplificación del genoma completo (WGA) para el aislamiento de núcleos de granos de polen individualizados y su posterior amplificación genómica y genotipado con marcadores moleculares. El desarrollo de esta novedosa metodología podría permitir la realización de estudios genéticos más básicos relacionados con el mapeo genético, eventos de recombinación y distorsiones alélicas originadas en los gametos haploides producidos por genotipos diploides, identificar el mecanismo implicado en la formación de gametos no reducidos de polen y estudiar los modelos de segregación cromosómica de las plantas tetraploides, todo ello sin la necesidad de tener que regenerar plantas.

1.7.3 Marcadores moleculares

En cítricos se han desarrollado varios tipos de marcadores moleculares que se han utilizado para la realización de estudios filogenéticos, caracterización de germoplasma y nuevas variedades, discriminación entre plántulas zigóticas y nucelares, análisis del mecanismo de formación de gametos no reducidos, creación de mapas genéticos, mapeo de los centrómeros y la selección asistida aplicada a la mejora (Ruiz and Asins, 2003; Luro et al., 2004; Froelicher et al., 2007; Chen et al., 2008c; Cuenca et al., 2011, 2013b, 2016; Garcia-Lor et al., 2015; Ollitrault et al., 2012a; Garcia-Lor et al., 2012, 2013b; Aleza et al., 2016; Curk et al., 2016; Oueslati et al., 2017; Rouiss et al., 2017a, 2017b; Curtolo et al., 2017).

Dentro del conjunto de marcadores moleculares empleados en cítricos se encuentran: isoenzimas (Torres et al., 1978; Roose, 1988; Asíns et al., 1995); RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Luro et al., 1994); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) (Nicolosi et al., 2000); RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Federici et al., 1998); SSRs (Simple Sequence Repeats) (Kijas et al., 1997; Luro et al., 2001, 2008; Barkley et al., 2006; Terol et al., 2008, 2007; Chen et al., 2008c; Froelicher et al., 2008; Cuenca et al., 2011; Garcia-Lor et al., 2013a, 2015); ISSR (Intersimple Sequence Repeats) (Fang et al., 1997); AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Liang et al., 2007; Pang et al., 2007); CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) (Lotfy et al., 2003); Indel (Insertion-Deletion), DARt (Diversity Arrays Technology) (Curtolo et al., 2017); y SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) (Ollitrault et al., 2012a, 2012b; Chen and Gmitter Jr, 2013; Cuenca et al., 2013a; Garcia-Lor et al., 2013a, 2015).

Un avance muy importante para el uso eficiente de los marcadores moleculares en estudios genéticos y en los programas de mejora genética es la disponibilidad de marcadores moleculares que sean codominantes, que estén mapeados genéticamente y anclados a la secuencia física del genoma. En 2012 se publicó el mapa genético de referencia de clementina (Ollitrault et al., 2012a) que incluye 961 marcadores codominantes (677 SNPs, 258 SSRs y 26 Indels) distribuidos en los 9 GL con una distancia media entre ellos de 1,13 cM. La disponibilidad de un mapa genético es un requisito previo esencial para el ensamblaje de la secuencia de referencia del genoma de los cítricos (Wu et al., 2014) que se obtuvo a partir de una planta haploide de clementina (Aleza et al., 2009a). Posteriormente se localizaron los centrómeros en los 9 GL del mapa genético de referencia (Aleza et al., 2015a) y todas estas herramientas son básicas para la realización de estudios genéticos y genómicos.

La combinación de marcadores SSR y SNP son de gran utilidad para los programas de mejora genética de cítricos (Aleza et al., 2009a, 2009b, 2010b, 2011, 2012a, 2012b, 2015, 2016, Kamiri et al., 2011, 2018, Cuenca et al., 2015b, 2016, 2013b, 2013a, Rouiss et al., 2017a, 2017b, 2018). Los marcadores SSR son secuencias de repeticiones en tándem que se presentan de forma consecutiva en un número variable, por lo que tienen un alto nivel de polimorfismo, son abundantes, codominantes y altamente reproducibles (Garcia-Lor et al., 2013a; Lu et al., 2015). Además estos marcadores permiten estimar las dosis alélicas de híbridos triploides y tetraploides mediante el método MAC-PR (Microsatellite DNA Allele Counting-peak Ratios)(Esselink et al., 2004) validado en cítricos por Cuenca et al. (2011). Los marcadores SSR se han utilizado en cítricos para el análisis de la variabilidad genética (Aleza et al., 2009b), identificación de variedades (Aleza et al., 2010a, 2010b; Cuenca et al., 2010), estudio genéticos de plantas poliploides (Aleza et al., 2009a, 2016, Kamiri et al., 2011, 2018, Rouiss et al., 2017b, 2018), discriminación entre de híbridos zigóticos y nucelares (Aleza et al., 2010b, 2011) e identificación de mecanismos de formación de gametos no reducidos (Aleza et al., 2010b, 2012a, 2012b, Cuenca et al., 2011, 2015b; Rouiss et al., 2017b). Los SNP son polimorfismos de variación en la secuencia de ADN de un solo nucleótido. Son

marcadores bialélicos y codominantes. Las ventajas frente a otros marcadores es su abundancia y distribución a lo largo de todo el genoma y su alta reproducibilidad entre laboratorios (Brookes, 1999; Garcia-Lor et al., 2013b). Además, como consecuencia de la abundancia de genomas actualmente disponibles y al desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva (GBS, Genotyping by Sequencing), son relativamente fáciles de identificar lo que posibilita disponer de un número elevado de SNP para ser aplicados en estudios de interés. Los SNP se han utilizado en cítricos para analizar la diversidad genética (Garcia-Lor et al., 2013b; Oueslati et al., 2017), estimación de las dosis alélicas en híbridos triploides y tetraploides (Cuenca et al., 2013a), identificar los mecanismos de formación de gametos no reducidos (Aleza et al., 2015a; Cuenca et al., 2015b; Rouiss et al., 2017a, 2017b) y para la realización de estudios genéticos sobre los modelos de segregación cromosómica en plantas tetraploides (Aleza et al., 2016; Rouiss et al., 2017a, 2018; Kamiri et al., 2018).

En esta tesis doctoral utilizaremos los marcadores SSR y SNP para la realización de estudios genéticos de los productos de amplificación genómica de los núcleos individualizados de granos de polen cítricos y para determinar el tipo de segregación cromosómica del mandarino 'Moncada' tetraploide utilizado tanto como parental masculino y femenino en hibridaciones sexuales interploides, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$.

2. Objetivos

Objetivo 1: Desarrollar una metodología reproducible y eficiente para determinar el nivel de ploidía de poblaciones de núcleos de granos de polen de genotipos diploides, triploides y tetraploides de cítricos mediante citometría de flujo.

En cítricos no hay antecedentes de una metodología eficiente que permita determinar el nivel de ploidía de poblaciones de granos de polen mediante citometría de flujo. En esta tesis doctoral se intentará establecer por primera vez en cítricos una metodología eficiente de citometría de flujo para:

- Analizar el nivel de ploidía de poblaciones de núcleos de granos de polen maduro de genotipos diploides, triploides y tetraploides.
- Identificar los genotipos diploides que producen gametos no reducidos de polen.
- Determinar el impacto de esta metodología en los programas de mejora genética de mandarino basados en hibridación sexual.

Objetivo 2: Aplicar FACS y WGA para el aislamiento y amplificación genómica de núcleos individualizados de granos de polen de cítricos para su posterior análisis genético con marcadores SSR y SNP.

En cítricos, el aislamiento de núcleos individualizados de granos de polen no se ha aplicado y la posibilidad de realizar estudios genéticos con numerosos marcadores SSR y SNP está enormemente limitada por la reducida cantidad de ADN que contienen sus núcleos; para lo cual se utilizará un kit de amplificación del genoma (WGA) que permita incrementar la cantidad de ADN de un solo núcleo, pasando de fg a μg . Por lo tanto, en esta tesis doctoral, se estudiará:

- La aplicación de la técnica FACS para el aislamiento individualizado de núcleos de granos de polen de diferentes genotipos de cítricos.
- La eficiencia de un kit de amplificación genómica del ADN de núcleos haploides y diploides de cítricos para su posterior análisis genético con marcadores SSR y SNP.
- Consecuencias genéticas derivadas del aislamiento y genotipado de núcleos individualizados haploides y diploides.

Objetivo 3: Analizar con marcadores SSR y SNP la estructura genética de núcleos haploides de granos de polen individualizados y amplificados con FACS y WGA.

Actualmente no hay antecedentes sobre estudios genéticos en los productos de amplificación genómica obtenidos de núcleos haploides individualizados de granos de polen de cítricos. El limón 'Eureka' es un híbrido interespecífico directo entre dos especies distanciadas genéticamente (*C. aurantium* y *C. medica*) lo que facilita la identificación de eventos de recombinación. Por otra parte, el híbrido 'CSO' es un parental de gran interés en los programas de mejora genética por su elevado contenido en antocianos por lo cual el

análisis de la distorsión en la segregación es de gran importancia. En esta tesis doctoral se analizarán con marcadores SSR y SNP los productos de amplificación genómica de núcleos individualizados de granos de polen haploides para:

- Determinar la frecuencia de eventos de recombinación en el cromosoma I en gametos haploides del limón 'Eureka'.
- Determinar las distorsiones de las frecuencias alélicas en granos de polen del tangor 'CSO' y en los híbridos diploides regenerados a partir de una hibridación sexual en la cual el tangor 'CSO' se utilizó como parental masculino.
- Analizar las implicaciones de estos estudios genéticos en los programas de mejora genética.

Objetivo 4: Generar nuevo conocimiento sobre el modo de segregación del mandarino 'Moncada' tetraploide y sus implicaciones en los programas de mejora genética dirigidos a la obtención de híbridos triploides.

En cítricos es fundamental comprender los modelos de segregación de los parentales tetraploides utilizados en los programas de mejora genética para optimizar las estrategias. El mandarino 'Moncada' diploide es un excelente parental para la obtención de nuevos híbridos triploides por su excelente calidad de la fruta y maduración tardía. El tratamiento de ápices microinjertados con colchicina y orizalina permitió la obtención de plantas tetraploides estables de mandarino 'Moncada'. El análisis del modo de segregación del mandarino 'Moncada' tetraploide utilizado como parental femenino y masculino en hibridaciones interploides nos permitirá comprobar si existen diferencias o no en los modelos de segregación y definir qué estrategia podría ser la más adecuada para la obtención de híbridos triploides. En esta tesis doctoral se analizará:

- El modelo de herencia del mandarino 'Moncada' tetraploide como parental femenino y masculino.
- La estructura genética de los gametos diploides.
- La utilización del mandarino 'Moncada' tetraploide en la obtención de híbridos triploides en hibridaciones $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$.

3. Capítulos

CAPITULO I

Assessing ploidy level analysis and single pollen genotyping of diploid and euploid Citrus genotypes by Fluorescence-Activated Cell Sorting and Whole- Genome Amplification

Miguel Garavello, José Cuenca, Steven Dreissig, Jörg Fuchs, Andreas Houben and Pablo
Aleza

Frontiers in Plant Science (2019)

DOI: 10.3389/fpls.2019.01174

Abstract

Flow cytometry is widely used to determine genome size and ploidy level in plants. This technique, when coupled with fluorescence-activated cell sorting (FACS), whole genome amplification and genotyping (WGA), opens up new opportunities for genetic studies of individualized nuclei. This strategy was used to analyze the genetic composition of single pollen nuclei of different citrus species. The flow cytometry and microscope observations allowed us to differentiate the populations of pollen nuclei present in the diploid and euploid genotypes analyzed, showing that citrus has binuclear pollen. We have identified in the 'CSO' tangor an additional nuclei population composed by the vegetative plus generative nuclei. Genotyping of this nuclei population revealed that vegetative and generative nuclei show the same genetic configuration. In addition, we have demonstrated the presence of unreduced gametes in the diploid genotype 'Mexican lime'. Genomic amplification is a robust method for haploid nuclei genotyping with several molecular markers, whereas in diploid nuclei using heterozygous markers showed a bias towards one of the two alleles, limiting the use of this tool in this type of nuclei. We further discuss the importance and applications of single pollen genotyping in citrus genetic studies.

Keywords: flow cytometry, triploid, tetraploid, fluorescence-activated cell sorting, whole genome amplification, SSR and SNP markers, unreduced gametes.

Introduction

Flow cytometry has become a widely used technique for genome size estimation and ploidy analysis in plant research because of its high throughput, accuracy and resolution as well as low operating cost per sample. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) enables the separation of nuclei according to their optical properties. The direct analysis of individual nuclei is generally limited by their low amount of DNA (Hou et al., 2015). To circumvent this problem Whole Genome Amplification (WGA) can be applied. WGA is a method for the robust amplification of a complete genome, starting with nanogram DNA quantities and resulting in microgram quantities of the amplified products (de Bourcy et al., 2014; Dreissig et al., 2015; Gawad et al., 2016). A critical step in WGA is the minimization of the amplification bias, generation of mutations and chimeras. In this sense, isothermal methods such as Multiple Displacement Amplification (MDA) have demonstrated to introduce a low error rate (Gawad et al., 2016).

Beside the application of leaves, young stems, flowers, roots and seeds, also mature pollen grains collected from anthers of several herbaceous and woody species have been used for flow cytometry analysis (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Zhang et al., 1992b; Mishiba et al., 2000; Pichot and El Maâtaoui, 2000; Pan et al., 2004; Stehlik et al., 2007; Kron and Husband, 2012; Chung et al., 2013; Dreissig et al., 2017). Angiosperm pollen contains both vegetative and generative sperm nuclei, which can be structurally and morphologically different (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Dewitte et al., 2009). The genotyping of individualized pollen grain nuclei opens up new opportunities in different areas of research such as the ecology of pollination, genetic and genomic studies (Isagi and Suyama, 2010). In addition, genotyping of individual pollen grains can be useful for the determination of the haplotypes of the male parent and meiotic recombination patterns (Mase et al., 2014; Dreissig et al., 2017) and also allows performing studies on the genetic structures of pollen grain populations as compared with those originated at the plant level, without interferences due to a potential cross-incompatibility (Gu et al., 2013). However, to our knowledge, ploidy level analysis and genotyping of pollen grains have not been previously assessed in citrus.

Diploid genotypes are the most common one in *Citrus* and related genera, with a basic chromosome number of $x = 9$ (Krug, 1943); although euploids and aneuploids have been induced or found occasionally, with triploids and tetraploids being the most common euploid variations (Lee, 1988). The genus *Citrus* can be used as a model for the study of somatic and sexual polyploidization (Ollitrault et al., 2008; Aleza et al., 2009b, 2009a; Cuenca et al., 2015a; Rouiss et al., 2017b). Sexual polyploidization by the formation of female unreduced gametes is a relatively frequent event in citrus and it is routinely used to obtain triploid hybrids through hybridizations between diploid progenitors (Aleza et al., 2010b; Cuenca et al., 2011, 2015b, 2015a; Rouiss et al., 2017b). The formation of unreduced pollen grains in citrus has been also reported from the genetic analysis of tetraploid populations (Rouiss et al., 2017a) and the direct observation and hand- made isolation of large pollen grains of one diploid genotype, associated with unreduced gametes (Honsho et

al., 2016). In order to improve the efficiency of citrus triploid breeding based on sexual hybridizations between diploid parents, it would be of great interest to develop a simple methodology that allows the ploidy level analysis of mature pollen grains for identifying parents producing unreduced pollen grains. In addition, this methodology would also increase the knowledge about the viability of citrus triploid hybrids pollen grains.

On the other hand, there is a lack of knowledge about citrus pollen genotyping. A limiting factor of this technique is the small amount of DNA per pollen and, thus, limiting the number of markers that can be used for analyzing single pollen grains. Citrus pollen genotyping has been previously only performed by multiplex PCR (Honsho et al., 2016). In the present study, we describe an effective methodology to determine the ploidy level in mature pollen grains of diploid, triploid, and tetraploid citrus genotypes, using FACS, followed by WGA and genotyping of individualized nuclei from pollen grains by Simple Sequence Repeats (SSR) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) molecular markers. Finally, we discuss the applications and implications of flow cytometry to determine the ploidy level of citrus pollen grains populations and the use of FACS combined with WGA for the genotyping of individualized nuclei.

Materials and Methods

Plant material

A total of 59 genotypes of different *Citrus* species and ploidy levels (1 haploid, 45 diploid, 7 triploid, and 6 tetraploid genotypes) were used from the pathogen-free Germplasm Bank (Navarro et al., 2002) (Table I-I) of the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) located at Moncada (Valencia, Spain). Between 40 and 50 flowers in pre-anthesis were collected from each genotype from the four cardinal points of the tree during Spring 2018. The anthers were removed from the flowers and placed in Petri dishes (50–80 anthers/plate, 16–25 plates/genotype) inside a desiccator containing silica gel until the anthers opened within 24–48 h. Petri dishes containing fully dehisced anthers were then sealed with parafilm and stored at –20°C until use (Volk, 2011).

Table I-I Citrus genotypes used to measure the relative DNA content of pollen grains by flow cytometry.

Ploidy level	Genotype	*Species	Bank ID
1X	Haploid clementine	<i>C. clementina</i>	IVIA-638
2X	N'15 mandarin	<i>C. hybrid</i>	-
2X	CSO tangor	<i>C. hybrid</i>	-
2X	Hamlin sweet orange	<i>C. sinensis</i>	IVIA-010
2X	Pineapple sweet orange	<i>C. sinensis</i>	IVIA-011
2X	Wilking mandarin	<i>C. reticulata</i>	IVIA-028
2X	Sanguinelli blood orange	<i>C. sinensis</i>	IVIA-034
2X	Fina clementine	<i>C. clementina</i>	IVIA-039
2X	Fino 74-L-08 lemon	<i>C. limon</i>	IVIA-049
2X	Verna lemon	<i>C. limon</i>	IVIA-062
2X	Fortune mandarin	<i>C. reticulata</i>	IVIA-080
2X	Temple tangor	<i>C. temple</i>	IVIA-081
2X	Fairchild mandarin	<i>C. reticulata</i>	IVIA-083
2X	Seville sour orange	<i>C. aurantium</i>	IVIA-117
2X	Olinda sweet orange	<i>C. sinensis</i>	IVIA-127
2X	Mexican lime	<i>C. aurantifolia</i>	IVIA-164
2X	Marsh grapefruit	<i>C. paradisi</i>	IVIA-176
2X	Campeona mandarin	<i>C. nobilis</i>	IVIA-193
2X	Ellendale tangor	<i>C. reticulata</i>	IVIA-194
2X	Murcott tangor	<i>C. reticulata</i>	IVIA-196
2X	Star Ruby grapefruit	<i>C. paradisi</i>	IVIA-197
2X	Fingered citron	<i>C. medica</i>	IVIA-202
2X	Chandler pummelo	<i>C. maxima</i>	IVIA-207
2X	Limoneira Lisbon lemon	<i>C. limon</i>	IVIA-214
2X	Frost navel orange	<i>C. sinensis</i>	IVIA-222
2X	Tachibana	<i>C. tachibana</i>	IVIA-237
2X	Duncan grapefruit	<i>C. paradisi</i>	IVIA-274
2X	Pink pummelo	<i>C. maxima</i>	IVIA-275
2X	Ortanique tangor	<i>C. reticulata</i>	IVIA-276
2X	Río Red grapefruit	<i>C. paradisi</i>	IVIA-289
2X	Eureka Frost lemon	<i>C. limon</i>	IVIA-297
2X	Palestine sweet lime	<i>C. limettioides</i>	IVIA-305
2X	Gil pummelo	<i>C. maxima</i>	IVIA-321
2X	Bernalina sweet orange	<i>C. sinensis</i>	IVIA-331
2X	Rough lemon	<i>C. jambhiri</i>	IVIA-333
2X	Rangpur lime	<i>C. limonia</i>	IVIA-334
2X	Seminole tangelo	<i>C. hybrid</i>	IVIA-348
2X	Willow leaf mandarin	<i>C. deliciosa</i>	IVIA-383

Table I.I Continued

Ploidy level	Genotype	*Species	Bank ID
2x	Carrizo citrange	<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>	IVIA-387
2X	Anana mandarin	<i>C. reticulata</i>	IVIA-390
2X	Tarocco Rosso blood orange	<i>C. sinensis</i>	IVIA-392
2X	Moncada mandarin	<i>C. hybrid</i>	IVIA-421
2X	Alemow	<i>C. macrophylla</i>	IVIA-518
2X	Corsican citron	<i>C. medica</i>	IVIA-567
2X	Imperial mandarin	<i>C. reticulata</i>	IVIA-576
2X	Nadorcott mandarin	<i>C. reticulata</i>	IVIA-641
3X	CidMexT 99-7	<i>C. hybrid</i>	-
3X	Oroblanco	<i>C. maxima</i> x <i>C. paradisi</i>	IVIA-302
3X	Safor mandarin	<i>C. hybrid</i>	IVIA-581
3X	Alborea mandarin	<i>C. hybrid</i>	IVIA-592
3X	Coral mandarin	<i>C. hybrid</i>	IVIA-593
3X	Tania 46 mandarin	<i>C. hybrid</i>	IVIA-594
3X	Matiz mandarin	<i>C. hybrid</i>	IVIA-595
4X	Chandler pummelo	<i>C. maxima</i>	-
4X	Nadorcott mandarin	<i>C. reticulata</i>	-
4X	Moncada mandarin	<i>C. hybrid</i>	-
4X	Eureka lemon	<i>C. limon</i>	IVIA-495
4X	Cleopatra mandarin	<i>C. reshni</i>	IVIA-502
4X	Alemow	<i>C. macrophylla</i>	IVIA-518

*The name of the species is based on the Tanaka classification (Tanaka, 1954, 1977).

Pollen nuclei isolation and ploidy level analysis

Flow cytometry was used to determine the ploidy level of the control leaves and mature pollen grains. As controls, we used leaves of haploid and diploid clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.). Leaf samples were chopped using a razor blade in the presence of a nuclei isolation buffer (Galbraith et al., 1983). Nuclei were filtered through a 30 µm nylon filter and stained with DAPI (1.5 µg/ml). After 10 min incubation, stained samples were run on a BD Influx (BD Biosciences, USA) and analyzed with BD FACS software.

To determine the pollen size, pollen from fully dehisced anthers were distributed with a brush onto a microscope slide. Preparations were observed under a Leica DMLS microscope and the diameters of 200 mature pollen grains were measured using the ImageJ2 software (Schindelin et al., 2015). To analyze the ploidy level of mature pollen grains, pollen nuclei were isolated as described by Kron and Husband (2012). The mesh size of the pre-filter and bursting filter was 20 and 50 µm, respectively. Afterwards, 4–5 dehisced anthers were collected in a 1.5 mL tube adding 300 µl of nuclei isolation buffer. The suspension was vortexed to release all pollen grains. The suspension was then filtered using the pre-filter and the bursting filter (CellTrics® filters, Partec®). The bursting filter, with the collected pollen grains, was then placed inside a clean tube and the pollen grains were gently rubbed against the filter for 10–15 s, using a plastic rod. Nuclei were rinsed through the filter with nuclei isolation buffer, and the process was repeated twice. After adding DAPI (1.5 µg/ml) the suspension was incubated for 10 min on ice and run on the cytometer as described before.

FACS-Based purification of single nuclei and whole genome amplification

FACS-based purification of single nuclei and WGA was carried out following the methodology described by Dreissig et al. (2015). From the nuclei suspension, single nuclei were sorted using a BD Influx cell sorter (BD Biosciences, USA) into individual wells of a 384-microwell plate containing 2 µl lysis solution, which was composed of 0.5 µl lysis buffer, 0.5 µl ddH₂O and 1 µl sample buffer (Genomiphi V2, GE Healthcare). To control the nuclear composition of the individual peaks, nuclei from the different fractions were sorted onto microscopic slides and checked under a fluorescence microscope Axioplan2 (ZEISS, Jena, Germany) equipped with an ORCA-ER CCD camera (Hamamatsu, Japan). Pictures were taken using the Simple PCI (Compix Inc., Imaging Systems, USA) software. WGA was performed using the Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, USA). Nuclei lysis and DNA denaturation were conducted by incubation at 65°C for 3 min in 2 µl lysis solution. The lysis solution was neutralized by adding 0.5 µl neutralization buffer (666 mM Tris-HCl, 250 mM HCl). Afterwards, a master mix composed of 3.5 µl sample buffer, 4.5 µl reaction buffer and 0.5 µl enzyme mix (Genomiphi V2, GE Healthcare) per reaction was added and samples were incubated at 30°C for 8 h followed by inactivation of the enzyme at 65°C for 10 min. Subsequently, each sample was diluted with 500 µl ddH₂O. The DNA concentration of the WGA products was measured by fluorometric quantitation (Qubit, Life Technologies). Additionally, several single pollen nuclei of the genotypes subjected to WGA were mixed in the same well to be used as a positive control against amplification errors (Dreissig et al., 2015).

Genotyping with molecular markers

WGA pollen DNA and genomic leaf DNA were genotyped with SSR and SNP molecular markers displaying heterozygosity for the analyzed genotypes (Table I.II). These markers are distributed across all linkage groups (LGs) of the clementine genetic map (Ollitrault et al., 2012a). Genomic DNA from control leaves was isolated using a Plant DNeasy kit from Qiagen Inc. (Valencia, CA, USA) following the manufacturer's protocol. PCR amplification using SSR markers was performed using a Thermocycler rep gradient S (Eppendorf®) in 15 µl containing 0.5 µl 1 U/µl of Taq DNA polymerase (Fermentas®), 3 µl citrus DNA, 1.5 µl of 2 mM welled (Sigma®) dye-labeled forward primer, 1.5 µl of 2 mM non-dye-labeled reverse primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 µl 10X PCR buffer, and 0.45 µl 50 mM MgCl₂. The PCR protocol was as follows: denaturation at 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 50 or 55°C, and 30 s at 72°C; and a final elongation step of 8 min at 72°C. Capillary electrophoresis was carried out using a Genetic Analysis System 8000 (Beckman Coulter Inc.). The PCR products were initially denatured at 90°C for 2 min, injected at 2 kV for 30 s, and separated at 6 kV for 35 min. Alleles were sized based on a DNA size standard (400 bp). GenomeLab™ v.10.0 (Beckman Coulter Inc.) genetic analysis software was used for data collection.

Table I-II Information about the molecular markers used in citrus pollen grain and leaf nuclei genotyping, including GenBank accession numbers, genetic distances, noted alleles and bibliographic references.

Genotype	Locus	Gene Bank/Phytozome Accesion	Marker type	Linkage Group	Genetic map locus position (cM)	Distance to the centromere (cM)	Noted alleles	Reference
CSO tangor	CIBE6147	ET085226	SSR	1	2.69	57.97	204-212	Ollitrault et al. (2010)
	2P21022555	Ciclev10018135 m.g	SNP	2	57.00	0.10	A:T	Curk et al. (2015)
	MEST470	DY290454	SSR	3	88.76	1.83	254-258	In preparation
	CF-ACA01	CN181701.1	SSR	4	24.41	8.30	335-338	In preparation
	MEST15	FC912829	SSR	5	16.21	6.91	174-192	Garcia-Lor et al. (2012)
	CiC4356-06	ET111465	SNP	6	6.21	0.20	C:T	Ollitrault et al. (2012a)
	mCrCIR03B07	FR677573	SSR	7	83.39	13.04	263-265	Cuenca et al. (2011)
LCY2-M-379	FJ516403	SNP	8	58.10	3.90	A:G	Ollitrault et al. (2012a)	
Carrizo citrange	SOS1-M50	JX630068	SNP	1	78.51	17.85	A:G	Garcia-Lor et al.(2013a)
	PSY-M30	JX630080	SNP	6	69.72	63.52	C:G	Garcia-Lor et al.(2013a)
	FLS-P129	JX630083	SNP	7	45.99	50.44	C:T	Garcia-Lor et al.(2013a)
Eureka Frost lemon	CiC2110-02	ET099643	SNP	1	29.61	31.05	A:C	Ollitrault et al. (2012a)
	CiC3712-01	ET079481	SNP	2	93.92	37.05	A:C	Ollitrault et al. (2012a)
	CiC1459-02	ET073328	SNP	3	118.06	27.47	A:C	Ollitrault et al. (2012a)
Moncada mandarin	CiC2810-01	ET103230	SNP	1	63.40	2.7	A:C	Ollitrault et al. (2012a)
	INVA-P855	JX630071	SNP	3	30.21	60.37	C:T	Garcia-Lor et al.(2013a)
	LAPXCF238	EU719653	SNP	6	19.16	12.96	G:C	Ollitrault et al. (2012a)
Mexican lime	CiC6213-07	ET085253	SNP	4	84.57	61.45	G:A	Ollitrault et al. (2012a)
	CiC4356-06	ET107540	SNP	6	6.15	0.05	C:T	Ollitrault et al. (2012a)
	CHI-M598	JX630075	SNP	4	11.03	5.13	C:G	Garcia-Lor et al.(2013a)

SNP markers were genotyped using KASPar™ technology by LGC Genomics (Hoddesdon, UK). The KASPar™ Genotyping System is a competitive, allele-specific dual Förster resonance energy transfer (FRET)-based assay for SNP genotyping. Primers were directly designed by LGC Genomics based on the SNP locus flanking sequence. A detailed explanation of the specific conditions and reagents using the KASPar technique can be found in Cuppen (2007). In order to test if WGA of diploid nuclei is an adequate approach to identify unreduced gametes, 10 individualized nuclei from leaves of ‘Carrizo’ citrange, ‘Eureka’ lemon, ‘Mexican’ lime, and ‘Moncada’ mandarin were isolated and amplified. As positive controls, DNA from leaves and 20 leaf nuclei were isolated from each genotype in the same well. WGA products were evaluated using three different heterozygous SNPs markers for each genotype located in different LGs.

Results

Ploidy level of mature pollen grains of diploid, triploid, and tetraploid citrus genotypes

To isolate the nuclei of mature citrus pollen grains for flow cytometric measurements of the DNA content a practical and efficient protocol is needed. For this purpose, we tested different methodologies reported in the literature, including mechanical crushing (Galbraith et al., 1983) and sonication (Dewitte et al., 2009). However, these approaches resulted in high levels of background and no conspicuous and reliable peaks were detected in the histograms (data no shown). Only the ‘bursting’ methodology proposed by Kron and Husband (2012) resulted in clear DNA peaks. To determine the necessary diameters of the pre- and bursting filters required for the pollen grain and nuclei isolation, respectively, we measured the diameters of pollen grains of 10 different citrus genotypes representing ancestral and secondary species. Figure I.I shows selected examples of pollen grain size measurements of the cultivars ‘Corsican’ citron, ‘Fortune’ mandarin and ‘Mexican’ lime. The populations of pollen grains showed a unimodal distribution, with slight differences in sizes between genotypes. The diameters of ‘Corsican’ citron pollen grains ranged from 26 to 40 μm , between 22 and 36 μm for ‘Fortune’ mandarin and ‘Mexican’ lime showed a size distribution between 22 and 50 μm (Figure I.I). The minimum diameter value observed was 22 μm and the maximum value was 50 μm ; therefore, we decided to work with the 50 μm pre-filter and the 20 μm bursting filter. Then, following this methodology, we obtained histograms with relatively low background and distinct peaks. To confirm ploidy differences between the selected *Citrus* genotypes, we performed comparative measurements of nuclei isolated from leaf tissue of two different clementine genotypes. In both cases, only one dominant peak was observed with the diploid genotype (IVIA-039) showing the peak at a fluorescence value twice as big as that of the haploid genotype (IVIA-638) (Figure I.II).

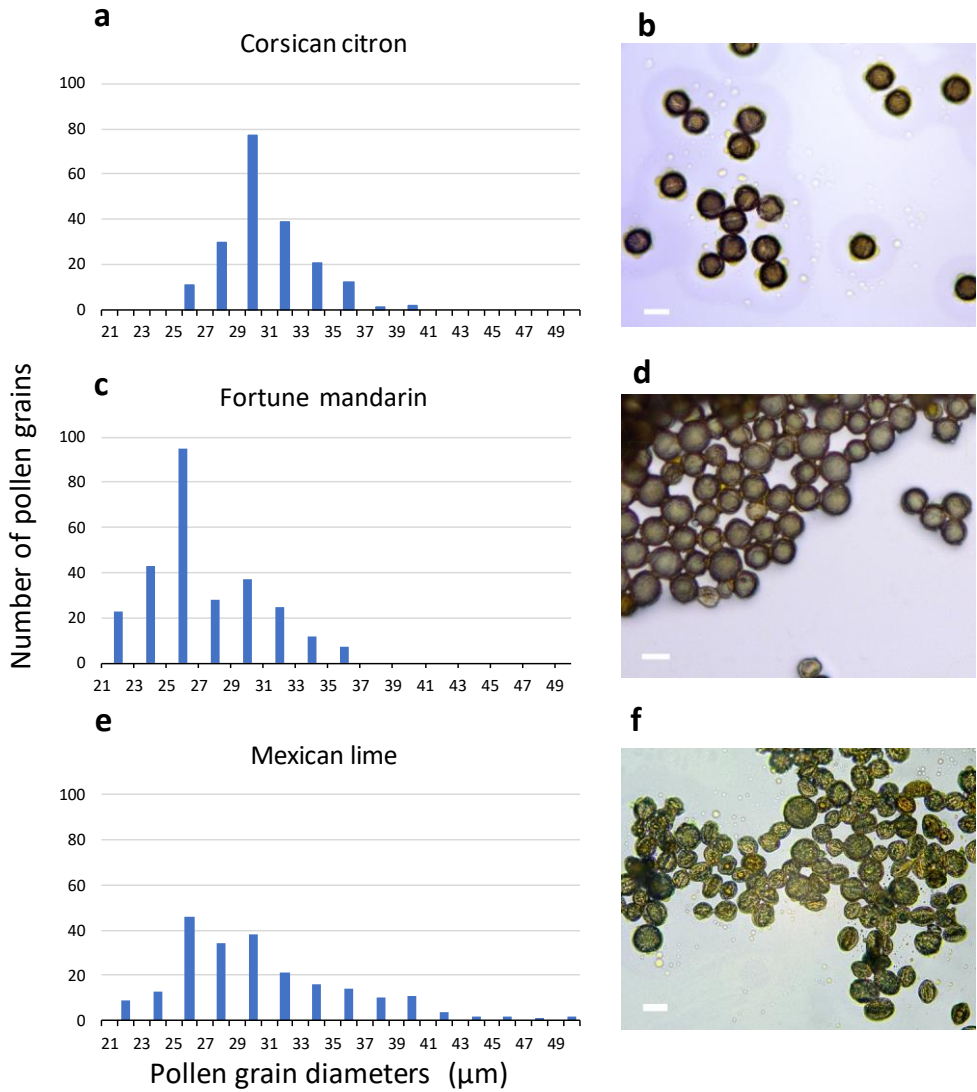


Figure I-I Distribution of representative frequencies and images showing the heterogeneity of pollen diameters in three citrus genotypes: **a-b**: 'Corsican' citron, **c-d**: 'Fortune' mandarin, **e-f**: 'Mexican' lime. Scale bars, 30 μm .

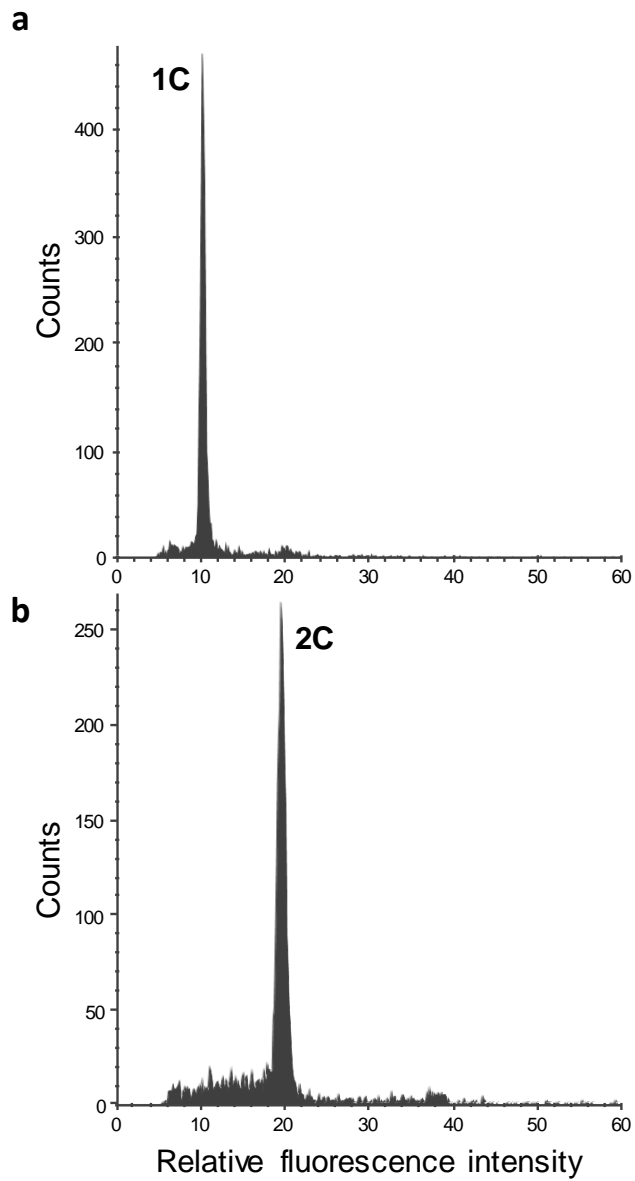


Figure I-II Flow cytometric histograms of DAPI-stained leaf nuclei of the haploid control plant IVIA-638 (a) and the diploid control plant IVIA-039 (b) of clementine.

Subsequently, we analyzed the ploidy level of mature pollen grains of 45 diploid, 7 triploid, and 6 tetraploid genotypes (Table I.I). Forty-three of the 45 diploids showed histograms with two peaks (Figure I.IIIb), corresponding to the 1C peak of the vegetative nuclei (V) and the 2C peak of the generative nuclei as it is typical for species with binucleate pollen (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Kron and Husband, 2012). However, exceptions were observed for 'CSO' tangor and 'Mexican' lime. Pollen from the 'CSO' tangor produced a histogram with an additional third peak (Figure I.IIIa-c). The fluorescence values of the first two nuclei populations coincide with the values obtained for the other diploid genotype analyzed (1V, 1G), whereas the third peak (1VG) displayed a higher fluorescence intensity than the other two peaks (Figures I.IIIb, c). To identify the origin of this third peak, we sorted nuclei corresponding to the three individual peaks separately and evaluated them microscopically. Nuclei from the populations 1V and 1G revealed different chromatin structures. While the population with the lower fluorescence intensity corresponding to the vegetative nuclei (1V) revealed a relaxed chromatin condensation, the generative nuclei (1G) showed a condensed chromatin structure (Figure I.IIIc). Interestingly, the third peak (1VG) reflects two nuclei attached to each other, one with a relaxed structure and one with a compact structure (Figure I.IIIc).

On the other hand, pollen nuclei from 'Mexican' lime showed five populations (Figure I.III d, e). Beside 1V and 1G populations, which were also present in the other diploid genotypes analyzed; we found two additional populations with twice the fluorescence value of 1V and 1G nuclei populations which were named 2V and 2G, respectively ($2V/1V = 1.98$; $2G/1G = 1.98$); and a fifth small peak with twice the fluorescence of the 2G peak, named 4G, with a correlation in the DNA content of the 4G and 2G populations ($4G/2G = 1.94$). The fluorescence ratios between 2V/1V and 2G/1G indicate that 2V and 2G peaks potentially contain unreduced gametes, whereas the 4G peak might correspond to a population of tetraploid nuclei that could be originated as a consequence of doubled-unreduced gametes. However, due to a low number of viable pollen grains in 'Mexican' lime (Pons et al., 2011; Rouiss et al., 2018), the number of nuclei of the corresponding ploidy levels is relatively low and the resulting peaks not very pronounced.

The tetraploid genotypes showed two populations of nuclei with fluorescence values twice as high as that of the populations of the 1V and 1G nuclei of diploid genotypes (Figure I.IV). Nuclei of pollen grains of triploid genotypes could not be isolated (data not shown).

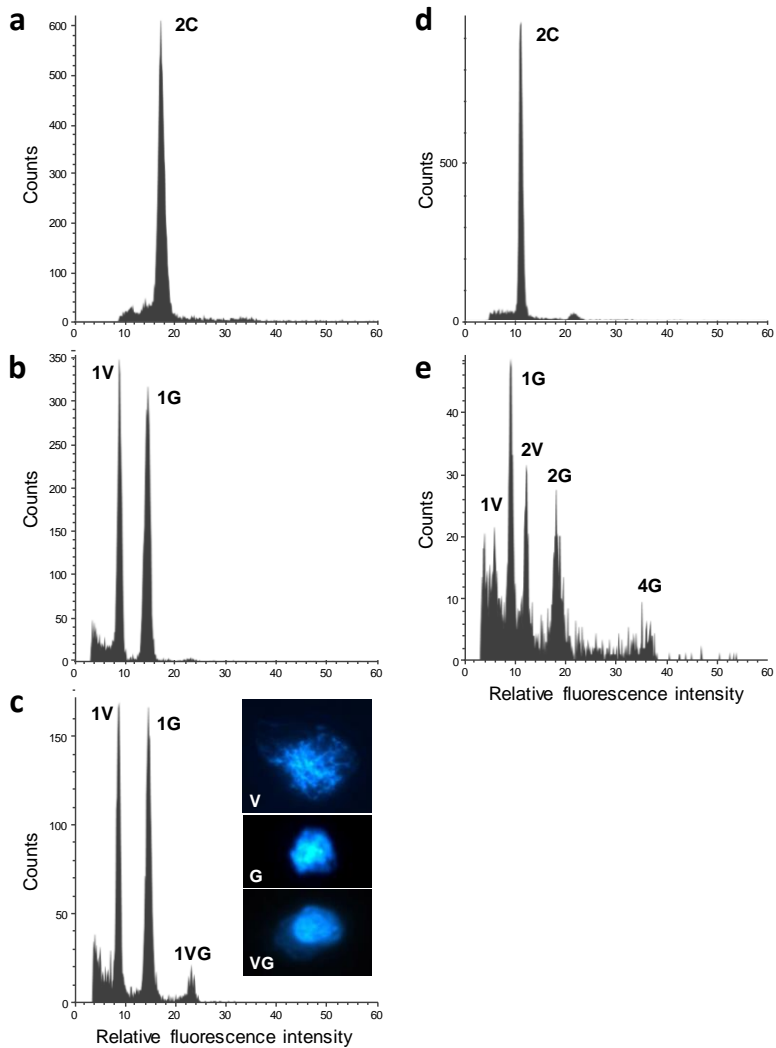


Figure I-III Flow cytometric measurements of DAPI-stained leaf and pollen nuclei of diploid citrus genotypes: **a.** 'CSO' tangor leaf. **b.** 'Moncada' mandarin pollen. **c.** 'CSO' tangor pollen. **d.** 'Mexican' lime leaf. **e.** 'Mexican' lime pollen. Inserts in **c** show examples of flow sorted pollen nuclei of the corresponding histogram peaks of 'CSO' tangor. V, G and VG represent vegetative, generative and vegetative plus generative pollen nuclei, respectively. Please note that the histograms of 'CSO' tangor and 'Mexican' lime were recorded on different days with different cytometer settings resulting in a variation in the peak positions when both genotypes are compared with each other.

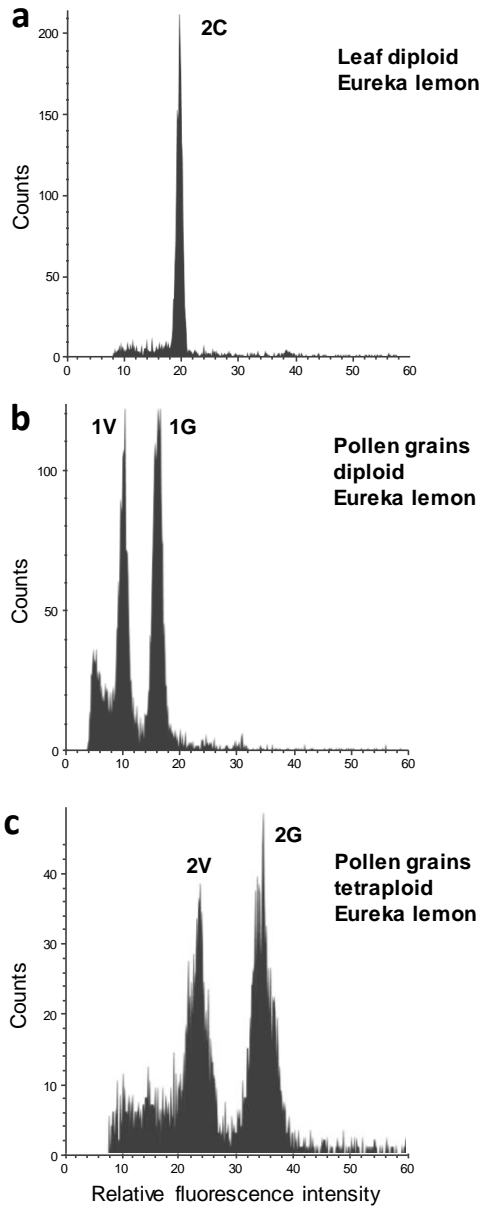


Figure I-IV Flow cytometric measurements of leaf and pollen nuclei of 'Eureka' lemon. a. Diploid 'Eureka' lemon leaf, b. Pollen of diploid 'Eureka' lemon. c. Pollen of tetraploid 'Eureka' lemon.

FACS, WGA, and Genotyping of single pollen nuclei

In order to determine the genotype underlying the three different populations of pollen nuclei found in 'CSO' tangor, FACS-based isolation of single nuclei coupled with whole-genome amplification was performed. A total of 72 nuclei were isolated, 24 nuclei from each of the three fluorescence peaks (1V, 1G and 1VG, Figure I.IIIc), along with 20 nuclei sorted into the same well as positive control and leaf DNA. To confirm the successful sorting of the nuclei in single microwells and to identify their genetic origin, WGA products were analyzed with five SSR and three SNP markers heterozygous for 'CSO' tangor (Table I.III) located in eight different linkage groups (LGs) of the clementine genetic map (Ollitrault et al., 2012a). From the 72 nuclei, 63 displayed at least 50% of positive PCR reactions (87.5%). Out of 576 PCR reactions for all marker combinations, 487 were positive (84.5%).

The marker call rates were 68.2% for the 1V nuclei population, 91.7% for the 1G nuclei population and 95.8% for the 1VG population (Table I.III). These results could be related with the increasing number of copies in each nuclei population. The marker analysis displayed heterozygosity for the leaf and pollen positive controls, as expected (Table I.III). In contrast, only one allele was observed with all SSR and SNP markers for the 1V, 1G, and 1VG nuclei populations. Therefore, we confirmed that the three nuclei populations recovered from pollen grains of the diploid 'CSO' tangor are based on a single allele of the same origin each. In addition, the fact that the nuclei population with the highest fluorescence peak (1VG) is homozygous reflects that this population is composed of two attached nuclei (1V+1G) derived from the same pollen grain.

Taken together the results obtained with molecular markers for 'CSO' tangor and the histogram obtained after ploidy level analysis of mature pollen grains of 'Mexican' lime, we can consider that the peaks 1V and 1G in 'Mexican' lime correspond to vegetative and generative nuclei, whereas 2V and 2G peaks correspond to unreduced gametes.

We tested the genotyping of WGA-diploid nuclei as an approach to identify unreduced gametes by isolating and amplifying individualized nuclei from leaves of several genotypes, along with DNA from leaves and 20 leaf nuclei mixed from each genotype. Out of the 40 amplified nuclei, 24 produced positive PCR amplifications for at least 50% of the analyzed markers (62.5%). The amplification ratios were 70% for 'Carrizo' citrange, 90% for 'Mexican' lime and 60% for 'Eureka' lemon and 'Moncada' mandarin. For these leaf nuclei, the ratios of the allele signals for all marker-genotype combinations are scattered in the plot, without forming a clear heterozygous group, as expected, and even showing homozygous amplifications.

Table I-III Results by linkage group (LG) and molecular marker of the diploid genotype 'CSO' for populations of vegetative nuclei 1V, generative nuclei 1G and attached nuclei 1VG.

Samples	Molecular markers by Linkage group in brackets							
	CIBE6147 (1)	2P21022555 (2)	MEST470 (3)	CF-ACA01 (4)	MEST15 (5)	CiC4356-06 (6)	mCrCIR03B07 (7)	LCY2-M379 (8)
Leaf control	204-212	AG	254-258	336-339	174-192	TC	263-265	GA
PPC1	204-212	AG	254-258	336-339	174-192	TC	263-265	GA
V-01	-	G	254	336	192	C	263	A
V-02	-	A	X	-	174	C	265	A
V-03	212	G	-	336	174	T	265	G
V-04	204	G	254	-	192	C	263	-
V-05	-	-	-	-	-	-	-	-
V-06	-	G	254	336	192	T	263	G
V-07	-	-	-	-	-	-	-	-
V-08	212	G	-	339	174	T	265	A
V-09	-	-	-	-	-	C	-	-
V-10	212	A	-	336	192	C	263	G
V-11	212	G	258	336	174	C	263	A
V-12	204	A	254	336	192	C	263	A
V-13	204	-	254	339	192	-	-	-
V-14	204	A	254	336	192	C	263	-
V-15	204	G	254	336	174	C	263	G
V-16	204	G	258	336	192	C	263	G
V-17	212	G	258	339	192	C	265	G
V-18	-	-	-	-	-	-	-	-
V-19	212	G	258	336	174	T	265	A
V-20	204	G	254	339	192	T	263	G
V-21	-	-	-	-	-	-	-	-
V-22	-	-	-	-	-	C	-	-
V-23	212	G	258	339	192	C	265	G
V-24	212	-	254	336	174	T	265	A
G-01	204	A	258	339	174	C	263	A
G-02	204	A	254	336	192	T	265	G
G-03	-	A	-	-	-	-	-	-
G-04	204	A	254	336	192	T	263	G
G-05	212	G	258	339	192	C	263	G
G-06	212	G	258	339	174	C	265	G
G-07	204	G	254	339	192	C	263	G
G-08	204	G	258	339	174	T	263	G
G-09	-	-	-	-	-	-	-	-
G-10	-	G	-	-	174	C	265	A
G-11	204	G	254	336	174	C	263	A

Table I.III Continued

Samples	Molecular markers by Linkage group in brackets							
	CIBE6147 (1)	2P21022555 (2)	MEST470 (3)	CF-ACA01 (4)	MEST15 (5)	CiC4356-06 (6)	mCrCIR03B07 (7)	LCY2-M379 (8)
G-12	204	A	254	339	192	C	263	G
G-13	204	G	258	339	192	C	263	A
G-14	204	G	254	-	192	T	263	A
G-15	212	A	254	339	192	T	265	G
G-16	204	A	254	336	192	C	263	G
G-17	212	G	258	339	192	T	265	G
G-18	212	G	258	339	174	T	265	A
G-19	212	A	254	339	192	T	263	A
G-20	204	-	258	336	192	T	265	A
G-21	204	G	258	336	192	C	265	G
G-22	212	G	254	339	174	T	265	A
G-23	212	G	254	339	174	T	265	G
G-24	204	G	258	339	174	T	265	-
VG-01	212	A	258	336	174	T	263	A
VG-02	204	A	258	336	192	C	265	A
VG-03	212	A	258	336	192	T	263	G
VG-04	212	G	254	336	174	T	263	A
VG-05	212	G	258	336	192	T	263	A
VG-06	204	G	254	336	174	T	263	A
VG-07	212	-	-	339	-	-	265	-
VG-08	204	G	254	336	174	C	265	A
VG-09	212	A	254	336	174	C	265	A
VG-10	212	G	254	336	192	C	265	G
VG-11	212	A	254	336	192	C	265	A
VG-12	212	G	254	336	174	C	265	G
VG-13	212	G	254	336	174	T	265	A
VG-14	212	G	254	336	174	C	263	G
VG-15	204	A	258	336	174	C	265	G
VG-16	204	G	258	336	192	C	265	A
VG-17	212	G	258	336	-	T	-	G
VG-18	212	G	254	336	192	T	263	G
VG-19	212	G	258	336	192	C	265	A
VG-20	204	G	254	336	174	C	263	A
VG-21	212	G	258	339	192	C	263	A
VG-22	212	G	254	336	192	T	263	G
VG-23	212	G	258	339	192	T	263	G
VG-24	212	A	254	336	192	C	265	A

1. **PPC**: Pollen positive control. **V** samples correspond to nuclei isolated from the 1V fluorescence peak, **G** from the 1G fluorescence peak and **VG** from the 1VG fluorescence peak.

For example, DNA from leaves and leaf nuclei positive control of `Mexican´ lime genotyped with the CHI-M598 SNP marker, resulted in heterozygous call rates (CG alleles), as expected. Furthermore, we used DNA from homozygous leaf controls, producing homozygosity for each allele, CC and GG signals. However, leaf nuclei amplifications displayed no defined heterozygous clusters and even some amplifications are grouped together with the homozygous controls (Figure I.V). These results show that the WGA kit in at least some cases only amplifies a single allele of the two present alleles or the allele amplification is not balanced (Figure I.V). With these results, the WGA of diploid nuclei of unreduced gametes of `Mexican´ cannot be used for genotyping and to identify the mechanism underlying the formation of 2n pollen gametes.

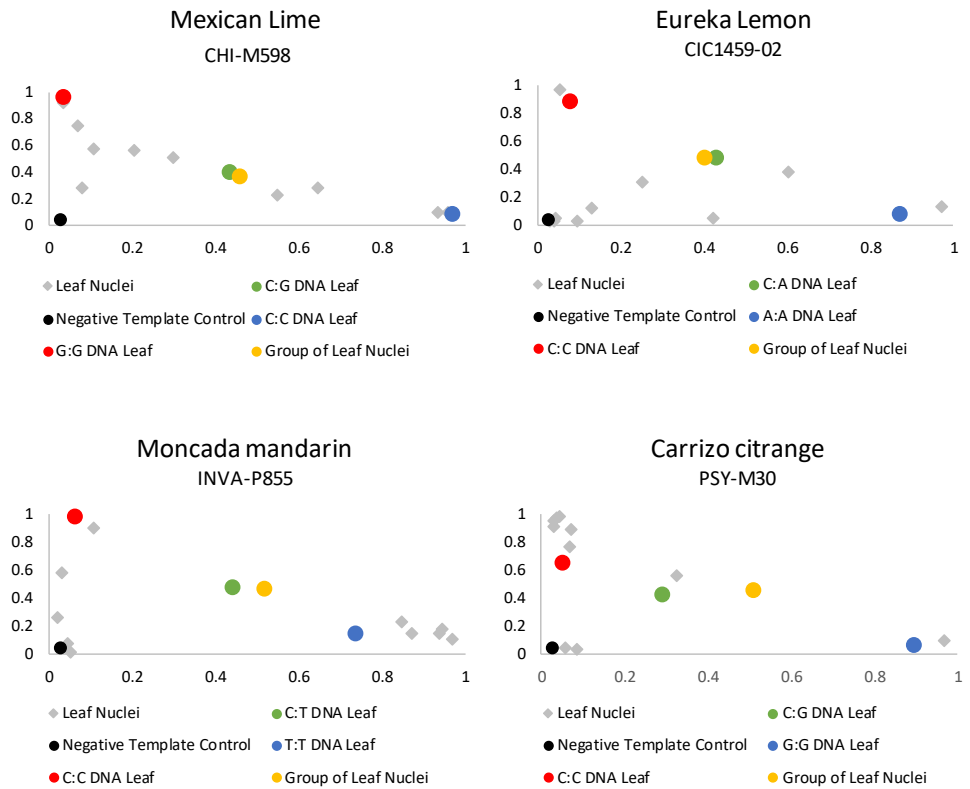


Figure I-V Representative dispersion diagram of PCR products of the foliar nuclei amplified with the WGA kit of the four diploid genotypes analyzed.

Discussion

Flow cytometry is a simple and efficient method to determine the ploidy level of citrus pollen grains

The applications of flow cytometry has increased considerably since its inception (Doležel et al., 2007; Orbović et al., 2008; Adan et al., 2017; Bourge et al., 2018; Hoang et al., 2019). This method has become a reliable and fast tool in plant biology to determine the nuclear DNA content (Kron and Husband, 2012; Hoang et al., 2019) as well as ploidy levels (Eeckhaut et al., 2005; Ochatt, 2008; Bourge et al., 2018). In citrus, flow cytometry has been mainly used to determine the genome size and the ploidy level of somatic tissue in many breeding programs (Ollitrault and Michaux-Ferrière, 1992; Seker et al., 2003; Guo et al., 2004; Orbović et al., 2008; Aleza et al., 2009b, 2012b, 2012a; Dutt et al., 2010; Cuenca et al., 2011; Kamiri et al., 2011, 2018; Navarro et al., 2015; Rouiss et al., 2017b, 2017a).

In recent years, flow cytometry has also been used to study the DNA content of pollen nuclei in a large number of plant genera, which opens up new opportunities to study the meiotic processes, such as sexual polyploidization (Dewitte et al., 2009; Kron and Husband, 2015; Sora et al., 2016; Kreiner et al., 2017), and demonstrating that many angiosperms are capable of producing $2n$ gametes (Van Tuyl et al., 1989; Pan et al., 2004; Kron and Husband, 2012; Chung et al., 2013). In this paper, we apply for the first-time flow cytometry to study pollen grain populations in several species of the genus *Citrus*. Our study confirms that flow cytometry as a simple and cost-effective methodology to determine the ploidy level of citrus pollen grains. Quality histograms were obtained with DAPI-stained pollen nuclei, as reported for other species (Van Tuyl et al., 1989; Pan et al., 2004; Doležel et al., 2007; Dewitte et al., 2009; Kron and Husband, 2012).

The DNA content of haploid leaf nuclei is expected to be similar to that of the vegetative pollen nuclei, as their ploidy level is x (in the case of *Citrus* $x = 9$), while the DNA content in diploid nuclei from leaf is expected to be similar to that of the generative pollen nuclei, as their DNA content is $2C$. However, we have observed slightly lower fluorescence for the generative pollen nuclei in comparison with leaf nuclei. These differences have also been reported for other species (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Dewitte et al., 2009; Kron and Husband, 2012). The reason behind could be structural differences between the generative and leaf nuclei (Bennett and Leitch, 2005) and fluorescence inhibition that operates differently on leaf and the pollen nuclei (Price et al., 2000).

We confirmed by microscopy and flow cytometry that mature pollen grains of citrus are binucleated. Histograms of the analyzed pollen grains from diploid donors revealed the clear presence of two populations with different fluorescence intensities, which agrees with what was found for pollen grains of other diploid angiosperm species (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Pan et al., 2004; Dewitte et al., 2009; Kron and Husband, 2012, 2015). The first population contained vegetative nuclei, with half of the DNA content of leaf nuclei whereas the second population composed of generative nuclei has almost the same DNA

content as the leaf tissue. This indicates that the generative nucleus is in the post replication stage of the cell division (G2) (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Dewitte et al., 2009; Kron and Husband, 2012, 2015). Afterwards, the generative nuclei performs a further mitotic division to produce twin sperm cells responsible for the double fecundation (Berger and Twell, 2011). Citrus pollen contained nuclei having structural differences. The vegetative nucleus is large and less condensed, while the generative nucleus is more condensed. These differences have also been observed in other species (Dewitte et al., 2009; Alonso Peña, 2011; Kron and Husband, 2015). Only two exceptions were found in the analyzed histograms of the diploid genotypes 'CSO' tangor and 'Mexican' lime, in which beside 1V and 1G peaks additional were found.

In 'CSO' tangor, we observed an additional peak named 1VG, (Figure I.IIIc). The fluorescence value of this peak suggests that the vegetative and generative nuclei of the same cell remained attached to each other after the opening of the pollen using the bursting-isolation method. In addition, we confirmed with SSR and SNPs markers that the each of the three nuclei populations has an identical genetic origin. On the other hand, (Rouiss et al. (2017a) identified the presence of unreduced pollen from the diploid genotype 'CSO' by analyzing tetraploid progenies obtained with a tetraploid female parent. However, we did not find any peak corresponding to unreduced pollen. In this context, in addition to genetic factors, the generation of unreduced gametes is also influenced by environmental factors (Souza et al., 2004; d'Erfurth et al., 2009; Dewitte et al., 2009; Aleza et al., 2010b; Mason et al., 2011; De Storme et al., 2012; De Storme and Geelen, 2013; Sora et al., 2016; Wang et al., 2017), which might not be favoring their production during the season covered by the present study. In fact, tetraploid progenies from 'CSO' were only obtained during the season in which Rouiss et al. (2017a) performed their study (H. Rouiss, personal communication).

Nevertheless, our methodology could be applied to further studies focused on how temperature stress or environmental conditions could influence the formation of 2n gametes in citrus. Unreduced pollen grains were observed in the diploid 'Mexican' lime. To our knowledge, this is the first report on the observation of this type of pollen population by flow cytometry in *Citrus*. The 'Mexican' lime pollen showed 2V and 2G nuclei populations, with similar fluorescence intensity as the vegetative and generative pollen nuclei of tetraploid genotypes. The presence of pollen nuclei with a duplicated DNA content (2G) in comparison to leaf nuclei (2C) was observed for other plant genera before (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Dewitte et al., 2009). In addition, a 4G nuclei population was observed with a double DNA content of the 2G population which could be due to the formation of doubled-unreduced gametes. This phenomenon is unusual although the formation of tetraploid pollen due to the lack of post-meiotic cytokinesis in all microspore mother cells has been described in alfalfa (McCoy and Smith, 1983; Pfeiffer and Bingham, 1983; Tavoletti et al., 2000). Doubled-unreduced gametes have been observed in interspecific strawberry hybrids (Bringhurst and Gill, 1970). We also observed large pollen grains in this genotype (Figure I.If). The presence of enlarged pollen grains is generally associated with the formation of unreduced gametes (Jones et al., 2007; Honsho et al.,

2016). The 'Mexican' lime is a interspecific hybrid between *C. micrantha* × *C. medica* (Nicolosi et al., 2000; Garcia-Lor et al., 2013a; Curk et al., 2016). It is known that interspecific hybrids of other plant genera show a tendency towards the formation of unreduced gametes (Van Tuyl et al., 1989; Ramanna et al., 2003; Mason et al., 2011; Chung et al., 2013; Martin et al., 2019). In addition, Curk et al. (2016) proposed that *C. latifolia* ('Tahiti' lime like accessions) resulted from the fertilization of a haploid lemon ovule by a diploid gamete of a diploid 'Mexican' like lime. These observations support the hypothesis that 'Mexican' lime produce unreduced pollen gametes.

In contrast to all diploid and tetraploid genotypes, the results obtained from the analysis of the triploid genotypes showed no clear peaks in the histograms. In general, citrus triploid hybrids do not produce seeds or induce seeds in other genotypes by cross-pollination since they have very low male and female fertility (Aleza et al., 2010b, 2012a; Phillips et al., 2016). Odd-numbered polyploids often have pollen of high rates of infertility or aneuploidy, as reported for other species (e.g. *Aeschynanthus* spp., *Alstroemeria* spp., *Crocus* spp., *Lilium* spp.; Kron and Husband, 2012; Phillips et al., 2016; Rounsaville et al., 2011). The absence of clear peaks in the histograms has been demonstrated to be due to pollen infertility.

Our flow cytometry analysis of pollen from tetraploid genotypes revealed the presence of two populations, i.e., vegetative and generative pollen nuclei, both showing twice the fluorescence than their counterpart nuclei in the diploid genotypes. Although cases of unreduced pollen have been reported in diploid citrus genotypes (Honsho et al., 2016; Rouiss et al., 2017a), little is known regarding tetraploid genotypes. In studies of progenies from controlled $2X \times 4X$ hybridizations, where the female parent is self-incompatible, double reduced haploid pollen gametes were observed, resulting in diploid plants (Aleza et al., 2012a). Kamiri et al. (2009) also reported the production of haploid gametes from citrus allotetraploid somatic hybrids. Koutecký et al. (2011) observed one pentaploid hybrid between diploid *Centaurea pseudofirgia* and tetraploid *C. jacea*, arising from a reduced diploid ovule and a tetraploid unreduced pollen grain. These studies showed that tetraploid genotypes can produce pollen grains with different ploidy levels than the expected, and these variants are difficult to identify by flow cytometry.

FACS coupled with WGA is an effective tool for the genotyping of individualized pollen nuclei

We demonstrate that the FACS strategy can be applied to isolate individual nuclei of citrus, allowing their classification and further amplification and genotyping. The use of WGA for individualized nuclei combined with genotyping provides the opportunity to use a large number of molecular markers (Dreissig et al., 2015, 2017; Gawad et al., 2016).

The results obtained with the molecular markers allowed us to conclude that the 1V, 1G, and 1VG nuclei populations observed in the 'CSO' genotype correspond to reduced and not to unreduced pollen. These findings are of importance for the interpretation of the

histograms. We can affirm that, in citrus, the presence of a second peak in pollen from diploid and tetraploid genotypes does not imply their correspondence with $2n$ pollen and are in agreement with binucleated citrus pollen grains. To our knowledge, this is the first report in citrus demonstrating that vegetative and generative nuclei have the same genetic configuration based on molecular markers as expected. In this context, vegetative and generative nuclei populations have been identified in different woody and herbaceous species (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Dewitte et al., 2009; Kron and Husband, 2012; Kreiner et al., 2017), but their genetic constitution has not been demonstrated.

The use of the WGA method and further genotyping with SSR and SNPs markers shows to be reliable for the genotyping of haploid nuclei isolated from mature pollen grains, offering new approaches to increase our knowledge about citrus genetics. However, the amplifications of diploid leaf nuclei did not show the expected results. WGA of those nuclei and their genotyping with heterozygous markers resulted in unbalanced amplifications, losing the 1:1 expected ratio and biased towards one of the two alleles. This allelic imbalance has been previously observed in single-cell genomic sequencing studies also, which is attributed to the bias in the whole genome amplification that occurs in the initial reaction, which is exaggerated by further reactions (de Bourcy et al., 2014; Gawad et al., 2016; Yuan et al., 2018).

Conclusions

In this paper, we have demonstrated that flow cytometry is an efficient tool for the analysis of pollen grain nuclei populations in several citrus species. In addition, we report for the first time, the generation of unreduced pollen from the interspecific diploid 'Mexican' lime. This methodology opens up new applications in citrus research studies, such as the determination of unreduced pollen frequency in breeding parents and the analysis of environmental conditions (e.g. temperature) on the frequency of the unreduced pollen. Sorted nuclei can be used for subsequent WGA for further genetic studies. The whole genome amplified samples can be used to perform studies related to allele segregation, genetic mapping and meiotic crossovers, without the interference that can be encountered when analyzing the derived progenies. However, WGA from diploid leaf nuclei was generally biased towards one allele, thus hampering the genetic analysis of unreduced pollen and of normal diploid pollen arising from tetraploid parents.

Genotyping of the whole genome amplified DNA derived from single pollen nuclei with SSR and SNP molecular markers resulted in a call rate comparable with those previously reported for several species. The obtained results allowed the genetic analysis of single pollen nuclei arising from diploid parents. Altogether, the methodology presented here represents a very useful tool for facilitating research focused on assessing the genetic origin, evolution, and reproductive biology of citrus populations.

CAPITULO II

Analysis of crossover events and allele segregation distortion in interspecific citrus hybrids by single pollen genotyping

Miguel Garavello, José Cuenca, Steven Dreissig, Jörg Fuchs, Luis Navarro, Andreas Houben,
and Pablo Aleza

Frontiers in Plant Science (2020)

DOI: 10.3389/fpls.2020.00615

Abstract

In citrus, a classical method of studying crossovers and segregation distortion (SD) is the genetic analysis of progenies. A new strategy combining Fluorescence-Activated Cell Sorting and Whole Genome Amplification of haploid pollen nuclei with a large set of molecular markers, offers the opportunity to efficiently determine the frequency of crossovers and the identification of SD without the need to generate segregating populations. Here we have analyzed meiotic crossover events in a pollen nuclei population from 'Eureka' lemon and the allelic SD was evaluated in a pollen nuclei population from a clementine X sweet orange hybrid ('CSO'). Data obtained from the 'CSO' pollen nuclei population were compared to those obtained from genotyping of a segregating population ('RTSO') arising from a hand-made sexual hybridization between diploid non apomictic selected tangor (mandarin X sweet orange; 'RTO' tangor) as female parent pollinated with 'CSO' tangor as male parent. The analysis of crossovers rates on chromosome 1 revealed the presence of up to five crossovers events on one arm and four on the corresponding other arm, with an average of 1.97 crossovers per chromosome while no crossover events were observed in five 'Eureka' lemon pollen nuclei. The rate of SD observed in 'CSO' pollen nuclei (13.8%) was slightly lower than that recovered in the 'RTSO' population (20.7%). In the pollen nuclei population, SD was found on linkage group (LG) 2, while the 'RTSO' population showed SD on LGs 2 and 7. Potential male gametic selection mechanisms were distinguished in pollen grains, while in the population, mechanisms of gametophytic selection and/or zygotic selection were observed. This methodology is a very useful tool to facilitate research focused on the reproductive biology of citrus and study the mechanisms that affect crossovers and SD.

Keywords: Fluorescence-Activated Cell Sorting, Whole Genome Amplification, SSR and SNP markers, Mandarin.

Introduction

Most plant species that reproduce sexually alternate the life cycle between a diploid sporophytic phase and a reduced gametophytic haploid phase (Xu et al., 2013a). Meiosis is the process in which the number of chromosomes is halved, leading to haploid gametes (Zamariola et al., 2014; Bomblies et al., 2015). The formation of crossovers between homologous parental chromosomes occurs in the prophase of meiosis I (Hunter, 2015; Lambing et al., 2017; Li et al., 2017), and consists in the exchange of genetic information between two non-sister homologous chromatids (Zamariola et al., 2014; Lambing et al., 2017). Crossovers are fundamental for chromosome segregation in most eukaryotes, but play also an important role in evolution and speciation of plants (Li et al., 2017), as they generate novel genetic combinations (Morgan et al., 2017). Many studies have demonstrated that the distribution of meiotic crossover events along chromosomes is non-random in plants, varying locally and displaying several hotspots (Mézard, 2006; Choi et al., 2008; Lambing et al., 2017).

On the other hand, allelic segregation distortion (SD), that is, the deviation of the allelic segregation ratio from the expected Mendelian-ratio, is increasingly recognized as an additional powerful evolutionary force (Dai et al., 2017). SD may result mainly from non-random segregation of gametes during meiosis (due to several causes such as the presence of deleterious alleles or gamete competition), post-meiotic gamete dysfunction or differential gamete success (such as differential pollen tube growth, pollen-pistil interactions or partial incompatibility) and differential zygotic fitness (Li et al., 2014; Bodénès et al., 2016; Fishman and McIntosh, 2019; Seymour et al., 2019).

Many studies have been conducted in crossover formation and allelic SD in several plant species, such as *Arabidopsis* spp., wheat, barley, maize, tomato and rice (Zamariola et al., 2014; Wang and Copenhaver, 2018). In citrus species, belonging to the family *Rutaceae*, subfamily *Aurantioideae* and with nine ($x=9$) as basic chromosome number (Krug, 1943), the analysis of the crossover rate was determined in mandarin and lemon by analyzing progenies with molecular markers. Results showed that up to four crossover events per chromosome arm can be found (Cuenca et al., 2011; Aleza et al., 2015a; Rouiss et al., 2017b). In addition, skewed markers appear to be concentrated in specific areas, usually named segregation distortion regions, which are different for the different genotypes analyzed (Ollitrault et al., 2012a), and could contain deleterious genes or be associated with hybridization incompatibility (Zhou et al., 2015). In addition to parental genotype, differential aptitude of gamete genotypes, direction of the crosses, and regulatory gene interactions can also contribute to the high level of SD in citrus (Bernet et al., 2010; Curtolo et al., 2017). Such SD was proposed to result from gametic selection rather than zygotic selection for the analyzed crosses (Bernet et al., 2010; Ollitrault et al., 2012a).

A classical approach to locate crossovers is analyzing the co-inheritance of linked heterozygous markers through meiosis in segregating populations, which requires precise genetic maps and the availability of known genome structures (Choi and Henderson, 2015). Strategies for identifying whether gametic or zygotic selection (or both) is causing SD are based on genotyping segregating populations from reciprocal and mixed crosses (Ruiz and Asins, 2003; Bernet et al., 2010; Ollitrault et al., 2012a; Xu et al., 2013a; Bodénès et al., 2016; Seymour et al., 2018). Alternative methods involve cytogenetic analyses based on

recombination nodule maps, chiasma counting or C-band maps (Mézard, 2006; Li et al., 2017).

One alternative strategy for investigating both meiotic recombination patterns and allelic SD is to perform direct genotyping of the gametes, rather than individuals from segregating populations. This methodology paves the way for new information into the genetic basis of non-Mendelian inheritance in contrast to population-based analyses (Choi et al., 2008; Dreissig et al., 2015, 2017; Sun et al., 2019).

The use of the Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) technique (Galbraith, 2010) coupled with whole genome amplification (WGA) allows the analysis of individual nuclei with a high number of molecular markers (Dreissig et al., 2015, 2017). In this context, genotyping of individual pollen grains nuclei can be useful for the determination of the male parent haplotypes, the evaluation of meiotic recombination and potential allelic SD (Mase et al., 2014; Dreissig et al., 2017). This strategy also allows performing studies on the genetic structures of pollen grain populations as compared with those originated at the plant level, without interferences due to a potential partial cross-incompatibility or gamete competition (Gu et al., 2013). In citrus, the strategy of ploidy level analysis, sorting and genotyping of single pollen grains has been previously assessed for several diploid, triploid and tetraploid genotypes (Garavello et al., 2019a), with successful results when applied to haploid pollen grains.

In the current study, we used a strategy combining flow-sorting of pollen nuclei with whole genome amplification and genotyping of individualized nuclei by Simple Sequence Repeats (SSR) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) molecular markers. The meiotic crossover events were investigated in a pollen grain population derived from 'Eureka' lemon (*Citrus limon* [L.] Burm. f.) and the allelic SD was evaluated in a pollen grain population derived from a clementine X sweet orange hybrid (*C. clementina* X *C. sinensis*; hereafter referred to as 'CSO' tangor). Data obtained from pollen grain population were compared to those obtained from genotyping of a segregating population recovered from a hand-made hybridization between diploid non apomictic selected tangor (*C. reticulata* x *C. sinensis*) as female parent pollinated with 'CSO' tangor as male parent.

Materials and Methods

Plant Material

Plant material was sampled from the parental collection of our triploid breeding program (Navarro et al., 2015) carried out in the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) located at Moncada (Valencia, Spain).

For crossover analysis, we isolated and whole-genome amplified pollen nuclei from the diploid 'Eureka' lemon. Lemon resulted from an ancient direct interspecific hybridization between sour orange (*C. aurantium* L.) as female parent and citron (*C. medica* L.) as male parent (Nicolosi et al., 2000; Froelicher et al., 2011; Garcia-Lor et al., 2013a; Curk et al., 2016; Wu et al., 2018). Since sour orange and citron are genetically distant species, the identification of alleles from each parent is greatly facilitated (Wu et al., 2018).

On the other hand, for the SD analysis, we used a progeny of 86 diploid hybrids arising from a hand-made cross between diploid non apomictic selected tangor (*C. reticulata* x *C. sinensis*; hereafter referred to as 'RTO' tangor) as female parent pollinated with 'CSO' tangor as male parent, hereafter referred as 'RTSO' population. This hybridization is of great interest in citrus breeding programs to combine desired attributes from both parents such as late maturing from 'RTO' and anthocyanin content from 'CSO'. Isolated and whole-genome amplified pollen nuclei from 'CSO' tangor were genotyped to be compared with the diploid hybrids belonging to the 'RTSO' population. Further information about recovery and ploidy level analysis of regenerated diploid plants can be found in Aleza et al. (2009b).

DNA extraction from leaves

Genomic DNA was extracted from 'RTO' and 'CSO' tangors, 'RTSO' diploid progeny, 'Eureka' lemon, sour orange and citron, using a Plant DNeasy kit from Qiagen Inc. (Valencia, CA, USA) following the manufacturer's protocol and measured using a spectrophotometer (NanoDrop 2000C, Thermo Fisher). The samples were diluted with sterile water (Sigma-Aldrich, Co., UK) at a concentration of 10 ng/μl and stored at -20°C until use.

FACS-based isolation of single pollen nuclei and whole genome amplification

For pollen grain recovery, between 40 and 50 flowers of the 'CSO' tangor and 'Eureka' lemon were collected in pre-anthesis during the spring of 2018. The anthers were removed from the flowers with forceps and were dried in Petri dishes over silica gel in a desiccator at room temperature until the anthers opened after one or two days. Then, dehiscent anthers were selected under magnifying glass, discarding those that were not fully open, and they were sealed with parafilm and stored at -20°C until use. To isolate pollen nuclei we used the methodology described by Kron and Husband (2012) and validated in citrus by Garavello et al., (2019a). Briefly, 4-5 dehiscent anthers were vortexed in a small tube with 300 μl of nuclei isolation buffer in order to recover all pollen grains. Afterward, the suspension was filtered using the pre-filter and the bursting filter (CellTrics® filters, Partec®). With the help of a plastic rod, collected pollen grains over the bursting filter were rubbed against the filter and washed with nuclei isolation buffer, twice. Subsequently, DAPI staining solution (1.5

µg/ml) was added to the suspension and incubated for 10 min. Stained suspension were run in a BD Influx (BD Biosciences, USA) and analyzed with BD FACS software.

We have followed the methodology described by Dreissig et al., (2015) to perform FACS-based purification of single nuclei and WGA. From the nuclei suspension, individualized nuclei were sorted into individual wells of a 384-microwell plate containing 2 µl lysis solution, which was composed of 0.5 µl lysis buffer, 0.5 µl ddH₂O and 1 µl sample buffer (Genomiphi V2, GE Healthcare). Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, USA) was used to WGA. Prior to calculate the DNA concentration of WGA products, each sample was diluted with 500 µl of ddH₂O, and subsequently was measured by fluorometric quantification (Qubit, Life Technologies).

Fifty-four pollen nuclei of 'CSO' tangor and forty-four pollen nuclei of 'Eureka' lemon were sorted and whole genome amplified. Additionally, ten single pollen nuclei of the analyzed genotypes were mixed in the same well to be used as a positive control against amplification errors (Dreissig et al., 2015)

Genotyping using Simple Sequence Repeat (SSR) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers

The hybrids of 'RTSO' progeny and their parents together with the amplified pollen nuclei of 'CSO' tangor were genotyped using 30 molecular markers (23 SSRs and 7 SNPs) heterozygous for 'CSO' and with polymorphism with 'RTO'. These markers are distributed across all LGs of the Clementine genetic map (Ollitrault et al., 2012a). Isolated pollen nuclei of 'Eureka' lemon were genotyped using 7 SSRs and 5 SNPs heterozygous markers. These markers are distributed across LG1 of the Clementine genetic map (Ollitrault et al., 2012a). Detailed information about all markers used is given in Tables II.I and II.II.

Polymerase Chain Reactions (PCRs) using SSR markers were performed using a Thermocycler rep gradient S (Eppendorf®) using the following protocol: reaction volume, 15 µl containing 0.5 µl 1U/µl of Taq DNA polymerase (Fermentas®), 3 µl citrus template DNA (10 ng/µl), 1.5 µl of 2 mM weller (Sigma®) dye-labeled forward primer, 1.5 µl of 2 mM non-dye-labeled reverse primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 µl of PCR reaction buffer 10X, and 0.45 µl 50 mM MgCl₂. The cycling program was set as follows: denaturation for 5 min at 94°C followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 50 or 55°C, 30 s at 72°C; and a final elongation step of 8 min at 72°C. Separation was carried out by capillary gel electrophoresis using a Genetic Analysis System 8000 (Beckman Coulter Inc.). The PCR products were initially denatured at 90°C for 2 min, injected at 2 kV for 30 s, and separated at 6 kV for 35 min. Alleles were sized based on a DNA size standard (400 bp). GenomeLab™ v.10.0 (Beckman Coulter Inc.) genetic analysis software was used for data collection.

For SNP markers genotyping we used KASPar™ technology by LGC Genomics (<http://www.lgcgenomics.com>). Primers were directly designed by LGC Genomics from each SNP locus flanking sequence, considering approximately 50 nt on each side of the SNP. The KASPar genotyping system is a competitive allele-specific dual Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-based assay for SNP genotyping, and detailed explanation of specific conditions and reagents can be found in Cuppen (2007).

Table II-I Information about molecular markers used for genotyping `CSO` tangor pollen nuclei, `RTSO` progeny and its parents, indicating accession number in Gene Bank or Phytozome, position in the reference clementine genetic map, noted alleles and reference.

Locus	LG	Location cM	DC cM	Gene Bank/ Phytozome accession	RTO noted alleles	CSO noted alleles	Reference
CIBE6147	1	14.39	46.27	ET085226	206-206	204-212	Ollitrault et al. (2010)
CIBE5720	1	58.69	1.97	ET082224	329-337	325-341	Ollitrault et al. (2010)
JK-TAA15	1	119.73	59.07	-	204-204	189-192	Kijas et al. (1997)
2P21022555	2	57.00	0.13	Ciclev10018135 m.g	GG	AG	Curk et al. (2015)
CX6F23	2	59.35	2.48	CF417259	162-168	155-162	Chen et al. (2008)
CIC3712-01	2	114.51	57.64	ET079481	CC	AC	Ollitrault et al. (2012b)
TAA41	2	160.74	103.87	-	154-160	148-154	Kijas et al. (1997)
MEST256	3	17.02	73.57	DY290355	225-225	210-225	García-Lor et al. (2012)
3P35931624	3	95.01	4.42	Ciclev10023979 m.g	GG	GA	Rouiss et al. (2017a)
Jl-TC01	3	109.67	19.08	CK934237	333-342	333-352	In preparation
C4P5278891	4	18.44	2.3	-	GG	AG	Garavello et al. (2019b)
CI03G05	4	75.07	58.93	FR677578	226-226	199-226	Cuenca et al. (2011)
CI03D12a	4	90.06	73.92	-	280-280	251-261	Aleza et al. (2011)
MEST15	5	16.21	6.91	FC912829	189-189	174-192	García-Lor et al. (2012)
MEST88	5	57.05	33.93	DY271576	104-112	112-118	García-Lor et al. (2012)
mCrCIR06A12	5	93.2	33.93	AM489742	95-95	95-102	Froelicher et al. (2008)
mCrCIR07E12	5	95.43	72.31	AM489750	118-118	118-124	Froelicher et al. (2008)
MEST191	6	10.79	4.59	DY283044	235-241	241-244	In preparation
MEST488	6	68.39	62.19	DY297637	126-126	126-140	García-Lor et al. (2012)
CIBE6256	6	84.49	78.29	ET085615	174-192	176-190	Ollitrault et al. (2010)
MEST107	7	8.89	87.54	DY274062	175-175	175-182	Cuenca et al. (2011)
MEST202	7	20.60	75.83	DY284147	169-172	157-169	in preparation
CIC3674-02	7	23.56	72.87	ET079224	GG	AG	Ollitrault et al. (2012b)
CI07C07	7	98.01	1.58	AJ567409	238-240	227-240	Froelicher et al. (2008)
mCrCIR07B05	8	33.17	21.04	AM489747	220-222	202-222	Froelicher et al. (2008)
CIC1208-01	8	57.78	3.57	ET070547	GG	AG	Ollitrault et al. (2012b)
mCrCIR02G02	8	59.15	4.94	FR677572	116-122	112-122	Cuenca et al. (2011)
CI02B07	9	0.01	52.15	AJ567403	162-170	160-162	Froelicher et al. (2008)
CIC5087-01	9	15.88	36.28	ET111514	TT	AT	Ollitrault et al. (2012b)
MEST308	9	50.41	1.75	DY296351	260-260	241-260	in preparation

LG Linkage group, Location and Distance to the centromere (DC) derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a) and location of centromere (Aleza et al., 2015a).

Table II-II Information about molecular markers used for genotyping 'Eureka' lemon pollen nuclei, indicating accession number in Gene Bank or Phytozome, position in the reference clementine genetic map, noted alleles and reference.

Locus	LG	Location	DC	Gene Bank/ Phytozome accession	Noted alleles	Reference
CIBE6126	1	2.68	57.98	ET084980	218-220	Ollitrault et al. (2010)
CIBE6147	1	14.39	46.27	ET085226	214-293	Ollitrault et al. (2010)
CiC4827-01	1	20.54	40.12	ET072918	AG	Ollitrault et al. (2012a)
1P3705568	1	32.48	28.18	Ciclev10010157m.g	AG	Curk et al. (2015)
EMA-M30	1	46.03	14.63	JX630064	CT	Garcia-Lor et al. (2013a)
mCrCIR06B05	1	50.27	10.39	AM489744	187-199	Froelicher et al. (2008)
CIBE5720	1	58.15	2.51	ET082224	320-333	Ollitrault et al. (2010)
MEST539	1	61.82	1.16	DY294904	97-104	In preparation
MEST001	1	70.60	9.94	DY262452	171-187	Luro et al. (2008)
CIC5950-02	1	91.37	30.71	ET083949	GA	Ollitrault et al. (2012b)
TSC-C80	1	111.55	50.89	JX630084	TG	Garcia-Lor et al. (2013a)
MEST431	1	119.00	58.34	DY291553	331-348	García-Lor et al. (2012)

LG Linkage group, DC Distance to the centromere [derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a) and location of centromere (Aleza et al. 2015)]

Analysis of segregation distortion and crossovers

The potential allelic SD was analyzed in the 'RTSO' progeny as well as in the pollen nuclei population from 'CSO' tangor using the Chi-square test (χ^2), assuming an expected allelic segregation ratio of 1: 1 ($p < 0.05$) for each analyzed marker.

The crossover events along the chromosome 1 were detected in 'Eureka' pollen nuclei by identifying changes in alleles inherited from sour orange to citron, and vice versa. The number of crossovers was estimated for each arm of the chromosome 1 according to the following calculation:

$$CO \text{ ratio} = \frac{n(CO)}{n(M)}$$

where $n(CO)$ is the number of crossovers and $n(M)$ is the total number of observations. The pairs of markers in the analyzed gametes that showed missing data points were omitted from the analysis.

Analysis of population diversity

Population diversity organization between hybrids of the 'RTSO' progeny at the male gamete level and the 'CSO' pollen nuclei population was examined using DARwin6 software

(Perrier and Jacquemoud-Collet, 2018). Neighbor-Joining analysis using the simple matching dissimilarity index (d_{i-j}) between pairs of markers (units) was performed:

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

where d_{i-j} is the dissimilarity between units i and j , L is the number of *loci*, m_l is the number of matching alleles for *locus* l , and π is the ploidy level, which is one in this case. From the dissimilarity matrix obtained, a Weighted Neighbor-Joining tree (Saitou and Nei, 1987) was computed.

Results and Discussion

FACS of pollen nuclei, Whole Genome-Amplification and Genotyping

In a previous work, we have demonstrated that FACS technique coupled with whole genome amplification (WGA) is an adequate methodology for multi-locus SSR and SNP genotyping of citrus haploid pollen nuclei (Garavello et al., 2019a). In the present work, a total of 44 and 54 haploid pollen nuclei from 'Eureka' lemon and 'CSO' tangor were analyzed, respectively.

'CSO' tangor pollen nuclei were genotyped with the same set of molecular markers as the 'RTSO' population (Table II.I). For further analysis, we selected those gametes with a minimum of 65% positive amplifications (Figure II.I) for the set of markers used. Thirty-four 'Eureka' lemon (77.3%) and 48 'CSO' pollen nuclei (88.9%) showed at least 65% positive PCR reactions.

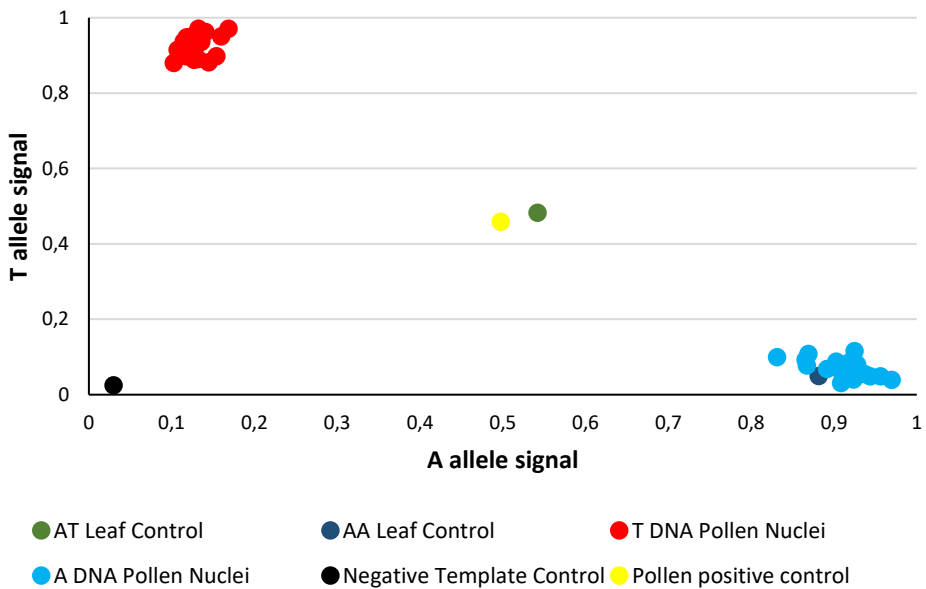


Figure II-I Representative dispersion diagram of PCR products obtained with CIC5087-01 SNP marker of haploid pollen grains nuclei amplified with WGA kit from the 'CSO' diploid genotype .

Out of 408 PCR reactions performed for all marker combinations in 'Eureka' lemon (Table II.II), 362 were positive (88.7%). On the other hand, the 'CSO' tangor showed 1393 positive PCR reactions (96.7%) of a total of 1440.

The percentage of WGA positive PCR in 'Eureka' lemon was slightly lower than that found by Dreissig et al., (2015) when analyzed barley pollen nuclei with SNP markers. However, this value was more similar for 'CSO'. In the same way, these results are in agreement with

what was found by Garavello et al. (2019a), who conducted a classification and genotyping study of individual haploid citrus pollen nuclei.

The genotyping of the 86 'RTSO' diploid hybrids and their parents, performed with the same set of markers used for 'CSO' pollen nuclei, (Table II.I) allowed the unequivocal allelic differentiation between both parents and assessing the allelic contribution of the male parent to form each diploid hybrid (Figure II.II).

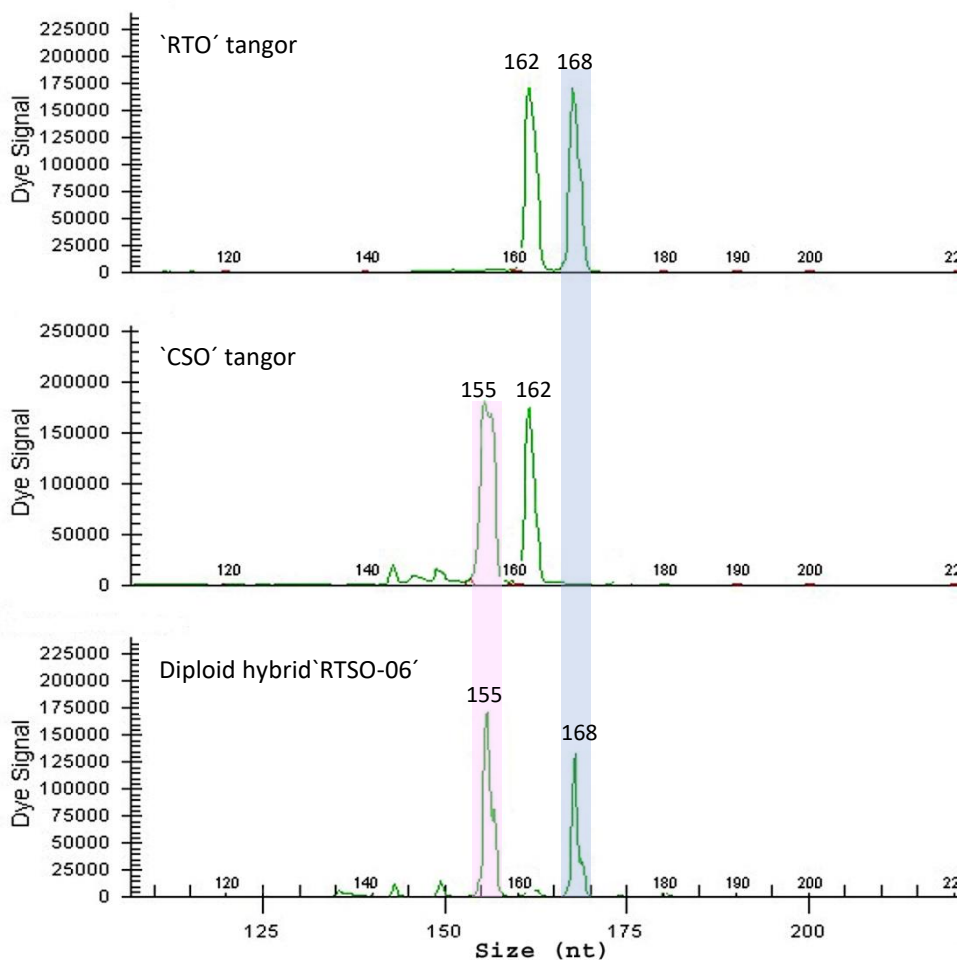


Figure II-II Electropherograms of a diploid hybrid recovered from hybridization between 'RTO' diploid tangor as female parent and the 'CSO' diploid tangor as male parent with CX06F23 SSR marker.

Analysis of crossover events in haploid pollen nuclei of ‘Eureka’ lemon

We analyzed the number of crossovers for both arms on chromosome 1 (Table II.III). The analysis of crossover rates revealed the presence of up to five crossovers events on one arm and four on the other arm. Comparatively, the average number of crossovers on chromosome 1 in the pollen nuclei population from ‘Eureka’ lemon was 1.97.

Table II-III Number of observed crossover events on each arm of chromosome 1 based on analysis of haploid pollen nuclei from ‘Eureka’ lemon using twelve SSR and SNP markers.

Number of crossovers		Arm 1					
		0	1	2	3	4	5
Arm 2	0	5	3	1	0	0	0
	1	6	4	1	0	1	0
	2	6	2	1	0	0	1
	3	1	1	0	0	0	0
	4	1	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0

No bold numbers correspond with the number of crossovers on both arms in the haploid pollen nuclei population.

Interestingly, we found five pollen nuclei (14.7%) with no crossover events between analyzed markers (Table II.IV), resulting with the same configuration as one of the lemon parents, i.e., citron or sour orange. Three pollen nuclei showed the same configuration as citron (samples Eur-P4, Eur-P9 and Eur-P19) while two pollen nuclei showed the same configuration as sour orange (samples Eur-P12 and Eur-P26) although it is possible that the crossovers in these pollen nuclei escaped to our detection, since in none of the five pollen nuclei all markers were amplified. The lack of amplification of these alleles may be attributed to the WGA kit performance at these specific loci since in the lemon leaf DNA PCR amplifications always happened (Table II.IV). In addition, other explanation could be related with the presence of null alleles in the parent species of the ‘Eureka’ lemon. The remaining 29 pollen nuclei (85.3%) showed at least one recombination event between both genomes. However our results indicate a tendency that were similar to those of Rouiss et al. (2017b) who, using six SSR markers detected up to four crossovers on one chromosome arm and three on the other arm when analyzing 27 unreduced gametes recovered from ‘Eureka Frost’ lemon pollinated either with *C. ichangensis* or ‘Fortune’ mandarin. Similarly, Aleza et al. (2015) and Cuenca et al. (2011) identified up to four crossovers on one chromosome arm in unreduced gametes of *C. clementina* and ‘Fortune’ mandarin, respectively. Furthermore, Ollitrault et al. (2012a) identified up to two recombination break points on three LGs in the sweet orange gamete that originated *C. clementina*, and three

crossover events on one LG in the *C. clementina* gamete that originated the haploid Clementine used by the International Citrus Genomic Consortium (ICGC) to establish the reference citrus haploid whole genome sequence (Aleza et al., 2009b).

In addition, in several organisms the frequency of meiotic crossover formation is determined genetically and also by the influence of environmental conditions. In plants, exposure to biotic and abiotic stresses can modify the overall rate of recombination (De Storme and Geelen, 2014). For example, a change in temperature from 22 to 30 °C caused a reduction and alter distribution of meiotic crossover formation in barley (*Hordeum vulgare*) (Higgins et al., 2012), whereas a change in temperature from 18 to 28 °C caused an increase of meiotic crossover formation in *Arabidopsis* (Francis et al., 2007). Similarly, in maize (*Zea mays*), both low temperature and water deficit significantly enhance the frequency of crossovers (De Storme and Geelen, 2014).

On the other hand, recombination frequency was determined along chromosome 1 by counting the number of crossovers at intervals of neighboring markers (Figure II.III). The highest frequencies of recombination were found towards the distal region of the chromosome, while the lowest frequencies were found near the centromere, which is in agreement with what was observed in *C. clementina* where centromeric areas showed low recombination rates (<1.0 cM/Mb), although this reduction changed greatly between chromosomes (Aleza et al., 2015a). Suppression of crossovers in centromeric and pericentromeric regions has been displayed in many plant species like wheat, barley and tomato (Sherman and Stack, 1995; Dreissig et al., 2015; Darrier et al., 2017; Blary and Jenczewski, 2019).

This methodology is of great interest to study in citrus how environmental stress can alter the number and the distribution of crossover in haploid gametes and its implication in breeding programs based on sexual hybridization.

Table II-IV Multilocus configuration of the haploid pollen nuclei population from 'Eureka' lemon analyzed with twelve SSR and SNP markers located on both arms of chromosome 1. Light red indicates the presence of alleles inherited from citron, and green indicates those from sour orange.

Name and location in cM of markers located on chromosome 1														
	Arm 1							Arm 2						
	2.68	14.39	20.54	32.48	46.03	50.27	58.15	60.66	61.82	70.60	91.37	111.55	119.00	
	CIBE6126	CIBE6147	CIC4827-01	1P3705568	EMA-M30	C106B05	CIBE5720	Centromere	MEST539	MEST1	CIC5950-02	TSC-C80	MEST431	
Samples														
Citron	Light red							Blue	Light red					
Sour orange	Green							Blue	Green					
Eur-P1	Light red	*	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P2	Light red	Light red	Light red	Green	Green	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P3	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P4	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P5	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Green	
Eur-P6	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P7	Green	Green	Green	Green	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Green	Light red	Light red	
Eur-P8	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P9	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P10	Green	Light red	Green	Green	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P11	Green	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P12	Green	Light red	Green	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P13	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P14	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P15	Green	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P16	Green	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P17	Green	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P18	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P19	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P20	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P21	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P22	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P23	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P24	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P25	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P26	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P27	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P28	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P29	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P30	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P31	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P32	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P33	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	
Eur-P34	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	Blue	Light red	Light red	Light red	Light red	Light red	

* White boxes indicate no PCR product amplification with SSR or SNP markers

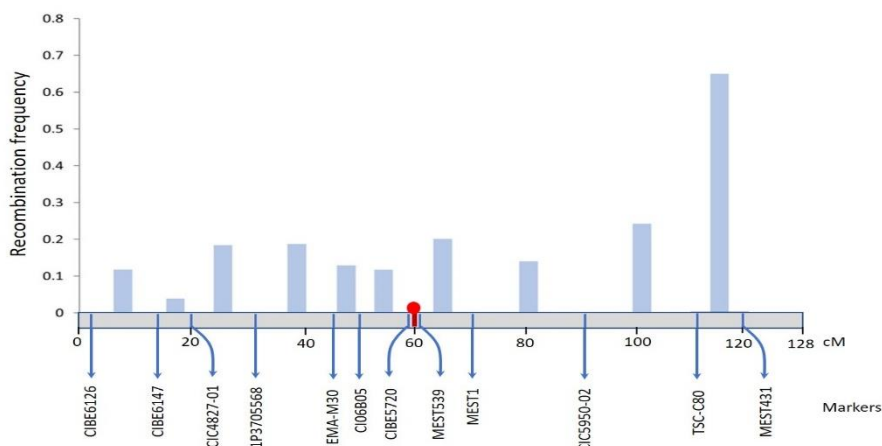


Figure II-III Recombination frequency along chromosome 1 determined by haploid pollen nuclei genotyping of 'Eureka' lemon. Red point Indicated relative position of centromere according to Aleza et al., (2015).

Genotyping of 'CSO' haploid pollen nuclei population and one progeny of diploid hybrids recovered with the same genotype as male parent.

Conventional strategy to identify deviations from Mendelian segregation are based in genetic mapping populations from reciprocal and mixed crosses (Fishman and McIntosh, 2019). However, this conventional strategy can be improved by FACS, WGA and genotyping of haploid pollen nuclei because with this new approach we might identify different mechanisms underlying SD that cannot be observed with the traditional way. To perform a comparative analysis between allele segregation in the 'CSO' pollen nuclei population and the progeny recovered through hand-made pollination between 'RTO' tangor as female parent and the 'CSO' tangor as male parent ('RTSO' population), the same set of molecular markers was used distributed in the nine LGs of the Clementine genetic map (Ollitrault et al., 2012a). The preferential transmission of one allele over another in a statistically significant deviation from the expected Mendelian segregation ratio 1:1 is known as segregation distortion (SD) (Bodénès et al., 2016; Dai et al., 2017; Dreissig et al., 2017). Table II.V shows the number and Chi-square value ($p < 0.05$) of the 'CSO' alleles in the pollen nuclei and the 'RTSO' populations (Supplementary Tables II.I and II.II).

The markers displayed allelic SD in the two populations were analyzed. The rate of SD observed in 'CSO' pollen nuclei (13.8%) was slightly lower than that recovered in 'RTSO' population (20.7%). In the pollen nuclei population, SD was found on LGs 2 and 5, while the 'RTSO' population showed SD on LGs 2 and 7. Globally, a total of six analyzed markers showed SD. Among these markers, 2P21022555, CX6F23 and CIC3712-01, all located on LG 2, were synchronously distorted in the two populations. However, MEST88 marker, located on LG 5, shows SD for the pollen nuclei population, and not in the 'RTSO' progeny. In addition, MEST107, MEST202 and CIC3674-02 markers, all located on LG 7, showed SD only in the 'RTSO' population.

Table II-V Analysis of Mendelian allelic segregation (Chi-square test) for `CSO` tangor pollen nuclei population and `RTSO` progeny.

Locus	LG	Location	DC	CSO pollen nuclei population				RTSO progeny			
				A ₁	A ₂	Chi-square	P value	A ₁	A ₂	Chi-square	P value
CIBE6147	1	14.39	46.27	21	26	0.532	0.466	40	46	0.419	0.518
CIBE5720	1	58.69	1.97	27	21	0.750	0.387	41	45	0.186	0.666
TAA15	1	119.73	59.07	30	17	3.596	0.058	41	45	0.186	0.666
2P21022555	2	57.00	0.13	15	32	6.149	0.013	7	79	60.279	0.000
CX6F23	2	59.35	2.48	17	31	4.083	0.043	13	73	41.860	0.000
CIC3712-01	2	114.51	57.64	16	30	4.261	0.039	19	67	26.791	0.000
TAA41	2	160.74	103.87	21	27	0.750	0.387	52	34	3.767	0.052
MEST256	3	17.02	73.57	26	20	0.783	0.376	49	37	1.674	0.196
3P35931624	3	95.01	4.42	23	23	0.000	1.000	47	39	0.744	0.388
JI-TC01	3	109.67	19.08	23	22	0.022	0.882	42	44	0.047	0.829
C4P5278891	4	18.44	2.3	26	22	0.333	0.564	48	38	1.163	0.281
CI03G05	4	75.07	58.93	23	22	0.022	0.881	43	43	0.000	1.000
CI03D12a	4	90.06	73.92	25	21	0.348	0.555	41	45	0.186	0.666
MEST15	5	16.21	6.91	20	25	0.556	0.456	47	39	0.744	0.388
MEST88	5	57.05	33.93	31	16	4.787	0.029	40	46	0.419	0.518
mCrCIR06A12	5	93.20	70.08	24	23	0.021	0.884	38	48	1.163	0.280
CI07E12	5	95.43	72.31	25	21	0.348	0.555	42	44	0.047	0.829
MEST191	6	10.79	4.59	22	23	0.022	0.881	49	37	1.674	0.196
MEST488	6	68.39	62.19	25	20	0.556	0.456	50	36	2.279	0.131
CIBE6256	6	84.49	78.29	17	28	2.689	0.101	40	46	0.419	0.518
MEST107	7	8.89	87.54	24	23	0.021	0.884	4	82	70.744	0.000
MEST202	7	20.60	75.83	24	21	0.200	0.655	86	0	86.000	0.000
CIC3674-02	7	23.56	72.87	21	26	0.532	0.466	85	1	82.047	0.000
CI07C07	7	98.01	1.58	24	23	0.021	0.884	49	37	1.674	0.196
CI07B05	8	33.17	21.04	27	19	1.391	0.238	40	46	0.419	0.518
CIC1208-01	8	57.78	3.57	24	24	0.000	1.000	42	44	0.047	0.829
mCrCIR02G02	8	59.15	4.94	24	22	0.087	0.768	47	39	0.744	0.388
CI02B07	9	0.01	52.15	22	25	0.191	0.662	38	48	1.163	0.281
CIC5087-02	9	15.88	36.28	21	24	0.200	0.655	45	41	0.186	0.666
MEST308	9	50.41	1.75	22	25	0.191	0.662	47	39	0.744	0.388

LG Linkage group, DC Distance to the centromere [derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a) and location of centromere (Aleza et al. 2015)], A₁ and A₂ Number of individuals with that allelic configuration

SD can be originated by different processes that include non-random segregation of gametes during meiosis, alteration of viability or functionality of gametes after meiosis, and differential zygotic fitness (Seymour et al., 2018). Synchronic SD visualized in the two gamete populations on LG 2 could be related with a gamete selection during pollen meiotic process. In other species like maize, monkeyflowers (*Mimulus sp.*), cotton (*Gossypium hirsutum*) it has been observed gametal factors that influence male gametes viability (Fishman and Saunders, 2008; Xu et al., 2013a; Dai et al., 2017). For example, in monkeyflowers Fishman and Saunders, (2008) observed that the locus D strongly affects pollen viability and DD homozygotes suffered a 20% pollen viability reduction contributing to male fitness variation.

In addition, most loci with SD tend to cluster in segregation distortion regions (SDRs) as we have observed in both populations of 'CSO' male gametes on LG 2. One explanation for SDRs could be that specific loci in the genome are conducted to viability differentiation (Luo and Xu, 2003; Li et al., 2011). The selection of an allele at the locus would result in nearby markers that deviate from the expected ratio, consistent with the theory of genetic hitchhiking (Dai et al., 2017).

Likewise, a strong SD has been observed on LG 7 only in 'RTSO' progeny rather than 'CSO' pollen nuclei population (Table II.V and Supplementary Table II.II). The gametophytic incompatibility system (GIS) was identified in citrus as one of the pollen-pistil interaction mechanisms that cause SD, defined as "the inability of a fertile hermaphrodite seed plant to produce zygotes after self-pollination" (Soost, 1965; de Nettancourt, 1977). Recently, Liang et al., (2020) have demonstrated that in citrus operate the S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system that hold a S-RNase linked to about nine S-locus F-box genes. In this system, incompatibility reaction arises from the cytotoxic activity of S-RNase, meanwhile compatible pollen tubes avoid S-RNase cytotoxicity and grows into the style reaching the ovary (McClure et al., 2011). This system has been described in many genotypes including ancient and cultivated citrus species like mandarins and its hybrids (Liang et al., 2020). The GIS could be a factor for male gametic selection and this may lead to a complete exclusion of one allele for the concerned locus as we have noted in the three markers located on this LG with a very high distortion (4/82, 86/0 and 85/1 for MEST107, MEST202 and CIC3674-02 markers, respectively). In this context and taking into account the S-RNase-based GIS (Liang et al., 2020), 'RTO' and 'CSO' tangors have *C. sinensis* as the same ancestor and could share a S-RNase haplotype, whereby segregate as could be expected for the GSI system. These results could also suggest that in this genomic region could be located alleles related with the GIS in citrus. In fact, Liang et al., (2020) locate the S locus on LG 7 which is the same one we have observed SD. In previous results (data not shown) we could not recover any hybrid using 'CSO' tangor as male parent in hand-made pollinations using clementines as female parent, suggesting incompatibility of this tangor with other genotypes. Nevertheless we cannot rule out zygotic or post-zygotic mechanisms involved in SD (Sweigart and Willis, 2012).

On Figure II.IV we display the genetic relationship of these two populations that was calculated by Neighbor-Joining analysis using the simple matching dissimilarity index, allowing the differentiation of gamete groups within each population and determining their genetic diversity. This figure shows a gamete cluster produced by 'CSO' haploid pollen nuclei that were absent in the 'RTSO' gamete population, allowing to conclude that in citrus

some kind of selection occurs during the progametic phase, either in the pollen grain germination on the stigmatic surface, pollen tube growth into the style (gametophytic incompatibility system) or differences in the zygotic or post-zygotic viability, precluding the recovery of hybrids with specific allelic configurations.

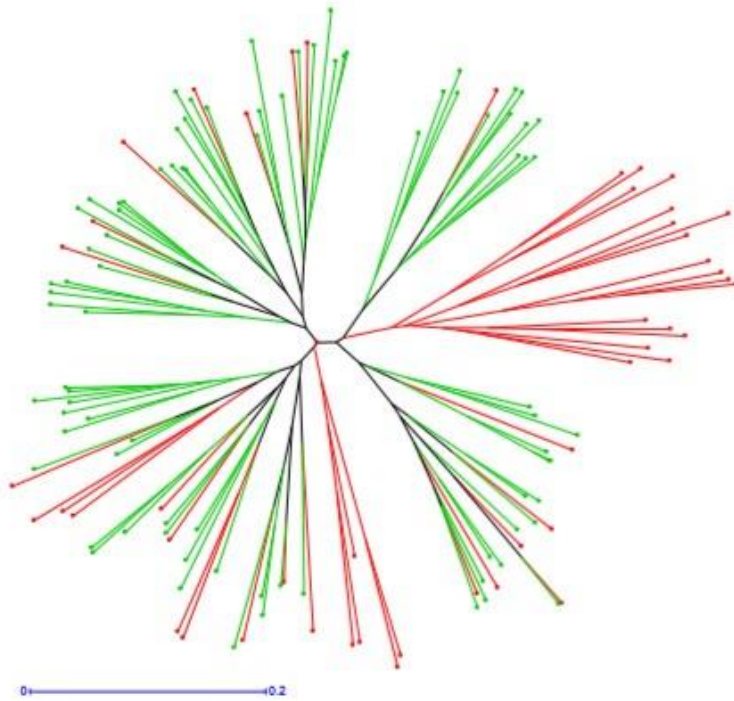


Figure II-IV Neighbor-Joining tree obtained from allelic data of ‘CSO’ pollen nuclei population (red), and the male gametes from ‘RTSO’ progeny (green).

Each gametes population showed different patterns of marker segregation, demonstrating that the genetic mechanism of SD has a specificity in each gametes population resulting from complex genetic system (Dai et al., 2017). These variations in the SD agree with different widely documented studies in plants, obtained through interspecific crosses for genetic mapping (Xu et al., 1997, 2013a; Shirasawa et al., 2010; Bodénès et al., 2016; Dai et al., 2017; Seymour et al., 2018), where large differences in SD values were found according to the direction of the crosses. The first distortion studies associated with sex were carried out in *Drosophila obscura* (Gershenson, 1928) because sexual dimorphism is common, and the sex ratio deviated a lot from 1: 1 (Seymour et al., 2018). Since then, several articles revealed a variety of meiotic and post-meiotic processes responsible for SD (Soltis et al., 1993; Fishman and Saunders, 2008; McDermott and Noor, 2010; Xu et al., 2013a; Lindholm et al., 2016; Lambing et al., 2017). In citrus, Bernet et al., (2010) reported a higher SD in the male parent rather than in the female in a reciprocal hybridization between ‘Chandler’ pummelo and ‘Fortune’ mandarin. Subsequently, SD was evidenced by Ollitrault et al., (2012a) in clementine, pummelo and sweet orange when they were used either as female

or male parents. From a breeding point of view, the presence SDRs implies that frequencies of relevant genes located there could be inherited at frequencies different from expected, affecting the efficiency of citrus breeding programs based on sexual hybridizations (Bernet et al., 2010).

In citrus, papers published until now about SD have been carried out mainly studying reciprocal crosses, as we have described before. In this work, we display for the first time a multi-locus genotyping study of the `CSO` haploid pollen gametes with and without the interference of the female parent. This approach allows us to identify mechanisms that could be related with specific genomic regions associated to non-random segregation of gametes during meiosis (as we have shown on LG 2) or with male and female gametic interactions, or zygotic mechanisms (LG 7). In addition, this methodology may have an important advantage for the achievement of sequencing projects. High heterozygosity is a general characteristic of Citrus species, making it difficult to assemble large genome sequences. For this reason, the International Citrus Genomic Consortium (ICGC) decided to establish a reference whole citrus genome sequence from a clementine homozygous plant recovered by *in situ* gynogenesis induced by irradiated pollen Aleza et al. (2009a). Therefore, obtaining haplotypes from FACS coupled with WGA of haploid pollen nuclei would allow the sequencing projects to be approached more easily, from any genotype regardless its heterozygosity, and without the need to recover haploid plants using *in vitro* techniques, which in many cases is a very difficult task with very low efficiency.

Conclusion

FACS coupled with WGA allows the analysis of individual nuclei with a large number of molecular markers, offering the opportunity to efficiently determine the frequency of crossovers and the SD in haploid pollen nuclei without the need to generate segregating populations.

Until now, no study was conducted regarding the recombination in citrus pollen nuclei. The analysis of the `Eureka` lemon pollen nuclei allowed the identification of recombination points through the use of SSR and SNP markers, showing a greater number of crossovers in centromere distal regions of chromosome 1. In addition, SD has been observed either on LG2 of both populations and only on LG 7 we have observed that the SD in the pollen of `CSO` tangor and the plants of the population differ in frequency or position. Potential male gametic selection mechanisms were distinguished in pollen grains, while in the population, mechanisms of gametophytic selection and/or zygotic selection were observed. The methodology presented here represents a very useful tool to facilitate research focused on the reproductive biology of citrus and study the mechanisms that affect crossovers and SD

Supplementary information

Supplementary Table II.I Genotyping of 'CSO' haploid pollen nuclei with SSR and SNP markers distributed across the nine linkage groups of reference.

	LG1			LG2			
Centromere position (cM)*	60.66			56.87			
Locus	CIBE6147	CIBE5720	TAA15	2P21022555	CX6F23	CIC3712-01	TAA41
Location (cM)**	14.39	58.44	115.90	57.00	59.35	114.51	160.74
CSO	204-212	325-341	189-192	AG	155-162	AC	148-154
CSO P-1	204	325	189	A	155	A	154
CSO P-2	204	325	-	A	155	A	154
CSO P-3	204	341	189	G	155	C	148
CSO P-4	212	341	192	A	162	C	148
CSO P-5	204	325	189	A	162	C	148
CSO P-6	212	341	192	G	162	C	154
CSO P-7	212	325	189	G	162	C	148
CSO P-8	204	341	189	G	162	C	154
CSO P-9	204	325	189	G	162	C	148
CSO P-10	-	341	189	G	162	A	154
CSO P-11	204	325	192	G	162	C	148
CSO P-12	204	341	192	A	162	A	154
CSO P-13	204	325	192	G	162	C	148
CSO P-14	204	325	192	G	162	-	154
CSO P-15	212	325	189	A	155	A	154
CSO P-16	204	325	192	A	155	A	154
CSO P-17	212	325	192	G	162	A	154
CSO P-18	212	325	189	G	155	C	148
CSO P-19	212	341	192	A	155	A	148
CSO P-20	204	325	192	-	155	A	148
CSO P-21	204	341	192	G	162	C	154
CSO P-22	212	341	189	G	162	-	154
CSO P-23	212	325	189	G	162	A	154
CSO P-24	204	341	189	G	162	C	154
CSO P-25	212	341	189	A	155	C	148
CSO P-26	204	325	189	A	162	A	148
CSO P-27	212	325	189	A	155	A	154
CSO P-28	212	325	189	G	162	C	154
CSO P-29	212	325	189	G	155	C	148
CSO P-30	204	325	189	G	162	C	148
CSO P-31	204	341	189	G	162	A	154
CSO P-32	212	341	189	A	155	A	148
CSO P-33	212	325	189	G	162	C	154
CSO P-34	212	341	192	A	162	A	154
CSO P-35	212	325	189	G	162	C	148
CSO P-36	212	325	189	G	155	C	154

CSO P-37	212	341	189	G	155	C	154
Supplementary Table II.I Continued (LG1 and LG2)							
	LG1			LG2			
Locus	CIBE6147	CIBE5720	TAA15	2P21022555	CX6F23	C1C3712-01	TAA41
Location (cM)**	14.39	58.44	115.90	57.00	59.35	114.51	160.74
CSO P-38	204	325	189	A	155	A	154
CSO P-39	204	341	189	G	162	C	148
CSO P-40	212	341	192	G	155	C	148
CSO P-41	212	325	192	G	162	C	154
CSO P-42	212	341	189	G	155	C	148
CSO P-43	204	341	192	G	162	C	154
CSO P-44	212	325	189	G	162	C	154
CSO P-45	204	325	189	G	162	C	154
CSO P-46	212	341	189	G	162	C	154
CSO P-47	212	341	192	G	162	C	148
CSO P-48	212	325	192	A	162	C	148

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

**Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.I Continued (LG3 and LG4)

	LG3			LG4		
Centromere position (cM)*	90.59			16.14		
Locus	MEST256	3P35931624	TC01	C4P5278891	CI03G05	CI03D12a
Location (cM)**	17.02	95.10	109.67	18.45	75.07	90.06
CSO	210-225	GA	333-352	AG	199-226	251-261
CSO P-1	-	G	-	G	-	251
CSO P-2	225	A	333	G	199	261
CSO P-3	210	G	352	A	199	261
CSO P-4	210	G	352	A	199	261
CSO P-5	210	A	352	A	226	251
CSO P-6	210	A	352	G	199	261
CSO P-7	210	G	333	A	226	251
CSO P-8	210	G	352	A	226	251
CSO P-9	210	G	333	G	199	261
CSO P-10	210	G	333	A	226	251
CSO P-11	210	G	352	G	199	251
CSO P-12	225	A	352	G	226	251
CSO P-13	225	G	333	G	226	251
CSO P-14	210	A	333	A	199	251
CSO P-15	225	A	352	A	199	261
CSO P-16	210	-	-	G	226	251
CSO P-17	-	-	-	A	-	251
CSO P-18	210	G	352	A	199	251
CSO P-19	210	A	352	G	226	-
CSO P-20	225	A	352	A	226	261
CSO P-21	210	G	333	G	226	261
CSO P-22	225	G	352	A	226	251
CSO P-23	210	A	333	A	199	261
CSO P-24	225	A	333	A	-	-
CSO P-25	225	G	333	A	199	261
CSO P-26	210	G	333	A	199	261
CSO P-27	225	G	352	A	226	251
CSO P-28	210	A	352	G	199	261
CSO P-29	225	G	352	G	226	251
CSO P-30	210	A	352	G	226	251
CSO P-31	225	A	352	A	199	261
CSO P-32	225	A	333	A	226	251
CSO P-33	225	A	333	A	199	261
CSO P-34	225	A	333	G	199	261
CSO P-35	210	A	352	A	226	251
CSO P-36	210	A	333	A	199	261
CSO P-37	210	A	352	G	199	261
CSO P-38	225	G	333	G	199	261
CSO P-39	225	G	352	A	226	251
CSO P-40	210	G	333	A	226	251
CSO P-41	225	A	333	G	199	251

CSO P-42	210	G	333	A	226	261
Supplementary Table II.I Continued (LG3 and LG4).						
	LG3			LG4		
Locus	MEST256	3P35931624	TC01	C4P5278891	CI03G05	CI03D12a
Location (cM)**	17.02	95.10	109.67	18.45	75.07	90.06
CSO P-43	210	A	333	G	199	251
CSO P-44	225	G	333	G	226	261
CSO P-45	210	G	352	G	199	251
CSO P-46	210	A	352	G	199	261
CSO P-47	225	G	333	G	226	251
CSO P-48	225	A	333	A	226	251

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

**Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.I Continued (LG5).

LG5				
Centromere position (cM)*	23.12			
Locus	MEST15	MEST88	mCrCIR06A12	mCrCIR07E12
Location (cM)**	16.21	57.05	93.20	95.43
CSO	174-192	112-118	95-102	118-124
CSO P-1	174	118	102	124
CSO P-2	192	-	95	-
CSO P-3	-	112	95	118
CSO P-4	-	118	102	124
CSO P-5	192	112	95	118
CSO P-6	192	112	102	124
CSO P-7	174	112	95	118
CSO P-8	192	118	95	118
CSO P-9	174	112	102	124
CSO P-10	174	112	102	124
CSO P-11	174	112	-	-
CSO P-12	192	112	95	118
CSO P-13	192	118	102	124
CSO P-14	192	112	102	118
CSO P-15	192	118	95	118
CSO P-16	192	112	95	118
CSO P-17	192	118	102	124
CSO P-18	174	112	102	124
CSO P-19	192	112	95	118
CSO P-20	192	112	95	118
CSO P-21	192	112	95	118
CSO P-22	174	118	102	118
CSO P-23	174	112	95	118
CSO P-24	174	118	102	124
CSO P-25	174	112	102	124
CSO P-26	192	112	95	118
CSO P-27	192	112	102	124
CSO P-28	174	118	102	124
CSO P-29	192	112	95	118
CSO P-30	174	112	95	118
CSO P-31	174	118	102	124
CSO P-32	174	112	102	124
CSO P-33	192	112	95	118
CSO P-34	192	112	102	124
CSO P-35	174	112	102	124
CSO P-36	174	112	95	118
CSO P-37	174	118	102	124
CSO P-38	174	112	95	118
CSO P-39	192	112	95	118
CSO P-40	-	112	95	118
CSO P-41	192	118	102	124
CSO P-42	192	112	102	124

Supplementary Table II.I Continued (LG5).

Locus	LG5			
	MEST15	MEST88	mCrCIR06A12	mCrCIR07E12
Location (cM)**	16.21	57.05	93.20	95.43
CSO P-43	174	118	95	118
CSO P-44	192	118	102	124
CSO P-45	174	112	95	118
CSO P-46	192	118	95	118
CSO P-47	192	118	102	124
CSO P-48	192	112	95	118

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

**Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.I Continued (LG6 and LG7).

	LG6			LG7			
Centromere position (cM)*	6.20			96.43			
Locus	MEST191	MEST488	CIBEG256	MEST107	MEST202	CIC3674-02	C107C07
Location (cM)**	10.79	68.39	84.49	8.89	20.60	23.56	98.01
CSO	241-244	126-140	176-190	175-182	157-169	AG	227-240
CSO P-1	244	140	190	182	157	A	240
CSO P-2	-	126	176	175	157	-	-
CSO P-3	241	140	176	175	157	G	227
CSO P-4	241	140	176	182	157	A	227
CSO P-5	241	126	190	175	169	G	227
CSO P-6	244	126	190	182	157	A	240
CSO P-7	244	126	190	182	157	A	227
CSO P-8	244	-	190	175	169	G	240
CSO P-9	241	140	176	175	157	A	240
CSO P-10	244	126	190	182	157	A	227
CSO P-11	244	140	-	175	169	G	240
CSO P-12	244	126	176	175	169	G	240
CSO P-13	244	126	176	182	157	A	240
CSO P-14	241	126	190	175	169	G	227
CSO P-15	241	140	190	182	157	A	227
CSO P-16	244	126	190	175	-	G	240
CSO P-17	-	-	-	182	-	A	227
CSO P-18	-	-	-	175	-	G	227
CSO P-19	241	126	190	-	169	G	240
CSO P-20	241	140	176	182	157	A	227
CSO P-21	241	126	190	182	169	G	240
CSO P-22	241	126	190	175	169	G	227
CSO P-23	241	140	190	182	157	A	227
CSO P-24	241	126	176	175	169	G	227
CSO P-25	241	140	190	182	169	G	227
CSO P-26	244	126	190	175	157	A	227
CSO P-27	241	140	176	182	157	G	240
CSO P-28	241	126	190	182	157	G	240
CSO P-29	241	126	190	182	157	A	240
CSO P-30	241	126	190	175	169	G	240
CSO P-31	244	126	176	175	169	G	227
CSO P-32	244	126	190	182	157	A	227
CSO P-33	244	140	176	175	169	G	227
CSO P-34	244	126	190	175	169	G	240
CSO P-35	244	140	176	175	169	G	227
CSO P-36	244	140	176	182	157	A	227
CSO P-37	244	140	176	175	169	G	240
CSO P-38	244	140	190	182	157	A	240

Supplementary Table II.I Continued (LG6 and LG7).

Locus	LG6			LG7			
	MEST191	MEST488	CIBE6256	MEST107	MEST202	CIC3674-02	CI07C07
Location (cM)**	10.79	68.39	84.49	8.89	20.60	23.56	98.01
CSO P-39	244	126	190	175	169	G	227
CSO P-40	241	126	176	182	169	G	227
CSO P-41	241	140	176	175	169	G	240
CSO P-42	244	126	176	175	169	G	227
CSO P-43	244	126	190	175	157	A	240
CSO P-44	244	140	190	182	157	A	240
CSO P-45	241	140	190	182	157	A	240
CSO P-46	241	140	190	182	157	A	240
CSO P-47	244	126	190	182	157	A	240
CSO P-48	241	140	190	175	169	G	227

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

**Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.I Continued (LG8 and LG9).

Centromere position (cM)*	LG8			LG9		
	54.21			52.16		
Locus	mCrCIR07B05	CIC1208-01	mCrCIR02G02	CIO2B07	CIC5087-02	MEST308
Location (cM)**	33.17	57.78	59.15	0.01	15.88	50.41
CSO	202-222	AG	112-122	160-162	AT	241-260
CSO P-1	-	G	112	-	T	-
CSO P-2	202	A	122	162	A	260
CSO P-3	222	G	112	160	T	241
CSO P-4	202	A	122	160	T	241
CSO P-5	202	A	122	162	A	260
CSO P-6	202	A	122	162	A	260
CSO P-7	222	A	112	160	T	260
CSO P-8	202	A	122	162	A	260
CSO P-9	202	A	122	162	A	241
CSO P-10	202	G	112	162	A	241
CSO P-11	222	G	112	162	T	241
CSO P-12	202	A	122	160	T	241
CSO P-13	222	G	112	162	A	260
CSO P-14	202	G	112	162	-	260
CSO P-15	202	A	122	160	T	260
CSO P-16	222	A	122	160	T	241
CSO P-17	-	A	122	160	T	241
CSO P-18	222	G	112	162	A	260
CSO P-19	202	G	R	160	T	241
CSO P-20	222	G	112	160	T	241
CSO P-21	202	A	112	162	A	260
CSO P-22	222	G	112	162	-	260
CSO P-23	202	A	122	160	T	241
CSO P-24	202	A	122	162	A	241
CSO P-25	222	G	112	160	T	241
CSO P-26	202	G	112	162	T	241
CSO P-27	222	A	122	162	A	260
CSO P-28	202	G	112	162	A	260
CSO P-29	222	G	112	162	-	260
CSO P-30	222	G	112	160	T	260
CSO P-31	222	G	-	162	T	241
CSO P-32	222	G	112	162	A	260
CSO P-33	222	A	122	162	A	260
CSO P-34	202	G	112	160	A	260
CSO P-35	202	A	122	160	T	241
CSO P-36	202	G	112	162	A	260
CSO P-37	202	A	122	160	T	241
CSO P-38	202	A	122	160	T	241

Supplementary Table II.I Continued (LG8 and LG9).

Locus	LG8			LG9		
	mCrCIR07B05	CIC1208-01	mCrCIR02G02	C102B07	C1C5087-02	MEST308
Location (cM)**	33.17	57.78	59.15	0.01	15.88	50.41
CSO P-39	222	G	112	160	T	241
CSO P-40	202	A	122	162	A	260
CSO P-41	202	A	122	162	A	260
CSO P-42	202	G	112	160	T	241
CSO P-43	222	G	112	162	A	260
CSO P-44	222	G	112	162	A	260
CSO P-45	222	G	112	160	A	241
CSO P-46	202	A	122	160	T	241
CSO P-47	202	A	122	160	T	260
CSO P-48	202	A	122	160	T	260

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

Supplementary Table II.II Genotyping of 'RTO' diploid progeny with SSR and SNP markers distributed across the nine linkage groups of reference clementine.

LG1						
Centromere position (cM)*	60.66					
Locus	CIBE6147		CIBE5720		TAA15	
Location (cM)**	14.39		58.44		115.90	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTO	206-206	-	329-337	-	204-204	-
CSO	-	204-212	-	325-341	-	189-192
RTSO-01	206	204	329	325	204	189
RTSO-02	206	204	337	325	204	189
RTSO-03	206	212	329	341	204	192
RTSO-04	206	204	337	325	204	189
RTSO-05	206	212	329	341	204	192
RTSO-06	206	212	329	341	204	189
RTSO-07	206	212	337	325	204	189
RTSO-08	206	212	337	341	204	192
RTSO-09	206	204	337	325	204	192
RTSO-10	206	212	337	325	204	192
RTSO-11	206	204	329	341	204	192
RTSO-12	206	204	329	325	204	189
RTSO-13	206	204	329	325	204	192
RTSO-14	206	204	329	325	204	189
RTSO-15	206	212	329	341	204	192
RTSO-16	206	204	337	325	204	192
RTSO-17	206	204	337	325	204	192
RTSO-18	206	204	337	325	204	189
RTSO-19	206	204	337	325	204	192
RTSO-20	206	212	329	325	204	192
RTSO-21	206	212	337	341	204	192
RTSO-22	206	212	329	325	204	189
RTSO-23	206	204	329	341	204	192
RTSO-24	206	204	329	325	204	189
RTSO-25	206	212	337	341	204	189
RTSO-26	206	212	337	341	204	189
RTSO-27	206	212	329	341	204	192
RTSO-28	206	212	329	341	204	192
RTSO-29	206	212	329	341	204	192
RTSO-30	206	212	329	341	204	189
RTSO-31	206	204	337	325	204	189
RTSO-32	206	204	337	341	204	192
RTSO-33	206	212	329	341	204	189
RTSO-34	206	212	337	341	204	192
RTSO-35	206	204	337	341	204	189
RTSO-36	206	204	337	341	204	189
RTSO-37	206	204	337	341	204	189
RTSO-38	206	212	329	341	204	189
RTSO-39	206	204	329	341	204	192

Supplementary Table II.II Continued (LG1)

Locus	LG1					
	CIBE6147		CIBE5720		TAA15	
Location (cM)**	14.39		58.44		115.90	
RTSO-40	206	204	329	325	204	192
RTSO-41	206	212	329	325	204	192
RTSO-42	206	204	337	325	204	192
RTSO-43	206	212	329	325	204	192
RTSO-44	206	204	337	325	204	192
RTSO-45	206	212	329	341	204	192
RTSO-46	206	204	329	325	204	192
RTSO-47	206	204	329	325	204	192
RTSO-48	206	212	329	341	204	192
RTSO-49	206	212	337	325	204	189
RTSO-50	206	204	329	341	204	192
RTSO-51	206	212	337	325	204	189
RTSO-52	206	212	329	325	204	192
RTSO-53	206	204	337	341	204	192
RTSO-54	206	212	329	341	204	189
RTSO-55	206	204	329	341	204	189
RTSO-56	206	212	329	325	204	189
RTSO-57	206	204	329	325	204	189
RTSO-58	206	212	337	341	204	192
RTSO-59	206	204	329	341	204	189
RTSO-60	206	204	329	341	204	189
RTSO-61	206	204	337	325	204	192
RTSO-62	206	212	337	341	204	189
RTSO-63	206	212	329	325	204	189
RTSO-64	206	212	329	341	204	189
RTSO-65	206	212	337	325	204	189
RTSO-66	206	212	337	325	204	192
RTSO-67	206	212	337	341	204	192
RTSO-68	206	212	337	325	204	192
RTSO-69	206	212	329	341	204	189
RTSO-70	206	204	329	325	204	189
RTSO-71	206	212	337	325	204	192
RTSO-72	206	212	329	325	204	189
RTSO-73	206	212	329	341	204	189
RTSO-74	206	212	329	341	204	189
RTSO-75	206	212	337	341	204	189
RTSO-76	206	204	329	341	204	192
RTSO-77	206	204	329	325	204	192
RTSO-78	206	204	329	325	204	192
RTSO-79	206	204	329	341	204	192
RTSO-80	206	212	337	325	204	192
RTSO-81	206	204	329	341	204	192
RTSO-82	206	204	337	325	204	189
RTSO-83	206	212	337	341	204	189
RTSO-84	206	212	329	341	204	189

Supplementary Table II.II Continued (LG1)

Locus	LG1					
	CIBE6147		CIBE5720		TAA15	
Location (cM)**	14.39		58.44		115.90	
RTSO-85	206	204	329	341	204	192
RTSO-86	206	212	337	341	204	189

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

** Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.II Continued (LG2)

LG2								
Centromere Position (cM)*	56.87							
Locus (cM)**	2P21022555		CX6F23		C1C3712-01		TAA41	
Location	57.00		59.35		114.51		160.74	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTO	GG	-	162-168	-	CC	-	154-160	-
CSO	-	AG	-	155-162	-	AC	-	148-154
RTSO-01	G	G	168	162	C	A	154	154
RTSO-02	G	G	168	162	C	C	160	148
RTSO-03	G	G	168	162	C	A	160	154
RTSO-04	G	G	168	162	C	A	160	154
RTSO-05	G	G	168	162	C	C	160	148
RTSO-06	G	A	168	155	C	A	154	154
RTSO-07	G	G	168	162	C	C	154	148
RTSO-08	G	G	168	162	C	C	154	148
RTSO-09	G	G	168	162	C	C	160	148
RTSO-10	G	G	162	162	C	C	160	154
RTSO-11	G	G	168	162	C	C	154	154
RTSO-12	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-13	G	G	168	162	C	A	154	148
RTSO-14	G	G	162	162	C	A	160	148
RTSO-15	G	G	162	162	C	C	160	154
RTSO-16	G	G	162	162	C	A	160	148
RTSO-17	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-18	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-19	G	G	168	162	C	A	154	148
RTSO-20	G	A	168	155	C	C	160	148
RTSO-21	G	G	162	162	C	C	154	154
RTSO-22	G	G	162	162	C	A	154	154
RTSO-23	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-24	G	G	168	162	C	C	160	148
RTSO-25	G	G	162	162	C	C	160	148
RTSO-26	G	G	162	162	C	C	160	148
RTSO-27	G	G	162	162	C	C	160	148
RTSO-28	G	G	168	162	C	C	154	154
RTSO-29	G	G	168	162	C	C	160	148
RTSO-30	G	G	162	162	C	C	160	148
RTSO-31	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-32	G	G	168	162	C	C	154	148
RTSO-33	G	G	162	162	C	C	160	148
RTSO-34	G	G	168	162	C	C	160	154
RTSO-35	G	G	168	162	C	C	154	154
RTSO-36	G	G	168	162	C	C	154	154

Supplementary Table II.II Continued (LG2)

LG2								
Locus (cM)**	2P21022555		CX6F23		C1C3712-01		TAA41	
	57.00		59.35		114.51		160.74	
Location	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-37	G	G	168	162	C	A	160	154
RTSO-38	G	G	168	162	C	C	154	148
RTSO-39	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-40	G	G	168	162	C	C	160	148
RTSO-41	G	G	168	162	C	C	154	148
RTSO-42	G	G	168	162	C	C	154	154
RTSO-43	G	A	168	155	C	A	154	148
RTSO-44	G	G	168	162	C	A	154	154
RTSO-45	G	G	162	162	C	C	154	154
RTSO-46	G	G	168	162	C	C	160	154
RTSO-47	G	A	162	155	C	C	154	148
RTSO-48	G	G	168	162	C	A	160	154
RTSO-49	G	A	168	155	C	A	160	154
RTSO-50	G	G	168	155	C	C	160	154
RTSO-51	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-52	G	G	162	162	C	C	160	148
RTSO-53	G	G	168	162	C	C	154	154
RTSO-54	G	A	168	155	C	A	160	148
RTSO-55	G	G	162	162	C	A	154	154
RTSO-56	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-57	G	G	162	155	C	C	154	154
RTSO-58	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-59	G	G	168	155	C	C	160	148
RTSO-60	G	G	168	162	C	C	154	148
RTSO-61	G	G	162	162	C	C	160	154
RTSO-62	G	G	168	162	C	C	154	148
RTSO-63	G	G	168	155	C	C	160	154
RTSO-64	G	G	168	162	C	A	160	154
RTSO-65	G	G	162	162	C	A	160	154
RTSO-66	G	G	162	162	C	C	160	148
RTSO-67	G	G	162	155	C	C	154	148
RTSO-68	G	G	162	162	C	A	154	148
RTSO-69	G	G	168	162	C	C	154	148
RTSO-70	G	G	168	155	C	C	160	148
RTSO-71	G	G	162	162	C	C	160	148
RTSO-72	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-73	G	G	168	162	C	C	160	148
RTSO-74	G	G	168	162	C	C	160	154
RTSO-75	G	G	168	162	C	C	160	148
RTSO-76	G	G	162	162	C	C	154	154

Supplementary Table II.II Continued (LG2).

LG2								
Locus (cM)**	2P21022555		CX6F23		C1C3712-01		TAA41	
Location	57.00		59.35		114.51		160.74	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-77	G	A	168	155	C	C	160	148
RTSO-78	G	G	168	162	C	C	160	148
RTSO-79	G	G	168	162	C	C	154	154
RTSO-80	G	G	162	162	C	C	160	154
RTSO-81	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-82	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-83	G	G	162	162	C	C	154	148
RTSO-84	G	G	168	162	C	C	160	148
RTSO-85	G	G	168	162	C	C	160	154
RTSO-86	G	G	168	162	C	C	154	154

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

** Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.II Continued (LG3).

LG3						
Centromere Position (cM)*	90.59					
Locus (cM)**	MEST256		3P359316 24		TC01	
Location	17.02		95.10		109.67	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTO	225-225	-	GG	-	333-342	-
CSO	-	210-225	-	GA	-	333-352
RTSO-01	225	210	G	G	342	333
RTSO-02	225	225	G	G	342	352
RTSO-03	225	225	G	A	333	352
RTSO-04	225	225	G	G	333	352
RTSO-05	225	210	G	A	333	352
RTSO-06	225	225	G	G	333	333
RTSO-07	225	210	G	G	333	333
RTSO-08	225	225	G	A	342	333
RTSO-09	225	210	G	G	333	333
RTSO-10	225	210	G	A	333	352
RTSO-11	225	225	G	G	333	333
RTSO-12	225	225	G	G	342	333
RTSO-13	225	225	G	G	342	333
RTSO-14	225	210	G	A	333	352
RTSO-15	225	225	G	A	333	352
RTSO-16	225	225	G	A	333	352
RTSO-17	225	210	G	G	333	333
RTSO-18	225	225	G	G	333	333
RTSO-19	225	210	G	A	342	352
RTSO-20	225	210	G	A	342	352
RTSO-21	225	225	G	G	333	333
RTSO-22	225	225	G	G	333	333
RTSO-23	225	210	G	G	333	333
RTSO-24	225	210	G	G	342	333
RTSO-25	225	225	G	A	333	352
RTSO-26	225	225	G	A	333	333
RTSO-27	225	210	G	A	333	352
RTSO-28	225	225	G	G	333	352
RTSO-29	225	210	G	G	333	333
RTSO-30	225	225	G	G	342	333
RTSO-31	225	225	G	A	333	352
RTSO-32	225	210	G	A	342	352
RTSO-33	225	210	G	A	333	352
RTSO-34	225	225	G	G	333	352
RTSO-35	225	210	G	G	333	333
RTSO-36	225	210	G	G	333	333

Supplementary Table II.II Continued (LG3).

Locus (cM)**	LG3					
	MEST256		3P35931624		TC01	
Location	17.02		95.10		109.67	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-37	225	225	G	G	342	333
RTSO-38	225	225	G	A	342	352
RTSO-39	225	225	G	G	342	333
RTSO-40	225	210	G	A	342	352
RTSO-41	225	225	G	A	333	352
RTSO-42	225	225	G	A	342	352
RTSO-43	225	210	G	A	342	352
RTSO-44	225	210	G	G	333	333
RTSO-45	225	210	G	G	333	333
RTSO-46	225	210	G	A	342	352
RTSO-47	225	210	G	A	342	352
RTSO-48	225	225	G	G	342	333
RTSO-49	225	210	G	A	342	352
RTSO-50	225	210	G	G	342	333
RTSO-51	225	225	G	G	333	352
RTSO-52	225	210	G	A	333	352
RTSO-53	225	210	G	A	342	352
RTSO-54	225	225	G	A	342	352
RTSO-55	225	225	G	G	333	333
RTSO-56	225	210	G	A	333	352
RTSO-57	225	210	G	G	342	333
RTSO-58	225	225	G	G	333	333
RTSO-59	225	210	G	G	333	352
RTSO-60	225	225	G	G	342	333
RTSO-61	225	225	G	G	342	333
RTSO-62	225	225	G	G	342	333
RTSO-63	225	210	G	G	342	352
RTSO-64	225	225	G	G	333	333
RTSO-65	225	210	G	A	342	352
RTSO-66	225	225	G	G	342	333
RTSO-67	225	210	G	G	342	333
RTSO-68	225	210	G	A	342	352
RTSO-69	225	210	G	A	342	352
RTSO-70	225	225	G	G	333	333
RTSO-71	225	225	G	G	342	333
RTSO-72	225	210	G	G	333	333
RTSO-73	225	210	G	A	333	352
RTSO-74	225	210	G	G	333	333
RTSO-75	225	210	G	A	333	352
RTSO-76	225	210	G	A	333	352
RTSO-77	225	210	G	G	333	333

Supplementary Table II.II Continued (LG3).

Locus (cM)**	LG3					
	MEST256		3P35931624		TC01	
Location	17.02		95.10		109.67	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-78	225	210	G	G	342	333
RTSO-79	225	225	G	G	333	333
RTSO-80	225	210	G	G	342	333
RTSO-81	225	210	G	A	333	352
RTSO-82	225	210	G	A	342	352
RTSO-83	225	210	G	A	342	352
RTSO-84	225	210	G	A	342	352
RTSO-85	225	210	G	A	342	352
RTSO-86	225	210	G	A	342	352

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

** Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.II Continued (LG4).

LG4						
Centromere Position (cM)*	16.14					
Locus (cM)**	C4P5278891		C103G05		C103D12a	
Location	18.45		75.07		90.06	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTO	GG	-	226-226	-	280-280	-
CSO	-	AG	-	199-226	-	251-261
RTSO-01	G	A	226	226	280	261
RTSO-02	G	A	226	226	280	251
RTSO-03	G	G	226	226	280	251
RTSO-04	G	A	226	226	280	251
RTSO-05	G	A	226	226	280	261
RTSO-06	G	A	226	226	280	251
RTSO-07	G	G	226	199	280	261
RTSO-08	G	A	226	226	280	251
RTSO-09	G	A	226	226	280	251
RTSO-10	G	A	226	199	280	261
RTSO-11	G	A	226	199	280	251
RTSO-12	G	G	226	199	280	261
RTSO-13	G	G	226	199	280	261
RTSO-14	G	A	226	199	280	261
RTSO-15	G	G	226	199	280	261
RTSO-16	G	G	226	199	280	261
RTSO-17	G	A	226	199	280	261
RTSO-18	G	G	226	199	280	261
RTSO-19	G	G	226	199	280	261
RTSO-20	G	G	226	226	280	251
RTSO-21	G	G	226	199	280	261
RTSO-22	G	G	226	199	280	261
RTSO-23	G	G	226	199	280	261
RTSO-24	G	G	226	226	280	251
RTSO-25	G	G	226	226	280	251
RTSO-26	G	G	226	199	280	261
RTSO-27	G	A	226	226	280	251
RTSO-28	G	A	226	199	280	261
RTSO-29	G	A	226	226	280	251
RTSO-30	G	G	226	226	280	251
RTSO-31	G	A	226	226	280	251
RTSO-32	G	A	226	226	280	251
RTSO-33	G	G	226	226	280	251
RTSO-34	G	G	226	226	280	251
RTSO-35	G	A	226	199	280	261
RTSO-36	G	A	226	199	280	261

Supplementary Table II.II Continued (LG4).

Locus (cM)**	LG4					
	C4P5Z78891		C103G05		C103D12a	
	18.45		75.07		90.06	
Location	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-37	G	A	226	226	280	251
RTSO-38	G	A	226	199	280	261
RTSO-39	G	A	226	226	280	251
RTSO-40	G	A	226	199	280	261
RTSO-41	G	A	226	199	280	261
RTSO-42	G	A	226	226	280	251
RTSO-43	G	A	226	226	280	251
RTSO-44	G	A	226	226	280	251
RTSO-45	G	G	226	199	280	261
RTSO-46	G	A	226	199	280	261
RTSO-47	G	A	226	226	280	251
RTSO-48	G	A	226	199	280	261
RTSO-49	G	A	226	199	280	261
RTSO-50	G	G	226	199	280	261
RTSO-51	G	G	226	199	280	261
RTSO-52	G	G	226	199	280	261
RTSO-53	G	A	226	199	280	261
RTSO-54	G	A	226	226	280	251
RTSO-55	G	A	226	226	280	251
RTSO-56	G	G	226	199	280	261
RTSO-57	G	G	226	226	280	251
RTSO-58	G	G	226	199	280	261
RTSO-59	G	A	226	226	280	251
RTSO-60	G	G	226	226	280	251
RTSO-61	G	A	226	226	280	251
RTSO-62	G	A	226	226	280	251
RTSO-63	G	A	226	199	280	261
RTSO-64	G	G	226	199	280	261
RTSO-65	G	A	226	226	280	251
RTSO-66	G	A	226	199	280	261
RTSO-67	G	A	226	199	280	261
RTSO-68	G	G	226	226	280	251
RTSO-69	G	G	226	199	280	261
RTSO-70	G	G	226	226	280	251
RTSO-71	G	A	226	199	280	261
RTSO-72	G	A	226	199	280	261
RTSO-73	G	A	226	226	280	251
RTSO-74	G	G	226	199	280	261
RTSO-75	G	G	226	226	280	251
RTSO-76	G	A	226	226	280	251
RTSO-77	G	A	226	226	280	251

Supplementary Table II.II Continued (LG4).

Locus (cM)**	LG4					
	C4P5278891		C103G05		C103D12a	
Location	18.45		75.07		90.06	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-78	G	A	226	226	280	251
RTSO-79	G	G	226	226	280	251
RTSO-80	G	G	226	199	280	261
RTSO-81	G	G	226	226	280	251
RTSO-82	G	G	226	199	280	261
RTSO-83	G	G	226	199	280	261
RTSO-84	G	G	226	199	280	261
RTSO-85	G	A	226	226	280	251
RTSO-86	G	A	226	226	280	261

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

** Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.II Continued (LG5).

LG5								
Centromere Position (cM)*	23.12							
Locus (cM)**	MEST15		MEST8		mCrCIR06A12		mCrCIR07E12	
Location	16.21		57.05		93.20		95.43	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTO	189-189	-	126-126	-	95-95	-	118-118	-
CSO	-	174-192	-	126-140	-	95-102	-	118-124
RTSO-01	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-02	189	174	126	126	95	95	118	118
RTSO-03	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-04	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-05	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-06	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-07	189	174	126	126	95	95	118	118
RTSO-08	189	192	126	140	95	102	118	124
RTSO-09	189	192	126	126	95	102	118	124
RTSO-10	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-11	189	192	126	126	95	102	118	124
RTSO-12	189	192	126	126	95	102	118	124
RTSO-13	189	192	126	140	95	95	118	118
RTSO-14	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-15	189	174	126	140	95	102	118	118
RTSO-16	189	174	126	140	95	95	118	118
RTSO-17	189	174	126	126	95	95	118	118
RTSO-18	189	192	126	140	95	95	118	118
RTSO-19	189	192	126	126	95	102	118	124
RTSO-20	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-21	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-22	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-23	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-24	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-25	189	192	126	126	95	102	118	124
RTSO-26	189	192	126	140	95	95	118	118
RTSO-27	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-28	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-29	189	192	126	140	95	102	118	124
RTSO-30	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-31	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-32	189	192	126	140	95	102	118	124
RTSO-33	189	192	126	126	95	102	118	124
RTSO-34	189	174	126	140	95	95	118	118
RTSO-35	189	174	126	126	95	95	118	118

Supplementary Table II.II Continued (LG5).

LG5								
Locus (cM)**	MEST15		MEST88		mCrCIR06A12		mCrCIR07E12	
	16.21		57.05		93.20		95.43	
Location	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-36	189	174	126	126	95	95	118	118
RTSO-37	189	192	126	140	95	102	118	118
RTSO-38	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-39	189	174	126	126	95	95	118	118
RTSO-40	189	174	126	126	95	95	118	118
RTSO-41	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-42	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-43	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-44	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-45	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-46	189	174	126	140	95	95	118	118
RTSO-47	189	174	126	126	95	102	118	118
RTSO-48	189	192	126	140	95	102	118	124
RTSO-49	189	192	126	140	95	95	118	118
RTSO-50	189	192	126	140	95	102	118	124
RTSO-51	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-52	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-53	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-54	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-55	189	174	126	126	95	102	118	118
RTSO-56	189	174	126	140	95	95	118	118
RTSO-57	189	192	126	140	95	102	118	124
RTSO-58	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-59	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-60	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-61	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-62	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-63	189	192	126	140	95	95	118	118
RTSO-64	189	174	126	140	95	95	118	118
RTSO-65	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-66	189	192	126	140	95	95	118	118
RTSO-67	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-68	189	174	126	140	95	95	118	118
RTSO-69	189	192	126	140	95	102	118	124
RTSO-70	189	174	126	126	95	95	118	118
RTSO-71	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-72	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-73	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-74	189	192	126	126	95	102	118	124
RTSO-75	189	192	126	126	95	102	118	124

Supplementary Table II.II Continued (LG5).

LG5								
Locus (cM)**	MEST15		MEST88		mCrCIR06A12		mCrCIR07E12	
Location	16.21		57.05		93.20		95.43	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-76	189	174	126	140	95	102	118	124
RTSO-77	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-78	189	192	126	140	95	95	118	118
RTSO-79	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-80	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-81	189	174	126	140	95	95	118	118
RTSO-82	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-83	189	174	126	126	95	102	118	124
RTSO-84	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-85	189	192	126	126	95	95	118	118
RTSO-86	189	174	126	140	95	102	118	124

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

** Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.II Continued (LG6).

LG6						
Centromere Position (cM)*	6.20					
Locus (cM)**	MEST191	MEST488		CIBE6256		
Location	10.79		68.39		84.49	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTO	235-241	-	126-126	-	174-192	-
CSO	-	241-244	-	126-140	-	176-190
RTSO-01	241	241	126	140	192	176
RTSO-02	241	244	126	126	174	190
RTSO-03	235	244	126	140	174	176
RTSO-04	241	244	126	126	192	190
RTSO-05	241	244	126	126	174	176
RTSO-06	235	241	126	140	174	176
RTSO-07	241	244	126	126	192	190
RTSO-08	241	241	126	140	192	176
RTSO-09	235	244	126	126	192	190
RTSO-10	241	244	126	126	192	176
RTSO-11	241	241	126	126	174	190
RTSO-12	241	244	126	126	174	190
RTSO-13	235	241	126	140	174	176
RTSO-14	241	241	126	126	192	190
RTSO-15	241	244	126	140	174	176
RTSO-16	235	241	126	140	192	176
RTSO-17	241	244	126	126	192	190
RTSO-18	241	241	126	140	174	190
RTSO-19	241	241	126	126	174	190
RTSO-20	235	241	126	126	192	190
RTSO-21	235	241	126	140	192	190
RTSO-22	241	244	126	126	174	190
RTSO-23	241	241	126	140	174	176
RTSO-24	235	241	126	140	174	176
RTSO-25	241	244	126	126	174	190
RTSO-26	241	241	126	140	192	176
RTSO-27	235	244	126	126	174	190
RTSO-28	241	241	126	126	174	176
RTSO-29	235	241	126	140	174	176
RTSO-30	235	241	126	126	174	176
RTSO-31	235	241	126	140	174	176
RTSO-32	241	244	126	140	192	190
RTSO-33	241	244	126	126	174	190
RTSO-34	241	241	126	140	192	176
RTSO-35	241	244	126	126	174	176
RTSO-36	241	244	126	126	174	176

Supplementary Table II.II Continued (LG6).

Locus (cM)**	LG6					
	MEST191		MEST488		CIB6256	
	10.79		68.39		84.49	
Location	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-37	235	241	126	140	192	176
RTSO-38	241	244	126	126	192	190
RTSO-39	235	244	126	126	192	190
RTSO-40	235	241	126	126	174	190
RTSO-41	235	241	126	126	174	190
RTSO-42	235	241	126	140	192	176
RTSO-43	235	241	126	126	192	190
RTSO-44	241	244	126	140	174	190
RTSO-45	235	244	126	140	174	176
RTSO-46	241	241	126	140	192	176
RTSO-47	241	244	126	126	174	190
RTSO-48	235	244	126	140	192	176
RTSO-49	241	241	126	140	192	176
RTSO-50	235	241	126	140	192	190
RTSO-51	235	244	126	126	192	190
RTSO-52	235	244	126	126	174	190
RTSO-53	235	244	126	126	174	190
RTSO-54	235	241	126	126	174	190
RTSO-55	241	244	126	126	174	190
RTSO-56	235	241	126	140	174	176
RTSO-57	235	244	126	140	192	176
RTSO-58	241	244	126	126	174	176
RTSO-59	241	241	126	140	192	190
RTSO-60	235	241	126	126	174	176
RTSO-61	241	244	126	126	174	190
RTSO-62	241	241	126	126	192	190
RTSO-63	235	241	126	140	192	190
RTSO-64	235	241	126	140	174	176
RTSO-65	235	244	126	126	192	190
RTSO-66	235	241	126	140	174	176
RTSO-67	241	244	126	126	174	190
RTSO-68	241	241	126	140	174	176
RTSO-69	241	241	126	140	192	190
RTSO-70	241	241	126	126	192	190
RTSO-71	241	241	126	126	174	190
RTSO-72	241	241	126	126	174	190
RTSO-73	241	244	126	126	192	190
RTSO-74	235	241	126	126	192	190
RTSO-75	241	244	126	126	192	176
RTSO-76	241	241	126	140	174	176
RTSO-77	241	241	126	126	192	190

Supplementary Table II.II Continued (LG6).

Locus (cM)**	LG6					
	MEST191		MEST488		CIB6256	
Location	10.79		68.39		84.49	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-78	241	241	126	140	192	176
RTSO-79	235	241	126	126	174	176
RTSO-80	241	244	126	126	192	190
RTSO-81	241	244	126	140	174	176
RTSO-82	235	241	126	126	192	190
RTSO-83	241	241	126	126	174	176
RTSO-84	241	244	126	126	192	190
RTSO-85	241	241	126	126	192	176
RTSO-86	235	241	126	140	192	176

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

** Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.II Continued (LG7).

LG7								
Centromere Position (cM)*	96.43							
Locus (cM)**	MEST107		MEST202		C1C3674-02		C107C07	
Location	8.89		20.60		23.56		98.01	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTO	175-175	-	169-172	-	GG	-	238-240	-
CSO	-	175-182	-	157-169	-	AG	-	227-240
RTSO-01	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-02	175	182	169	157	G	A	238	227
RTSO-03	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-04	175	182	169	157	G	A	238	227
RTSO-05	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-06	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-07	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-08	175	182	172	157	G	A	240	227
RTSO-09	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-10	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-11	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-12	175	182	169	157	G	A	238	240
RTSO-13	175	182	169	157	G	A	240	240
RTSO-14	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-15	175	182	169	157	G	A	240	240
RTSO-16	175	182	172	157	G	A	238	240
RTSO-17	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-18	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-19	175	182	169	157	G	A	240	240
RTSO-20	175	182	169	157	G	A	238	240
RTSO-21	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-22	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-23	175	182	172	157	G	A	238	240
RTSO-24	175	182	169	157	G	A	240	240
RTSO-25	175	182	169	157	G	A	238	240
RTSO-26	175	182	169	157	G	A	238	240
RTSO-27	175	182	172	157	G	A	240	227
RTSO-28	175	182	169	157	G	A	238	227
RTSO-29	175	175	169	157	G	A	238	227
RTSO-30	175	182	172	157	G	A	238	240
RTSO-31	175	182	169	157	G	A	238	227
RTSO-32	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-33	175	182	169	157	G	A	240	240
RTSO-34	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-35	175	182	169	157	G	A	238	227
RTSO-36	175	182	169	157	G	A	238	227

Supplementary Table II.II Continued (LG7).

Locus (cM)**	LG7							
	MEST107		MEST202		CIC3674-02		C107C07	
	8.89		20.60		23.56		98.01	
Location	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-37	175	182	169	157	G	A	238	227
RTSO-38	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-39	175	175	172	157	G	A	238	227
RTSO-40	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-41	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-42	175	182	169	157	G	A	238	227
RTSO-43	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-44	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-45	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-46	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-47	175	182	169	157	G	A	238	227
RTSO-48	175	182	172	157	G	A	240	227
RTSO-49	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-50	175	182	169	157	G	A	240	240
RTSO-51	175	182	172	157	G	A	238	240
RTSO-52	175	175	169	157	G	A	240	227
RTSO-53	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-54	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-55	175	182	172	157	G	A	240	227
RTSO-56	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-57	175	182	172	157	G	A	238	240
RTSO-58	175	182	169	157	G	A	240	240
RTSO-59	175	182	172	157	G	A	240	227
RTSO-60	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-61	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-62	175	182	169	157	G	A	238	227
RTSO-63	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-64	175	182	172	157	G	A	238	240
RTSO-65	175	182	172	157	G	A	240	227
RTSO-66	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-67	175	182	172	157	G	A	240	227
RTSO-68	175	182	172	157	G	A	238	240
RTSO-69	175	182	169	157	G	G	240	240
RTSO-70	175	182	169	157	G	A	238	240
RTSO-71	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-72	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-73	175	182	172	157	G	A	240	227
RTSO-74	175	182	172	157	G	A	238	240
RTSO-75	175	182	169	157	G	A	238	240
RTSO-76	175	182	172	157	G	A	238	227
RTSO-77	175	182	172	157	G	A	240	227

Supplementary Table II.II Continued (LG7).

Locus (cM)**	LG7							
	MEST107		MEST202		CIC3674-02		C107C07	
Location	8.89		20.60		23.56		98.01	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-78	175	182	169	157	G	A	240	227
RTSO-79	175	182	169	157	G	A	240	240
RTSO-80	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-81	175	182	172	157	G	A	240	240
RTSO-82	175	182	172	157	G	A	238	240
RTSO-83	175	182	169	157	G	A	240	240
RTSO-84	175	182	172	157	G	A	238	240
RTSO-85	175	175	169	157	G	A	238	227
RTSO-86	175	182	169	157	G	A	240	227

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

** Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.II Continued (LG8).

LG8						
Centromere Position (cM)*	54.21					
Locus (cM)**	mCrCIR07B05		C1C1208-01		mCrCIR02G0₂	
Location	33.17		57.78		59.15	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTO	220-222	-	GG	-	116-122	-
CSO	-	202-222	-	AG	-	112-122
RTSO-01	220	222	G	G	122	112
RTSO-02	220	202	G	A	116	122
RTSO-03	220	202	G	A	116	122
RTSO-04	222	202	G	A	122	122
RTSO-05	220	202	G	A	116	122
RTSO-06	222	222	G	G	116	112
RTSO-07	222	202	G	G	122	112
RTSO-08	222	202	G	A	122	122
RTSO-09	222	222	G	G	116	112
RTSO-10	222	222	G	G	116	112
RTSO-11	220	202	G	G	122	112
RTSO-12	222	202	G	A	122	122
RTSO-13	222	202	G	A	122	122
RTSO-14	220	202	G	A	122	122
RTSO-15	222	202	G	A	122	122
RTSO-16	220	202	G	A	116	122
RTSO-17	222	202	G	A	122	122
RTSO-18	220	202	G	A	122	122
RTSO-19	220	222	G	G	116	112
RTSO-20	220	202	G	A	116	122
RTSO-21	220	222	G	A	116	122
RTSO-22	220	222	G	G	116	112
RTSO-23	222	202	G	A	122	122
RTSO-24	220	222	G	G	116	112
RTSO-25	220	222	G	G	116	112
RTSO-26	220	202	G	A	122	122
RTSO-27	220	222	G	G	116	112
RTSO-28	222	222	G	G	122	112
RTSO-29	220	222	G	G	116	112
RTSO-30	220	202	G	A	116	112
RTSO-31	222	222	G	G	122	112
RTSO-32	220	222	G	G	116	112
RTSO-33	220	202	G	A	122	122
RTSO-34	220	222	G	G	116	112
RTSO-35	222	202	G	A	122	122
RTSO-36	222	202	G	A	122	122

Supplementary Table II.II Continued (LG8).

Locus (cM)**	LG8					
	mCrCIR07B05		CIC1208-01		mCrCIR02G02	
	33.17		57.78		59.15	
Location	RT0	CSO	RT0	CSO	RT0	CSO
RTSO-37	222	202	G	A	122	122
RTSO-38	220	202	G	A	122	122
RTSO-39	222	222	G	G	116	112
RTSO-40	222	202	G	G	122	112
RTSO-41	220	202	G	A	122	122
RTSO-42	220	222	G	G	116	112
RTSO-43	220	222	G	G	116	112
RTSO-44	220	222	G	G	116	112
RTSO-45	222	222	G	G	116	112
RTSO-46	220	202	G	A	122	122
RTSO-47	220	222	G	G	116	112
RTSO-48	220	222	G	G	116	112
RTSO-49	220	202	G	A	116	122
RTSO-50	220	222	G	G	116	112
RTSO-51	220	222	G	G	116	112
RTSO-52	220	222	G	G	116	112
RTSO-53	222	222	G	G	122	112
RTSO-54	220	202	G	A	122	122
RTSO-55	220	202	G	A	116	122
RTSO-56	220	222	G	G	116	112
RTSO-57	220	222	G	A	116	122
RTSO-58	222	202	G	G	116	112
RTSO-59	220	222	G	G	116	112
RTSO-60	222	202	G	A	122	122
RTSO-61	222	222	G	G	122	112
RTSO-62	222	222	G	G	122	112
RTSO-63	222	222	G	G	116	112
RTSO-64	220	202	G	A	122	122
RTSO-65	220	222	G	G	116	112
RTSO-66	220	202	G	A	116	122
RTSO-67	220	202	G	A	116	122
RTSO-68	222	222	G	A	122	122
RTSO-69	220	222	G	G	116	112
RTSO-70	220	222	G	G	116	112
RTSO-71	220	222	G	A	116	122
RTSO-72	220	202	G	G	116	112
RTSO-73	220	222	G	G	116	112
RTSO-74	220	202	G	A	116	122
RTSO-75	222	202	G	A	116	122
RTSO-76	220	222	G	A	122	122

Supplementary Table II.II Continued (LG8).

LG8						
Locus (cM)**	mCrCIR07B05		CIC1208-01		mCrCIR02G02	
	Location	33.17	57.78		59.15	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-77	220	222	G	G	116	112
RTSO-78	220	222	G	G	116	112
RTSO-79	222	202	G	A	122	122
RTSO-80	222	222	G	G	122	112
RTSO-81	222	202	G	A	122	122
RTSO-82	220	202	G	G	116	112
RTSO-83	222	202	G	A	122	122
RTSO-84	220	222	G	G	116	112
RTSO-85	222	202	G	G	116	112
RTSO-86	220	222	G	G	116	112

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

** Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

Supplementary Table II.II Continued (LG9).

LG9						
Centromere Position (cM)*	52.16					
Locus (cM)**	C102B07		C1C5087-01		MEST308	
Location	0.01		15.88		50.41	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTO	162-170	-	TT	-	260-260	-
CSO	-	160-162	-	AT	-	241-260
RTSO-01	170	160	T	A	260	260
RTSO-02	170	162	T	A	260	260
RTSO-03	170	162	T	A	260	241
RTSO-04	162	160	T	T	260	260
RTSO-05	162	162	T	A	260	260
RTSO-06	170	160	T	T	260	241
RTSO-07	170	162	T	A	260	260
RTSO-08	162	162	T	T	260	241
RTSO-09	162	162	T	A	260	260
RTSO-10	170	160	T	T	260	260
RTSO-11	162	160	T	T	260	241
RTSO-12	162	162	T	A	260	260
RTSO-13	162	160	T	A	260	260
RTSO-14	170	160	T	T	260	241
RTSO-15	170	160	T	T	260	241
RTSO-16	170	162	T	A	260	260
RTSO-17	170	162	T	T	260	241
RTSO-18	170	160	T	A	260	260
RTSO-19	170	162	T	A	260	260
RTSO-20	170	160	T	A	260	260
RTSO-21	162	162	T	T	260	241
RTSO-22	162	162	T	A	260	260
RTSO-23	170	162	T	A	260	260
RTSO-24	162	162	T	A	260	260
RTSO-25	162	160	T	A	260	260
RTSO-26	162	160	T	T	260	241
RTSO-27	170	162	T	A	260	260
RTSO-28	162	160	T	T	260	260
RTSO-29	162	162	T	A	260	241
RTSO-30	162	162	T	A	260	241
RTSO-31	162	162	T	A	260	260
RTSO-32	162	162	T	T	260	241
RTSO-33	170	162	T	A	260	260
RTSO-34	170	162	T	T	260	241
RTSO-35	170	162	T	T	260	241
RTSO-36	170	162	T	T	260	241

Supplementary Table II.II Continued (LG9).

Locus (cM)**	LG9					
	C102B07		C1C5087-01		MEST308	
	0.01		15.88		50.41	
Location	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-37	170	162	T	A	260	260
RTSO-38	170	160	T	T	260	241
RTSO-39	162	162	T	A	260	241
RTSO-40	162	162	T	A	260	241
RTSO-41	170	162	T	A	260	260
RTSO-42	170	162	T	A	260	241
RTSO-43	162	162	T	A	260	260
RTSO-44	170	160	T	T	260	241
RTSO-45	170	162	T	T	260	241
RTSO-46	162	162	T	T	260	241
RTSO-47	170	160	T	T	260	241
RTSO-48	170	160	T	A	260	260
RTSO-49	162	160	T	T	260	241
RTSO-50	162	160	T	T	260	260
RTSO-51	162	160	T	T	260	241
RTSO-52	170	160	T	T	260	241
RTSO-53	170	162	T	A	260	260
RTSO-54	170	162	T	A	260	260
RTSO-55	170	160	T	T	260	241
RTSO-56	162	162	T	A	260	241
RTSO-57	170	160	T	A	260	260
RTSO-58	162	160	T	T	260	260
RTSO-59	162	160	T	T	260	241
RTSO-60	162	162	T	A	260	260
RTSO-61	170	160	T	T	260	241
RTSO-62	170	160	T	T	260	241
RTSO-63	170	160	T	A	260	260
RTSO-64	162	162	T	A	260	241
RTSO-65	162	160	T	T	260	241
RTSO-66	162	160	T	T	260	241
RTSO-67	162	162	T	A	260	241
RTSO-68	170	162	T	A	260	241
RTSO-69	170	162	T	T	260	241
RTSO-70	170	162	T	A	260	260
RTSO-71	162	162	T	T	260	241
RTSO-72	170	162	T	A	260	241
RTSO-73	170	162	T	A	260	241
RTSO-74	170	160	T	T	260	260
RTSO-75	162	162	T	A	260	241
RTSO-76	162	162	T	A	260	260
RTSO-77	170	162	T	A	260	260

Supplementary Table II.II Continued (LG9).

Locus (cM)**	LG9					
	C102B07		C1C5087-01		MEST308	
Location	0.01		15.88		50.41	
Genotype	RTO	CSO	RTO	CSO	RTO	CSO
RTSO-78	170	160	T	A	260	260
RTSO-79	162	162	T	T	260	241
RTSO-80	170	160	T	T	260	241
RTSO-81	162	160	T	T	260	241
RTSO-82	162	160	T	T	260	260
RTSO-83	162	160	T	T	260	241
RTSO-84	162	160	T	T	260	241
RTSO-85	170	160	T	T	260	241
RTSO-86	170	162	T	A	260	260

*Centromere location derived from reference genetic mapping of centromeres data (Aleza et al., 2015a).

** Locus location in cM derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a).

CAPITULO III

Male and female inheritance patterns in tetraploid `Moncada` mandarin

Miguel Garavello, José Cuenca, Andrés Garcia-Lor, Neus Ortega, Luis Navarro, Patrick Ollitrault and Pablo Aleza

Plant Cell Reports (2020)

DOI: 10.1007/s00299-019-02494-y

Abstract

Triploid breeding programs in citrus are key tool to develop seedless cultivars. Obtaining triploid citrus hybrids may be achieved through different strategies, such as the exploitation of female unreduced gamete in crosses between diploid parents and diploid by tetraploid sexual hybridizations, in which tetraploid genotypes can be used as male or female parents. Genetic configuration of triploid populations from interploidy crosses greatly depends on the chromosomal segregation mode of the tetraploid parent used. Here, we have analyzed the inheritance of the tetraploid 'Moncada' mandarin and compared the genetic structures of the resulting gametes when used as male and as female parent. The preferential chromosome pairing rate is calculated from the parental heterozygosity restitution (PHR) of codominant molecular markers, indicating the proportion between disomic and tetrasomic segregation. Tetraploid 'Moncada' both as female and male parent largely exhibited tetrasomic segregation. However, as female parent, one linkage group (LG8) showed intermediate segregation with tendency towards tetrasomic inheritance, while another linkage group (LG4) evidenced a clear intermediate segregation. On the other hand, when used as male parent two linkage groups (LG5 and LG6) showed values that fit an intermediate inheritance model with tetrasomic tendency. Significant doubled reduction (DR) rates were observed in five linkage groups as female parent, and in six linkage groups as male parent. The new knowledge generated here will serve to define crossing strategies in citrus improvement programs to efficiently obtain new varieties of interest in the global fresh consumption market.

Keywords: citrus, triploid, tetraploid, SSR and SNP markers, disomic inheritance, tetrasomic inheritance.

Key message: Tetraploid 'Moncada' mandarin, used as male and female in interploidy hybridizations, displays mainly tetrasomic inheritance for most LGs, with slight variations according to the direction of the crossing.

Introduction

Polyploids are plants with somatic cells that contain three or more complete sets of chromosomes (Ramsey and Schemske, 1998). Ancient whole-genome duplications have been reported in most evolutionary lineages and may represent a crucial mode of speciation and eukaryotic genome evolution (Van de Peer et al., 2017; Cai et al., 2019). In fact, all the angiosperm genomes sequenced to date exhibit evidence of ancient polyploidization events (Soltis et al., 2014; Van de Peer et al., 2017; Cai et al., 2019) and polyploidy is one of the major forces of evolution for plant species, leading to their diversification and differentiation (Otto and Whitton, 2000; Gallais, 2003; Van de Peer et al., 2017).

Basically, polyploids differ from the diploid counterparts in their ecological, morphological and physiological characteristics (Ramsey, 2007; Dewitte et al., 2009; Guerra et al., 2014; Ruiz et al., 2016). Several mechanisms lead to polyploidy, such as somatic doubling or the production of unreduced gametes which is the main polyploidization mechanism reported in plants (Bretagnolle and Thompson, 1995; De Storme and Geelen, 2013; Ramsey and Schemske, 1998, 2002).

Polyploidization offers many opportunities as a valuable tool in citrus breeding programs (Ollitrault et al., 2008; Grosser and Gmitter Jr, 2011; Cuenca et al., 2015b; Aleza et al., 2016). In *Citrus* and related genera, diploid genotypes are the most common, with a basic chromosome number $x = 9$ (Krug, 1943). However, euploids and aneuploids have been induced or found occasionally, with triploids and tetraploids being the most common euploid variations (Lee, 1988). Citrus triploid genotypes are generally seedless, a demanded characteristic for fresh fruit marketing (Aleza et al., 2012b, 2012a, 2016). However, a few seedy triploid lime varieties have been described (Curk et al., 2016). Triploid genotypes in citrus are routinely obtained by sexual hybridization, through unreduced female gametes (Cuenca et al., 2011, 2015b; Aleza et al., 2016), and interploid hybridizations between diploid and tetraploid genotypes (Starrantino and Recuperero, 1982; Grosser and Gmitter Jr, 2011; Aleza et al., 2012a, 2012b).

There are two extreme models for diploid gametes produced by tetraploid plants, i.e. disomic in allotetraploids and tetrasomic in autotetraploids (Stebbins, 1947; Stift et al., 2008; Sybenga, 2012). The fusion of the genomes of two species give rise to the allotetraploids, which present two sets of homologous chromosomes. During meiosis, each chromosome is paired with its homologous and forms only bivalents (Stebbins, 1947; Sybenga, 2012). This generates a 100% interspecific heterozygosity transmitted by each gamete, resulting in a disomic inheritance (Stift et al., 2008). In contrast, the four homologous chromosomes in the autotetraploids have the same opportunity to mate during meiosis, leading to multivalent formation and thus, tetrasomic inheritance (Jackson and Jackson, 1996; Sybenga, 1996; Aleza et al., 2016). For autotetraploids resulting from somatic chromosome doubling of diploid varieties, it theoretically leads to 66% restitution of the heterozygosity of the diploid that originates the tetraploid (Sanford, 1983; Aleza et al., 2016). In fact, allo- and autotetraploids are the extremes of the range. In cases where

parents are divergent but have retained enough homology to prevent exclusive preferential pairing, inheritance patterns intermediate between di- and tetrasomic can be expected (Stebbins, 1947; Sybenga, 1996; Stift et al., 2008; Jeridi et al., 2012). Intermediate inheritance patterns have been revealed in citrus allotetraploid somatic hybrids (Kamiri et al., 2011, 2018) and for the tetraploid 'Clemenules' clementine (Aleza et al., 2016). Stift et al. (2008) developed a likelihood-based approach to evaluate whether disomic, intermediate or tetrasomic inheritances best fitted the segregation of genetic markers and to estimate preferential pairing and double reduction (DR) rates. DRs can occur when tetravalent are formed and increase the homozygosity of diploid gametes (Sybenga, 1996; Ronfort et al., 1998; Stift et al., 2008; Aleza et al., 2016). A simplified likelihood method was proposed by Aleza et al. (2016) for tetraploid resulting from somatic chromosome doubling.

Molecular marker analysis indicate that cultivated citrus resulted from complex interspecific admixtures of four ancestral taxa: *C. reticulata* (mandarin), *C. maxima* (pummelo), *C. medica* (citron) and *C. micrantha* (papada) that arose during the domestication of citrus fruits (Nicolosi et al., 2000; Froelicher et al., 2011; Garcia-Lor et al., 2013a; Curk et al., 2016) and these results were confirmed by sequencing data (Xu et al., 2013b; Wu et al., 2014, 2018). Commonly, the tetraploid parents used in interploid hybridizations for triploid breeding results from somatic chromosome doubling occurring spontaneously in nucellar cells or induced by treatment using antimitotic agents such as colchicine and oryzaline (Aleza et al., 2009a, 2011). In relation with the phylogenetic origin of the parental diploid such somatic tetraploids can be autotetraploid for monospecific varieties, allotetraploids when parental diploid resulted from direct interspecific hybridization or segmental allotetraploid when parental diploid had a more complex admixture genome. These complex genomes may therefore impact the observed segregations in breeding programs.

Here, we analyze the segregation pattern of the tetraploid 'Moncada' mandarin used both as male and as female parent in interploid crosses by genotyping triploid progenies with Simple Sequence Repeat (SSR) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) molecular markers.

Diploid 'Moncada' mandarin was obtained from after 1980 in a breeding program held at Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) from a handmade pollination between 'Oroval' clementine (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) and 'Kara' mandarin (*C. unshiu* (Mak) Marc. x *C. nobilis* Lour.) (Bermejo et al., 2011). Later, tetraploid 'Moncada' mandarin was obtained by colchicine treatment of shoot-tips grafted *in vitro* (Aleza et al., 2009a). This mandarin hybrid is characterized by its excellent fruit quality, very easy to peel, very late maturity period and also is a non-apomictic genotype what makes a very interesting parent in citrus breeding programs based on sexual hybridizations aimed to recover large populations of triploid hybrids. The breeding implications of the use of the tetraploid 'Moncada' mandarin as male or female parent in the recovery of large populations of triploid hybrids are further discussed.

Materials and methods

Plant Material

Triploid hybrid progenies were obtained from 4x X 2x and 2x X 4x sexual hybridizations using tetraploid 'Moncada' mandarin as female and male parent, respectively. Tetraploid 'Moncada' mandarin was obtained directly from shoot tip grafting combined with colchicine treatment (Aleza et al., 2009a). In 4x X 2x sexual hybridization, 72 triploid hybrids were recovered using diploid 'Anana' mandarin (*C. reticulata*) as male parent (from here on referred as MA hybridization) whereas in the 2x X 4x sexual hybridization, 88 triploid hybrids were obtained with the non-apomictic diploid 'Clemenules' clementine female parent (from here on referred as CM hybridization). Ploidy level analysis by flow cytometry and triploid hybrids recovery were performed following the methodology described by Aleza et al. (2012a, 2012b).

Genotyping of the triploid progenies

To study the genetic structure of the diploid gametes produced by the tetraploid 'Moncada' mandarin, progenies along with the parents were genotyped using SSR and SNP markers distributed homogeneously in the nine linkage groups (LGs) of the clementine reference genetic map (Ollitrault et al., 2012a). These markers were heterozygous for 'Moncada' mandarin and displayed polymorphism between 'Moncada' mandarin and 'Clemenules' or 'Anana' mandarins. Since 'Moncada' is a direct hybrid between clementine and 'Kara' mandarin, it was difficult to find heterozygous markers for 'Moncada' mandarin with polymorphism with clementine. Finally, 24 SSRs and 19 SNPs markers previously developed were analyzed for both populations. In addition, 11 new SNP markers were developed (Table III.I) from a Genotyping by Sequencing (GBS) diversity analysis (unpublished data). Detailed information about SSR and SNP markers used in this study is given in Table III.II. Given the genetic proximity between the tetraploid 'Moncada' and clementines, the exact same set of molecular markers could not be used in both families (CM and MA). Even so, 13 molecular markers were used in common for both families, distributed in eight out of the nine LGs.

PCR amplifications using SSR markers were performed using a Thermocycler rep gradient S (Eppendorf®) in 15 µL containing 0.5 µl 1U/µl of Taq DNA polymerase (Fermentas®), 3 µL citrus DNA, 1.5 µl of 2 mM welled (Sigma®) dye-labeled forward primer, 1.5 µl of 2mM non-dye-labeled reverse primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 µl 10X PCR buffer, and 0.45 µl 50mM MgCl₂. The PCR protocol was as follows: denaturation at 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 50 or 55°C, and 30 s at 72°C; and a final elongation step of 8 min at 72°C. Capillary electrophoresis was carried out using a Genetic Analysis System 8000 (Beckman Coulter Inc.). The PCR products were initially denatured at 90°C for 2 min, loaded at 2 kV for 30 s, and separated at 6 kV for 35 min. Alleles were sized based on a DNA size standard (400 bp). GenomeLab™ v.10.0 (Beckman Coulter Inc.) genetic analysis software was used for data collection.

SNP markers were genotyped using KASPar™ technology by LGC Genomics (Hoddesdon, UK). The KASPar™ Genotyping System is a competitive, allele-specific dual Förster resonance energy transfer (FRET)-based assay for SNP genotyping. Primers were directly designed by LGC Genomics based on the SNP locus flanking sequence. Detailed explanation of the specific conditions and reagents used in the KASPar™ technique can be found in Cuppen (2007). The allelic doses estimation in the heterozygous triploid hybrids were performed as described by Cuenca et al. (2013).

Table III-I Primer sequences of the new SNP markers developed in this paper for use in KASPar™ assay.

Markers name	SNP-specific primer	Common primer
C1P26815936	Allele X: ATGATTGTCTCAGATACTGTTGAAGCT	AAAGCTGAGCTAGTTTCCCACTTTCATA
	Allele Y: ATGATTGTCTCAGATACTGTTGAAGCA	
C2_23768463	Allele X: CAAAGAACCCTCTTGCAGCGTG	CGTGCTTATACCTCTCCCATTGGTT
	Allele Y: CAAAGAACCCTCTTGCAGCGTC	
C3_11509117	Allele X: CAGAAGCCAAACCCACTTGATTTTC	AGTTTGCAGCTTTTGGGTGGGGAT
	Allele Y: CAGAAGCCAAACCCACTTGATTTTG	
C4P229604	Allele X: AGGATCTAATGCTATTGAGGACCTG	GTGCCCTTCAGGTTGATTAGAATTTGTTT
	Allele Y: AAGGATCTAATGCTATTGAGGACCTA	
C4P25377913	Allele X: AGTGTTTTACATAGTCCCTTTGGA	CACAAAAGGACCTGCAAATAGGAGTAAAA
	Allele Y: GTGTTTTACATAGTCCCTTTGGG	
C4P5278891	Allele X: GAATTACTGCAGCAACTTGAGAAGCA	ATAACGAGCTGTGCGTAGCCCATTA
	Allele Y: AATTACTGCAGCAACTTGAGAAGCG	
C6_15847634	Allele X: CGTTCAGGTGCACTGGCATTG	GCGAACGACTCAAGAATGCCTAGAA
	Allele Y: CCGTTCAGGTGCACTGGCATTT	
C6_310721	Allele X: GGATAATTTTCCCAAAAAAGAAAAGTACT	GGGTTTGCAGCCGCTTCGTCAA
	Allele Y: GATAATTTTCCCAAAAAAGAAAAGTACC	
C8P19129409	Allele X: CCCAAGCTACCTACAG	GTCTATTTAGTTTCAGGTGATAAAGCTGCTT
	Allele Y: CATGCTCCAAGCTACCTACAC	
C9_12216080	Allele X: CTGCTTGATTATGGTTGTGCAGAT	CGTTTCTCAGCAGCTTCTCAAAACATT
	Allele Y: CTGCTTGATTATGGTTGTGCAGAC	
C9P27534079	Allele X: GCAGCCACGAGTTCCGGC	CTCAAAGTTCACAGTTGGAAGCTTCATT
	Allele Y: GGCAGCCACGAGTTCCGGT	

Table III-II Information about molecular markers used for genotyping diploid gametes originated by tetraploid ‘Moncada’ mandarin as male and female parent, indicating accession number in Gene Bank or Phytosome, position in the reference clementine genetic map, noted alleles in ‘Moncada’ and reference.

Marker	Gene Bank/ Phytosome Accession	Male- Female parent	Marker type	Linkage Group	Genetic position (cM)	Distance to centromere (cM)	Alleles	Reference
mCrCIR02G08	FR692362	M / F	SSR	1	16.73	43.93	244-246	Ollitrault et al. (2012a)
CIBE5720	ET082224	M	SSR	1	57.76	2.9	329-337	Ollitrault et al. (2010)
CIC2810-01	ET103213	F	SNP	1	63.40	2.74	AC	Ollitrault et al. (2012b)
EMA-M30	JX630064	F	SNP	1	69.72	9.06	CT	García-Lor et al.(2013a)
CIC5950-02	ET083949	F	SNP	1	91.36	30.7	GA	Ollitrault et al. (2012b)
C1P26815936		M	SNP	1	117.56	56.9	TA	new
mCrCIR02D09	FR677569	M / F	SSR	2	13.37	43.53	236-238	Cuenca et al. (2011)
JK-CAC15	-	F	SSR	2	52.56	4.34	150-160	Kijas et al. (1997)
C2_23768463		M / F	SNP	2	81.04	24.14	GC	new
mCrCIR07D05	FR677574	M	SSR	2	90.41	33.51	185-189	Froelicher et al. (2008)
CIC3712-01	ET079481	F	SNP	2	93.92	37.02	CA	Ollitrault et al. (2012b)
JK-TAA41	-	M / F	SSR	2	160.74	103.84	154-163	Kijas et al. (1997)
MEST256	DY290355	F	SSR	3	17.02	73.58	209-225	García-Lor et al.(2012)
INVA-P855	JX630071	M	SNP	3	30.21	60.39	CT	García-Lor et al.(2013a)
CIC4681-02	ET109640	F	SNP	3	92.78	2.18	TA	Ollitrault et al. (2012b)
C3_11509117		M / F	SNP	3	89.58	1.02	CG	new
CX0124	CN187496	M	SSR	3	110.27	19.67	164-170	In preparation
ATMR-M728	JX630073	F	SNP	3	141.92	51.32	GT	García-Lor et al. (2013)
CHS-M183	JX630074	M	SNP	3	167.33	76.73	GC	García et al. (2013)
C4P229604		M	SNP	4	0.802	15.29	GA	new
MEST070	DY268779	F	SSR	4	4.23	11.87	217-229	In preparation
CHI-M598	JX630074	F	SNP	4	11.37	4.73	GC	García-Lor et al. (2013)
C4P5278891		M	SNP	4	18.45	2.35	AG	new
mCrCIR06A02	AM489738	F	SSR	4	62.42	46.32	222-225	Froelicher et al. (2008)
C4P25377913		M	SNP	4	88.72	72.62	AG	new
CIC0446-01	ET091387	F	SNP	4	77.78	61.68	AT	Ollitrault et al. (2012b)
CI03D12a		M / F	SSR	4	90.06	73.96	261-281	
MEST015	FC912829	M	SSR	5	16.21	6.89	174-186	García-Lor et al. (2012)
CM530	-	M	SSR	5	31.35	8.25	150-152	Ahmad et al. (2003)
MEST104	DY273697	F	SSR	5	34.95	11.85	236-238	García-Lor et al. (2012)
CIC5842-02	ET083106	F	SNP	5	71.8	48.7	AC	Ollitrault et al. (2012b)
mCrCIR07E12	AM489750	M	SSR	5	95.43	72.33	138-142	Froelicher et al (2008)
CIC2417-04	ET101382	F	SNP	5	103.36	80.26	TA	Ollitrault et al. (2012b)
C6_310721		M / F	SNP	6	0.32	5.88	TC	new
CIC2414-01	ET101372	F	SNP	6	8.11	1.91	AG	García-Lor et al. (2013)
C6_15847634		M	SNP	6	15.38	9.18	GT	new
LAPX-M238	JX630079	M / F	SNP	6	19.16	12.96	GC	García-Lor et al. (2013)
CI02F12	FR677570	F	SSR	6	60.84	54.64	122-130	Cuenca et al. (2011)
AOC-M290	JX630081	F	SNP	6	85.88	79.68	TC	García-Lor et al (2013)
MEST123	DY276100	M	SSR	6	91.87	85.67	252-260	Aleza et al. (2011)
MEST107	DY274062	F	SSR	7	8.89	87.51	176-184	Cuenca et al (2011)
FLS-M400	JX630083	M	SNP	7	45.99	50.41	CT	García-Lor et al. (2013)
mCrCIR03B07	FR677573	M / F	SSR	7	83.39	13.01	261-265	Cuenca et al (2011)
CI07C07	AJ567409	M / F	SSR	7	98.01	1.61	227-234	Froelicher et al (2008)
mCrCIR01F04a	AM489736	M / F	SSR	8	5.91	48.29	188-210	Froelicher et al (2008)
CIC1208-01	ET070547	F	SNP	8	33.17	21.03	AG	Ollitrault et al (2012)
mCrCIR07B05	AM489747	F	SSR	8	57.78	3.58	203-209	Froelicher et al (2008)
C8P19129409		M	SNP	8	77.07	22.87	CG	new
mCrCIR02C09	FR692359	F	SSR	8	95.32	41.12	248-255	Ollitrault et al. (2012b)
mCrCIR02A09	FR677568	M	SSR	8	98.18	43.98	152-162	Cuenca et al. (2011)
CIC5087-01	ET111514	F	SNP	9	15.88	36.32	TA	Ollitrault et al. (2012b)
C9_12216080		M / F	SNP	9	23.58	28.62	AG	new
mCrCIR07F11	FR677567	M / F	SSR	9	49.47	2.73	146-160	Kamiri et al. (2011)
C9P27534079		M	SNP	9	59.04	5.84	AG	new

SSR simple sequence repeat, SNP single nucleotide polymorphism, M male parent, F female parent

Data analysis*Inferring the diploid gamete genetic configuration*

In interploid crosses leading to triploid progenies, diploid gametes are transmitted from the tetraploid parent (Aleza et al., 2012a, 2012b). For loci with completely different parental allelic configurations ($A_1A_2 \times A_3A_4$), the genotype of the 2x gamete can be read directly from the configuration of triallelic triploid hybrids. When the female and male parents share one allele ($A_1A_2 \times A_2A_2$ or $A_1A_2 \times A_2A_3$), we inferred the structure of the 2x gamete forming biallelic triploid hybrids from the allelic dose, as described by Cuenca et al. (2011, 2013). We confirmed that all triploid hybrids were formed through the fusion of a diploid gamete from the tetraploid parent and a haploid gamete from the diploid parent by either observing triallelic configuration in the hybrids for at least one marker or from dosage estimation.

Parental Heterozygosity Restitution (PHR)

The PHR was calculated for each locus as the percentage of triploid individuals with the heterozygous allelic configuration inherited from tetraploid 'Moncada' mandarin transmitted through diploid gametes. Similarly, PHR was calculated for each individual as the percentage of loci with the same heterozygous allelic configuration as tetraploid 'Moncada' mandarin.

Estimation of preferential association frequency and maximum double reduction rate

For citrus, Stift et al. (2008) proposed a segregation model for allotetraploids, which was simplified by Aleza et al. (2016) for tetraploid resulting from somatic chromosome doubling. It is considered that in such tetraploid, for centromeric loci, the expected frequencies of each type of gamete depend only on the 'tetrasomic' parameter (τ), corresponding to the proportion of gametes formed by random associations of meiotic chromosomes (i.e., random bivalent or tetravalent pairing). The estimation of τ was performed using a maximum likelihood approach from the analysis of the marker closest to the centromere for each LG, as proposed by Aleza et al. (2016). This value ranges from 0 for completely disomic to 1 for complete tetrasomic inheritance. Confidence intervals (CIs) were estimated following a similar approach to the LOD drop-off method (Lander and Botstein, 1989), by finding the values at either side of the estimated τ that corresponded to a tenfold decrease in probability. Then, preferential pairing (PP) was calculated as $1 - \tau$.

The double reduction rate (DR) and its confidence interval (CI) for each LG were estimated as proposed by Aleza et al. (2016). Briefly, DR is estimated from τ values for each LG for the markers furthest from the centromere applying a maximum likelihood approach, and the CI corresponds to the values on each side with a tenfold decrease in the probability.

Population diversity organization

Genetic differences between individuals were estimated using the DARwin6 software (Perrier and Jacquemoud-Collet 2018) and analyzed with a Neighbor-Joining analysis using the simple matching dissimilarity index:

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

where d_{i-j} is the dissimilarity between units i and j , L is the number of *loci*, m_l is the number of matching alleles for *locus* l and π is the ploidy. From the dissimilarity matrix obtained, a weighted Neighbor-Joining tree (Saitou and Nei, 1987) was computed.

The potential distortion in allelic segregation was analyzed using Chi-square test (χ^2) with the Bonferroni correction for multiple testing applied (Bonferroni, 1936; Holm, 1979; Goeman and Solari, 2014).

For group differentiation between the analyzed triploid hybrids of each progeny, the G/N relation was used, where G is the number of groups differentiated by the molecular markers used within each LG, and N is the total number of genotypes. The groups were obtained with the DARwin6 software (Perrier and Jacquemoud-Collet 2018).

Result and discussion

Triploid genotyping

The genotyping of the triploid progenies was performed with 36 markers for MA and 31 for CM hybridizations, which allowed the unequivocal allelic differentiation between both parents and the determination of the origin of the diploid gametes that gave rise to each triploid hybrid.

Triallelic configurations with two alleles arising from tetraploid 'Moncada' were observed for all hybrids from MA for at least one SSR marker, directly confirming that the 2x gametes came from the tetraploid 'Moncada' progenitor. However, for CM hybrids, all molecular markers showed biallelic configurations, and the allele dosages were estimated as proposed by Cuenca et al., (2015b). Finally, all triploid hybrids in both families were confirmed to arise from the fusion of a diploid gamete from tetraploid 'Moncada' and a haploid gamete from the diploid genitor (Figure III.I). Once the origin of the 2x gametes was confirmed, their genetic configurations were inferred for all marker-gamete combinations (Supplementary Table III.I and III.II). An example for assessing genetic configuration from the direct observation of triallelic hybrids and the dosage estimation the peak ratio from a triallelic hybrid for the Cl01F04a SSR marker is given in Figure 1. In this case, tetraploid 'Moncada' shows 186/210 alleles (Figure III.Ia), and 'Anana' 199/201 alleles (Figure III.Ib). Hybrid 'MA14' shows 186/199/210 allele configuration (Figure III.Ic), thus allows directly inferring 186/210 configuration for the 2x gamete from tetraploid 'Moncada' (heterozygosity restitution). In contrast, the hybrid 'MA50' for the same marker shows 199/210 allelic configuration (Figure III.Id) and therefore, the allelic dose estimation was done considering the relationship between the alleles 199/210 of the triallelic triploid hybrid as a baseline. It was concluded a 199/210:210 genotype for 'MA50' and consequently 210/210 genotypes for the 2x gamete from tetraploid 'Moncada' (no heterozygosity restitution).

The potential distortion in allelic segregation for the two types of homozygous gametes was analyzed using Chi-square test (χ^2) with the Bonferroni correction for multiple testing applied. Only the marker MEST256 in LG3 for the MA population (Table III.III) and the markers CHS-M183, MEST123 and FLS-M400 in LG3, LG6 and LG7 respectively, for the CM population presented distortion in allele segregations (Table III.IV).

Other citrus studies showed segregation distortions. Bernet et al. (2010) analyzed reciprocal crosses between 'Fortune' mandarin and 'Chandler' pummelo, obtaining progenies with allelic frequencies distorted in both populations. In the same way, Ollitrault et al. (2012a) observed segregation distortions in male and female gametes of 'Clemenules' clementine. In both studies distortions were higher for the male gametes and the authors suggested that general factors like mechanisms of gamete abortion, pollen competition or gametophytic incompatibility could be related with them (Bernet et al., 2010; Ollitrault et al., 2012a).

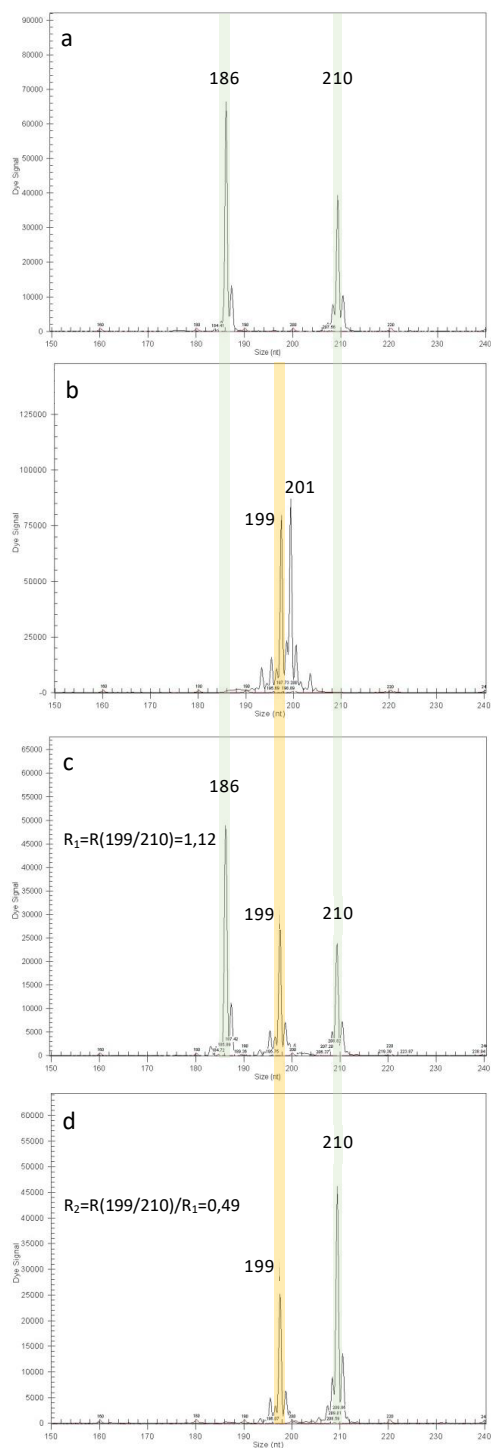


Figure III-I Electroferograms obtained using the CI01F04a SSR marker in: a) tetraploid 'Moncada', b) diploid 'Anana', c) triallelic triploid hybrid MA14, d) triploid hybrid MA50 with allelic dose correction using 199/210 ratio from MA14 as a baseline.

Table III-III Estimation of parental heterozygosity restitution (PHR) frequency by diploid 'Moncada' ovules for each marker in triploid hybrids obtained from MA population and analysis of Mendelian allelic segregation (Chi-square test).

Locus	LG	Location	PHR	Chi-square	P value
CI02G08	1	16.73	0.611	1.286	0.257
CIC2810-01	1	63.40	0.569	0.032	0.857
EMA-M30	1	69.72	0.569	0.032	0.857
CIC5950	1	91.36	0.556	0.500	0.480
Ci02D09	2	13.37	0.542	0.758	0.384
CAC15	2	52.56	0.694	0.182	0.670
C2_23768463	2	81.04	0.681	0.043	0.835
CIC3712-01	2	93.92	0.542	0.758	0.384
TAA41	2	160.74	0.542	6.818	0.009
MEST256	3	17.02	0.542	22.091	0.000
CIC4681-02	3	92.78	0.764	7.118	0.008
C3_11509117	3	89.58	0.681	3.522	0.061
ATMR-M728	3	141.92	0.625	6.259	0.012
MEST70	4	4.23	0.764	4.765	0.029
CHI-M598	4	11.37	0.833	0.000	1.000
CI06A02	4	62.42	0.764	0.529	0.467
CIC 0446-01	4	77.78	0.817	1.923	0.166
CI03D12a	4	90.06	0.792	0.067	0.796
MEST104	5	34.95	0.611	0.000	1.000
CiC5842-02	5	71.8	0.528	0.000	1.000
CiC2417-04	5	103.36	0.625	0.333	0.564
C6_310721	6	0.32	0.597	0.034	0.853
CICC2414-01	6	8.11	0.625	0.037	0.847
LAPX-M238	6	19.16	0.611	0.143	0.705
CI02F12	6	60.84	0.694	0.727	0.394
AOC-M290	6	85.88	0.653	1.000	0.317
MEST107	7	8.89	0.597	1.690	0.194
CI03B07	7	83.39	0.583	0.533	0.465
CI07C07	7	98.01	0.639	0.154	0.695
CI01F04a	8	5.91	0.764	0.059	0.808
CIC1208-01	8	33.17	0.792	0.067	0.796
CI07B05	8	57.78	0.75	0.000	1.000
CI02C09	8	95.32	0.653	0.360	0.549
CIC5087-01	9	15.88	0.556	1.125	0.289
C9_12216080	9	23.58	0.792	0.067	0.796
CI07F11	9	49.47	0.583	0.533	0.465

Table III-IV Estimation of parental heterozygosity restitution (PHR) frequency by diploid 'Moncada' pollen for each marker in triploid hybrids recovered from CM population and analysis of Mendelian allelic segregation (Chi-square test).

Locus	LG	Location	PHR	Chi-square	P value
CI02G08	1	16.73	0.614	2.941	0.086
CIBE5720	1	57.76	0.523	9.524	0.002
C1P26815936	1	117.56	0.636	0.500	0.480
CI02D09	2	13.37	0.557	0.231	0.631
C2_23768463	2	81.04	0.523	9.524	0.002
CI07D05	2	90.41	0.511	3.930	0.047
TAA41	2	160.74	0.432	0.080	0.777
INVAP855	3	30.21	0.648	1.581	0.209
C3_11509117	3	89.6	0.659	4.800	0.028
CX0124	3	110.27	0.500	0.818	0.366
CHSM183	3	167.33	0.466	11.255	0.001
C4P229604	4	0.80	0.750	1.636	0.201
C4P5278891	4	18.45	0.580	6.081	0.014
C4P25377913	4	88.72	0.568	6.737	0.009
Ci03D12a	4	90.06	0.557	7.410	0.006
MEST15	5	16.21	0.739	0.043	0.835
CMS30	5	31.35	0.500	1.455	0.228
CI07E12	5	95.43	0.534	5.488	0.019
C6_310721	6	0.30	0.705	0.154	0.695
C6_15847634	6	15.38	0.761	2.333	0.127
LAPXM238	6	19.16	0.667	0.034	0.853
MEST123	6	91.87	0.602	10.314	0.001
FLSM400	7	45.99	0.545	16.900	0.000
CI03B07	7	83.39	0.586	1.000	0.317
CI07C07	7	98.01	0.557	0.026	0.873
Ci01F04a	8	5.91	0.625	2.455	0.117
C8P19129409	8	77.07	0.568	8.526	0.004
Ci02A09	8	98.18	0.648	0.806	0.369
C9_12216080	9	23.58	0.724	0.000	1.000
CI07F11	9	49.47	0.602	2.314	0.128
C9P27534079	9	59.04	0.682	2.286	0.131

Genetic structure of diploid gamete populations arising from tetraploid ‘Moncada’ mandarin as female and male parent.

Variability of PHR

The PHR obtained from tetraploid ‘Moncada’ as male and female parent was calculated at gamete and marker level. At the gamete level, PHR presented a unimodal distribution when tetraploid ‘Moncada’ was used as female parent (Figure III.II), with a PHR average of 0.654 ± 0.093 . The unimodal distribution observed in tetraploid ‘Moncada’ as female parent was similarly observed for tetraploid ‘Clemenules’ clementine analyzed by Aleza et al. (2016). In contrast, a more heterogeneous distribution was observed when used as male parent, displaying 14 diploid gametes ('CM19', 'CM21', 'CM25', 'CM48', 'CM54', 'CM55', 'CM60', 'CM73', 'CM74', 'CM75', 'CM78', 'CM83', 'CM85' and 'CM86') with very low PHR values, ranging from 0.10 to 0.40. Therefore, the average of PHR was a little bit lower (0.599 ± 0.085) (Figure III.II). At marker level, both populations displayed a unimodal distribution of PHR although the diploid male gamete population showed lower PHR values, probably originated by the diploid male gametes with low PHR values (Figure III.III).

Figure III-II Distribution of PHR at the gamete level in the diploid gametes produced by tetraploid ‘Moncada’ mandarin used as female (red) or male parent (blue).

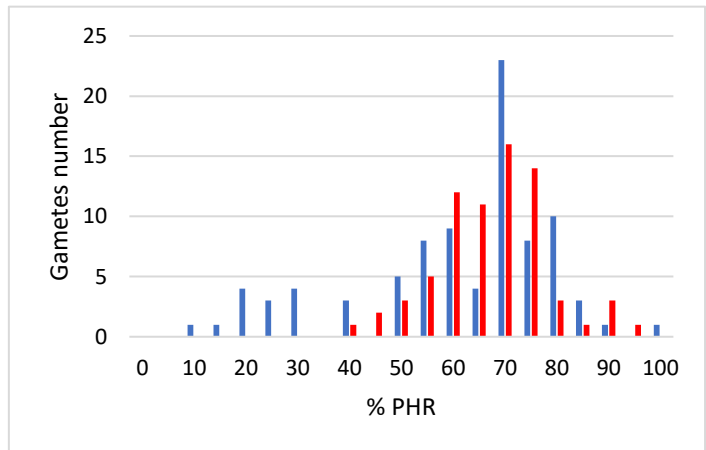
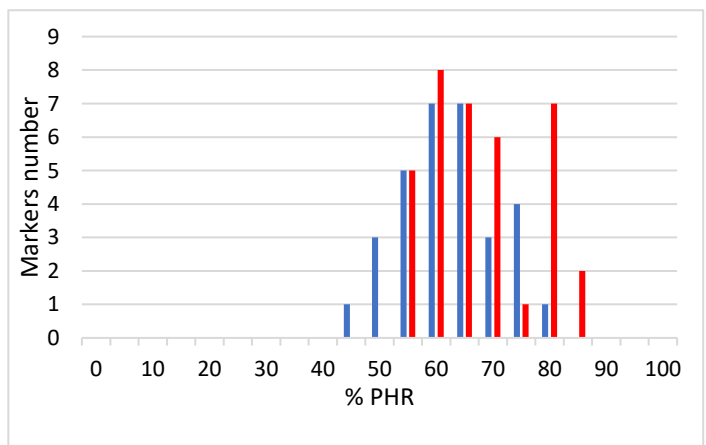


Figure III-III Distribution of PHR at the marker level in the diploid gametes originated by tetraploid ‘Moncada’ mandarin as female (red) and male parent (blue).



MA produced 2x gametes with PHR values ranging from 0.528 for the CIC5842-02 SNP locus in LG5 to 0.833 for the CHI-M598 SNP locus in LG4 (Table 3). For the remaining LGs, PHR values remain mostly constant along the chromosome. On the other hand, CM produced 2x gametes with PHR values ranging from 0.432 for the TAA41 SSR locus in LG2 to 0.761 for the C6_1584763 SNP locus in LG6 (Table III.IV).

Comparing tetraploid 'Moncada' as female and male parent, largest differences are found in LG 4 and 8. As female parent, PHR values were 0.794 ± 0.31 for LG4 and 0.74 ± 0.06 for LG 8; as male parent, PHR values were 0.614 ± 0.091 and 0.614 ± 0.041 for LG4 and 8 respectively (Table III.V).

Genotypic variability

The genetic structure of these two populations was calculated by a Neighbor-Joining analysis (Figure III.IV), allowing the differentiation of hybrid groups within each family and determine their genetic distance. The molecular markers used in this work made possible the differentiation of all triploid hybrids within each progeny ($G/N=1$) (Table 5). The average genetic distance between gametes was slightly higher for CM (0.308 ± 0.0029) than for MA (0.278 ± 0.0027). In addition, the genetic structure of the MA population gametes is more homogeneous and compact than that obtained for the CM population. Comparing the genetic distances of both population gametes in relation to the tetraploid 'Moncada', CM displayed a genetic distance of 0.200 ± 0.093 whereas for MA this distance was 0.173 ± 0.054 . The results found for tetraploid 'Moncada' as male and female parent are consistent with those described by Aleza et al. (2016), which found a genetic distance value to tetraploid 'Clemenules' clementine of 0.176 ± 0.012 for the population of triploid hybrids obtained with this genotype as female parent. Nevertheless, in the CM gamete population, a group with higher genetic distance to the tetraploid 'Moncada' (0.362 ± 0.043) was observed (Figure III.IV). This subpopulation is constituted by the same 14 diploid gametes described above with very low PHR. The genetic analysis performed in these hybrids reveals the same allele homozygosity configuration in nine (CIBE5720, C2_23768463, TAA41, CHSM183, C4P5278891, C4P25377913, Ci03D12a, Ci03B07 and C8P19129409) over the 31 molecular markers used, and also with two other SSR markers (MEST123 and Ci07D05) with the same homozygosity configuration except for only one diploid gamete. These molecular markers are located in all LGs, with the exception of LG9, and in the LG2 and LG6, three over the four markers analyzed in each LG, displayed the same allelic configuration in homozygosity.

Table III-V Estimation of the parental heterozygosity restitution for each LG, differentiated groups between genotypes analyzed and genetic distance in triploid populations arising from tetraploid 'Moncada' as male and female parent.

LG	Female gamete					LG	Male gamete				
	PHR	PHR SD	G/N	Av D	Av D CI		PHR	PHR SD	G/N	Av D	Av D CI
LG1	0.576	0.024	0.329	0.334	0.0087	LG1	0.591	0.060	0.213	0.3142	0.0059
LG2	0.600	0.080	0.548	0.313	0.0069	LG2	0.506	0.053	0.270	0.3632	0.0064
LG3	0.653	0.094	0.288	0.258	0.0065	LG3	0.568	0.099	0.270	0.3239	0.0058
LG4	0.794	0.031	0.288	0.182	0.0064	LG4	0.614	0.091	0.258	0.2966	0.0059
LG5	0.588	0.053	0.205	0.327	0.0087	LG5	0.591	0.129	0.236	0.3147	0.0060
LG6	0.636	0.039	0.301	0.297	0.0087	LG6	0.684	0.067	0.101	0.2601	0.0058
LG7	0.606	0.029	0.233	0.315	0.0084	LG7	0.563	0.021	0.213	0.3282	0.0066
LG8	0.740	0.060	0.329	0.225	0.0069	LG8	0.614	0.041	0.225	0.3029	0.0064
LG9	0.644	0.129	0.219	0.287	0.0074	LG9	0.669	0.062	0.112	0.2718	0.0059
TOTAL	0.654	0.093	1.000	0.278	0.0027	TOTAL	0.599	0.085	1.000	0.3086	0.0029

LG: Linkage group, PHR: Parental Heterozygosity Restitution, PHR SD: Standard deviation of the Parental Heterozygosity Restitution, G/N: number of genotypes on the total identified, Av D: Weighted average of the genetic distance, Av D CI: Confidence interval with $\alpha=0.05$ of genetic distance.

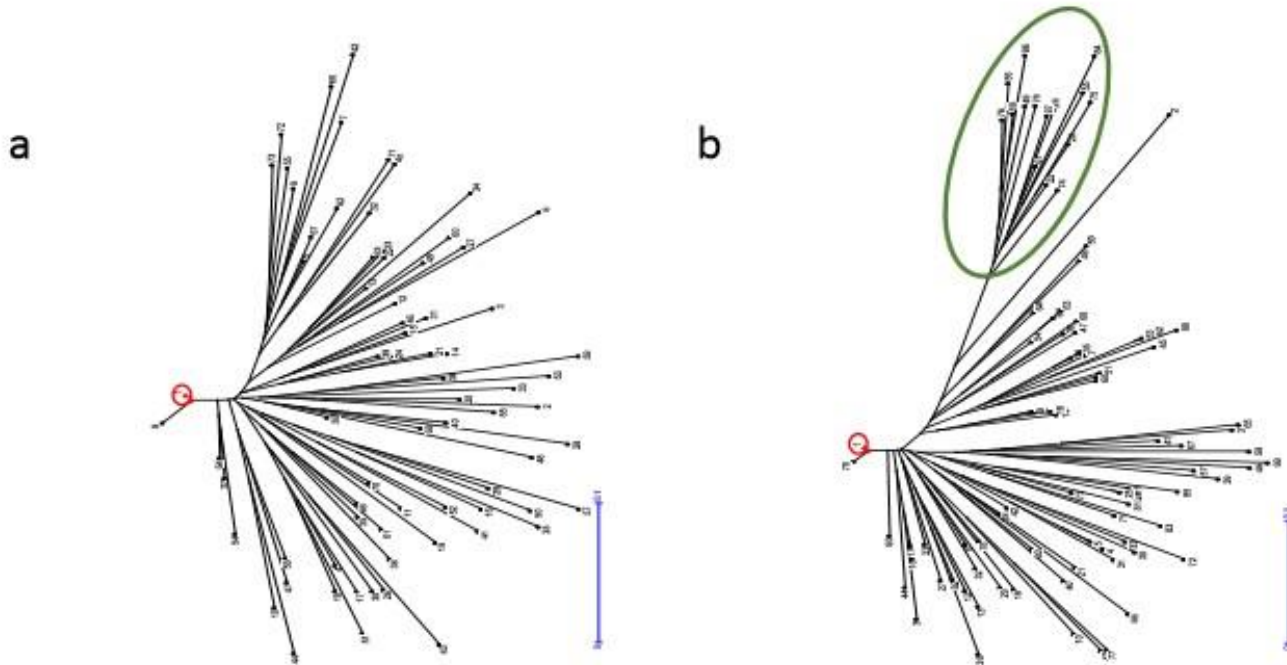


Figure III-IV Dendrograms corresponding to the genetic analysis performed with SSR and SNP markers obtained by calculating the Simple Matching Dissimilarity Index and construction of the tree by Weighted Neighbor-Joining of two populations of triploid hybrids regenerated from crosses **a)** tetraploid 'Moncada' x 'Anana' and **b)** 'Clemenules' x tetraploid 'Moncada'. The red circle highlights the position of tetraploid 'Moncada'. The green circle highlights the group of hybrids furthest from tetraploid 'Moncada'.

Preferential pairing (PP) and maximum double reduction (DR)

The genome of many cultivated citrus is composed of mosaics of the ancestral species (Curk et al., 2014, 2015, Wu et al., 2014, 2018). The works carried out on citrus phylogeny (Wu et al., 2014, 2018; Oueslati et al., 2017) have shown that the genomes of the progenitors that gave rise to 'Moncada' mandarin ('Oroval' clementine (*C. deliciosa* X *C. sinensis*) and 'Kara' mandarin (*C. unshiu* X *C. nobilis*) are constituted by an interspecific mandarin/pummelo mosaic structure; therefore, 'Moncada' mandarin also has an interspecific structure in its chromosomes.

τ and PP were calculated for each LG from the segregation data of the markers closest to the centromere using the probability models (Aleza et al., 2016). These markers were located between 1.0 and 24.1 cM from the centromere. For tetraploid 'Moncada' as female parent (Table III.VI), complete tetrasomic inheritance was the best model for seven out of the nine LGs (LG1, LG2, LG3, LG5, LG6, LG7 and LG9). For LG8, an intermediate inheritance with tendency towards a tetrasomic inheritance (PP=0.375) was estimated, while the LG4 evidenced a clear intermediate inheritance (PP=0.5). For tetraploid 'Moncada' as male parent (Table III.VII), most of the chromosomes fit the tetrasomic inheritance model with the markers used, with PP=0 for LG1, LG2, LG3, LG4, LG7, LG8 and LG9, while LG5 and LG6 showed values that fit an intermediate inheritance model with tetrasomic tendency (PP=0.215 and 0.115, respectively).

Likewise, clementines also present an interspecific mandarin/pummelo structure (Wu et al., 2018) Aleza et al. (2016) studied the segregation model in tetraploid 'Clemenules' clementine as female parent, obtaining very similar results as we report for the tetraploid 'Moncada' mandarin, generally fitting the tetrasomic inheritance model except for LG4, which fitted the intermediate inheritance model. However, they also reported that the LG6 and LG8 showed values that fit the intermediate inheritance model, with high tetrasomic tendency. Comparatively, we found that for 'Moncada' mandarin as female parent, the LG6 shows tetrasomic segregation, while results for the LG8 agree with the after as was reported for the tetraploid 'Clemenules' clementine, but with higher PP value. Subsequently, Rouiss et al. (2018) analyzed the segregation model of the tetraploid 'Mexican' lime (*C. aurantiifolia*), which originated from an interspecific hybridization between *C. micrantha* (papeda) and *C. medica* (Citron) (Curk et al. 2016; Nicolosi et al. 2000; Wu et al. 2018). The results showed that tetraploid 'Mexican' lime has intermediary inheritance with a preferential disomic trend. In addition, Kamiri et al. (2018) assessed the meiotic behavior of an intergeneric tetraploid somatic hybrid resulting from symmetric protoplast fusion of diploid *C. reticulata* and diploid *Poncirus trifoliata* and observed an intermediate inheritance with a preferential disomic trend. On the other hand, the genotyping of the triploid progeny derived from a cross between diploid pummelo (*C. maxima*) and an allotetraploid intergeneric somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon* showed a tetrasomic and intermediate inheritance for this citrus interspecific somatic hybrid (Kamiri

et al., 2011). Altogether, these studies reveal that the preferential pairing of tetraploid citrus genotypes greatly varies in relation to their constitutive genomes. The differentiation between *C. medica* and *C. micrantha* as well as the one between *C. reticulata* and *P. trifoliata* seems to have a much more impact in preferential pairing than the one between *C. maxima* and *C. reticulata*. Tetraploid 'Moncada' differs slightly in the segregation model when used as female or male parent. These sex-specific differences were also observed for salmon fish (Allendorf and Danzmann; 1997). Disomic segregation was observed in females, while segregation in males were best explained by a mixture of disomic and tetrasomic inheritance.

The tetraploid 'Moncada' as female parent showed significant values of DR in LG2, LG3, LG4, LG7 and LG9. For all LGs, the confidence intervals (CI) for DR values include the value of 1/6, considered as the maximum value of DR for tetrasomic segregation and one crossover event occurring between the marker and the corresponding centromere (Haynes and Douches, 1993; Mather, 1936; Bourke et al. 2015), although LGs 2 and 3 displayed a higher estimation of DR. When tetraploid 'Moncada' was used as male parent, significant values of DR were obtained for LG2, LG3, LG4, LG5, LG6 and LG7. For LG3, LG4, LG6 and LG7, the confidence intervals (CI) for DR values include the maximum value of DR under the hypothesis described above. In addition, LG2 and LG5 showed higher DR values. Tetraploid 'Moncada' shows the same trend as female and male parent in DR values for LG1, LG2, LG3, LG4, LG7 and LG8. The frequency of DR considers maximum values of 0 for random chromosome segregation hypothesis, 1/7 with pure random chromatid segregation hypothesis, and 1/6 with complete equational segregation (Muller, 1914; Mather, 1935). Estimated values over 1/6 should be due to the segregation distortion observed for the corresponding markers. Indeed our model analysis is based on Mendelian segregation hypothesis while negative sporophytic selection for dominant gene may induce a diminution of heterozygous frequencies (for the gene and linked markers) and results in overestimation of DR. Different works have been performed with the objective to estimate the DR frequency and these values have been ranged from 0 to almost 0.30 (Fisher, 1947, 1950; Welch et al., 1960; Tai, 1982a, 1982b; Haynes and Douches, 1993; Wu et al., 2001). The values of DR rate can differ between loci according the tetrasomic inheritance model. This variability depends on both the chromosome in which the marker is located and the position of the marker within the chromosome. There are chromosomes with a greater tendency to form multivalent, that would originate higher values of DR (Butruille and Boiteux, 2000). In addition, DR could be better estimated using larger populations (Butruille and Boiteux, 2000) and it is more probable to occur in markers located in telomeric rather than in centromeric regions, in which the probability of recombination events is close to zero (Welch et al., 1960; Butruille and Boiteux, 2000; Aleza et al., 2015a). In addition, Butruille and Boiteux (2000) indicated that DR causes a decrease of the equilibrium frequencies of deleterious alleles, and it has much more influence on genes subjected to gametophytic selection than on genes solely

under sporophytic selection. With gametophytic selection, low frequencies of DR are enough to reduce equilibrium frequencies several-fold.

Table III-VI Estimation of Preferential Pairing (PP) and Double Reduction (DR) rate for tetraploid ‘Moncada’ mandarin as female parent for markers located close and far from the centromere within each of the nine LGs.

LG	Locus	DC (cM)	A ₁ A ₁	A ₁ A ₂	A ₂ A ₂	τ	CI	PP	CI	DR	CI
1	CIC2810-01	2.7	16	41	15	1	1-0.845	0	0-0.165		
1	CI02G08	43.9	<i>11</i>	<i>44</i>	<i>17</i>			0		0.083	0-0.273
2	CAC15	4.3	10	50	12	0.915	1-0.595	0.085	0-0.195		
2	TAA41	103.8	24	39	9			0.085		0.251	0.05-0.458
3	C3_11509117	1.0	16	49	7	0.960	1-0.815	0.040	0-0.185		
3	MEST256	73.6	<i>30</i>	<i>39</i>	<i>3</i>			0.040		0.216	0.025-0.413
4	CHI-M598	4.7	6	60	6	0.500	0.790 - 0.260	0.500	0.180-0.740		
4	CI03D12a	74.0	<i>8</i>	<i>57</i>	<i>7</i>			0.500		0.125	0-0.467
5	MEST104	11.9	14	44	14	1	1-0.785	0	0-0.215		
5	CI2417-04	80.3	<i>12</i>	<i>45</i>	<i>15</i>			0		0.063	0-0.251
6	CIC2414-01	1.9	13	45	14	1	1-0.805	0	0-0.195		
6	AOC-M290	79.7	<i>10</i>	<i>47</i>	<i>15</i>			0		0.021	0-0.208
7	CI07C07	1.6	14	46	12	1	1-0.735	0	0-0.265		
7	MEST107	87.5	<i>11</i>	<i>43</i>	<i>18</i>			0		0.104	0-0.293
8	CIC1208-01	3.6	7	57	8	0.625	0.965-0.355	0.375	0.035-0.645		
8	CI01F04a	48.3	<i>8</i>	<i>55</i>	<i>9</i>			0.375		0.067	0-0.347
9	CI07F11	2.7	13	42	17	1	1-0.820	0	0-0.180		
9	CIC5087-01	36.3	<i>13</i>	<i>40</i>	<i>19</i>			0		0.167	0-0.356

LG Linkage group, **DC** Distance to the centromere in cM [derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a) and location of centromere (Aleza et al., 2015a)], **A₁A₁** Number of individuals with that allelic configuration, **τ** Tetrasomic rate, **CI** Confidence interval, **PP** Preferential pairing, **DR** Double reduction rate. Allelic configurations for the loci used to estimate DR have been highlighted in italics.

Table III-VII Estimation of Preferential Pairing (PP) and Double Reduction (DR) rate for tetraploid ‘Moncada’ mandarin as male parent for markers located close and far from the centromere within each of the nine LGs.

LG	Locus	DC (cM)	A ₁ A ₁	A ₁ A ₂	A ₂ A ₂	τ	CI	PP	CI	DR	CI
1	CIBE5720	2.9	11	46	31	1	1-0.895	0	0-0.105		
1	C1P26815936	56.9	<i>1</i>	<i>56</i>	<i>18</i>			0		0.045	0-0.216
2	C2_23768463	24.1	11	46	31	1	1-0.895	0	0-0.105		
2	TAA41	103.8	26	38	24			0		0.352	0.181-0.518
3	C3_11509117	1.0	21	58	9	1	1-0.715	0	0-0.285		
3	CHSM183	167.3	<i>12</i>	<i>41</i>	<i>35</i>			0		0.301	0.130-0.468
4	C4P5278891	2.4	11	51	26	1	1-0.850	0	0-0.150		
4	CI03D12a	74.0	28	49	11			0		0.165	0-0.336
5	MEST15	6.9	12	65	11	0.785	1-0.510	0.215	0-0.490		
5	CI07E12	72.3	13	47	28			0.215		0.390	0.174-0.608
6	C6_310721	5.9	14	62	12	0.885	0.96-0.815	0.115	0.04-0.185		
6	MEST123	85.7	27	53	8			0.115		0.174	0-0.368
7	CI07C07	1.6	19	49	20	1	1-0.870	0	0-0.130		
7	FLSM400	50.4	33	48	7			0		0.182	0.015-0.353
1	CIBE5720	2.9	11	46	31	1	1-0.895	0	0-0.105		
1	C1P26815936	56.9	<i>1</i>	<i>56</i>	<i>18</i>			0		0.045	0-0.216
2	C2_23768463	24.1	11	46	31	1	1-0.895	0	0-0.105		
2	TAA41	103.8	26	38	24			0		0.352	0.181-0.518

LG Linkage group, **DC** Distance to the centromere in cM [derived from reference genetic map data (Ollitrault et al., 2012a) and location of centromere (Aleza et al., 2015a)], **A₁A₁** Number of individuals with that allelic configuration, **τ** Tetrasomic rate, **CI** Confidence interval, **PP** Preferential pairing, **DR** Double reduction rate. Allelic configurations for the loci used to estimate DR have been highlighted in italics

Implications for citrus breeding programs

Two strategies are routinely exploited for obtaining citrus triploids, i.e. interploid hybridizations between 2x and 4x parents (Aleza et al., 2012a, 2012b; Starrantino and Recupero, 1982) and through female 2n gametes (Aleza et al., 2010b; Cuenca et al., 2011, 2015b). In interploid hybridizations, the tetraploid parent results usually from somatic chromosome doubling arising spontaneously in nucellar cells or induced by colchicine treatment. The study of the origin of the diploid gametes, which greatly influences the structure of the resulting triploid hybrid populations, is of great interest in order to select the most appropriate strategies to obtain new hybrids with desired characteristics. Cuenca et al. (2015b) demonstrated that SDR mechanism gives rise to the 2n megagametophytes in diploid 'Moncada' mandarin. The use of this strategy produces hybrid progenies with large genetic variation, due to the relatively low transmission of the parental heterozygosity to the offspring (about 40% on average), thus resulting in high number of new allelic multilocus combinations. In this paper, we have analyzed the chromosome segregation in the tetraploid 'Moncada' mandarin, which showed predominantly tetrasomic segregation, when used both as female and male parent, with an average PHR of 65% when used as female and 60% as male parent. Moreover, PHR is relatively constant along the chromosomes. Therefore, if we compared with SDR-2n female gametes, interploid hybridizations with tetraploid 'Moncada' mandarin as tetraploid parent is potentially a more efficient strategy for the development of new varieties that are genotypically more similar to the 'Moncada' mandarin.

Furthermore, depending on the LG in which a gene controlling an eventual trait of interest is located, the genetic regulation of the trait and the direction of the crossing, different segregation in the offspring can be obtained. For example, the PHR in LG8 is higher when tetraploid 'Moncada' is used as female than as male parent and, therefore, the progeny will show higher heterogeneity in this LG when using tetraploid 'Moncada' as male parent. Considering a trait of interest controlled by a single dominant allele at a locus in LG8, the probability to obtain triploid hybrids that inherit the trait of interest is higher using tetraploid 'Moncada' as female parent.

Tetraploid 'Moncada' mandarin displayed significant values of DR as male and female parent. DR results in a decrease of PHR and thus an increase of inbreeding (Haynes and Douches 1993). The production of higher levels of homozygosity could be useful in triploid mandarin breeding for the potential cleaning effect that DR can have by revealing deleterious alleles to selection (Butruille and Boiteux 2000; Bourke et al. 2015). DR also could increase the accumulation of rare but favorable allelic configurations through selection with molecular markers (Bourke et al. 2015).

The knowledge of the difference in segregations according to the crossing strategy (2n gametes or interploid hybridization) to obtain hybrid triploid progenies with the 'Moncada' mandarin opens a range of possibilities for designing efficient breeding programs aimed to obtain innovative products to fulfill the market demands.

Conclusions

The analysis of codominant marker segregation over the nine citrus chromosomes allowed to unravel the segregation pattern of the tetraploid 'Moncada'. Used both as female and male parent it displayed tetrasomic inheritance for most LGs, with slight variations according to the direction of the crossing. As female parent, LG8 showed intermediate inheritance with tendency towards tetrasomic inheritance, and LG4 evidenced clear intermediate inheritance. As male parent, LG5 and LG6 showed values that fit an intermediate inheritance model with tetrasomic tendency. Significant DR rates were found in LG2, LG3, LG4, LG7 and LG9 when using tetraploid Moncada as female parent and in LG2, LG3, LG4, LG5, LG6 and LG7 as male parent. Likewise, differences in PHR were found between tetraploid 'Moncada' as female parent and male parent, with higher values in LG 4 and LG 8 as female parent. The new knowledge generated here will serve to define crossing strategies in citrus improvement programs to efficiently obtain new varieties of interest in the global fresh consumption market.

Supplementary information

Supplementary Table III.I Genetic configuration of diploid gametes produced by tetraploid 'Moncada' mandarin used as male parent

LG1						
Centromere position	60.7					
Locus	CI02G08		CIB5720		C1P26815936	
Location	16.7		57.8		117.6	
Genotype	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
Monc		244-246		329-337		TA
Clem	244-248		325-337		TT	
CM01	244	244-244	337	329-337	T	TA
CM02	248	244-246	325	329-329	T	AA
CM03	244	244-244	337	337-337	T	TA
CM04	244	244-244	337	337-337	T	TA
CM05	248	244-246	325	329-337	T	TA
CM06	248	244-246	337	337-337	T	TT
CM07	248	244-246	325	329-337	T	TA
CM08	248	244-246	325	329-337	T	TA
CM09	244	244-246	337	337-337	T	TT
CM10	248	244-246	325	329-337	T	TT
CM11	244	244-246	325	329-337	T	TA
CM12	248	244-246	325	329-337	T	TT
CM13	248	244-246	337	329-337	T	TA
CM14	248	244-246	337	329-337	T	TA
CM15	244	244-246	337	329-329	T	AA
CM16	244	244-246	337	329-329	T	AA
CM17	248	244-244	325	329-337	T	TA
CM18	248	244-246	325	337-337	T	TT
CM19	248	244-246	337	337-337	T	TT
CM20	248	244-244	337	329-337	T	TA
CM21	244	244-246	337	337-337	T	TT
CM22	244	244-246	337	337-337	T	AA
CM23	248	246-246	337	329-337	T	TA
CM24	248	246-246	337	329-337	T	TA
CM25	244	244-244	337	337-337	T	TA
CM26	244	244-246	337	329-337	T	TA
CM27	244	244-246	337	329-337	T	TA
CM28	248	244-244	325	329-337	T	TA
CM29	248	244-246	337	337-337	T	TA
CM30	248	244-244	337	337-337	T	TT
CM31	248	244-246	337	329-337	T	TA
CM32	244	244-246	337	329-337	T	TA
CM33	244	244-244	325	337-337	T	TA
CM34	244	244-244	325	337-337	T	TA
CM35	248	244-244	325	329-337	T	TA
CM36	248	244-246	337	329-329	T	AA
CM37	248	244-246	325	329-337	T	TA
CM38	244	246-246	325	329-337	T	TA
CM39	248	244-246	337	329-329	T	TA
CM40	248	244-244	325	329-329	T	AA
CM41	244	244-246	337	329-337	T	AA

Supplementary Table III.I Continued (LG1)

Locus	CI02G08		CIBE5720		C1P26815936	
Location	16.7		57.8		117.6	
Genotype	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
CM42	244	244-244	337	329-337	T	TA
CM43	244	246-246	337	329-337	T	AA
CM44	248	244-244	325	337-337	T	TT
CM45	244	244-246	325	329-329	T	AA
CM46	248	244-246	325	329-337	T	TA
CM47	248	244-246	325	329-337	T	TA
CM48	244	244-246	337	337-337	T	AA
CM49	248	246-246	337	329-337	T	TA
CM50	244	244-246	325	329-337	T	TA
CM51	244	244-244	337	329-337	T	TA
CM52	244	244-244	337	329-337	T	TA
CM53	244	244-246	337	329-337	T	TA
CM54	244	244-244	337	337-337	T	TA
CM55	248	244-246	325	337-337	T	TT
CM56	244	246-246	337	329-337	T	AA
CM57	248	244-246	337	329-329	T	AA
CM58	244	244-246	337	337-337	T	TT
CM59	244	244-246	337	329-337	T	TT
CM60	244	244-246	337	337-337	T	TA
CM61	248	244-244	325	337-337	T	TA
CM62	248	244-244	325	337-337	T	TA
CM63	244	244-246	337	329-337	T	TA
CM64	244	246-246	325	329-329	T	TA
CM65	244	244-246	337	329-337	T	TA
CM66	244	244-246	337	329-329	T	TA
CM67	244	244-246	337	329-337	T	TA
CM68	248	246-246	337	329-329	T	AA
CM69	244	244-246	337	329-337	T	TA
CM70	244	244-246	325	329-337	T	TA
CM71	248	244-246	325	329-337	T	AA
CM72	244	244-246	325	329-337	T	TA
CM73	248	244-244	325	337-337	T	AA
CM74	248	246-246	325	337-337	T	TA
CM75	244	244-246	337	337-337	T	TT
CM76	248	244-246	337	329-337	T	TA
CM77	244	244-246	337	337-337	T	AA
CM78	244	244-246	337	337-337	T	AA
CM79	248	244-246	325	329-337	T	TA
CM80	248	246-246	337	329-337	T	TA
CM81	244	244-246	325	329-337	T	TA
CM82	248	244-246	325	337-337	T	TT
CM83	244	244-246	337	337-337	T	AA
CM84	244	246-246	325	329-337	T	TA
CM85	244	244-244	337	337-337	T	TA
CM86	244	246-246	325	337-337	T	TA
CM87	244	244-244	337	329-337	T	TA
CM88	248	244-246	325	337-337	T	TA

Supplementary Table III.I Continued (LG2)

LG2								
Centromere position	56.9							
Locus	CI02D09		C2_23768463		CI07D05		TAA41	
Location	13.4		81.0		90.4		160.7	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
Moncada	236-238		GC		185-189		154-163	
Clemenules	230-238		GG		187-189		147-154	
CM01	230	236-236	G	GG	187	185-185	154	163-163
CM02	230	236-238	G	GC	187	185-185	154	154-163
CM03	230	236-238	G	GC	187	185-189	147	154-163
CM04	230	236-238	G	GC	187	185-189	147	154-163
CM05	238	236-238	G	GC	189	185-189	147	154-163
CM06	238	236-238	G	GG	189	185-189	154	154-163
CM07	238	236-238	G	GC	189	185-189	154	163-163
CM08	238	236-238	G	GC	189	185-189	154	163-163
CM09	230	238-238	G	GG	189	189-189	147	154-163
CM10	230	236-238	G	GC	187	185-189	147	154-163
CM11	230	236-236	G	CC	189	185-185	154	163-163
CM12	238	238-238	G	CC	189	185-185	147	154-163
CM13	230	236-236	G	GC	189	185-185	147	154-163
CM14	238	236-238	G	GC	189	185-189	154	154-163
CM15	230	238-238	G	GC	187	185-189	147	154-163
CM16	230	238-238	G	GC	187	185-189	147	154-163
CM17	230	236-238	G	GC	187	185-189	154	163-163
CM18	238	238-238	G	GC	189	185-189	147	154-163
CM19	230	236-236	G	GG	189	189-189	147	154-154
CM20	238	236-238	G	GG	187	189-189	154	154-154
CM21	230	236-238	G	GG	187	189-189	147	154-154
CM22	238	236-238	G	GC	189	185-185	154	163-163
CM23	238	236-238	G	GC	187	185-189	154	163-163
CM24	238	236-238	G	GC	187	185-189	154	154-163
CM25	230	238-238	G	GG	187	189-189	147	154-154
CM26	238	236-238	G	CC	187	189-189	147	163-163
CM27	230	236-238	G	GG	189	189-189	154	154-154
CM28	238	238-238	G	GG	189	189-189	147	154-163
CM29	230	238-238	G	CC	187	185-185	147	163-163
CM30	230	236-238	G	GC	187	185-189	147	154-163
CM31	230	236-238	G	GC	187	185-189	154	154-163
CM32	238	236-238	G	GC	189	185-189	147	154-154
CM33	238	236-238	G	GC	187	185-189	147	154-163
CM34	238	236-238	G	GC	187	185-189	147	154-163
CM35	230	236-236	G	CC	187	185-185	154	163-163
CM36	238	238-238	G	GG	189	185-189	154	163-163
CM37	238	236-238	G	GC	189	185-189	154	163-163
CM38	230	236-236	G	GC	187	185-189	147	154-163
CM39	238	236-238	G	GC	189	185-189	154	163-163
CM40	230	236-238	G	GG	187	189-189	154	154-163

Supplementary Table III.I Continued (LG2)

Locus	C102D09		C2_23768463		C107D05		TAA41	
Location	13.4		81.0		90.4		160.7	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
CM41	238	236-238	G	GC	189	185-189	147	163-163
CM42	238	236-238	G	GG	189	189-189	154	154-154
CM43	238	236-236	G	GC	187	185-189	147	154-154
CM44	238	236-238	G	GC	187	185-189	154	154-163
CM45	238	238-238	G	GG	187	185-189	147	154-163
CM46	238	236-238	G	CC	189	185-185	147	154-163
CM47	238	236-238	G	GC	189	185-189	147	154-163
CM48	230	238-238	G	GG	187	185-185	147	154-154
CM49	238	236-238	G	GC	189	185-189	154	163-163
CM50	230	236-238	G	GC	189	185-189	147	154-163
CM51	230	236-238	G	GC	187	189-189	154	154-163
CM52	230	236-238	G	GC	187	189-189	154	154-163
CM53	238	236-238	G	CC	189	185-185	154	154-163
CM54	230	236-236	G	GG	189	189-189	154	154-154
CM55	230	236-238	G	GG	189	189-189	154	154-154
CM56	230	236-238	G	GC	187	185-189	154	163-163
CM57	238	236-238	G	GC	189	185-189	154	154-154
CM58	230	236-238	G	GC	189	185-189	154	163-163
CM59	230	236-238	G	GC	189	185-189	147	154-163
CM60	230	236-238	G	GG	187	189-189	147	154-154
CM61	238	236-238	G	CC	189	185-185	154	163-163
CM62	238	236-238	G	CC	189	185-185	154	154-163
CM63	238	238-238	G	GC	189	185-189	147	154-163
CM64	238	238-238	G	GG	187	189-189	154	163-163
CM65	230	236-238	G	GG	187	189-189	154	163-163
CM66	238	236-236	G	GG	189	189-189	154	154-154
CM67	238	236-238	G	GC	187	185-189	147	154-163
CM68	230	236-236	G	GC	187	185-189	154	154-163
CM69	238	236-236	G	GC	189	185-189	154	154-163
CM70	230	236-236	G	GC	187	185-189	154	163-163
CM71	238	236-236	G	CC	189	185-189	147	154-154
CM72	230	238-238	G	GC	187	185-189	154	163-163
CM73	230	236-238	G	GG	187	189-189	147	154-154
CM74	238	236-236	G	GG	187	189-189	147	154-154
CM75	230	236-236	G	GG	187	189-189	147	154-154
CM76	230	238-238	G	GG	189	189-189	147	154-154
CM77	230	238-238	G	GC	187	185-189	147	154-154
CM78	230	236-236	G	GG	187	189-189	147	154-154
CM79	238	236-238	G	GG	189	189-189	147	163-163
CM80	238	238-238	G	GG	189	185-189	147	154-163
CM81	230	238-238	G	CC	187	185-185	147	163-163
CM82	230	236-236	G	GC	189	185-189	147	163-163
CM83	230	236-236	G	GG	187	189-189	147	154-154
CM84	238	236-238	G	GC	189	185-185	154	154-163
CM85	230	236-236	G	GG	187	189-189	147	154-154

Supplementary Table III. IContinued (LG2)

Locus	CI02D09		C2_23768463		CI07D05		TAA41	
Location	13.4		81.0		90.4		160.7	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	
CM86	230	236-236	G	GG	189	189-189	147	154-154
CM87	238	236-236	G	GC	189	185-189	147	154-163
CM88	230	236-236	G	GG	187	189-189	147	154-154

Clem diploid 'Clemenules' mandarin, **Monc** tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.I Continued (LG3)

LG3								
Centromere Position	90.6							
Locus	INVA-P855		C3_15509117		CX0124		CHS-M183	
Location	30.2		89.6		110.3		167.3	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
Moncada		CT		CG		164-170		GC
Clemenules	TT		CC		161-170		CC	
CM01	T	CT	C	CC	161	170-170	C	CC
CM02	T	CT	C	CG	161	164-164	C	GG
CM03	T	TT	C	CC	161	164-164	C	GG
CM04	T	TT	C	CC	170	164-170	C	GG
CM05	T	CT	C	CG	170	164-170	C	CC
CM06	T	CT	C	CG	161	170-170	C	GC
CM07	T	TT	C	CC	161	170-170	C	GC
CM08	T	TT	C	CC	161	170-170	C	GC
CM09	T	CC	C	CG	170	164-170	C	CC
CM10	T	CT	C	CG	170	170-170	C	GC
CM11	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GG
CM12	T	TT	C	CC	161	164-170	C	GC
CM13	T	CT	C	CG	170	170-170	C	CC
CM14	T	TT	C	CC	161	170-170	C	GC
CM15	T	CT	C	CG	170	164-170	C	GC
CM16	T	CT	C	CG	170	164-170	C	GC
CM17	T	CT	C	CG	170	170-170	C	CC
CM18	T	CC	C	GG	170	164-170	C	GC
CM19	T	TT	C	CC	161	164-164	C	CC
CM20	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM21	T	CT	C	CG	161	164-164	C	CC
CM22	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM23	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM24	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM25	T	CT	C	CG	161	164-164	C	CC
CM26	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM27	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM28	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GG
CM29	T	CT	C	GG	161	164-164	C	CC
CM30	T	CC	C	GG	161	164-164	C	GG
CM31	T	CT	C	CG	161	164-164	C	GC
CM32	T	TT	C	CC	170	164-170	C	GC
CM33	T	CT	C	CG	170	164-170	C	GC
CM34	T	CT	C	CG	170	164-170	C	GC
CM35	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM36	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM37	T	CT	C	CG	170	170-170	C	CC
CM38	T	CT	C	CC	161	164-170	C	GG
CM39	T	CT	C	CC	161	164-170	C	GC
CM40	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC

Supplementary Table III.I Continued (LG3)

Locus	INVA-P855		C3_15509117		CX0124		CHS-M183	
Location	30.2		89.6		110.3		167.3	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
CM41	T	CT	C	CG	161	164-164	C	GC
CM42	T	CT	C	GG	170	164-170	C	GC
CM43	T	CT	C	CG	170	164-170	C	GC
CM44	T	CT	C	CC	161	170-170	C	CC
CM45	T	CC	C	GG	161	164-170	C	GG
CM46	T	CT	C	CC	161	170-170	C	CC
CM47	T	TT	C	CG	161	170-170	C	CC
CM48	T	CT	C	CG	161	164-164	C	CC
CM49	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM50	T	TT	C	CC	161	170-170	C	GC
CM51	T	TT	C	CC	170	170-170	C	CC
CM52	T	TT	C	CC	170	170-170	C	CC
CM53	T	CT	C	CG	161	170-170	C	GC
CM54	T	CC	C	CG	161	164-170	C	CC
CM55	T	TT	C	CG	161	164-170	C	CC
CM56	T	CT	C	CC	161	164-170	C	GG
CM57	T	CT	C	CG	170	170-170	C	CC
CM58	T	TT	C	CC	170	170-170	C	CC
CM59	T	TT	C	CC	161	170-170	C	GC
CM60	T	CT	C	CG	161	164-164	C	CC
CM61	T	CC	C	CG	161	170-170	C	CC
CM62	T	CC	C	CG	161	170-170	C	CC
CM63	T	TT	C	CG	170	164-170	C	GC
CM64	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM65	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM66	T	CC	C	CG	170	164-170	C	GC
CM67	T	CT	C	CG	161	170-170	C	GG
CM68	T	CC	C	GG	170	164-164	C	GG
CM69	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM70	T	CT	C	GG	170	164-164	C	CC
CM71	T	CC	C	CC	161	170-170	C	GC
CM72	T	CT	C	CG	170	164-170	C	GC
CM73	T	CT	C	CG	161	170-170	C	CC
CM74	T	TT	C	CC	170	164-164	C	CC
CM75	T	CC	C	GG	161	164-170	C	CC
CM76	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM77	T	CT	C	CG	170	164-170	C	GG
CM78	T	TT	C	CG	161	164-164	C	CC
CM79	T	TT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM80	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM81	T	CT	C	CG	161	164-170	C	GC
CM82	T	CT	C	CG	161	164-170	C	CC
CM83	T	CC	C	GG	170	164-164	C	CC
CM84	T	CT	C	CG	161	164-170	C	CC
CM85	T	CT	C	CG	170	164-164	C	CC

Supplementary Table III.I Continued (LG3)

Locus	INVA-P855		C3_15509117		CX0124		CHS-M183	
Location	30.2		89.6		110.3		167.3	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem		Monc	Clem
CM86	T	CT	C	CG	161	164-164	C	CC
CM87	T	CT	C	CG	161	170-170	C	CC
CM88	T	CT	C	CG	161	164-164	C	CC

Clem diploid 'Clemenules' mandarin, **Monc** tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.I Continued (LG4)

LG4								
Centromere position	16.1							
Locus	C4P229604		C4P5278891		C4P25377913		CI03D12a	
Location	0.8		18.5		88.7		90.1	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
Moncada		GA		AG		AG		261-280
Clemenules	GG		AA		AA		251-261	
CM01	G	GG	A	AA	A	AA	251	261-261
CM02	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM03	G	GA	A	AG	A	GG	261	280-280
CM04	G	GA	A	AG	A	GG	261	280-280
CM05	G	GG	A	AG	A	AA	251	261-261
CM06	G	GA	A	GG	A	AG	261	261-280
CM07	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM08	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM09	G	AA	A	AG	A	AG	251	261-280
CM10	G	GA	A	AA	A	AG	261	261-280
CM11	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM12	G	GA	A	AG	A	AG	251	261-280
CM13	G	GA	A	AG	A	GG	251	261-280
CM14	G	GA	A	AG	A	AA	261	261-261
CM15	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM16	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM17	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM18	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM19	G	GA	A	GG	A	AA	251	261-261
CM20	G	AA	A	AG	A	AG	251	261-280
CM21	G	GA	A	GG	A	AA	251	261-261
CM22	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM23	G	GG	A	AA	A	AG	251	261-280
CM24	G	GG	A	AA	A	AG	251	261-280
CM25	G	GA	A	GG	A	AA	251	261-261
CM26	G	GA	A	AG	A	AG	251	261-280
CM27	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM28	G	GG	A	AG	A	AA	251	261-261
CM29	G	GA	A	AG	A	GG	251	280-280
CM30	G	GA	A	AG	A	AG	251	280-280
CM31	G	GA	A	AG	A	AA	251	261-261
CM32	G	GA	A	AA	A	GG	251	280-280
CM33	G	GA	A	GG	A	AG	261	261-280
CM34	G	GA	A	GG	A	AG	261	261-280
CM35	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM36	G	AA	A	AA	A	AG	261	261-280
CM37	G	GG	A	AG	A	AG	261	261-280
CM38	G	GA	A	AA	A	AG	251	261-280
CM39	G	GG	A	GG	A	AG	251	261-280
CM40	G	GA	A	AG	A	AA	261	261-261

Supplementary Table III.I Continued (LG4)								
Locus	C4P229604		C4P5278891		C4P25377913		CI03D12a	
Location	0.8		18.5		88.7		90.1	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
CM41	G	GA	A	AG	A	GG	261	280-280
CM42	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM43	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM44	G	AA	A	AA	A	AG	261	261-280
CM45	G	GA	A	GG	A	AG	251	261-280
CM46	G	GA	A	AG	A	AG	251	261-280
CM47	G	GA	A	AG	A	AA	261	261-261
CM48	G	GA	A	GG	A	AA	261	261-261
CM49	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM50	G	GA	A	AG	A	AG	251	261-280
CM51	G	GA	A	GG	A	AG	261	261-280
CM52	G	GA	A	GG	A	AG	261	261-280
CM53	G	GA	A	AG	A	AA	261	261-261
CM54	G	GG	A	GG	A	AA	251	261-261
CM55	G	AA	A	GG	A	AA	251	261-261
CM56	G	GA	A	GG	A	GG	251	280-280
CM57	G	GA	A	GG	A	AG	251	261-280
CM58	G	GA	A	AG	A	AA	261	261-261
CM59	G	GA	A	AG	A	AG	251	261-280
CM60	G	GA	A	GG	A	AA	251	261-261
CM61	G	GA	A	AG	A	AA	261	261-261
CM62	G	GA	A	AG	A	AA	261	261-261
CM63	G	AA	A	AG	A	AA	261	261-261
CM64	G	AA	A	AG	A	GG	261	280-280
CM65	G	GG	A	AG	A	GG	261	280-280
CM66	G	GA	A	AA	A	AG	251	261-280
CM67	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM68	G	GA	A	AA	A	AG	261	261-280
CM69	G	GA	A	AG	A	AG	251	261-280
CM70	G	GG	A	AG	A	AG	261	261-280
CM71	G	GA	A	AG	A	GG	261	280-280
CM72	G	GA	A	AG	A	GG	251	280-280
CM73	G	GA	A	GG	A	AA	251	261-261
CM74	G	GG	A	GG	A	AA	251	261-261
CM75	G	GA	A	GG	A	AA	251	261-261
CM76	G	GA	A	AG	A	AG	251	261-280
CM77	G	GA	A	AG	A	AG	251	261-280
CM78	G	AA	A	GG	A	AA	251	261-261
CM79	G	GA	A	GG	A	AG	251	261-280
CM80	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM81	G	GA	A	AG	A	AG	261	261-280
CM82	G	GG	A	AG	A	AG	251	261-280
CM83	G	GA	A	GG	A	AA	261	261-261
CM84	G	GA	A	AA	A	AG	251	261-280
CM85	G	GA	A	GG	A	AA	251	261-261

Supplementary Table III.I Continued (LG4)

Locus	C4P229604		C4P5278891		C4P25377913		CI03D12a	
Location	0.8		18.5		88.7		90.1	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	
CM86	G	GG	A	GG	A	AA	251	261-261
CM87	G	GG	A	GG	A	AG	261	261-280
CM88	G	GA	A	GG	A	AA	251	261-261

Clem diploid 'Clemenules' mandarin, **Monc** tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.I Continued (LG5)

LG5						
Centromere position	23.1					
Locus	MEST15		CMS30		CI07E12	
Location	16.2		31.4		95.4	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
Monc		174-186		150-152		138-142
Clem	183-186		152-156		136-142	
CM01	183	186-186	152	152-152	136	142-142
CM02	183	174-186	152	150-152	142	138-142
CM03	186	174-186	152	150-150	142	138-142
CM04	186	174-186	152	150-150	142	138-142
CM05	186	174-186	156	152-152	136	142-142
CM06	186	174-186	152	150-152	136	138-142
CM07	186	174-186	156	150-152	142	138-142
CM08	183	174-186	156	150-152	142	138-142
CM09	183	174-186	156	150-152	142	138-142
CM10	183	174-186	156	150-150	142	138-142
CM11	183	174-186	156	150-152	136	138-142
CM12	183	174-186	152	152-152	136	142-142
CM13	186	174-186	156	150-150	136	138-142
CM14	186	186-186	152	150-152	136	138-142
CM15	183	174-186	152	150-152	136	138-142
CM16	183	174-186	152	150-152	136	138-142
CM17	186	174-186	156	150-152	142	138-142
CM18	186	174-186	156	150-152	136	138-142
CM19	186	174-186	152	150-150	136	138-138
CM20	186	174-174	152	152-152	136	138-142
CM21	186	174-186	156	150-150	136	142-142
CM22	186	174-186	152	150-152	142	138-138
CM23	183	174-186	156	150-152	136	142-142
CM24	183	174-186	156	150-152	136	142-142
CM25	186	174-174	152	150-150	142	138-138
CM26	183	186-186	152	150-152	142	138-138
CM27	183	174-186	152	152-152	142	142-142
CM28	183	174-186	152	150-152	136	138-142
CM29	183	174-186	152	150-152	142	138-142
CM30	183	174-186	156	150-150	136	138-142
CM31	183	174-186	152	150-152	136	138-142
CM32	183	174-186	152	150-152	136	138-142
CM33	186	174-186	152	152-152	142	138-142
CM34	186	174-186	152	152-152	142	138-142
CM35	183	174-174	152	150-152	142	138-142
CM36	183	174-174	152	150-150	142	138-142
CM37	183	186-186	152	150-150	136	138-142
CM38	186	186-186	156	152-152	136	142-142
CM39	183	174-186	152	150-152	142	138-142
CM40	186	174-186	152	150-152	142	138-142

Supplementary Table III.I Continued (LG5)

Locus	MEST15		CMS30		CI07E12	
Location	16.2		31.4		95.4	
	Clem	Monc	Clem	Clem	Monc	Clem
CM41	186	174-186	156	150-152	136	142-142
CM42	186	174-174	152	150-152	136	138-142
CM43	183	186-186	156	150-152	142	138-142
CM44	183	174-186	156	152-152	142	142-142
CM45	186	186-186	152	150-150	142	142-142
CM46	183	174-186	156	150-152	136	142-142
CM47	183	174-174	152	150-152	142	138-142
CM48	186	174-174	152	150-150	142	142-142
CM49	186	174-186	156	152-152	142	138-142
CM50	186	174-186	152	152-152	142	138-142
CM51	183	174-186	156	150-152	142	138-142
CM52	183	174-186	156	150-152	142	138-142
CM53	183	174-186	152	150-152	136	138-142
CM54	186	174-186	152	152-152	136	142-142
CM55	183	174-186	156	150-150	136	138-138
CM56	183	174-186	152	152-152	142	142-142
CM57	186	174-174	152	152-152	136	142-142
CM58	186	174-186	156	150-150	142	138-142
CM59	186	174-186	152	150-150	142	142-142
CM60	186	174-186	156	150-150	142	138-138
CM61	183	174-186	152	150-152	136	138-142
CM62	183	174-186	152	150-152	136	138-142
CM63	183	174-186	156	150-152	142	138-142
CM64	186	174-186	152	150-152	136	142-142
CM65	183	174-186	152	152-152	136	142-142
CM66	186	174-174	156	150-152	142	142-142
CM67	183	186-186	156	150-150	142	138-142
CM68	183	174-186	152	150-152	136	142-142
CM69	183	174-186	156	150-152	142	138-142
CM70	183	174-174	156	150-152	136	138-142
CM71	183	174-186	156	150-150	142	138-138
CM72	186	174-186	156	150-152	142	138-138
CM73	183	174-186	152	150-150	136	142-142
CM74	183	174-186	152	150-150	136	142-142
CM75	186	174-186	152	150-150	136	138-142
CM76	183	174-174	152	150-152	136	138-142
CM77	183	174-186	152	150-152	142	138-142
CM78	183	174-186	156	152-152	136	142-142
CM79	183	174-186	156	150-152	136	142-142
CM80	183	174-186	156	150-152	142	138-138
CM81	186	174-186	152	150-152	142	138-138
CM82	186	186-186	156	152-152	136	142-142
CM83	183	174-174	156	150-150	136	142-142
CM84	186	174-186	156	150-150	142	138-138
CM85	186	186-186	152	150-150	136	138-138

Supplementary Table III.I Continued (LG5)

Locus	MEST15		CMS30		CI07E12	
Location	16.2		31.4		95.4	
	Clem	Monc	Clem		Clem	Monc
CM86	183	174-186	156	150-150	142	138-138
CM87	186	174-186	156	152-152	136	138-142
CM88	183	186-186	156	150-150	136	142-142

Clem diploid 'Clemenules' mandarin, **Monc** tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.I Continued (LG6)

LG6								
Centromere position	6.2							
Locus	C6_310721		C6_15847634		LAPX-M238		MEST123	
Location	0.3		15.4		19.2		91.9	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
Monc		TC		GT		GC		252-260
Clem	TT		GG		CC		252-280	
CM01	T	TT	G	TT	C	-	280	260-260
CM02	T	CC	G	GT	C	GG	252	252-260
CM03	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM04	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-252
CM05	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM06	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-252
CM07	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-252
CM08	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-252
CM09	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-252
CM10	T	TC	G	TT	C	GC	280	260-260
CM11	T	TC	G	GT	C	GC	252	260-260
CM12	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM13	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-252
CM14	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM15	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM16	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM17	T	TT	G	GT	C	GC	252	252-252
CM18	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM19	T	TC	G	GT	C	GG	280	252-252
CM20	T	CC	G	GT	C	GG	252	252-260
CM21	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-252
CM22	T	CC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM23	T	TC	G	TT	C	GC	252	252-260
CM24	T	TC	G	TT	C	GC	252	252-260
CM25	T	TC	G	GT	C	GG	280	252-252
CM26	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM27	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM28	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM29	T	TC	G	GT	C	GG	252	252-260
CM30	T	TC	G	GT	C	GC	280	260-260
CM31	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM32	T	CC	G	GT	C	GG	280	252-260
CM33	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM34	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM35	T	TC	G	GG	C	GC	280	252-252
CM36	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM37	T	TC	G	GT	C	GG	280	252-260
CM38	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM39	T	CC	G	TT	C	GG	280	252-260
CM40	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-252

Supplementary Table III.I Continued (LG6)

Locus	C6_310721		C6_15847634		LAPX-M238		MEST123	
Location	0.3		15.4		19.2		91.9	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
CM41	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM42	T	TC	G	GG	C	CC	280	252-252
CM43	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM44	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM45	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM46	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM47	T	TT	G	GT	C	GG	252	260-260
CM48	T	TT	G	GG	C	CC	280	252-252
CM49	T	TT	G	GT	C	CC	280	252-260
CM50	T	TC	G	GG	C	GC	252	252-260
CM51	T	TT	G	GT	C	CC	280	252-260
CM52	T	TT	G	GT	C	CC	280	252-260
CM53	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM54	T	TC	G	GT	C	GG	280	252-252
CM55	T	TT	G	GG	C	CC	280	252-252
CM56	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM57	T	TC	G	GG	C	GC	252	252-260
CM58	T	TT	G	GT	C	CC	280	252-260
CM59	T	TC	G	GG	C	GC	252	252-260
CM60	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-252
CM61	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM62	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM63	T	TT	G	GT	C	GC	280	252-252
CM64	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM65	T	CC	G	TT	C	GG	252	252-260
CM66	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM67	T	CC	G	TT	C	GC	280	252-260
CM68	T	TC	G	GG	C	CC	252	252-260
CM69	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM70	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM71	T	CC	G	GT	C	GG	252	252-260
CM72	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM73	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-252
CM74	T	CC	G	GT	C	GG	280	252-252
CM75	T	TC	G	GG	C	CC	252	252-252
CM76	T	TT	G	GG	C	CC	252	252-252
CM77	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM78	T	TT	G	GT	C	CC	280	252-252
CM79	T	TC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM80	T	CC	G	GT	C	GG	280	260-260
CM81	T	TC	G	GG	C	GC	252	252-252
CM82	T	CC	G	GT	C	GC	252	252-260
CM83	T	CC	G	GT	C	GG	280	252-252
CM84	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-260
CM85	T	TT	G	GG	C	CC	252	260-260

Supplementary Table III.I Continued (LG6)

Locus	C6_310721		C6_15847634		LAPX-M238		MEST123	
Location	0.3		15.4		19.2		91.9	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	
CM86	T	TC	G	GT	C	GC	280	252-252
CM87	T	TT	G	GG	C	CC	252	252-252
CM88	T	TC	G	GG	C	CC	280	260-260

Clem diploid 'Clemenules' mandarin, **Monc** tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.I Continued (LG7)

LG7						
Centromere position	96.4					
Locus	FLS-M400		CI03B07		CI07C07	
Location	46.0		83.4		98.0	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
Monc		CT		261-265		227-234
Clem	TT		263-265		227-240	
CM01	T	CT	263	265-265	227	227-227
CM02	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM03	T	CT	265	261-265	227	234-234
CM04	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM05	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM06	T	CC	263	261-261	240	234-234
CM07	T	CT	263	261-265	227	227-234
CM08	T	CT	263	261-265	227	227-234
CM09	T	CT	263	265-265	240	227-234
CM10	T	CT	263	261-265	240	227-227
CM11	T	CT	263	261-265	240	227-234
CM12	T	CT	263	261-265	240	227-234
CM13	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM14	T	CC	263	261-261	227	234-234
CM15	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM16	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM17	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM18	T	CC	263	265-265	240	227-234
CM19	T	CC	263	265-265	240	234-234
CM20	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM21	T	CC	263	265-265	240	234-234
CM22	T	CT	263	261-265	240	227-234
CM23	T	CC	265	261-265	227	227-227
CM24	T	CC	265	261-265	227	227-227
CM25	T	CC	263	265-265	240	227-227
CM26	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM27	T	CT	263	261-265	240	227-234
CM28	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM29	T	CT	265	261-261	227	227-234
CM30	T	CT	263	261-265	240	227-234
CM31	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM32	T	CC	263	261-265	240	227-227
CM33	T	CC	265	261-261	227	234-234
CM34	T	TT	265	261-261	227	234-234
CM35	T	TT	-	-	240	227-234
CM36	T	CT	265	265-265	240	227-227
CM37	T	CT	263	261-265	240	227-234
CM38	T	CT	265	265-265	227	227-227
CM39	T	CT	263	261-261	240	234-234
CM40	T	CT	265	261-265	227	227-234

Supplementary Table III.I Continued (LG7)

Locus	FLS-M400		CI03B07		CI07C07	
Location	46.0		83.4		98.0	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
CM41	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM42	T	CT	265	261-265	240	227-234
CM43	T	TT	263	261-265	240	227-234
CM44	T	CC	263	261-261	227	227-227
CM45	T	CT	263	261-261	240	234-234
CM46	T	CC	263	261-265	240	227-234
CM47	T	CC	263	261-261	240	227-234
CM48	T	CC	263	265-265	227	227-227
CM49	T	CT	263	261-265	240	227-234
CM50	T	CC	263	261-261	240	227-234
CM51	T	CC	263	261-261	227	234-234
CM52	T	CT	263	261-261	227	234-234
CM53	T	CC	265	261-265	227	227-234
CM54	T	CC	263	265-265	240	234-234
CM55	T	CC	263	265-265	240	227-227
CM56	T	CT	263	261-261	240	234-234
CM57	T	CT	263	261-265	240	234-234
CM58	T	CC	265	261-265	240	227-234
CM59	T	CC	265	261-265	227	227-234
CM60	T	CT	263	265-265	240	234-234
CM61	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM62	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM63	T	CC	263	261-265	240	227-234
CM64	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM65	T	TT	263	261-265	240	227-234
CM66	T	TT	263	261-265	240	227-227
CM67	T	CT	263	261-265	240	227-234
CM68	T	CT	263	261-265	227	227-227
CM69	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM70	T	CT	263	261-265	240	227-234
CM71	T	CT	263	261-265	240	227-234
CM72	T	CC	263	261-265	227	227-234
CM73	T	CC	263	265-265	240	227-227
CM74	T	CC	265	265-265	240	234-234
CM75	T	CT	263	265-265	240	227-227
CM76	T	CC	263	261-265	240	227-234
CM77	T	CC	263	261-265	240	227-234
CM78	T	CT	263	265-265	240	234-234
CM79	T	CT	263	261-261	240	234-234
CM80	T	CT	265	261-265	227	227-234
CM81	T	TT	263	261-265	227	227-234
CM82	T	CC	265	261-265	227	227-234
CM83	T	TT	263	265-265	240	234-234
CM84	T	CC	265	265-265	227	227-227
CM85	T	CC	263	265-265	240	227-227

Supplementary Table III.I Continued (LG7)

Locus	FLS-M400		CI03B07		CI07C07	
Location	46.0		83.4		98.0	
	Clem	Monc	Clem		Clem	Monc
CM86	T	CC	263	265-265	240	227-227
CM87	T	CC	263	261-261	240	234-234
CM88	T	CC	265	265-265	240	227-227

Clem diploid 'Clemenules' mandarin, **Monc** tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.I Continued (LG8)

LG8						
Centromere position	54.2					
Locus	Ci01F04a		C8P19129409		Ci02A09	
Location	5.9		77.1		98.2	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
Monc		186-210		CG		152-162
Clem	186-202		CC		160-162	
CM01	202	186-210	C	CC	160	152-152
CM02	186	186-210	C	CC	160	152-162
CM03	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM04	186	186-210	C	CG	162	152-162
CM05	202	186-210	C	CG	162	152-162
CM06	186	186-210	C	CG	162	152-162
CM07	186	186-186	C	CG	162	152-162
CM08	202	186-210	C	CG	162	152-152
CM09	202	186-210	C	CG	160	152-152
CM10	202	186-210	C	CG	162	152-162
CM11	186	186-210	C	GG	160	152-152
CM12	202	186-210	C	GG	160	152-152
CM13	202	186-210	C	CG	162	152-162
CM14	202	186-210	C	CG	162	152-162
CM15	186	186-210	C	CC	160	152-152
CM16	186	186-210	C	CC	160	152-162
CM17	186	186-186	C	CG	162	152-162
CM18	186	186-186	C	CG	162	152-162
CM19	202	210-210	C	CC	162	152-162
CM20	186	186-210	C	CG	162	152-152
CM21	202	186-186	C	CC	160	152-162
CM22	186	186-210	C	CG	162	152-162
CM23	202	186-210	C	CG	160	152-162
CM24	202	186-210	C	CG	160	152-162
CM25	202	186-186	C	CC	160	152-152
CM26	186	186-210	C	CG	160	162-162
CM27	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM28	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM29	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM30	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM31	202	186-210	C	GG	162	152-152
CM32	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM33	202	210-210	C	CG	162	152-162
CM34	202	210-210	C	CG	162	152-162
CM35	186	186-186	C	GG	160	152-152
CM36	186	210-210	C	GG	160	152-152
CM37	186	186-210	C	CC	160	162-162
CM38	186	210-210	C	GG	162	162-162
CM39	186	186-210	C	CG	162	152-162
CM40	202	210-210	C	GG	162	152-162

Supplementary Table III.I Continued (LG8)

Locus	Ci01F04a		C8P19129409		Ci02A09	
Location	5.9		77.1		98.2	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
CM41	186	186-210	C	CG	162	152-162
CM42	186	186-210	C	GG	162	152-152
CM43	202	186-210	C	CC	162	162-162
CM44	202	186-210	C	CG	160	152-162
CM45	186	186-210	C	CG	162	162-162
CM46	202	186-186	C	CC	162	162-162
CM47	202	186-210	C	CC	160	162-162
CM48	202	186-186	C	CC	162	152-152
CM49	186	186-210	C	CG	162	152-162
CM50	186	186-210	C	CG	162	152-162
CM51	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM52	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM53	202	210-210	C	CG	162	152-162
CM54	202	186-186	C	CC	160	162-162
CM55	202	186-186	C	CC	160	152-162
CM56	202	186-210	C	CG	160	162-162
CM57	202	186-210	C	GG	162	152-152
CM58	186	186-186	C	CC	160	152-162
CM59	186	186-210	C	CG	160	162-162
CM60	202	186-186	C	CC	162	152-162
CM61	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM62	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM63	186	186-210	C	CC	160	152-162
CM64	202	210-210	C	GG	162	152-152
CM65	202	186-186	C	CC	160	152-162
CM66	202	186-210	C	CG	162	152-162
CM67	202	210-210	C	CC	160	162-162
CM68	202	210-210	C	CG	160	152-162
CM69	202	186-210	C	CG	160	152-162
CM70	186	186-210	C	CG	160	152-152
CM71	202	186-186	C	CG	160	152-162
CM72	202	186-210	C	CG	162	152-162
CM73	202	186-210	C	CC	162	152-162
CM74	186	210-210	C	CC	160	152-162
CM75	202	186-186	C	CC	162	152-162
CM76	202	210-210	C	CC	160	152-152
CM77	202	186-210	C	CG	160	152-162
CM78	202	186-186	C	CC	160	152-162
CM79	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM80	186	186-210	C	CG	160	152-162
CM81	186	186-210	C	CG	162	152-162
CM82	202	186-210	C	CG	162	162-162
CM83	202	186-186	C	CC	160	152-152
CM84	202	186-186	C	CG	162	152-162
CM85	202	186-186	C	CC	162	162-162

Supplementary Table III.I Continued (LG8)

Locus	Ci01F04a		C8P19129409		Ci02A09	
Location	5.9		77.1		98.2	
	Clem	Monc	Clem		Clem	Monc
CM86	202	186-186	C	CC	160	152-162
CM87	186	186-210	C	CG	162	152-162
CM88	202	186-186	C	CC	160	152-162

Clem diploid 'Clemenules' mandarin, **Monc** tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.I Continued (LG9)

LG9						
Centromere position	52.2					
Locus	C9P27534079		CI07F11		C9_12216080	
Location	23.6		49.5		59.0	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
Monc		CT		146-160		AG
Clem	CC		152-160		AA	
CM01	C	TT	152	160-160	A	AA
CM02	C	CT	160	160-160	A	AA
CM03	C	CT	152	146-160	A	AG
CM04	C	CT	152	146-160	A	-
CM05	C	CT	152	146-160	A	AG
CM06	C	CT	160	146-160	A	AG
CM07	C	CT	152	146-160	A	AG
CM08	C	CT	152	146-160	A	AG
CM09	C	CC	160	160-160	A	AG
CM10	C	TT	160	146-146	A	AG
CM11	C	CT	160	146-160	A	GG
CM12	C	CT	160	146-160	A	GG
CM13	C	CT	160	146-160	A	AG
CM14	C	CT	152	146-160	A	AG
CM15	C	CT	152	146-160	A	AA
CM16	C	CT	152	146-160	A	AA
CM17	C	CT	160	146-160	A	AG
CM18	C	CT	152	146-160	A	AG
CM19	C	CT	160	146-160	A	AG
CM20	C	CT	152	146-160	A	AG
CM21	C	CT	152	146-160	A	AG
CM22	C	CT	152	146-160	A	AG
CM23	C	CC	160	146-146	A	AG
CM24	C	CC	160	146-146	A	AG
CM25	C	CT	152	160-160	A	AG
CM26	C	CC	152	160-160	A	AG
CM27	C	CT	160	146-160	A	AG
CM28	C	TT	160	146-160	A	AG
CM29	C	CT	160	146-160	A	AG
CM30	C	CT	152	146-160	A	AG
CM31	C	CT	152	160-160	A	GG
CM32	C	CT	152	146-146	A	AG
CM33	C	CT	152	146-160	A	AG
CM34	C	CT	152	146-160	A	AG
CM35	C	CT	152	160-160	A	AG
CM36	C	CT	152	146-160	A	GG
CM37	C	CT	152	146-160	A	AA
CM38	C	CT	152	146-160	A	GG
CM39	C	CT	160	146-160	A	AG
CM40	C	CT	152	146-160	A	GG

Supplementary Table III.I Continued (LG9)

Locus	C9P27534079		CI07F11		C9_12216080	
Location	23.6		49.5		59.0	
	Clem	Monc	Clem	Monc	Clem	Monc
CM41	C	CT	160	146-160	A	AG
CM42	C	CC	152	160-160	A	GG
CM43	C	CT	152	146-160	A	AG
CM44	C	CT	152	146-160	A	AG
CM45	C	TT	160	146-146	A	AG
CM46	C	CT	152	146-160	A	AA
CM47	C	CT	152	146-160	A	AA
CM48	C	CT	152	146-160	A	AG
CM49	C	CT	160	146-160	A	AG
CM50	C	CC	160	160-160	A	AG
CM51	C	CT	160	146-146	A	AG
CM52	C	CT	160	146-146	A	AG
CM53	C	CT	152	146-160	A	AA
CM54	C	TT	152	160-160	A	GG
CM55	C	CC	160	146-146	A	AG
CM56	C	TT	160	146-160	A	AG
CM57	C	TT	160	146-146	A	GG
CM58	C	CT	152	146-160	A	AA
CM59	C	CT	152	146-160	A	AG
CM60	C	TT	152	160-160	A	AG
CM61	C	CT	152	146-146	A	AG
CM62	C	CC	152	146-146	A	AG
CM63	C	CT	160	146-160	A	AG
CM64	C	TT	160	146-146	A	GG
CM65	C	CT	152	146-160	A	AA
CM66	C	CT	160	146-160	A	GG
CM67	C	CT	152	146-160	A	AA
CM68	C	TT	160	146-146	A	AG
CM69	C	CT	152	146-160	A	AG
CM70	C	TT	160	146-146	A	AG
CM71	C	CT	152	146-160	A	AG
CM72	C	TT	152	146-146	A	AG
CM73	C	CT	160	146-146	A	AG
CM74	C	CT	160	146-146	A	AG
CM75	C	CT	160	146-146	A	AG
CM76	C	CC	160	146-160	A	AA
CM77	C	CT	160	146-160	A	AG
CM78	C	TT	160	146-160	A	AG
CM79	C	CT	152	146-160	A	AG
CM80	C	TT	152	146-146	A	AG
CM81	C	CT	160	146-160	A	AG
CM82	C	TT	160	146-146	A	AG
CM83	C	TT	152	160-160	A	AG
CM84	C	TT	160	146-146	A	AG
CM85	C	CC	160	146-146	A	AG

Supplementary Table III.I Continued (LG9)

Locus	C9P27534079		CI07F11		C9_12216080	
Location	23.6		49.5		59.0	
	Clem	Monc	Clem		Clem	Monc
CM86	C	CT	152	160-160	A	GG
CM87	C	CT	160	146-160	A	AG
CM88	C	TT	152	146-160	A	AG

Clem diploid 'Clemenules' mandarin, **Monc** tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Genetic configuration of diploid gametes produced by tetraploid 'Moncada' mandarin used as female parent.

LG1								
Centromere Position	60.7							
Locus	CIO2G08		CIC2810-01		EMA-M30		CIC5950	
Location	16.7		63.4		69.7		91.4	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	244-246		AC		CT		GA	
Anana		248-254		AA		TT		AA
MA01	244-246	248	AA	A	TT	T	GG	A
MA02	244-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA03	246-246	254	AA	A	TT	T	GG	A
MA04	244-246	254	CC	A	CC	T	AA	A
MA05	246-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA06	246-246	248	CC	A	CC	T	AA	A
MA07	244-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA08	246-246	248	CC	A	CC	T	AA	A
MA09	244-244	254	AA	A	TT	T	GG	A
MA10	244-246	248	AC	A	CT	T	AA	A
MA11	244-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA12	244-244	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA13	244-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA14	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA15	244-246	248	AA	A	TT	T	GA	A
MA16	244-246	254	AA	A	TT	T	GG	A
MA17	246-246	254	AA	A	TT	T	GA	A
MA18	244-244	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA19	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA20	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA21	244-246	254	AC	A	CC	T	GA	A
MA22	244-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA23	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA24	244-246	248	AC	A	CT	T	AA	A
MA25	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA26	244-246	248	AA	A	TT	T	GG	A
MA27	244-246	254	AA	A	CT	T	GG	A
MA28	246-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA29	246-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA30	244-246	254	AC	A	TT	T	GA	A
MA31	244-246	254	CC	A	CC	T	AA	A
MA32	244-244	254	AC	A	CT	T	AA	A
MA33	244-244	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA34	244-246	254	AC	A	CT	T	AA	A
MA35	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA36	244-246	248	AA	A	TT	T	GG	A
MA37	246-246	254	AC	A	CT	T	GG	A
MA38	244-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA39	246-246	248	AA	A	CT	T	GG	A

Supplementary Table III.IIContinued (LG1)

Locus	C102G08		C1C2810-01		EMA-M30		C1C5950	
Location	16.7		63.4		69.7		91.4	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
MA40	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA41	246-246	248	CC	A	CC	T	AA	A
MA42	244-244	254	AA	A	TT	T	GA	A
MA43	244-244	248	AA	A	TT	T	GG	A
MA44	244-246	254	CC	A	CC	T	AA	A
MA45	244-246	254	CC	A	CC	T	GA	A
MA46	244-244	248	AA	A	TT	T	GG	A
MA47	244-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA48	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA49	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA50	246-246	254	AA	A	TT	T	GG	A
MA51	244-246	248	AC	A	CT	T	GG	A
MA52	246-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA53	244-246	254	AA	A	TT	T	GA	A
MA54	244-244	254	CC	A	CC	T	AA	A
MA55	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA56	244-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA57	244-246	254	AA	A	TT	T	GG	A
MA58	244-246	254	AC	A	CT	T	AA	A
MA59	244-246	254	CC	A	CC	T	AA	A
MA60	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA61	244-246	248	CC	A	CC	T	AA	A
MA62	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA63	244-246	248	AC	A	TT	T	GA	A
MA64	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA65	246-246	248	CC	A	CC	T	AA	A
MA66	244-244	254	CC	A	CC	T	AA	A
MA67	246-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA68	246-246	248	AC	A	CT	T	GA	A
MA69	244-246	254	AC	A	CT	T	GA	A
MA70	244-244	248	CC	A	CT	T	AA	A
MA71	246-246	254	CC	A	CC	T	GA	A
MA72	246-246	248	CC	A	CC	T	AA	A

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Continued (LG2)

LG2						
Centromere position	56.9					
Locus	Ci02D09		CAC15		C2_23768463	
Location	13.4		52.6		81.0	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	236-238		150-160		GC	
Anana	230-236		160-160		CC	
MA01	238-238	236	150-150	160	GG	C
MA02	238-238	230	150-160	160	GC	C
MA03	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA04	236-236	236	150-160	160	GC	C
MA05	238-238	236	160-160	160	CC	C
MA06	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA07	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA08	238-238	236	150-160	160	GC	C
MA09	236-238	230	150-160	160	GC	C
MA10	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA11	236-238	230	150-160	160	GG	C
MA12	236-238	230	150-160	160	GC	C
MA13	236-238	230	150-160	160	GG	C
MA14	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA15	236-236	236	160-160	160	CC	C
MA16	236-238	230	150-160	160	GC	C
MA17	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA18	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA19	236-238	236	150-150	160	GG	C
MA20	236-236	236	150-160	160	GC	C
MA21	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA22	236-238	230	150-160	160	GC	C
MA23	236-236	230	150-160	160	GC	C
MA24	236-236	230	160-160	160	CC	C
MA25	238-238	236	150-160	160	GC	C
MA26	236-238	230	160-160	160	CC	C
MA27	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA28	236-238	230	160-160	160	CC	C
MA29	238-238	236	150-160	160	GC	C
MA30	236-236	236	150-160	160	GC	C
MA31	236-238	236	150-160	160	CC	C
MA32	236-236	236	150-160	160	GC	C
MA33	236-238	236	150-150	160	GG	C
MA34	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA35	236-238	236	150-150	160	GG	C
MA36	236-238	230	150-160	160	GC	C
MA37	238-238	236	150-160	160	GC	C
MA38	236-236	230	150-160	160	GC	C
MA39	238-238	236	150-160	160	GC	C
MA40	236-238	236	150-160	160	CC	C

Supplementary Table III.II Continued (LG2)

Locus	LG2					
	Ci02D09		CAC15		C2_23768463	
	13.4		52.6		81.0	
Location	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
MA41	236-236	230	160-160	160	CC	C
MA42	236-238	230	150-160	160	GC	C
MA43	236-238	236	150-150	160	GC	C
MA44	236-236	230	150-160	160	GC	C
MA45	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA46	236-238	230	150-160	160	GC	C
MA47	238-238	236	150-160	160	GG	C
MA48	236-236	236	150-160	160	GC	C
MA49	236-236	230	160-160	160	CC	C
MA50	236-238	230	150-160	160	GC	C
MA51	236-238	236	160-160	160	CC	C
MA52	236-236	236	160-160	160	GC	C
MA53	236-236	230	150-160	160	GC	C
MA54	236-238	230	150-150	160	GG	C
MA55	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA56	236-236	236	160-160	160	CC	C
MA57	236-238	230	150-160	160	GG	C
MA58	238-238	236	150-150	160	GG	C
MA59	236-238	236	150-150	160	GC	C
MA60	236-238	230	150-160	160	GC	C
MA61	236-236	236	160-160	160	GC	C
MA62	236-238	230	150-160	160	GC	C
MA63	238-238	236	150-160	160	GC	C
MA64	236-238	236	150-150	160	GC	C
MA65	238-238	236	150-150	160	GG	C
MA66	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA67	236-236	230	150-160	160	GC	C
MA68	236-236	236	150-160	160	GC	C
MA69	236-238	236	150-160	160	GC	C
MA70	236-236	236	160-160	160	CC	C
MA71	238-238	236	150-160	160	GC	C
MA72	238-238	236	150-160	160	GC	C

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Continued (LG2)

LG2				
Centromere position	56.9			
Locus	CIC3712-01		TAA41	
Location	93.9		160.7	
	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	CA		154-163	
Anana		CC		138-147
MA01	AA	C	154-154	138
MA02	CA	C	154-154	138
MA03	CA	C	154-154	138
MA04	CA	C	154-163	138
MA05	CC	C	163-163	147
MA06	CA	C	154-163	147
MA07	CC	C	154-163	138
MA08	CA	C	154-154	138
MA09	CA	C	154-163	138
MA10	CA	C	154-154	138
MA11	AA	C	154-163	147
MA12	CA	C	163-163	147
MA13	AA	C	154-154	147
MA14	AA	C	154-154	147
MA15	CC	C	154-154	147
MA16	CA	C	154-163	147
MA17	CA	C	154-163	147
MA18	CC	C	154-163	147
MA19	AA	C	154-154	147
MA20	CA	C	154-163	147
MA21	CA	C	154-163	147
MA22	CA	C	154-163	138
MA23	CA	C	154-154	147
MA24	CC	C	163-163	138
MA25	CA	C	163-163	147
MA26	CC	C	154-163	138
MA27	CA	C	154-163	147
MA28	CC	C	154-163	147
MA29	AA	C	154-154	138
MA30	CA	C	154-163	147
MA31	CA	C	154-163	147
MA32	CA	C	154-154	147
MA33	CA	C	154-163	138
MA34	CC	C	154-154	147
MA35	AA	C	154-154	138
MA36	CA	C	154-163	138
MA37	CA	C	154-154	147
MA38	AA	C	154-154	147
MA39	CA	C	154-163	138
MA40	CC	C	154-154	138

Supplementary Table III.II Continued (LG2)

LG2				
Locus	CIC3712-01		TAA41	
Location	93.9		160.7	
	Monc	Anana	Monc	Anana
MA41	CA	C	154-163	138
MA42	AA	C	154-154	147
MA43	CA	C	154-163	138
MA44	CA	C	154-154	147
MA45	CA	C	154-163	147
MA46	AA	C	154-163	147
MA47	AA	C	163-163	147
MA48	CC	C	163-163	147
MA49	CC	C	154-163	138
MA50	CA	C	163-163	138
MA51	CA	C	154-163	147
MA52	AA	C	154-154	147
MA53	CC	C	154-163	147
MA54	AA	C	154-163	147
MA55	CA	C	154-163	147
MA56	CC	C	163-163	147
MA57	AA	C	154-163	147
MA58	AA	C	154-154	138
MA59	CA	C	154-154	138
MA60	CC	C	154-163	147
MA61	CA	C	163-163	147
MA62	CA	C	154-163	138
MA63	CA	C	154-154	138
MA64	AA	C	154-163	147
MA65	AA	C	154-163	147
MA66	CA	C	154-163	147
MA67	CA	C	154-163	147
MA68	CA	C	154-163	147
MA69	CA	C	154-163	147
MA70	AA	C	154-154	147
MA71	CA	C	154-163	138
MA72	AA	C	154-163	147

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Continued (LG3)

LG3								
Centromere Position	90.6							
Locus	MEST256		CIC4681-02		C3_11509117		ATMR-M728	
Location	17.0		92.8		89.6		141.9	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	209-225		TA		CG		GT	
Anana		225-225		TT		CC		TT
MA01	209-225	225	TT	T	CC	C	GT	T
MA02	209-225	225	TA	T	CG	C	GG	T
MA03	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA04	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA05	225-225	225	TA	T	GG	C	GG	T
MA06	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA07	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA08	209-225	225	TA	T	GG	C	GG	T
MA09	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA10	209-225	225	TT	T	CC	C	GG	T
MA11	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA12	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA13	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA14	209-225	225	TA	T	CG	C	GG	T
MA15	209-209	225	TT	T	CC	C	GT	T
MA16	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA17	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA18	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA19	209-225	225	TT	T	CC	C	TT	T
MA20	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA21	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA22	209-209	225	TT	T	CC	C	GT	T
MA23	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA24	209-225	225	TT	T	CC	C	GT	T
MA25	209-225	225	TA	T	CG	C	TT	T
MA26	209-225	225	TA	T	CG	C	GG	T
MA27	209-209	225	TT	T	CC	C	GG	T
MA28	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA29	209-209	225	TT	T	CC	C	GT	T
MA30	209-209	225	TA	T	CC	C	GG	T
MA31	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA32	209-225	225	TT	T	CC	C	GT	T
MA33	209-225	225	TA	T	CG	C	GG	T
MA34	209-209	225	TA	T	GG	C	GT	T
MA35	209-209	225	TA	T	CG	C	TT	T
MA36	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA37	209-209	225	TA	T	GG	C	TT	T
MA38	209-209	225	TA	T	CG	C	GG	T
MA39	209-209	225	TT	T	CC	C	GT	T
MA40	209-225	225	TT	T	CC	C	TT	T

Supplementary Table III.II Continued (LG3)

LG3								
Locus	MEST256		CIC4681-02		C3_11509117		ATMR-M728	
Location	17.0		92.8		89.6		141.9	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
MA41	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA42	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA43	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA44	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA45	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA46	209-225	225	TA	T	GG	C	GG	T
MA47	209-209	225	TA	T	CC	C	GG	T
MA48	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA49	225-225	225	AA	T	CG	C	GG	T
MA50	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA51	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA52	209-225	225	AA	T	GG	C	GT	T
MA53	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA54	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA55	209-209	225	TT	T	CC	C	GG	T
MA56	209-225	225	TA	T	CG	C	GG	T
MA57	209-225	225	TA	T	CG	C	GG	T
MA58	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA59	209-225	225	TA	T	CG	C	GG	T
MA60	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA61	209-225	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA62	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA63	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA64	209-209	225	TT	T	CC	C	TT	T
MA65	209-225	225	TA	T	CG	C	TT	T
MA66	209-225	225	TA	T	CG	C	GG	T
MA67	209-225	225	TT	T	CC	C	GT	T
MA68	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA69	225-225	225	TA	T	CG	C	GG	T
MA70	209-209	225	TA	T	CG	C	GT	T
MA71	209-209	225	AA	T	GG	C	GT	T
MA72	209-209	225	TA	T	CG	C	GG	T

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Continued (LG4)

LG4						
Centromere position	16.1					
Locus	MEST70		CHI-M598		CI06A02	
Location	4.2		11.4		62.4	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	217-229		GC		222-225	
Anana	217-236		GG		225-239	
MA01	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA02	229-229	217	GC	G	222-225	239
MA03	217-229	236	GC	G	°	225
MA04	217-229	217	GC	G	222-225	239
MA05	217-229	236	GG	G	222-225	225
MA06	217-229	217	GC	G	222-222	225
MA07	217-229	217	GC	G	222-225	239
MA08	217-229	217	GC	G	222-225	225
MA09	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA10	217-229	236	GC	G	225-225	225
MA11	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA12	217-229	236	GC	G	222-225	239
MA13	217-229	236	GC	G	222-222	225
MA14	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA15	217-229	217	GC	G	222-225	225
MA16	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA17	229-229	217	GC	G	222-225	225
MA18	217-229	236	GC	G	225-225	225
MA19	217-217	217	GG	G	222-222	225
MA20	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA21	217-229	236	GC	G	222-225	239
MA22	229-229	217	GC	G	222-225	239
MA23	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA24	217-229	217	GC	G	222-225	225
MA25	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA26	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA27	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA28	217-229	217	GG	G	222-222	239
MA29	217-229	217	GC	G	222-225	225
MA30	217-229	217	GC	G	222-222	239
MA31	229-229	217	GC	G	222-225	225
MA32	217-229	236	GC	G	222-222	239
MA33	217-229	217	GC	G	222-222	239
MA34	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA35	229-229	217	GC	G	222-225	239
MA36	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA37	217-229	217	GC	G	222-225	239
MA38	217-229	217	GC	G	222-225	225
MA39	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA40	217-229	236	GC	G	225-225	239

Supplementary Table III.II Continued (LG4)

Locus	LG4					
	MEST70		CHI-M598		CI06A02	
	4.2		11.4		62.4	
Location	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
MA41	229-229	217	GC	G	222-225	239
MA42	229-229	217	GC	G	222-225	239
MA43	217-217	217	GG	G	225-225	239
MA44	217-229	236	CC	G	225-225	225
MA45	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA46	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA47	217-229	217	GC	G	222-225	239
MA48	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA49	217-229	236	CC	G	225-225	239
MA50	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA51	217-229	236	GC	G	225-225	225
MA52	217-229	236	GC	G	222-225	239
MA53	217-229	236	CC	G	222-225	239
MA54	217-217	236	GG	G	222-225	239
MA55	217-229	217	GC	G	222-225	239
MA56	217-217	217	GG	G	222-222	225
MA57	217-229	236	GC	G	222-222	225
MA58	229-229	217	GC	G	222-225	239
MA59	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA60	229-229	217	GC	G	222-225	239
MA61	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA62	229-229	217	GC	G	222-225	225
MA63	217-229	236	GC	G	222-225	239
MA64	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA65	229-229	217	CC	G	222-225	239
MA66	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA67	217-229	236	GC	G	222-225	225
MA68	217-229	236	CC	G	222-225	239
MA69	229-229	217	GC	G	222-225	225
MA70	229-229	217	CC	G	222-225	239
MA71	217-229	236	GC	G	222-225	239
MA72	217-229	236	GC	G	222-225	225

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Continued (LG4)

LG4				
Centromere position	16.1			
Locus	CIC 0446-01		CI03D12a	
Location	77.8		90.1	
	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	AT		261-281	
Anana		T Null		251-261
MA01	AT	T	261-281	251
MA02	AT	T	261-281	251
MA03	AT	T	261-281	251
MA04	AT	Null	261-281	261
MA05	AT	Null	261-281	261
MA06	TT	T	261-261	251
MA07	AT	Null	261-281	261
MA08	AT	T	261-281	251
MA09	AT	Null	261-281	261
MA10	AT	Null	281-281	251
MA11	AT	T	261-281	261
MA12	AT	Null	261-281	261
MA13	AT	Null	261-281	251
MA14	AT	T	261-281	251
MA15	AT	T	261-281	251
MA16	AT	T	261-281	251
MA17	AT	T	261-281	251
MA18	AT	Null	281-281	261
MA19	AT	T	261-281	251
MA20	AT	T	261-281	251
MA21	AT	Null	261-281	251
MA22	AT	Null	261-281	251
MA23	AT	T	261-281	251
MA24	AT	T	261-281	251
MA25	AT	T	261-281	251
MA26	AT	T	261-281	251
MA27	AT	Null	281-281	261
MA28	TT	T	261-261	261
MA29	AT	T	261-281	251
MA30	AT	Null	261-281	251
MA31	AT	T	261-281	251
MA32	TT	T	261-261	261
MA33	TT	T	261-261	261
MA34	AT	T	261-281	251
MA35	AT	T	261-281	251
MA36	AT	Null	261-281	261
MA37	AT	T	261-281	251
MA38	AT	T	261-281	251
MA39	AT	T	261-281	251
MA40	AA	Null	281-281	251

Supplementary Table III.II Continued (LG4)

LG4				
Locus	CIC 0446-01		CI03D12a	
Location	77.8		90.1	
	Monc	Anana	Monc	Anana
MA41	AT	T	261-281	251
MA42	AT	Null	261-281	261
MA43	AA	Null	281-281	261
MA44	TT	T	261-261	251
MA45	AT	Null	261-281	261
MA46	AT	T	261-281	251
MA47	AA	Null	281-281	261
MA48	AT	T	261-281	251
MA49	AT	Null	261-281	261
MA50	AT	T	261-281	261
MA51	AA	T	281-281	251
MA52	AT	Null	261-281	261
MA53	TT	T	261-281	261
MA54	AT	Null	261-281	261
MA55	AT	T	261-281	251
MA56	TT	T	261-261	261
MA57	TT	T	261-261	251
MA58	TT	T	261-261	261
MA59	AT	Null	261-281	261
MA60	AT	Null	261-281	261
MA61	AT	Null	261-281	261
MA62	AT	T	261-281	251
MA63	AT	T	261-281	251
MA64	AT	T	261-281	251
MA65	AT	T	261-281	261
MA66	AT	T	261-281	251
MA67	AT	Null	261-281	261
MA68	AT	Null	261-281	261
MA69	AT	T	261-281	251
MA70	AT	T	261-281	251
MA71	AT	Null	261-281	261
MA72	-	-	261-281	251

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III II Continued (LG5)

LG5						
Centromere Position	23.1					
Locus	MEST104		CiC5842-02		CiC2417-04	
Location	35.0		71.8		103.4	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	236-238		AC		TA	
Anana		236-242		CC		TT
MA01	236-238	236	AC	C	TA	T
MA02	236-238	236	AC	C	TA	T
MA03	238-238	242	AC	C	TA	T
MA04	236-238	236	AC	C	TA	T
MA05	233-238	242	AC	C	TT	T
MA06	236-238	242	AC	C	TA	T
MA07	236-238	236	AC	C	TA	T
MA08	236-238	236	AA	C	TA	T
MA09	236-236	242	CC	C	TT	T
MA10	236-238	236	AC	C	TA	T
MA11	236-236	236	AA	C	TA	T
MA12	236-238	236	AC	C	TA	T
MA13	236-236	242	CC	C	TT	T
MA14	236-238	242	CC	C	TA	T
MA15	236-238	236	AC	C	TA	T
MA16	236-238	242	AC	C	TA	T
MA17	236-238	236	CC	C	TA	T
MA18	236-236	242	AC	C	TA	T
MA19	236-238	242	AC	C	TA	T
MA20	236-236	242	CC	C	TT	T
MA21	236-238	242	AC	C	TA	T
MA22	236-238	242	CC	C	TA	T
MA23	236-236	242	CC	C	TA	T
MA24	236-238	236	AC	C	TA	T
MA25	236-236	236	AA	C	AA	T
MA26	236-238	236	AC	C	TA	T
MA27	238-238	242	AA	C	AA	T
MA28	236-238	236	AA	C	TA	T
MA29	236-238	236	AC	C	TT	T
MA30	236-238	242	CC	C	TA	T
MA31	236-236	242	AA	C	AA	T
MA32	236-238	236	AC	C	TT	T
MA33	236-238	242	AC	C	TA	T
MA34	238-238	236	AC	C	TA	T
MA35	238-238	236	AA	C	AA	T
MA36	236-238	236	AC	C	TA	T
MA37	236-238	242	CC	C	TA	T
MA38	236-236	242	CC	C	TT	T
MA39	238-238	236	AA	C	TT	T
MA40	236-238	242	CC	C	TA	T

Supplementary Table III.II Continued (LG5)

Locus	LG5					
	MEST104		CiC5842-02		CiC2417-04	
	35.0		71.8		103.4	
Location	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
MA41	238-238	236	AC	C	TA	T
MA42	238-238	242	AA	C	AA	T
MA43	236-236	236	CC	C	TT	T
MA44	238-238	236	AA	C	AA	T
MA45	236-238	242	AC	C	TA	T
MA46	236-238	242	AC	C	TA	T
MA47	238-238	236	AA	C	TT	T
MA48	238-238	242	AC	C	TA	T
MA49	236-238	236	AA	C	AA	T
MA50	236-238	236	AC	C	TA	T
MA51	236-238	236	AC	C	TA	T
MA52	236-238	236	AA	C	AA	T
MA53	236-238	242	AA	C	AA	T
MA54	236-238	236	CC	C	TT	T
MA55	236-238	242	AC	C	TA	T
MA56	236-238	242	AC	C	TA	T
MA57	238-238	242	AC	C	TA	T
MA58	236-238	242	AA	C	AA	T
MA59	238-238	242	AC	C	TA	T
MA60	236-238	242	AC	C	TA	T
MA61	236-236	236	AC	C	TA	T
MA62	236-238	242	CC	C	TT	T
MA63	236-238	242	AC	C	TA	T
MA64	236-236	242	CC	C	TT	T
MA65	236-238	236	AC	C	TT	T
MA66	236-236	236	AC	C	TA	T
MA67	238-238	236	AA	C	AA	T
MA68	236-238	242	AC	C	TA	T
MA69	236-238	242	AC	C	TA	T
MA70	236-236	242	AA	C	AA	T
MA71	236-238	242	CC	C	TA	T
MA72	238-238	236	CC	C	TT	T

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Continued (LG6)

LG6						
Centromere Position	6.2					
Locus	C6_310721		CICC2414-01		LAPX-M238	
Location	0.3		8.1		19.2	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	TC		AG		GC	
Anana		TT		AA		CC
MA01	TC	T	AG	A	GC	C
MA02	TC	T	AG	A	GG	C
MA03	TT	T	AA	A	CC	C
MA04	TC	T	AG	A	GC	C
MA05	CC	T	GG	A	GG	C
MA06	TT	T	AA	A	CC	C
MA07	TC	T	AG	A	GC	C
MA08	TC	T	AG	A	GC	C
MA09	CC	T	GG	A	GG	C
MA10	TC	T	AG	A	GC	C
MA11	CC	T	GG	A	GG	C
MA12	CC	T	GG	A	GG	C
MA13	TC	T	AG	A	GC	C
MA14	TC	T	AG	A	GC	C
MA15	TT	T	AA	A	CC	C
MA16	TT	T	AA	A	CC	C
MA17	TT	T	AA	A	CC	C
MA18	TC	T	AG	A	GC	C
MA19	TC	T	AG	A	GC	C
MA20	TC	T	AG	A	GC	C
MA21	CC	T	GG	A	GG	C
MA22	CC	T	GG	A	GG	C
MA23	TC	T	AG	A	GC	C
MA24	TT	T	AA	A	CC	C
MA25	TT	T	AA	A	CC	C
MA26	CC	T	GG	A	GG	C
MA27	CC	T	GG	A	GG	C
MA28	TT	T	AG	A	GC	C
MA29	TT	T	AA	A	CC	C
MA30	TC	T	AG	A	GC	C
MA31	TC	T	AG	A	GC	C
MA32	TC	T	AG	A	GC	C
MA33	CC	T	GG	A	GG	C
MA34	TC	T	AG	A	GC	C
MA35	TC	T	AG	A	GC	C
MA36	TC	T	AG	A	GC	C
MA37	TC	T	AG	A	GC	C
MA38	TC	T	AG	A	GC	C
MA39	TC	T	AG	A	GC	C
MA40	TC	T	AG	A	GC	C

Supplementary Table III.II Continued (LG6)

LG6						
Locus	C6_310721		CICC2414-01		LAPX-M238	
Location	0.3		8.1		19.2	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
MA41	TT	T	AA	A	CC	C
MA42	TT	T	AA	A	CC	C
MA43	TC	T	AG	A	GC	C
MA44	CC	T	GG	A	GG	C
MA45	TC	T	AG	A	GC	C
MA46	TC	T	AG	A	GC	C
MA47	TC	T	AG	A	GC	C
MA48	CC	T	GG	A	GG	C
MA49	TT	T	AG	A	GC	C
MA50	TT	T	AA	A	CC	C
MA51	TC	T	AG	A	GC	C
MA52	TC	T	AG	A	GC	C
MA53	TC	T	AG	A	GC	C
MA54	TC	T	AG	A	GC	C
MA55	TC	T	AG	A	GC	C
MA56	TC	T	AG	A	GC	C
MA57	TC	T	AG	A	GC	C
MA58	CC	T	AG	A	GC	C
MA59	CC	T	GG	A	GG	C
MA60	TT	T	AA	A	CC	C
MA61	TC	T	AG	A	GC	C
MA62	CC	T	GG	A	GG	C
MA63	TC	T	AG	A	GC	C
MA64	TC	T	AG	A	GC	C
MA65	TT	T	AA	A	CC	C
MA66	TC	T	AG	A	GC	C
MA67	TC	T	AG	A	GC	C
MA68	TC	T	AG	A	GC	C
MA69	TC	T	AG	A	GC	C
MA70	TC	T	GG	A	GG	C
MA71	TC	T	AG	A	GC	C
MA72	TC	T	AG	A	GC	C

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Continued (LG6)

LG6				
Centromere Position	6.2			
Locus	CI02F12		AOC-M290	
Location	60.8		85.9	
	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	122-130		TC	
Anana		122-127		TT
MA01	122-130	127	TT	T
MA02	122-130	122	CC	T
MA03	122-130	122	TT	T
MA04	122-130	122	TC	T
MA05	130-130	127	TC	T
MA06	122-122	122	CC	T
MA07	122-130	127	TT	T
MA08	122-130	122	TC	T
MA09	122-130	127	TT	T
MA10	122-130	127	TC	T
MA11	122-130	127	TC	T
MA12	122-130	127	TC	T
MA13	122-130	127	TT	T
MA14	122-130	122	TC	T
MA15	122-130	127	TC	T
MA16	122-130	127	TT	T
MA17	122-130	122	CC	T
MA18	122-130	127	TC	T
MA19	122-130	127	TC	T
MA20	122-130	122	TC	T
MA21	130-130	122	TT	T
MA22	130-130	127	TT	T
MA23	130-130	127	TT	T
MA24	130-130	122	TT	T
MA25	122-122	122	TC	T
MA26	130-130	122	TC	T
MA27	122-130	122	TC	T
MA28	122-130	127	TC	T
MA29	122-122	127	CC	T
MA30	122-130	127	TC	T
MA31	130-130	127	TC	T
MA32	122-130	127	TC	T
MA33	130-130	127	TT	T
MA34	122-130	122	TC	T
MA35	122-130	122	TC	T
MA36	122-130	122	TC	T
MA37	122-130	127	TC	T
MA38	122-130	127	TC	T
MA39	122-130	122	TC	T
MA40	122-130	127	TC	T

Supplementary Table III.II Continued (LG6)

LG6				
Locus	CI02F12		AOC-M290	
Location	60.8		85.9	
	Monc	Anana	Monc	Anana
MA41	122-122	127	TC	T
MA42	122-122	127	CC	T
MA43	122-130	127	TC	T
MA44	122-130	122	TC	T
MA45	122-130	122	TC	T
MA46	122-122	122	TT	T
MA47	130-130	122	TT	T
MA48	130-130	127	TC	T
MA49	122-130	122	TT	T
MA50	122-122	127	CC	T
MA51	122-122	127	CC	T
MA52	122-122	127	CC	T
MA53	122-130	127	TC	T
MA54	122-130	127	TC	T
MA55	122-130	122	TC	T
MA56	122-130	127	TC	T
MA57	122-130	127	TC	T
MA58	122-130	127	CC	T
MA59	130-130	122	TC	T
MA60	122-130	127	TC	T
MA61	122-130	122	TT	T
MA62	130-130	123	TC	T
MA63	122-130	122	TC	T
MA64	122-130	122	TC	T
MA65	130-130	122	TC	T
MA66	122-130	122	TC	T
MA67	122-130	127	TC	T
MA68	122-130	127	TC	T
MA69	122-130	122	TC	T
MA70	122-130	127	CC	T
MA71	122-130	127	TC	T
MA72	122-130	127	TC	T

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Continued (LG7)

LG7						
Centromere Position	96.4					
Locus	MEST107		CI03B07		CI07C07	
Location	87.5		12.5		1.6	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	176-184		261-263		227-234	
Anana		176-176		263-265		238-240
MA01	184-184	176	261-265	265	227-234	238
MA02	176-184	176	265-265	263	227-227	240
MA03	176-184	176	261-265	263	227-234	238
MA04	184-184	176	265-265	263	227-234	240
MA05	176-176	176	261-265	265	234-234	238
MA06	176-184	176	265-265	263	227-234	238
MA07	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA08	176-184	176	265-265	265	227-227	238
MA09	176-184	176	261-261	263	234-234	240
MA10	184-184	176	261-265	263	227-234	240
MA11	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA12	176-184	176	261-265	265	227-234	238
MA13	176-176	176	265-265	263	227-227	240
MA14	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA15	176-184	176	261-261	263	234-234	240
MA16	176-176	176	261-265	263	227-234	240
MA17	176-184	176	261-265	265	227-234	238
MA18	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA19	176-184	176	261-265	265	227-234	240
MA20	176-176	176	265-265	265	227-227	238
MA21	184-184	176	261-261	265	234-234	238
MA22	184-184	176	261-265	265	227-234	238
MA23	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA24	176-184	176	261-265	265	227-234	240
MA25	184-184	176	261-265	263	227-234	240
MA26	176-184	176	265-265	263	227-227	238
MA27	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA28	176-184	176	261-261	263	227-234	240
MA29	176-176	176	261-261	263	227-234	240
MA30	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA31	176-176	176	261-265	263	227-234	240
MA32	176-184	176	261-261	263	234-234	240
MA33	176-184	176	261-265	263	227-234	238
MA34	176-176	176	261-261	265	234-234	238
MA35	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA36	176-176	176	261-265	265	227-234	238
MA37	184-184	176	261-265	263	227-234	240
MA38	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA39	176-184	176	261-265	263	227-234	238
MA40	176-176	176	261-261	263	234-234	240

Supplementary Table III.II Continued (LG7)

Locus	LG7					
	MEST107		CI03B07		CI07C07	
	87.5		12.5		1.6	
Location	Monc	Anana	Monc		Monc	Anana
MA41	176-176	176	265-265	265	227-227	238
MA42	184-184	176	261-265	263	227-234	240
MA43	184-184	176	261-265	265	227-234	238
MA44	176-184	176	261-265	265	227-234	238
MA45	184-184	176	261-265	263	227-234	240
MA46	176-184	176	265-265	265	227-227	238
MA47	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA48	176-176	176	261-265	265	227-234	238
MA49	176-184	176	261-265	265	227-234	238
MA50	184-184	176	265-265	263	227-227	240
MA51	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA52	176-184	176	261-261	263	234-234	240
MA53	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA54	176-184	176	265-265	263	227-227	238
MA55	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA56	176-184	176	265-265	265	227-227	238
MA57	176-184	176	261-265	265	227-234	238
MA58	176-184	176	261-261	265	234-234	238
MA59	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA60	184-184	176	261-261	263	234-234	240
MA61	176-184	176	265-265	263	227-227	238
MA62	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA63	176-184	176	261-265	263	227-234	240
MA64	184-184	176	261-261	265	227-234	238
MA65	176-184	176	265-265	263	227-227	240
MA66	184-184	176	265-265	263	234-234	240
MA67	176-184	176	265-265	263	227-234	240
MA68	184-184	176	261-261	263	234-234	238
MA69	184-184	176	261-265	265	227-234	238
MA70	184-184	176	261-265	263	227-234	240
MA71	184-184	176	265-265	263	227-227	240
MA72	176-184	176	261-265	263	227-227	240

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Continued (LG8)

LG8								
Centromere position	54.2							
Locus	CI01F04a		CIC1208-01		CI07B05		CI02C09	
Location	5.9		33.2		57.8		95.3	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	186-210		AG		203-209		248-255	
Anana		199-201		GG		217-251		248-250
MA01	186-210	199	AA	G	203-203	217	248-255	250
MA02	186-186	201	AA	G	203-203	217	255-255	248
MA03	186-210	201	AG	G	203-209	251	248-255	250
MA04	186-210	201	AG	G	203-209	217	255-255	250
MA05	186-210	201	AG	G	203-209	217	248-255	250
MA06	186-210	199	GG	G	203-209	251	248-248	248
MA07	186-210	201	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA08	186-210	199	AG	G	203-209	217	248-255	248
MA09	186-210	199	AG	G	203-209	251	255-255	250
MA10	210-210	199	AG	G	209-209	251	255-255	248
MA11	186-210	201	AG	G	203-209	217	255-255	250
MA12	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	250
MA13	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA14	186-210	199	AA	G	203-203	251	248-255	248
MA15	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA16	186-186	201	GG	G	209-209	251	248-255	248
MA17	186-210	201	AG	G	209-209	217	248-248	248
MA18	210-210	201	GG	G	209-209	217	248-248	250
MA19	186-210	201	AG	G	203-209	217	248-255	250
MA20	186-210	201	GG	G	203-209	217	248-255	248
MA21	210-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	250
MA22	186-210	201	AG	G	203-209	217	248-255	250
MA23	186-210	201	AG	G	203-209	217	248-248	248
MA24	186-210	201	GG	G	209-209	217	248-255	248
MA25	186-210	199	AG	G	203-209	217	248-255	248
MA26	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA27	186-186	199	AG	G	203-203	217	255-255	248
MA28	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA29	186-210	201	AG	G	203-209	217	248-255	248
MA30	186-186	199	AG	G	203-203	251	255-255	250
MA31	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	250
MA32	186-210	201	GG	G	203-209	217	248-248	248
MA33	210-210	201	AG	G	209-209	251	248-255	250
MA34	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA35	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA36	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	250
MA37	210-210	199	AG	G	209-209	217	248-255	248
MA38	186-210	201	AG	G	203-209	217	255-255	250
MA39	186-210	201	AG	G	203-209	217	248-248	248
MA40	186-210	199	AG	G	203-209	251	255-255	248

Supplementary Table III.II Continued (LG8)

LG8								
Locus	CI01F04a		CIC1208-01		CI07B05		CI02C09	
Location	5.9		33.2		57.8		95.3	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
MA41	186-210	201	AA	G	203-203	217	255-255	250
MA42	186-210	201	AA	G	203-209	217	255-255	250
MA43	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	250
MA44	186-186	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA45	186-186	199	AG	G	203-203	251	248-248	250
MA46	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	250
MA47	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA48	186-210	201	AA	G	203-209	217	255-255	248
MA49	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA50	210-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA51	186-210	199	AG	G	203-209	217	255-255	250
MA52	186-210	199	AG	G	203-203	251	248-255	248
MA53	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA54	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA55	186-210	201	AG	G	203-209	217	248-255	248
MA56	186-210	199	GG	G	203-209	251	248-255	250
MA57	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA58	186-186	199	AG	G	203-209	251	248-248	248
MA59	186-210	199	AA	G	203-203	251	248-255	248
MA60	186-210	199	AG	G	203-209	217	248-255	248
MA61	186-210	201	AG	G	203-209	217	248-255	250
MA62	210-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	250
MA63	186-210	201	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA64	186-210	201	AG	G	203-209	217	248-248	248
MA65	186-210	199	AG	G	203-209	251	248-255	250
MA66	186-210	201	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA67	186-210	201	AG	G	203-209	251	248-255	248
MA68	186-210	199	AG	G	203-209	217	248-255	250
MA69	186-186	199	AG	G	209-209	217	255-255	248
MA70	186-210	199	AG	G	203-209	217	248-255	250
MA71	210-210	201	GG	G	209-209	251	248-248	248
MA72	210-210	201	AG	G	203-209	217	248-248	248

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

Supplementary Table III.II Continued (LG9)

LG9						
Centromere Position	52.2					
Locus	CIC5087-01		C9_12216080		CI07F11	
Location	15.9		23.6		49.5	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
Monc	TA		AG		146-160	
Anana		A Null		AA		160-164
MA01	TA	A	AA	A	146-146	164
MA02	TA	A	AA	A	146-160	160
MA03	TA	A	AG	A	146-160	160
MA04	TT	Null	AG	A	146-160	160
MA05	TA	Null	AG	A	160-160	164
MA06	TA	Null	AG	A	160-160	164
MA07	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA08	AA	A	AG	A	146-146	164
MA09	TA	A	AG	A	146-160	160
MA10	TA	A	AG	A	146-160	160
MA11	TT	A	AG	A	146-160	164
MA12	AA	A	AG	A	146-146	160
MA13	TA	A	AG	A	146-160	164
MA14	TT	Null	AA	A	160-160	164
MA15	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA16	TA	Null	GG	A	146-160	160
MA17	TA	A	AG	A	160-160	164
MA18	AA	A	GG	A	160-160	164
MA19	TA	A	AG	A	146-160	160
MA20	TA	Null	GG	A	146-160	164
MA21	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA22	TA	Null	AG	A	160-160	164
MA23	TA	Null	AG	A	160-160	164
MA24	TT	Null	GG	A	146-160	164
MA25	AA	A	AG	A	146-146	164
MA26	AA	A	AG	A	146-160	164
MA27	AA	A	AG	A	146-146	164
MA28	TA	Null	AG	A	160-160	164
MA29	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA30	TA	A	AA	A	146-160	164
MA31	TT	A	AG	A	160-160	160
MA32	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA33	TA	A	GG	A	146-146	160
MA34	TT	A	AG	A	146-160	164
MA35	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA36	TA	A	AG	A	146-160	164
MA37	TT	Null	AG	A	160-160	160
MA38	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA39	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA40	TT	A	AG	A	146-160	164

Supplementary Table III.II Continued (LG9)

LG9						
Locus	CIC5087-01		C9_12216080		CI07F11	
Location	15.9		23.6		49.5	
	Monc	Anana	Monc	Anana	Monc	Anana
MA41	AA	A	AA	A	146-146	160
MA42	AA	A	AG	A	146-146	160
MA43	AA	A	AG	A	146-146	164
MA44	TA	Null	AG	A	146-160	160
MA45	TA	Null	AA	A	146-160	164
MA46	AA	A	AG	A	146-160	160
MA47	TT	Null	AG	A	160-160	164
MA48	TA	A	AG	A	146-160	160
MA49	AA	A	AG	A	146-146	164
MA50	TT	Null	AG	A	160-160	164
MA51	TT	Null	AG	A	146-146	164
MA52	TA	Null	AA	A	146-160	164
MA53	TA	A	AG	A	146-160	160
MA54	TA	A	AG	A	146-160	160
MA55	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA56	AA	A	GG	A	146-146	164
MA57	TA	A	AG	A	146-160	160
MA58	TA	A	AG	A	146-160	164
MA59	TA	A	AA	A	146-160	160
MA60	TT	Null	AG	A	160-160	164
MA61	TT	Null	AG	A	160-160	164
MA62	TT	A	AG	A	160-160	160
MA63	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA64	AA	A	AG	A	146-146	164
MA65	TT	Null	AG	A	160-160	160
MA66	TT	Null	AG	A	146-160	164
MA67	TT	Null	AG	A	146-160	164
MA68	TT	Null	AG	A	160-160	164
MA69	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA70	TA	Null	AG	A	146-160	164
MA71	TA	A	GG	A	146-160	160
MA72	TT	A	AG	A	146-160	160

Monc tetraploid 'Moncada' mandarin.

4. Discusión General

Antecedentes

Los programas de mejora genética de mandarinos basados en hibridación sexual tienen como objetivo generar nuevas variedades que no produzcan semillas ni induzcan la formación de semillas en otras variedades por polinización cruzada, que presenten frutos con excelentes propiedades organolépticas y que maduren a lo largo de todo el calendario de cosecha (Navarro et al., 2005, 2015; Ollitrault et al., 2008; Aleza et al., 2010b, 2012a, 2012b; Cuenca et al., 2018). La manipulación del nivel de ploidía es una estrategia fundamental para la obtención de híbridos triploides de mandarinos sin semillas ya que estos se pueden obtener directamente a partir de hibridaciones entre dos genotipos diploides, como consecuencia de la formación de gametos no reducidos (Esen and Soost, 1971b; Luro et al., 2004; Aleza et al., 2009b; Cuenca et al., 2011) o mediante hibridaciones entre parentales diploides y tetraploides ($2x \times 4x$ o $4x \times 2x$) (Cameron and Burnett, 1978; Starrantino and Recupero, 1982; Aleza et al., 2009b, 2012b, 2012a).

La citometría de flujo es una tecnología que se ha utilizado para estimar el tamaño del genoma y para determinar el nivel de ploidía de tejidos somáticos (Galbraith et al., 1983; Doležel et al., 2007; Aleza et al., 2009b; Galbraith, 2010; Navarro et al., 2015) y de granos de polen maduros de varias especies herbáce

as y leñosas (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Zhang et al., 1992a; Mishiba et al., 2000; Pichot and El Maâtaoui, 2000; Pan et al., 2004; Stehlik et al., 2007; Kron and Husband, 2012; Chung et al., 2013). En cítricos, la citometría de flujo se ha empleado para determinar el tamaño del genoma de diferentes especies (Ollitrault and Michaux-Ferrière, 1992), y para determinar el nivel de ploidía en: híbridos regenerados a partir de hibridaciones sexuales (Ollitrault et al., 1996a, 1999, Aleza et al., 2009b, 2012a, 2012b, Rouiss et al., 2017b, 2017a, 2018), en protoplastos empleados para la obtención de híbridos somáticos (Ollitrault et al., 1996b, 1999, 2000; Grosser et al., 2000), en la obtención de plantas haploides (Froelicher et al., 2007; Aleza et al., 2009b) y en la obtención de variantes somaclonales (Orbović et al., 2008; Ding et al., 2009). Sin embargo, hasta el momento no se ha aplicado para el análisis del nivel de ploidía de granos de polen maduros de genotipos diploides y euploides, debido a la inexistencia de una metodología apropiada. El desarrollo de una metodología adecuada permitirá la identificación de genotipos diploides que produzcan granos de polen no reducido, la realización de trabajos de investigación que permitan el estudio de la influencia de factores externos, como por ejemplo la temperatura, en la frecuencia de formación de granos de polen no reducidos, así como determinar los niveles de ploidía de los granos de polen producidos por genotipos triploides y tetraploides.

Por otro lado, FACS es una herramienta de gran capacidad operativa que permite a partir de poblaciones o subpoblaciones de núcleos de granos de polen su aislamiento y clasificación según su intensidad de fluorescencia y por lo tanto del nivel de ploidía (Robinson and Grégori, 2007; Carter et al., 2013; Dreissig et al., 2015, 2017) para su posterior análisis genético con marcadores moleculares. No obstante, los análisis genéticos con marcadores SSR y SNP se encuentran limitados por la escasa cantidad de ADN (fg o pg) que poseen los núcleos individualizados (Carter et al., 2013; Hou et al., 2015). Una opción para solventar este problema es el uso de kits de WGA que permiten generar μg de ADN a partir del contenido de un solo núcleo (Treff et al., 2011; de Bourcy et al., 2014). La utilización de estas dos metodologías de una forma combinada se ha aplicado recientemente con éxito para individualizar y amplificar el genoma de los núcleos de granos de polen de cebada para su posterior análisis con múltiples marcadores SNP utilizando la metodología KASPAR (Dreissig et al., 2015). En cítricos estas metodologías nunca se han aplicado y su implementación permitiría generar nuevo conocimiento sobre su biología reproductiva en aspectos relacionados con la identificación de los mecanismos implicados en la formación de gametos no reducidos de polen, para estudiar el tipo de segregación cromosómica de las plantas tetraploides sin tener que producir plantas y para la realización de estudios genéticos básicos sobre eventos de recombinación y análisis de distorsiones en la segregación.

La poliploidía en los cítricos es un fenómeno relativamente frecuente, y su explotación en el ámbito de la mejora genética de mandarinos se ha convertido en una herramienta básica para la obtención de híbridos triploides (Ollitrault et al., 2008; Kamiri et al., 2011, 2018, Aleza et al., 2012a, 2016; Cuenca et al., 2015b; Rouiss et al., 2017a). Las hibridaciones sexuales $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$ son dos estrategias que permiten obtener elevadas poblaciones de híbridos triploides, y las estructuras genéticas de estos híbridos dependen en gran medida de los modelos de segregación de los parentales tetraploides. Existen dos modelos extremos de segregación de plantas tetraploides, disómico y tetrasómico (Stebbins, 1947; Stift et al., 2008; Sybenga, 2012), aunque también se han descrito modelos de segregación intermedia (Stebbins, 1947; Sybenga, 1996; Stift et al., 2008; Jeridi et al., 2012). Con la información disponible hasta el momento (Kamiri et al., 2011, 2018; Aleza et al., 2016; Rouiss et al., 2018) se ha comprobado en cítricos que la interespecificidad y la estructura filogenómica de los parentales que originaron las plantas tetraploides influyen destacadamente en los modelos de segregación. En este sentido es clave realizar estudios con marcadores SSR y SNP que permitan determinar los modelos de segregación de los parentales tetraploides utilizados en los programas de mejora genética de mandarino para optimizar y seleccionar las estrategias más eficientes para la obtención de híbridos triploides con determinadas características. El mandarino 'Moncada' diploide (Bermejo et al., 2011) se caracteriza por la producción de frutos con excelentes propiedades organolépticas de fácil pelado y maduración tardía, lo cual lo convierte en un excelente parental para su utilización en programas de mejora genética. Aleza et al., (2009b) mediante el tratamiento de ápices microinjertados con colchicina y orizalina obtuvieron plantas

tetraploides estables de mandarina `Moncada` lo que nos ha permitido en el marco de esta tesis doctoral analizar el modelo de segregación cromosómica tanto como parental femenino y masculino y discutir sus implicaciones en los programas de mejora genética de mandarina.

En esta tesis se ha (i) desarrollado una metodología que permite determinar el nivel de ploidía mediante citometría de flujo de núcleos de granos de polen de varias especies de cítricos, (ii) mediante FACS se han aislado e individualizado núcleos de granos de polen cítricos, (iii) se ha amplificado el genoma de los núcleos de los granos de polen individualizados mediante un kit WGA, (iv) los núcleos de los granos de polen amplificados se han analizado con marcadores SSR y SNP para determinar sus estructuras genéticas así como la realización de estudios genéticos sobre los eventos de recombinación y distorsiones en la segregación y (v) se ha determinado el modo de segregación cromosómica del mandarina `Moncada` tetraploide como parental femenino y masculino.

- **Desarrollo de una nueva metodología para el análisis del nivel de ploidía e individualización de núcleos de granos de polen de genotipos diploides, triploides y tetraploides de cítricos mediante FACS y posterior amplificación genómica para su genotipado con marcadores SSR y SNP.**

En esta tesis se ha utilizado por primera vez la citometría de flujo para determinar el nivel de ploidía de poblaciones de granos de polen de diferentes especies de cítricos. Para ello se adaptó la metodología propuesta por Kron y Husband (2012) utilizada en otras especies vegetales. Esta metodología consiste en colocar las anteras dehiscentes en una solución de extracción de núcleos que se agita vigorosamente durante unos segundos para suspender los granos de polen en una solución de extracción de núcleos que posteriormente se pasa por dos filtros: un primer prefiltro, que elimina las impurezas de mayor tamaño y permite el paso de los granos de polen, y un segundo filtro de ruptura que recoge los granos de polen. En el segundo filtro, los granos de polen se frota suavemente contra la malla del filtro con una varilla de extremo redondeado durante 10 o 15 segundos. Posteriormente, se añade una solución tinción para facilitar la recolección de los núcleos liberados en un tubo. Este paso se repite una vez más y posteriormente, la solución que contiene los núcleos aislados se deja reposar durante 10 minutos en hielo para favorecer su tinción y se procesa de acuerdo con los protocolos estándar de citometría de flujo. Para lograr el éxito de esta metodología en cítricos previamente se determinó el diámetro del prefiltro y el filtro de ruptura. Se midieron los diámetros de los granos de polen de diez diferentes genotipos, los cuales incluían especies ancestrales y secundarias de cítricos. Los valores observados de los diámetros de los granos de polen fueron de 22 μm para el mínimo y de 50 μm para el máximo, lo cual permitió utilizar un prefiltro de 50 μm y el filtro de ruptura de 20 μm .

Mediante microscopía y citometría de flujo se ha demostrado que los granos de polen maduros son binucleados. Los histogramas de los granos de polen de genotipos diploides

mostraron dos picos perfectamente definidos con diferentes intensidades de fluorescencia como se ha observado en varias especies de angiospermas con polen binucleado como *Buddleia davidii*, *Solanum lycopersicum*, *Vicia faba*, *Hisbiscus spp.*, *Lilium spp.*, *Begonia spp.* (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Pan et al., 2004; Dewitte et al., 2006, 2009; Kron and Husband, 2012). El primer pico corresponde a la población de núcleos vegetativos que presentan la mitad del contenido del ADN que los núcleos de hoja mientras que el segundo pico está constituido por los núcleos generativos que contienen casi el mismo contenido en ADN que los núcleos de hoja. Esta diferencia se debe a que los núcleos generativos están en la fase G2 del ciclo de división celular (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Dewitte et al., 2009; Kron and Husband, 2012, 2015) que posteriormente, cuando se completa la mitosis, se originan dos núcleos espermáticos idénticos responsables de la doble fecundación (Berger and Twell, 2011). Únicamente se han identificado dos excepciones con picos adicionales en sus histogramas; el tangor 'CSO' y la lima 'Mexicana'. El tangor 'CSO' mostró un pico adicional de fluorescencia (1VG) equivalente a la suma de los valores fluorescencia de los núcleos vegetativos (1V) y generativos (1G). Estos resultados sugieren que los núcleos vegetativo y generativo de la misma célula permanecen unidos después de su aislamiento de los granos de polen mediante el método de ruptura y aislamiento. Además, posteriormente se demostró con marcadores SSR y SNP que las tres poblaciones de núcleos presentan el mismo origen genético.

En la lima 'Mexicana' diploide se observaron granos de polen no reducidos, ya que en el histograma se identificaron poblaciones de núcleos 2V y 2G con valores de intensidad de fluorescencia similares a los núcleos vegetativos y generativos de los granos de polen de genotipos tetraploides. La presencia de núcleos de granos de polen (2G) con el doble de contenido de ADN que los núcleos de hoja (2C) se ha observado en otras especies como por ejemplo en *Lilium spp.* y *Begonia spp.* (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Dewitte et al., 2009). También se observó una pequeña población de núcleos 4G con el doble de contenido en ADN que la población de núcleos 2G lo cual podría ser debido a la formación de gametos no reducidos dobles. Este fenómeno es inusual, aunque se ha descrito en alfalfa, como consecuencia de un fallo en la citoquinesis posterior a la meiosis, en híbridos interespecíficos de fresa (Bringhurst and Gill, 1970; McCoy and Smith, 1983; Pfeiffer and Bingham, 1983; Tavoletti et al., 2000). En este sentido se ha descrito que los híbridos interespecíficos, como la lima 'Mexicana', muestran una mayor tendencia a producir granos de polen no reducido (Van Tuyl et al., 1989; Ramanna et al., 2003; Mason et al., 2011; Chung et al., 2013; Martin et al., 2019). Curk et al. (2016) indicaron que la lima 'Tahití' se originó a partir de un gameto haploide de limón como parental femenino y un gameto diploide de lima 'Mexicana' como parental masculino lo cual apoya la hipótesis que la lima 'Mexicana' produce gametos no reducidos de polen. Hasta donde nosotros sabemos, en este trabajo es la primera vez que se identifican poblaciones de granos de polen no reducido mediante citometría de flujo.

Los genotipos triploides analizados mostraron ausencia de picos claros y bien definidos en los histogramas obtenidos. Los híbridos triploides de cítricos se caracterizan por no

presentar semillas ni inducir la formación de semillas en otras variedades por polinización cruzada ya que presentan una fertilidad muy baja tanto a nivel masculino y femenino (Aleza et al., 2010b, 2012a, 2012b). La ausencia de picos claros en los histogramas se ha demostrado que está relacionado con la no fertilidad del polen (Kron and Husband, 2012).

Los histogramas de los genotipos tetraploides analizados revelaron la presencia de dos poblaciones de núcleos, correspondiendo con los núcleos vegetativos y generativos, ya que mostraron el doble de intensidad de fluorescencia que sus núcleos homólogos en los genotipos diploides y coincidiendo con los valores de fluorescencia de los núcleos de granos de polen no reducido de lima `Mexicana`. En trabajos previos se ha descrito que las plantas autotetraploides e híbridos somáticos alotetraploides de cítricos pueden producir granos de polen con diferentes niveles de ploidía (Kamiri et al., 2009; Aleza et al., 2012a) aunque estas variantes son difíciles de identificar mediante citometría de flujo.

Una vez puesta punto una metodología para determinar el nivel de ploidía de los núcleos de granos de polen se decidió aislar individualmente los núcleos de las poblaciones identificadas con el objetivo de amplificar el genoma de cada núcleo para su posterior análisis con marcadores SSR y SNP que nos permitiera analizar el origen y la estructura genética de los núcleos de los granos de polen de genotipos diploides y tetraploides e identificar los mecanismos implicados en la formación de gametos no reducidos de lima `Mexicana`. Para el aislamiento de los núcleos individualizados se utilizó la técnica FACS y con la utilización de un kit de amplificación genómica se amplificó el genoma de los núcleos individualizados de los granos de polen. Esta metodología se aplicó previamente con éxito en la individualización y amplificación genómica de núcleos de granos de polen de cebada para el análisis con múltiples marcadores SNP (Dreissig et al., 2015). Inicialmente se aislaron núcleos de las tres poblaciones identificadas en el histograma del tangor `CSO`, núcleos 1V, 1G y 1VG, y se demostró la presencia de un solo alelo, confirmando que corresponden a núcleos de granos de polen reducidos y no a núcleos de granos de polen no reducidos. Estos resultados son de gran importancia para una correcta interpretación de los histogramas, lo que nos permite afirmar que la presencia de un segundo pico en las poblaciones de granos de polen no corresponde con la presencia de granos de polen no reducidos. Acorde a nuestro conocimiento, este es el primer estudio en cítricos en el que se demuestra con marcadores SSR y SNP que las diferentes poblaciones de núcleos (1V, 1G y 1VG) presentan la misma configuración genética, como era de esperar en las poblaciones 1V y 1G. En este sentido, se han identificado poblaciones de núcleos vegetativos y generativos en diferentes especies leñosas y herbáceas pero no se ha demostrado su configuración genética (Van Tuyl et al., 1989; Bino et al., 1990; Dewitte et al., 2009; Kron and Husband, 2012; Kreiner et al., 2017).

El uso combinado de FCAS y WGA se mostró como una metodología válida y adecuada para la individualización, amplificación genómica y genotipado con marcadores SSR y SNP de núcleos haploides de granos de polen de genotipos diploides. Con este precedente se intentó analizar si la misma metodología era válida para identificar el mecanismo implicado en la formación de gametos no reducidos de polen de lima `Mexicana` y para estudiar el

modo de segregación cromosómica de las plantas tetraploides de cítricos sin la necesidad de tener que regenerar híbridos. Para ello y como control, se aislaron y amplificaron núcleos de hojas de genotipos diploides que se analizaron con diferentes marcadores heterocigotos. Los resultados obtenidos a partir de los núcleos diploides de hoja evidenciaron una amplificación desbalanceada hacia uno de los dos alelos y por lo tanto no amplificando los alelos correspondientes en la proporción esperada (1:1). Estos resultados indican que esta metodología no es adecuada para la realización de estudios genéticos con núcleos no haploides. Diferentes estudios atribuyen este desequilibrio alélico a una amplificación sesgada del genoma que se origina en las reacciones iniciales y que posteriormente se exagera en las sucesivas reacciones (de Bourcy et al., 2014; Gawad et al., 2016; Yuan et al., 2018).

La metodología desarrollada para el análisis del nivel de ploidía de núcleos de granos de polen maduros posibilita avanzar en nuevas líneas de investigación relacionadas directamente con los programas de mejora genética de cítricos basados en la hibridación sexual. En este sentido, permitirá la identificación de parentales que produzcan granos de polen no reducido, realizar trabajos más aplicados para el estudio de factores bióticos y abióticos que puedan influir en la frecuencia de estos gametos no reducidos y para la realización de estudios genéticos más básicos relacionados con el mapeo genético, eventos de recombinación y distorsiones en las segregaciones alélicas sin la interferencia que se pudiera originar desde el momento de la polinización hasta el desarrollo del embrión cigótico.

- **Aplicación de la metodología combinada de FACS y WGA para estudios genéticos en núcleos haploides de granos de polen cítricos**

Una vez puesta a punto la metodología combinada de FACS y WGA para el análisis con marcadores SSR y SNP de los productos de amplificación de núcleos haploides individualizados de granos de polen de cítricos se estudió si esta metodología era válida para la realización de estudios genéticos más básicos y dirigidos a la identificación de los eventos de recombinación y SD.

Para el análisis de los eventos de recombinación se decidió utilizar el limón 'Eureka' diploide ya que es un híbrido interespecífico entre naranjo amargo y cidro, dos especies genéticamente distantes que permite identificar claramente los alelos de cada especie parental. Para este análisis se utilizaron 44 núcleos de polen que se genotiparon con 7 SSRs y 5 SNPs heterocigóticos y distribuidos a lo largo del cromosoma 1. Se identificaron hasta 5 eventos de recombinación en un brazo y 4 en el otro con una media de 1,97 puntos de recombinación por gameto en el cromosoma 1. Estos resultados mostraron una tendencia similar a la observada en otros trabajos que analizaron poblaciones segregantes en limón 'Eureka Frost', mandarino 'Fortune' y clementina 'Clemenules' (Cuenca et al., 2011; Aleza

et al., 2015a; Rouiss et al., 2017b). Se identificaron 5 núcleos en los que no se observó recombinación presentando la misma configuración que los parentales del limón, tres igual que el cidro y dos igual que el naranjo amargo. La frecuencia de recombinación más alta se encontró en las regiones teloméricas del cromosoma 1, mientras que las frecuencias más bajas se encontraron en zonas centroméricas. La ausencia de recombinación en regiones pericentroméricas se ha observado en clementina (Aleza et al., 2015a) y en otras especies de plantas como trigo, cebada y tomate (Sherman and Stack, 1995; Dreissig et al., 2015; Darrier et al., 2017; Blary and Jenczewski, 2019).

Se ha demostrado en otras especies que factores bióticos y abióticos pueden modificar la frecuencia de recombinación (De Storme and Geelen, 2014). Por ejemplo, en maíz las bajas temperaturas combinadas con el déficit hídrico producen un incremento significativo en la frecuencia de recombinación (De Storme and Geelen, 2014). Del mismo modo se han observado cambios en la frecuencia de recombinación en cebada y *Arabidopsis* asociados a factores térmicos (Francis et al., 2007; Higgins et al., 2012). Esta metodología nos permitiría realizar en un futuro novedosos trabajos para comprobar, por ejemplo, si las condiciones ambientales pueden jugar un papel importante en la modificación de los patrones de recombinación en cítricos lo cual sin duda alguna tendría repercusión en los programas de mejora genética de cítricos basados en hibridación sexual.

El análisis de SD se realizó en una población de núcleos de granos de polen del tangor `CSO` y en una población de híbridos diploides (`RTSO`) obtenidos a partir de la hibridación entre el tangor `RTO` como parental femenino y el tangor `CSO` como parental masculino con treinta marcadores moleculares distribuidos homogéneamente en los nueve GL del mapa genético de clementina (Ollitrault et al., 2012). El tangor `RTO` es una variedad de mandarino con excelentes propiedades organolépticas, fruta de maduración tardía y semillas no apomícticas mientras que el tangor `CSO` se caracteriza por la producción de frutos con altos contenidos en antocianos. La SD en la población de núcleos de granos de polen evidenció valores menores (13,8%) respecto a los de la población `RTSO` (20,7%). Estas diferencias en la SD concuerdan con lo observado en poblaciones segregantes de roble, algodón, *Arabidopsis*, tomate, arroz, cítricos y maíz, en las cuales se observaron valores diferentes de SD según la dirección de las hibridaciones (Xu et al., 1997, 2013a; Bernet et al., 2010; Shirasawa et al., 2010; Bodénès et al., 2016; Dai et al., 2017; Seymour et al., 2018).

Se detectó una SD sincronizada en ambas poblaciones analizadas en los marcadores 2P21022555, CX6F23 y CIC3712-01, todos ellos ubicados en el GL2, lo que podría atribuirse a una selección gamética durante la meiosis que posteriormente originará los diferentes granos de polen. En otras especies como el maíz, algodón y monkey flowers (*Mimulus sp.*) se han observado factores genéticos que influyen directamente en la viabilidad de los gametos masculinos (Dai et al., 2017; Fishman y Saunders, 2008; Xu et al., 2013). En este sentido, Fishman y Saunders (2008) demostraron en monkey flowers que el locus D afecta a la reducción de la viabilidad del polen ya que los homocigotos DD reducían su viabilidad en un 20% modificando enormemente las frecuencias alélicas de los granos de polen.

Además, loci con SD tienden a agruparse en regiones propensas a la distorsión, como se ha observado en el GL 2. Una hipótesis que permita explicar este fenómeno es la teoría GHT (de las siglas del inglés: “genetic hitchhiking theory”) en la cual la selección de un alelo para un *locus* determinado podría modificar las frecuencias alélicas en marcadores ubicados cerca de este (Luo and Xu, 2003; Li et al., 2011; Dai et al., 2017).

En cambio, en el GL 7 se observó una SD solo en la población ‘RTSO’, ya que en los marcadores MEST107, MEST202 y CIC3674-02 siempre se identificó preferencialmente uno de los alelos ($p\text{-value} = 0,000$), lo cual nos permite suponer que esta selección alélica podría estar relacionada con un sistema de selección gametofítico. Los cítricos presentan un sistema de incompatibilidad de tipo gametofítico (Soost, 1965). Recientemente se ha demostrado que este sistema es S-RNasas dependiente identificando hasta nueve genes *SLF* (S-Locus F-box genes) (Liang et al., 2020). En cítricos, la SD varía según la dirección de las hibridaciones y tienden a agruparse en ciertas regiones del genoma de tamaño variable que no están conservadas entre las distintas especies (Bernet et al., 2010; Ollitrault et al., 2012b; Raga et al., 2012). La identificación de regiones del genoma con distorsiones tiene una gran importancia en la mejora genética basada en hibridaciones sexuales, ya que los genes ubicados allí tendrán una herencia diferente a la esperada (Bernet et al., 2010; Raga et al., 2012). Sin embargo, aunque hasta el momento no se han descrito en cítricos, no se puede descartar que actúen mecanismos cigóticos o post-cigóticos causantes de la SD (Sweigart and Willis, 2012).

La aplicación de esta metodología combinada de FACS y WGA para la obtención de productos amplificados de núcleos individualizados de granos de polen haploides demuestra ser eficiente para la realización de estudios genéticos con un gran número de marcadores moleculares. En su conjunto, esta metodología representa una nueva herramienta biotecnológica que permite la realización de trabajos de investigación en aspectos relacionados con la biología reproductiva de los cítricos y su aplicación práctica en los programas de mejora genética. Además, y como perspectivas de trabajo, esta metodología podría ser de gran utilidad para la realización de proyectos de secuenciación en especies altamente heterocigóticas como los cítricos ya que podría permitir la obtención de haplotipos sin la necesidad de regenerar plantas haploides utilizando técnicas de cultivo *in vitro*, ya que en muchos casos es un tarea muy difícil con muy baja eficiencia.

- **Análisis del modo de herencia del mandarino ‘Moncada’ tetraploide como parental femenino y masculino.**

Para realizar este estudio se obtuvieron dos poblaciones de híbridos triploides, una de 72 híbridos regenerada a partir de la hibridación entre el mandarino ‘Moncada’ tetraploide como parental femenino y el mandarino ‘Anana’ diploide como parental masculino y otra población de 88 híbridos a partir del cruzamiento entre la clementina ‘Clemenules’ diploide

como parental femenino y el mandarino 'Moncada' tetraploide como parental masculino. Se estimaron los valores de restitución de la heterocigosidad parental (PHR) para cada locus como el porcentaje de híbridos triploides que presentaron gametos diploides con una configuración alélica heterocigota heredada del mandarino 'Moncada' tetraploide.

Se calcularon los valores de PHR del mandarino 'Moncada' 4x como parental masculino y femenino a nivel de gameto y marcador. A nivel de gameto y como parental femenino, el valor medio de PHR fue 0.654 ± 0.093 similar a lo observado en un trabajo previo en clementina 'Clemenules' 4x (Aleza et al., 2016). Sin embargo, como parental masculino se observó una distribución más heterogénea, con un valor medio de PHR ligeramente más bajo (0.599 ± 0.085) probablemente debido a la identificación de 14 gametos diploides con valores de PHR muy bajos, oscilando entre 0.10 y 0.40. A nivel de marcador, ambas poblaciones mostraron una distribución de PHR unimodal, aunque como parental masculino se observaron valores más bajos, debido probablemente a los gametos diploides con valores bajos de PHR. Si comparamos los valores de PHR a nivel masculino y femenino por GL, las diferencias más destacadas se observaron en los GLs 4 y 8. Como parental femenino los valores de PHR calculados fueron 0.794 ± 0.31 para el GL4 y 0.74 ± 0.06 para el GL8 mientras que como parental masculino los valores de PHR fueron 0.614 ± 0.091 y 0.614 ± 0.041 para los grupos de ligamiento 4 y 8, respectivamente.

Según estudios recientes sobre filogenia de cítricos (Curk et al., 2014, 2015, Wu et al., 2014, 2018; Oueslati et al., 2017) el genoma de los ancestros del mandarino 'Moncada', clementina 'Oroval' (*C. deliciosa* × *C. sinensis*) y mandarino 'Kara' (*C. unshiu* × *C. nobilis*) están constituidos por una estructura interespecífica en mosaico entre las especies ancestrales mandarino y pummelo. Por lo tanto, los cromosomas de este mandarino tienen una estructura interespecífica mandarino/pummelo. El mandarino 'Moncada' tetraploide como parental femenino presentó un modelo de segregación tetrasómica completa en siete de los nueve GLs (GL1, GL2, GL3, GL5, GL6, GL7, y GL9). Sin embargo, en el GL8 se observó un modelo de herencia intermedia con tendencia hacia la tetrasomía (PP=0.375) mientras que el GL4 mostró una clara herencia intermedia (PP=0.5). Como parental masculino muchos de los GL se ajustaron a un modelo de segregación tetrasómica (PP=0) excepto en los GL 5 y 6 que presentaron modelos de segregación intermedios, PP=0.215 y 0.115, respectivamente. Estas variaciones en el modo de herencia están relacionadas con la estructura filogenómica e interespecífica de los cromosomas como así lo demuestran un gran número de estudios realizados sobre los modelos de segregación de plantas tetraploides de diferentes especies de cítricos (Kamiri et al., 2011, 2018; Aleza et al., 2016; Rouiss et al., 2018). Por ejemplo, Aleza et al. (2016), estudiaron el modelo de segregación de la clementina 'Clemenules' 4x como parental femenino, compuesta también por una estructura interespecífica de mandarino/pomelo (Wu et al., 2018). Estos autores comprobaron que el modelo de segregación tetrasómica es el que mejor se ajustaba a la mayoría de los GLs. Sin embargo, comprobaron que el GL 4 se ajustaba a un modelo de herencia intermedia mientras que los GLs 6 y 8 se ajustaban al modelo de herencia intermedia con alta tendencia a la tetrasomía. Comparativamente, los resultados

encontrados para el mandarino `Moncada` tetraploide como parental femenino, muestran modelos similares de segregación para los GLs 4 y 8, aunque en el GL8 se encontró un valor de PP más alto que el calculado para clementina 'Clemenules' 4x. Asimismo, Rouiss et al. (2018) analizaron el modelo de segregación de la lima `Mexicana` tetraploide (híbrido interespecífico entre *C. micrantha* y *C. medica*, (dos especies muy alejadas filogenéticamente) y observaron un modelo de herencia preferencialmente disómico. Estos datos demuestran que la interespecificidad de los cromosomas presenta un gran impacto en los modelos de segregación. Sin embargo, respecto a las diferencias específicas por sexo, Allendorf y Danzmann (1997) encontraron grandes diferencias en salmón. Estos autores indicaron que a nivel femenino el modelo de segregación era disómico mientras que a nivel masculino observaron una mezcla entre disómico y tetrasómico.

Estas variaciones en el modo de segregación a nivel de GL según la dirección de las hibridaciones tiene importantes implicaciones en los programas de mejora genética ya que dependiendo en qué GL se encuentre un gen que controle un carácter de interés, la regulación genética del carácter y la dirección del cruzamiento, se puede obtener una segregación diferente de la esperada en la descendencia.

El mandarino `Moncada` tetraploide presentó valores significativos de DR. Como parental femenino se observaron valores significativos en cinco GLs (GL2, GL3, GL4, GL7 y GL9) y como parental masculino en seis GLs (GL2, GL3, GL4, GL5, GL6, y GL7). Si comparamos los valores de DR obtenidos a nivel femenino y masculino, el mandarino `Moncada` tetraploide presentó la misma tendencia en el GL1, GL2, GL3, GL4, GL7, y GL8. La frecuencia de DR puede oscilar entre 0 para la hipótesis de random chromosome segregation, 1/7 para la hipótesis de pure random chromatid segregation y 1/6 bajo la hipótesis de complete equational segregation (Mather 1935; Muller 1914). Valores de DR pueden diferir entre loci ya que esta variabilidad depende del cromosoma en el cual se encuentre el marcador y la posición del marcador dentro del cromosoma. Se han identificado cromosomas que presentan una mayor tendencia a la formación de multivalentes que otros (Butruille y Boiteux 2000). En este sentido varios estudios teóricos han estimado la frecuencia de DR en maíz y patata demostrando que pueden variar entre 0 y 0.30 (Fisher, 1947, 1950; Welch et al., 1960; Tai, 1982a, 1982b; Haynes and Douches, 1993; Wu et al., 2001).

Los valores significativos de DR encontrados en el mandarino `Moncada` tetraploide como parental femenino y masculino, implican una disminución en el PHR y por consiguiente en un aumento de la endogamia (Haynes and Douches, 1993). La producción de valores más elevados de homocigosidad podría ser útil para los programas de mejora genética de mandarino dirigidos a la obtención de híbridos triploides debido al potencial efecto de "limpieza" que puede tener la DR al revelar alelos nocivos o deletéreos para la selección y aumentar las configuraciones alélicas raras pero favorables que pueden detectarse mediante marcadores moleculares (Butruille and Boiteux, 2000; Bourke et al., 2015).

5. Conclusiones generales

1. Se ha puesto a punto una metodología eficiente para la determinación del nivel de ploidía de núcleos de granos de polen de cítricos mediante citometría de flujo la cual ha permitido identificar que los genotipos diploides y tetraploides presentan histogramas con dos picos correspondientes a los núcleos vegetativos y generativos. Se identificaron dos excepciones, el tangor 'CSO' y la lima 'Mexicana'. El primero produjo histogramas con tres picos, los dos primeros correspondientes a los núcleos vegetativos (1V) y generativos (1G), mientras que el tercer pico está constituido por la unión de estos dos núcleos (1VG). En cambio, en la lima 'Mexicana' se identificaron por primera vez núcleos de granos de polen no reducido.

2. La utilización combinada de la tecnología FACS junto con los kits de amplificación genómica permitió el aislamiento individualizado de núcleos de granos de polen y de hoja. Posteriormente mediante los kits de amplificación genómica se amplificó el genoma de cada núcleo individualizado obteniendo productos de amplificación que se han podido analizar con múltiples marcadores SSR y SNP.

3. El análisis con marcadores moleculares de los productos de amplificación del genoma de núcleos haploides de granos de polen del tangor 'CSO' mostraron una gran cobertura del genoma con una baja tasa de error, lo que permitió demostrar que los núcleos vegetativos (1V), generativos (1G) y los núcleos pertenecientes al tercer pico (1VG) tienen la misma configuración genética.

4. El análisis con marcadores moleculares de los productos de amplificación del genoma completo de núcleos diploides de células de hojas mostró una amplificación no balanceada de los alelos, presentando en algunos casos la amplificación preferencial de un alelo sobre el otro. Esto implica que esta metodología no es válida para identificar el mecanismo implicado en la formación de gametos no reducidos de polen ni para determinar los modelos de segregación cromosómica de los granos de polen diploides de las plantas tetraploides de cítricos.

5. Se han identificado cinco eventos de recombinación en un brazo del cromosoma 1 y cuatro en el otro, con una media de 1,97 puntos de recombinación por gameto al analizar con marcadores SSR y SNP núcleos individualizados aislados de granos de polen de limón 'Eureka'. También, se identificaron cinco núcleos con la misma configuración genética que los parentales del limón, tres como el cidro y dos como el naranjo amargo. Además, se ha evidenciado la ausencia de eventos de recombinación en regiones centroméricas y pericentroméricas aumentando hacia zonas teloméricas.

6. El análisis con marcadores SSR y SNP de los núcleos de granos de polen del tangor 'CSO' y de una población de híbridos diploides obtenida con este genotipo como parental

masculino han permitido distinguir dos patrones diferentes de distorsión en la segregación de los alelos. En el GL2 se detectó una distorsión en la segregación sincronizada en ambas poblaciones, lo que podría atribuirse a una selección gamética durante la meiosis que posteriormente originará los diferentes granos de polen. En cambio, en el GL7 se observó una distorsión en la segregación solo en la población de híbridos ya que se identificaron preferencialmente uno de los alelos, lo cual nos permite suponer que esta selección alélica podría estar relacionada con un sistema de selección gametofítica y/o de selección cigótica.

7. El análisis con marcadores moleculares de dos poblaciones de híbridos triploides obtenidas con mandarino 'Moncada' tetraploide, como parental masculino y femenino, ha demostrado que el mandarino 'Moncada' 4x presentó un modelo de segregación tetrasómica con diferencias significativas en algunos grupos de ligamiento según la dirección del cruzamiento. Como parental femenino en el GL8 se observó un modelo de herencia intermedia con tendencia hacia la tetrasomía, mientras que el GL4 mostró una clara herencia intermedia. Sin embargo, como parental masculino, en los GL 5 y 6 se identificaron modelos de segregación intermedia. Estos resultados implican que dependiendo en qué grupo de ligamiento se encuentre un gen que controle un carácter de interés, la regulación genética del carácter y la dirección del cruzamiento, se puede obtener una segregación diferente de la esperada en la descendencia

Bibliografía

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., and Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 163–176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876.
- Aguilar, E., Villalobos, W., Moreira, L., Rodríguez, C. M., Kitajima, E. W., and Rivera, C. (2005). First Report of *Xylella fastidiosa* Infecting Citrus in Costa Rica. *Plant Dis.* 89, 687–687. doi:10.1094/pd-89-0687b.
- Ahmad, R., Struss, D., and Southwick, S. M. (2003). Development and Characterization of Microsatellite Markers in Citrus. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128, 584–590. doi:10.21273/jashs.128.4.0584.
- Akutsu, M., Kitamura, S., Toda, R., Miyajima, I., and Okazaki, K. (2007). Production of 2n pollen of Asiatic hybrid lilies by nitrous oxide treatment. *Euphytica* 155, 143–152. doi:10.1007/s10681-006-9317-y.
- Aleza, P., Juárez, J., Ollitrault, P., and Navarro, L. (2009a). Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant Cell Rep.* 28, 1837–1846. doi:10.1007/s00299-009-0783-2.
- Aleza, P., Juárez, J., Hernández, M., Pina, J. A., Ollitrault, P., and Navarro, L. (2009b). Recovery and characterization of a Citrus clementina Hort. ex Tan. “Clemenules” haploid plant selected to establish the reference whole Citrus genome sequence. *BMC Plant Biol.* 9, 110. doi:10.1186/1471-2229-9-110.
- Aleza, P., Cuenca, J., Juárez, J., Pina, J. A., and Navarro, L. (2010a). ‘Garbí’ Mandarin: A New Late-maturing Triploid Hybrid. *HortScience* 45, 139–141. doi:10.21273/HORTSCI.45.1.139.
- Aleza, P., Juárez, J., Cuenca, J., Ollitrault, P., and Navarro, L. (2010b). Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x × 2x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. *Plant Cell Rep.* 29, 1023–1034. doi:10.1007/s00299-010-0888-7.
- Aleza, P., Froelicher, Y., Schwarz, S., Agustí, M., Hernández, M., Juárez, J., et al. (2011). Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Ann. Bot.* 108, 37–50. doi:10.1093/aob/mcr099.
- Aleza, P., Juárez, J., Cuenca, J., Ollitrault, P., and Navarro, L. (2012a). Extensive citrus triploid hybrid production by 2x × 4x sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Rep.* 31, 1723–1735. doi:10.1007/s00299-012-1286-0.
- Aleza, P., Juárez, J., Hernández, M., Ollitrault, P., and Navarro, L. (2012b). Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on 4x × 2x sexual hybridisations. *Tree Genet. Genomes* 8, 1293–1306. doi:10.1007/s11295-012-0515-6.
- Aleza, P., Cuenca, J., Hernández, M., Juárez, J., Navarro, L., and 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 Biol.* 15, 80. doi:10.1186/s12870-015-0464-y.
- Aleza, P. (2015). Workshop on new Mandarin varieties. in *Proceedings of the XIIIth International Citrus Congress. Acta Horticulturae*, eds. Sabater-Muñoz, B., L. Peña, P. Moreno, and L. Navarro, 193–200. doi:10.17660/ActaHortic.2015.1065.20.
- Aleza, P., Cuenca, J., Juárez, J., Navarro, L., and Ollitrault, P. (2016). Inheritance in doubled-diploid clementine and comparative study with SDR unreduced gametes of diploid clementine. *Plant Cell Rep.* 35, 1573–1586. doi:10.1007/s00299-016-1972-4.
- Allendorf, F. W., and Danzmann, R. G. (1997). Secondary Tetrasomic Segregation of MDH-B and Preferential Pairing of Homeologues in Rainbow Trout. *Genetics* 145, 1083–1092.
- Alonso Peña, J. R. (2011). *Manual de histología vegetal*. Madrid, España: Mundi Prensa.
- Anderson, C. (2000). Scion Cultivar development in Concordia, Argentina. in *9th Congress International society of Citriculture* (Orlando, Florida), 39–41.
- Anderson, C., and Garavello, M. (2013). Nuevas variedades de mandarinas. in *VII Congreso Argentino de Citricultura* (Puerto Iguazú, Misiones), 21.
- Asíns, M. J., Herrero, R., and Navarro, L. (1995). Factors affecting Citrus tree isozyme-gene expression. *Theor. Appl. Genet.* 90, 892–898. doi:10.1007/BF00222028.
- Aziz, A. N., Seabrook, J. E. A., and Tai, G. C. C. (1999). Amplification of RAPD markers from single pollen grains of diploid (2N=2X=24) potato. *Am. J. Potato Res.* 76, 179–182.
- Barker, M. S., Husband, B. C., and Pires, J. C. (2016). Spreading Winge and flying high: The evolutionary importance of polyploidy after a century of study. *Am. J. Bot.* 103, 1139–1145. doi:10.3732/ajb.1600272.
- Barkley, N. A., Roose, M. L., Krueger, R. R., and Federici, C. T. (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* 112, 1519–1531. doi:10.1007/s00122-006-0255-9.
- Barrett, H. C., and Rhodes, A. M. (1976). A Numerical Taxonomic Study of Affinity Relationships in Cultivated Citrus and Its Close Relatives. *Syst. Bot.* 1, 105. doi:10.2307/2418763.
- Barrett, H. C., and Hutchison, D. J. (1978). Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of Citrus. *Econ. Bot.* 32, 27–45. doi:10.1007/BF02906727.
- Bennett, M. D., and Leitch, I. J. (2005). “Genome Size Evolution in Plants,” in *The Evolution of the Genome*, ed. Gregory, T. R. (Elsevier), 89–162. doi:10.1016/B978-012301463-4/50004-8.
- Berger, F., Hamamura, Y., Ingouff, M., and Higashiyama, T. (2008). Double fertilization – caught in the act. *Trends Plant Sci.* 13, 437–443. doi:10.1016/j.tplants.2008.05.011.
- Berger, F., and Twell, D. (2011). Germline Specification and Function in Plants. *Annu. Rev.*

-
- Plant Biol.* 62, 461–484. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103824.
- Bermejo, A., Pardo, J., and Cano, A. (2011). Influence of Gamma Irradiation on Seedless Citrus Production: Pollen Germination and Fruit Quality. *Food Nutr. Sci.* 02, 169–180. doi:10.4236/fns.2011.23024.
- Bernet, G. P., Fernandez-Ribacoba, J., Carbonell, E. A., and Asins, M. J. (2010). Comparative genome-wide segregation analysis and map construction using a reciprocal cross design to facilitate citrus germplasm utilization. *Mol. Breed.* 25, 659–673. doi:10.1007/s11032-009-9363-y.
- Bicknell, R. A. (2004). Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. *Plant Cell* 16, S228–S245. doi:10.1105/tpc.017921.
- Bino, R. J., Tuyl, J. M. VAN, De Vries, J. N., Van Tuyl, J. M., and De Vries, J. N. (1990). Flow Cytometric determination of relative nuclear DNA contents in bicellulate and tricellulate pollen. *Ann. Bot.* 65, 3–8. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a087904.
- Blary, A., and Jenczewski, E. (2019). Manipulation of crossover frequency and distribution for plant breeding. *Theor. Appl. Genet.* 132, 575–592. doi:10.1007/s00122-018-3240-1.
- Bleckmann, A., Alter, S., Dresselhaus, T., Sabelli, P., and Yin, Y. (2014). The beginning of a seed: regulatory mechanisms of double fertilization. doi:10.3389/fpls.2014.00452.
- Bodénès, C., Chancerel, E., Ehrenmann, F., Kremer, A., and Plomion, C. (2016). High-density linkage mapping and distribution of segregation distortion regions in the oak genome. *DNA Res.* 23, 115–124. doi:10.1093/dnares/dsw001.
- Bombliès, K., Higgins, J. D., and Yant, L. (2015). Meiosis evolves: adaptation to external and internal environments. *New Phytol.* 208, 306–323. doi:10.1111/nph.13499.
- Bonferroni, C. (1936). Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. *Pubbl. del R Ist. Super. di Sci. Econ. e Commer. di Firenze* 8, 3–62.
- Bourge, M., Brown, S. C., and Siljak-Yakovlev, S. (2018). Flow cytometry as tool in plant sciences, with emphasis on genome size and ploidy level assessment. *Genet. Appl.* 2, 1. doi:10.31383/ga.vol2iss2pp1-12.
- Bourke, P. M., Voorrips, R. E., Visser, R. G. F., and Maliepaard, C. (2015). The double-reduction landscape in tetraploid potato as revealed by a high-density linkage map. *Genetics* 201, 853–863. doi:10.1534/genetics.115.181008.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88, 7–37. doi:10.4454/jpp.v88i1.828.
- Bové, J. M. (2014). Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: Will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica* 42, 579–583. doi:10.1007/s12600-014-0415-4.
- Bretagnolle, F., and Thompson, J. D. (1995). Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol.* 129, 1–22. doi:10.1111/j.1469-8137.1995.tb03005.x.
-

- Bringhurst, R. S., and Gill, T. (1970). Origin of *Fragaria* polyploids. II. Unreduced and doubled-unreduced gametes. *Am. J. Bot.* 57, 969–976. doi:10.1002/j.1537-2197.1970.tb09896.x.
- Brlansky, R. H., Davis, C. L., Lee, R. F., and Al, E. (1993). Immunogold Localization of Xylem-Inhabiting Bacteria Affecting Citrus in Argentina and Brazil *. in *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* (International Organization of Citrus Virologists), 311–319.
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234, 177–186. doi:10.1016/S0378-1119(99)00219-X.
- Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Liu, J., Mackay, S., Bailey, P., et al. (2012). Retrotransposons Control Fruit-Specific, Cold-Dependent Accumulation of Anthocyanins in Blood Oranges. *Plant Cell* 24, 1242–1255. doi:10.1105/TPC.111.095232.
- Butelli, E., Garcia-Lor, A., Licciardello, C., Casas, G. Las, Hill, L., Recupero, G. R., et al. (2017). Changes in Anthocyanin Production during Domestication of Citrus. *Plant Physiol.* 173, 2225–2242. doi:10.1104/PP.16.01701.
- Butruille, D. V., and 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6608–6613. doi:10.1073/pnas.100101097.
- Cai, X., and Xu, S. (2007). Meiosis-Driven Genome Variation in Plants. *Curr. Genomics* 8, 151–161. doi:10.2174/138920207780833847.
- Cai, L., Xi, Z., Amorim, A. M., Sugumaran, M., Rest, J. S., Liu, L., et al. (2019). Widespread ancient whole-genome duplications in Malpighiales coincide with Eocene global climatic upheaval. *New Phytol.* 221, 565–576. doi:10.1111/nph.15357.
- Cameron, J. W., and Frost, H. B. (1968). “Genetic, breeding and nucellar embryony,” in *The citrus industry. Vol I - History, Botany and Breeding*, eds. Reuther, W., L. D. Batchelor, and H. J. Webber (California, United States of America), 325–370.
- Cameron, J. W., and Burnett, R. H. (1978). Use of sexual tetraploid seed parents for production of triploid citrus hybrids. *HortScience.*, 13, 167–169.
- Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Ibañez, V., Terol, J., Talon, M., and Dopazo, J. (2015). A phylogenetic analysis of 34 chloroplast genomes elucidates the relationships between wild and domestic species within the genus citrus. *Mol. Biol. Evol.* 32, 2015–2035. doi:10.1093/molbev/msv082.
- Carputo, D., Frusciantè, L., and Peloquin, S. J. (2003). The role of 2n gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in the tuber-bearing Solanums. *Genetics* 163, 287–94.
- Carter, A. D., Bonyadi, R., and Gifford, M. L. (2013). The use of fluorescence-activated cell sorting in studying plant development and environmental responses. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 545–552. doi:10.1387/ijdb.130195mg.

- Castle, W. S. (2010). A Career Perspective on Citrus Rootstocks, Their Development, and Commercialization. *HortScience* 45, 11–15. doi:10.21273/HORTSCI.45.1.11.
- Chen, C., Bowman, K. D., Choi, Y. A., Dang, P. M., Rao, M. N., Huang, S., et al. (2008a). EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Genet. Genomes* 4, 1–10. doi:10.1007/s11295-007-0083-3.
- Chen, P. H., Pan, Y. B., and Chen, R. K. (2008b). High-throughput procedure for single pollen grain collection and polymerase chain reaction in plants. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 375–383. doi:10.1111/j.1744-7909.2007.00624.x.
- Chen, C., Lyon, M. T., O'Malley, D., Federici, C. T., Gmitter, J., Grosser, J. W., et al. (2008c). Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. *Plant Sci.* 174, 1–8. doi:10.1016/j.plantsci.2007.08.005.
- Chen, C., and Gmitter Jr, F. G. (2013). Mining of haplotype-based expressed sequence tag single nucleotide polymorphisms in citrus. *BMC Genomics* 14, 746. doi:10.1186/1471-2164-14-746.
- Choi, K., Yelina, N. E., Serra, H., and Henderson, I. R. (2008). “Quantification and Sequencing of Crossover Recombinant Molecules from Arabidopsis Pollen DNA.,” in *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*, ed. Rédei, G. P. (Dordrecht: Springer Netherlands), 842–842. doi:10.1007/978-1-4020-6754-9_7341.
- Choi, K., and Henderson, I. R. (2015). Meiotic recombination hotspots - a comparative view. *Plant J.* 83, 52–61. doi:10.1111/tpj.12870.
- Chung, M.-Y., Chung, J.-D., Ramanna, M., Van Tuyl, J. M., and Lim, K.-B. (2013). Production of Polyploids and Unreduced Gametes in *Lilium auratum* × *L. henryi* Hybrid. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 693–701. doi:10.7150/ijbs.6427.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6, 836–846. doi:10.1038/nrg1711.
- Cooper, W. C., Reece, P. C., and Furr, J. R. (1962). Citrus breeding in Florida - Past, present and future. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 75, 5–13.
- Cuenca, J., Aleza, P., Juárez, J., Pina, J. A., and Navarro, L. (2010). “Safor” mandarin: A new citrus mid-late triploid hybrid. *HortScience* 45, 977–980. doi:10.21273/hortsci.45.6.977.
- Cuenca, J., Froelicher, Y., Aleza, P., Juárez, J., Navarro, L., and 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, 462–70. doi:10.1038/hdy.2011.33.
- Cuenca, J., Aleza, P., Navarro, L., and Ollitrault, P. (2013a). Assignment of SNP allelic configuration in polyploids using competitive allele-specific PCR: application to citrus triploid progeny. *Ann. Bot.* 111, 731–742. doi:10.1093/aob/mct032.
- Cuenca, J., Aleza, P., Vicent, A., Brunel, D., Ollitrault, P., and Navarro, L. (2013b). Genetically Based Location from Triploid Populations and Gene Ontology of a 3.3-Mb Genome Region Linked to Alternaria Brown Spot Resistance in Citrus Reveal

- Clusters of Resistance Genes. *PLoS One* 8, e76755. doi:10.1371/journal.pone.0076755.
- Cuenca, J., Aleza, P., Iborra, E., Vicent, A., Ollitrault, P., and Navarro, L. (2015a). Location of a chromosome region linked to *Alternaria* brown spot resistance from the evaluation of triploid mandarin populations. *Acta Hort.* 1065, 415–425. doi:10.17660/ActaHortic.2015.1065.51.
- Cuenca, J., Aleza, P., Juárez, J., García-Lor, A., Froelicher, Y., Navarro, L., et al. (2015b). Maximum-likelihood method identifies meiotic restitution mechanism from heterozygosity transmission of centromeric loci: application in citrus. *Sci. Rep.* 5, 9897. doi:10.1038/srep09897.
- Cuenca, J., Aleza, P., Garcia-Lor, A., Ollitrault, P., and 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. *Front. Plant Sci.* 7. doi:10.3389/fpls.2016.01948.
- Cuenca, J., Garcia-Lor, A., Navarro, L., and Aleza, P. (2018). “Citrus Genetics and Breeding,” in *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits* (Cham: Springer International Publishing), 403–436. doi:10.1007/978-3-319-91944-7_11.
- Cuppen, E. (2007). Genotyping by Allele-Specific Amplification (KASPar). *Cold Spring Harb. Protoc.* 2007, pdb.prot4841. doi:10.1101/pdb.prot4841.
- Curk, F., Ancillo, G., Garcia-Lor, A., Luro, F., Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.-P., et al. (2014). Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in Citrus species: analysis of chromosome 2. *BMC Genet.* 15, 152. doi:10.1186/s12863-014-0152-1.
- Curk, F., Ancillo, G., Ollitrault, F., Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.-P., Garcia-Lor, A., et al. (2015). Nuclear Species-Diagnostic SNP Markers Mined from 454 Amplicon Sequencing Reveal Admixture Genomic Structure of Modern Citrus Varieties. *PLoS One* 10, e0125628. doi:10.1371/journal.pone.0125628.
- Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., and Ollitrault, P. (2016). Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Ann. Bot.* 117, 565–583. doi:10.1093/aob/mcw005.
- Curtolo, M., Cristofani-Yaly, M., Gazaffi, R., Takita, M. A., Figueira, A., and Machado, M. A. (2017). QTL mapping for fruit quality in Citrus using DArTseq markers. *BMC Genomics* 18, 289. doi:10.1186/s12864-017-3629-2.
- d’Erfurth, I., Jolivet, S., Froger, N., Catrice, O., Novatchkova, M., and Mercier, R. (2009). Turning Meiosis into Mitosis. *PLoS Biol.* 7, e1000124. doi:10.1371/journal.pbio.1000124.
- Dai, B., Guo, H., Huang, C., Ahmed, M. M., and Lin, Z. (2017). Identification and Characterization of Segregation Distortion Loci on Cotton Chromosome 18. *Front. Plant Sci.* 7, 2037. doi:10.3389/fpls.2016.02037.
- Dambier, D., Benyahia, H., Pensabene-Bellavia, G., Aka Kaçar, Y., Froelicher, Y., Belfalah, Z.,

- et al. (2011). Somatic hybridization for citrus rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant Cell Rep.* 30, 883–900. doi:10.1007/s00299-010-1000-z.
- Darrier, B., Rimbart, H., Balfourier, F., Pingault, L., Josselin, A.-A., Servin, B., et al. (2017). High-Resolution Mapping of Crossover Events in the Hexaploid Wheat Genome Suggests a Universal Recombination Mechanism. *Genetics* 206, 1373–1388. doi:10.1534/GENETICS.116.196014.
- Davies, F. S., and Albrigo, L. G. (1994). *Citrus*. CAB International.
- de Bourcy, C. F. A., De Vlaminck, I., Kanbar, J. N., Wang, J., Gawad, C., and Quake, S. R. (2014). A Quantitative Comparison of Single-Cell Whole Genome Amplification Methods. *PLoS One* 9, e105585. doi:10.1371/journal.pone.0105585.
- de Nettancourt, D. (1977). *Incompatibility in Angiosperms.*, eds. Frankel, R. and B.-D. G. A. E. G. Davis Berlin, Heidelberg doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- De Storme, N., Copenhaver, G. P., and Geelen, D. (2012). Production of Diploid Male Gametes in Arabidopsis by Cold-Induced Destabilization of Postmeiotic Radial Microtubule Arrays. *Plant Physiol.* 160, 1808–1826. doi:10.1104/pp.112.208611.
- De Storme, N., and Geelen, D. (2013). Sexual polyploidization in plants - cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytol.* 198, 670–684. doi:10.1111/nph.12184.
- De Storme, N., and Geelen, D. (2014). The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: Biological processes and molecular mechanisms. *Plant, Cell Environ.* 37, 1–18. doi:10.1111/pce.12142.
- Dewitte, A., Eeckhaut, T., Van Huylenbroeck, J., and Van Bockstaele, E. (2006). Flow cytometric detection of unreduced pollen in Begonia. in *Acta Horticulturae*, 107–112. doi:10.17660/ActaHortic.2006.714.12.
- Dewitte, A., Eeckhaut, T., Van Huylenbroeck, J., and Van Bockstaele, E. (2009). Occurrence of viable unreduced pollen in a Begonia collection. *Euphytica* 168, 81–94. doi:10.1007/s10681-009-9891-x.
- Dewitte, A., Van Laere, K., and Van Huylenbroeck, J. (2012). “Use of 2n gametes in plant breeding,” in *Plant breeding*, ed. Ibrokhim, Y. A. (Rijeka, Croatia: In Tech), 59–86.
- Ding, J., Deng, X.-X., Zhang, H., Cheng, Y., Xu, Q., and Liu, Q. (2009). Somaclonal variation with early juice-sac granulation obtained by inter-specific protoplast fusion in citrus. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 84, 567–573. doi:10.1080/14620316.2009.11512567.
- Distefano, G., Caruso, M., La Malfa, S., Gentile, A., and Tribulato, E. (2009a). Histological and molecular analysis of pollen–pistil interaction in clementine. *Plant Cell Rep.* 28, 1439–1451. doi:10.1007/s00299-009-0744-9.
- Distefano, G., Casas, G. Las, La Malfa, S., Gentile, A., Tribulato, E., and Herrero, M. (2009b). Pollen Tube Behavior in Different Mandarin Hybrids. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 134, 583–588. doi:10.21273/JASHS.134.6.583.
- Dolezel, J., and Bartos, J. (2005). Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear

- Genome Size. *Ann. Bot.* 95, 99–110. doi:10.1093/aob/mci005.
- Doležel, J., Greilhuber, J., and Suda, J. (2007). “Flow cytometry with plant : an Overview,” in *Flow cytometry with plant cells : analysis of genes, chromosomes and genomes*, eds. Doležel, J., J. Greilhuber, and J. Suda (Germany: Wiley-VCH), 41–66.
- Dreissig, S., Fuchs, J., Cápál, P., Kettles, N., Byrne, E., and Houben, A. (2015). Measuring meiotic crossovers via multi-locus genotyping of single pollen grains in barley. *PLoS One* 10, e0137677. doi:10.1371/journal.pone.0137677.
- Dreissig, S., Fuchs, J., Himmelbach, A., Mascher, M., and Houben, A. (2017). Sequencing of Single Pollen Nuclei Reveals Meiotic Recombination Events at Megabase Resolution and Circumvents Segregation Distortion Caused by Postmeiotic Processes. *Front. Plant Sci.* 8, 1620. doi:10.3389/fpls.2017.01620.
- Dumas, C., and Rogowsky, P. (2008). Fertilization and early seed formation. *C. R. Biol.* 331, 715–725. doi:10.1016/j.crvi.2008.07.013.
- Dutt, M., Vasconcellos, M., Song, K. J., Gmitter, F. G., and Grosser, J. W. (2010). In vitro production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. *Euphytica* 173, 235–242. doi:10.1007/s10681-009-0098-y.
- Eeckhaut, T., Leus, L., and Van Huylenbroeck, J. (2005). Exploitation of flow cytometry for plant breeding. *Acta Physiol. Plant.* 27, 743–750. doi:10.1007/s11738-005-0079-2.
- Erdtman, G. (1986). *Pollen morphology and plant taxonomy - Angiosperm*. Third. , ed. Brill, E. J. The Netherlands: Leiden.
- Esen, A., and Soost, R. (1971a). Tetraploid progenies from 2x × 4x crosses of citrus and their origin. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97, 410–414.
- Esen, A., and Soost, R. K. (1971b). Unexpected Triploids in Citrus: Their Origin, Identification, and Possible Use. *J. Hered.* 62, 329–333. doi:10.1093/oxfordjournals.jhered.a108186.
- Esen, A., and Soost, R. K. (1973). Seed Development in Citrus With Special Reference To 2x X 4x Crosses. *Am. J. Bot.* 60, 448–462. doi:10.1002/j.1537-2197.1973.tb05945.x.
- Esen, A., and Soost, R. K. (1977). Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo: endosperm ploidy ratios in Citrus. in *Primer Congreso Mundial de Citricultura. Internacioinal Society of Citriculture*. (Murcia-Valencia, Spain), 53–63.
- Esen, A., Soost, R. K., and Geraci, G. (1979). Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in Citrus. *J. Hered.* 70, 5–8. doi:10.1093/oxfordjournals.jhered.a109188.
- Esselink, G. D., Nybom, H., and 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. doi:10.1007/s00122-004-1645-5.
- Fabroni, S., Ruberto, G., and Rapisarda, P. (2012). Essential oil profiles of new Citrus hybrids, a tool for genetic citrus improvement. *J. Essent. Oil Res.* 24, 159–169. doi:10.1080/10412905.2012.659529.

- Fang, D. Q., Roose, M. L., Krueger, R. R., and 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. doi:10.1007/s001220050550.
- FAO, F. and A. O. (2019). EST: Citrus Fruit. *Citrus Fruits Stat.* 2017.
- Fariña, N. (2017). *HLB en Paraguay: experiencias en la gestión Nacional*. Paraguay: SENAVE Available at: http://web.senave.gov.py:8081/docs/libros/Libro_HLB_2017.pdf.
- Federici, C. T., Fang, D. Q., Scora, R. W., and Roose, M. L. (1998). Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 96, 812–822. doi:10.1007/s001220050807.
- Fisher, R. A. (1947). The theory of linkage in polysomic inheritance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 233, 55–87. doi:10.1098/rstb.1947.0006.
- Fisher, R. A. (1950). The Theory of Inbreeding. *J. R. Stat. Soc. Ser. A* 113, 249. doi:10.2307/2981045.
- Fishman, L., and Saunders, A. (2008). Centromere-Associated Female Meiotic Drive Entails Male Fitness Costs in Monkeyflowers. *Science (80-.)*. 322, 1559–1562. doi:10.1126/science.1161406.
- Fishman, L., and McIntosh, M. (2019). Standard Deviations: The Biological Bases of Transmission Ratio Distortion. *Annu. Rev. Genet.* 53, 347–372. doi:10.1146/annurev-genet-112618-043905.
- Fourie, P. H., Kellerman, M., Carstens, E., Schutte, G. C., Hattingh, V., Dewdney, M., et al. (2016). Citrus black spot: what have we learnt in the past four years. in *Proceedings of the 13th International Citrus Congress* (Foz do Iguacu, Brazil: International Society of Citriculture), 130–130.
- Francis, K. E., Lam, S. Y., Harrison, B. D., Bey, A. L., Berchowitz, L. E., and Copenhaver, G. P. (2007). Pollen tetrad-based visual assay for meiotic recombination in Arabidopsis. in *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 3913–3918. doi:10.1073/pnas.0608936104.
- Froelicher, Y., Bassene, J.-B., Jedidi-Neji, E., Dambier, D., Morillon, R., Bernardini, G., et al. (2007). Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Rep.* 26, 937–944. doi:10.1007/s00299-007-0314-y.
- Froelicher, Y., Dambier, D., Bassene, J. B., Costantino, G., Lotfy, S., Didout, C., et al. (2008). Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Mol. Ecol. Resour.* 8, 119–122. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01893.x.
- Froelicher, Y., Mouhaya, W., Bassene, J.-B., Costantino, G., Kamiri, M., Luro, F., et al. (2011). New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genet. Genomes* 7, 49–61. doi:10.1007/s11295-010-0314-x.
- Frost, H. B., and Soost, R. K. (1968). “Seed Reproduction: development of gametes and

- embryos,” in *The Citrus Industry. Vol. II. Anatomy, Physiology, Genetics, and Reproduction.*, eds. Reuther, W., L. D. Batchelor, and H. J. Webber (California, United States of America: University of California, Division of Agricultural Sciences), 290–320.
- Gabriel, D., Gottwald, T. R., Lopes, S. A., and Wulff, N. A. (2020). *Bacterial pathogens of citrus: Citrus canker, citrus variegated chlorosis and Huanglongbing*. Elsevier Inc. doi:10.1016/b978-0-12-812163-4.00018-8.
- Galbraith, D. W., and Shields, B. A. (1982). The effects of inhibitors of cell wall synthesis on tobacco protoplast development. *Physiol. Plant.* 55, 25–30. doi:10.1111/j.1399-3054.1982.tb00279.x.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., and Firoozabady, E. (1983). Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. *Science (80-)*. 220, 1049–1051. doi:10.1126/science.220.4601.1049.
- Galbraith, D. W. (2010). Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting in plants: the past, present, and future. *Biomédica* 30, 65–70. doi:10.7705/biomedica.v30i0.824.
- Gallais, A. (2003). *Quantitative genetics and breeding methods in autopolyploids plants*. 2nd ed. France: INRA.
- Garavello, M., Cuenca, J., Dreissig, S., Fuchs, J., Houben, A., and Aleza, P. (2019a). Assessing Ploidy Level Analysis and Single Pollen Genotyping of Diploid and Euploid Citrus Genotypes by Fluorescence-Activated Cell Sorting and Whole-Genome Amplification. *Front. Plant Sci.* 10, 1174. doi:https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01174.
- Garavello, M., Cuenca, J., Garcia-Lor, A., Ortega, N., Navarro, L., Ollitrault, P., et al. (2019b). Male and female inheritance patterns in tetraploid ‘Moncada’ mandarin. *Plant Cell Rep.* doi:10.1007/s00299-019-02494-y.
- Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., and 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. *Mol. Genet. Genomics* 287, 77–94. doi:10.1007/s00438-011-0658-4.
- Garcia-Lor, A., Curk, F., Snoussi-Trifa, H., Morillon, R., Ancillo, G., Luro, F., et al. (2013a). A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *Ann. Bot.* 111, 1–19. doi:10.1093/aob/mcs227.
- Garcia-Lor, A., Ancillo, G., Navarro, L., and Ollitrault, P. (2013b). *Citrus* (Rutaceae) SNP Markers Based on Competitive Allele-Specific PCR; Transferability Across the Aurantioideae Subfamily. *Appl. Plant Sci.* 1, 1200406. doi:10.3732/apps.1200406.
- Garcia-Lor, A., Luro, F., Ollitrault, P., and Navarro, L. (2015). Genetic diversity and population structure analysis of mandarin germplasm by nuclear, chloroplastic and mitochondrial markers. *Tree Genet. Genomes* 11, 123. doi:10.1007/s11295-015-0951-1.

- Gawad, C., Koh, W., and Quake, S. R. (2016). Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat. Rev. Genet.* 17, 175–188. doi:10.1038/nrg.2015.16.
- Gershenson, S. (1928). A new sex-ratio abnormality in *Drosophila obscura*. *Genetics* 13, 488–507.
- Gibbs, P. E. (1986). Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism? *Plant Syst. Evol.* 154, 285–323. doi:10.1007/BF00990130.
- Gmitter, F. G., Ling, X. B., and Deng, X. X. (1990). Induction of triploid Citrus plants from endosperm calli in vitro. *Theor. Appl. Genet.* 80, 785–790. doi:10.1007/BF00224192.
- Gmitter, F. J., Grosser, J., and Moore, G. (1992). "Citrus," in *Biotechnology of perennial crops*, eds. Hammerschlag, F. and R. Litz (Wallingford, Oxon, U.K), 335–369.
- Gmitter, F. G., Soneji, J. R., and Rao, M. N. (2009). "Citrus Breeding," in *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*, eds. Jain, S. M. and P. M. Priyadarshan (New York: Springer), 105–139.
- Goeman, J. J., and Solari, A. (2014). Multiple hypothesis testing in genomics. *Stat. Med.* 33, 1946–1978. doi:10.1002/sim.6082.
- Gottwald, T. R., and Irey, M. (2007). Post-hurricane Analysis of Citrus Canker II: Predictive Model Estimation of Disease Spread and Area Potentially Impacted by Various Eradication Protocols Following Catastrophic Weather Events. *Plant Heal. Prog.* 8, 22. doi:10.1094/PHP-2007-0405-01-RS.
- Graça, J. V. da, and Louzada, E. S. (2004). The Origins of Red Pigmented Grapefruits and the Development of New Varieties. in *Proceedings of the International Society of Citriculture* (Agair, Morocco), 360–374.
- Graham, J. H. (1991). Research Perspectives on Eradication of Citrus Bacterial Diseases in Florida. *Plant Dis.* 75, 1193. doi:10.1094/PD-75-1193.
- Graham, J. H. (1997). Biology of citrus. By P. SPIEGEL-ROY and E. E. GOLDSCHMIDT. 24 x 14 cm. *New Phytol.* 136, 369–373.
- Grosser, J. W., Ollitrault, P., and Olivares-Fuster, O. (2000). Invited review: Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 36, 434–449. doi:10.1007/s11627-000-0080-9.
- Grosser, J. ., Deng, X. X., and Goodrich, R. M. (2007). "Somaclonal variation in sweet orange: practical applications for variety improvement and possible causes," in *Citrus: Genetics, Breeding and Biotechnology*, ed. Khan, I. (London, UK: CABI), 219–233.
- Grosser, J. W., Alovi, M., and Louzada, E. S. (2010). "Protoplast Fusion Technology-Somatic Hybridization and Cybridization," in *Plant Cell Culture*, eds. Davey, M. R. and P. Anthony (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 175–198. doi:10.1002/9780470686522.ch10.
- Grosser, J. W., and Gmitter Jr, F. G. (2011). Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell*,

-
- Tissue Organ Cult.* 104, 343–357. doi:10.1007/s11240-010-9823-4.
- Grosser, J. W., Gmitter Jr., F. G., Dutt, M., Calovic, M., Ling, P., and Castle, B. (2015). Highlights of the University of Florida, citrus research and education center's comprehensive citrus breeding and genetics program. *Acta Hort.*, 405–413. doi:10.17660/actahortic.2015.1065.50.
- Gu, C., Liu, Q.-Z., Yang, Y.-N., Zhang, S.-J., Khan, M. A., Wu, J., et al. (2013). Inheritance of Hetero-Diploid Pollen S-Haplotype in Self-Compatible Tetraploid Chinese Cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl). *PLoS One* 8, e61219. doi:10.1371/journal.pone.0061219.
- Guerra, D., Wittmann, M. T. S., Schwarz, S. F., Souza, P. V. D. de, Gonzatto, M. P., and Weiler, R. L. (2014). Comparison between diploid and tetraploid citrus rootstocks: morphological characterization and growth evaluation. *Bragantia* 73, 1–7. doi:10.1590/brag.2014.007.
- Guo, W. W., Prasad, D., Serrano, P., Gmitter, F. ., and Grosser, J. W. (2004). Citrus somatic hybridization with potential for direct tetraploid scion cultivar development. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 79, 400–405. doi:10.1080/14620316.2004.11511780.
- Harlan, J. R., and DeWet, J. M. J. (1975). On Ö. Winge and a Prayer: The origins of polyploidy. *Bot. Rev.* 41, 361–390. doi:10.1007/BF02860830.
- Hasegawa, Y., Suyama, Y., and Seiwa, K. (2015). Variation in pollen-donor composition among pollinators in an entomophilous tree species, *Castanea crenata*, revealed by single-pollen genotyping. *PLoS One* 10, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0120393.
- Hauber, D. P., Reeves, A., and Stack, S. M. (1999). Synapsis in a natural autotetraploid. *Genome* 42, 936–949. doi:10.1139/g99-026.
- Haynes, K. G., and Douches, D. S. (1993). Estimation of the coefficient of double reduction in the cultivated tetraploid potato. *Theor. Appl. Genet.* 85, 857–862. doi:10.1007/BF00225029.
- Heller, F. O. (1973). DNA-Measurement of *Vicia faba* L. with pulse cytophotometry. *Ber. Deutsh Bot. Gesellsch* 86, 437–441. doi:https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1973.tb02427.x.
- Henrique, F. H., Zacarías, L., Rodrigo, M. J., and Latado, R. R. (2016). Sanguinea de mombuca: a novel redfleshed brazilian orange accumulating lycopene and other colorless carotenes. in *Proceedings of 13th International Citrus Congress*, eds. Mattos Jr, D., E. F. Carlos, V. M. Novelli, F. Alves de Azevedo, H. Della Coletta Filho, and P. V. Contador Zaccheo (Foz do Iguazu), 104. doi:10.1109/iceee.2011.6106712.
- Henz, R. A. (1971). 'Star Ruby', a new deep red fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics. *HortScience* 25, 54–58.
- Herrero, R., Asíns, M. J., Carbonell, E. A., and Navarro, L. (1996). Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 92, 599–609. doi:10.1007/BF00224564.
- Higgins, J. D., Perry, R. M., Barakate, A., Ramsay, L., Waugh, R., Halpin, C., et al. (2012).
-

- Spatiotemporal Asymmetry of the Meiotic Program Underlies the Predominantly Distal Distribution of Meiotic Crossovers in Barley. *Plant Cell* 24, 4096–4109. doi:10.1105/tpc.112.102483.
- Hirano, T., and Hoshino, Y. (2009). Detection of changes in the nuclear phase and evaluation of male germ units by flow cytometry during in vitro pollen tube growth in *Alstroemeria aurea*. *J. Plant Res.* 122, 225–234. doi:10.1007/s10265-008-0208-2.
- Hoang, P. T. N., Schubert, V., Meister, A., Fuchs, J., and Schubert, I. (2019). Variation in genome size, cell and nucleus volume, chromosome number and rDNA loci among duckweeds. *Sci. Rep.* 9, 3234. doi:10.1038/s41598-019-39332-w.
- Hodgson, R. W. (1968). "Horticultural Varieties of Citrus," in *The citrus industry.*, eds. Reuther, W., L. D. Batchelor, and H. J. Webber (California, Estados Unidos: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources), 450–680.
- Holm, S. (1979). A simple sequential rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6, 65–70.
- Honsho, C., Yamamura, E., Tsuruta, K., Yoshimaru, Y., Yasuda, K., Uchida, A., et al. (2012). Unreduced 2n Pollen Production in 'Nishiuchi Konatsu' Hyuganatsu as Inferred by Pollen Characteristics and Progeny Ploidy Level. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 81, 19–26. doi:10.2503/jjshs1.81.19.
- Honsho, C., Sakata, A., Tanaka, H., Ishimura, S., and Tetsumura, T. (2016). Single-pollen genotyping to estimate mode of unreduced pollen formation in *Citrus tamurana* cv. Nishiuchi Konatsu. *Plant Reprod.* 29, 189–197. doi:10.1007/s00497-016-0277-7.
- Hou, Y., Wu, K., Shi, X., Li, F., Song, L., Wu, H., et al. (2015). Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing. *Gigascience* 4, 37. doi:10.1186/s13742-015-0068-3.
- Hunter, N. (2015). Meiotic Recombination: The Essence of Heredity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a016618. doi:10.1101/cshperspect.a016618.
- Isagi, Y., and Suyama, Y. (2010). *Single-pollen genotyping.*, eds. Isagi, Y. and Y. Suyama Tokyo, Japan: Springer Science & Business Media.
- Iwamasa, M., and Iwasaki, T. (1962). On the sterility phenomenon caused by low temperatures in the Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Bull. Hortic. Res. Station.* 2, 25–46.
- Iwamasa, M. (1966). Studies on the sterility in genus *Citrus* with special reference to the seedlessness. *Bull. Hort. Res. Sta. B* 6, 1–81.
- Jackson, R. C., and Jackson, J. W. (1996). Gene segregation in autotetraploids: prediction from meiotic configurations. *Am. J. Bot.* 83, 673–678. doi:10.1002/j.1537-2197.1996.tb12756.x.
- Jeridi, M., Perrier, X., Rodier-Goud, M., Ferchichi, A., D'Hont, A., and Bakry, F. (2012). Cytogenetic evidence of mixed disomic and polysomic inheritance in an allotetraploid (AABB) *Musa* genotype. *Ann. Bot.* 110, 1593. doi:10.1093/AOB/MCS220.

- Jia, H., and Wang, N. (2014). Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves. *Plant Cell Rep.* 33, 1993–2001. doi:10.1007/s00299-014-1673-9.
- Jones, K. D., Reed, S. M., and Rinehart, T. A. (2007). Analysis of Ploidy Level and Its Effects and Fertility in *Hydrangea macrophylla*. *HortScience* 42, 483–488.
- Kakade, V., Dubey, A. K., Sharma, R. M., and Malik, S. K. (2017). Gametophytic self-incompatibility causes seedlessness in 'Kagzi Kalan' lemon (*Citrus limon*). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 92, 303–312. doi:10.1080/14620316.2016.1276415.
- Kamiri, M., Srairi, I., Ollitrault, P., and Froelicher, Y. (2009). Origin of different ploidy levels of progeny from diploid x tetraploid somatic hybrid crosses in citrus. in *International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, May 17 - 20, 2009, Saint-Malo, France, program and abstracts* (Université de Rennes 1), 20230.
- Kamiri, M., Stift, M., Srairi, I., Costantino, G., Moussadik, A. El, Hmyene, A., et al. (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 Rep.* 30, 1415–1425. doi:10.1007/s00299-011-1050-x.
- Kamiri, M., Stift, M., Costantino, G., Dambier, D., Kabbage, T., Ollitrault, P., et al. (2018). Preferential Homologous Chromosome Pairing in a Tetraploid Intergeneric Somatic Hybrid (*Citrus reticulata* + *Poncirus trifoliata*) Revealed by Molecular Marker Inheritance. *Front. Plant Sci.* 9, 1–12. doi:10.3389/fpls.2018.01557.
- Kijas, J. M. H., Thomas, M. R., Fowler, J. C. S., and Roose, M. L. (1997). Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theor. Appl. Genet.* 94, 701–706. doi:10.1007/s001220050468.
- Koltunow, A. M. (1993). Apomixis: Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. *Plant Cell* 5, 1425–1437. doi:10.1105/tpc.5.10.1425.
- Kotzé, J. M. (1981). Epidemiology and Control of Citrus Black Spot in South Africa. *Plant Dis.* 65, 945–950. doi:10.1094/PD-65-945.
- Koutecký, P., Baďurová, T., Štech, M., Košnar, J., and Karásek, J. (2011). Hybridization between diploid *Centaurea pseudophrygia* and tetraploid *C. jacea* (Asteraceae): the role of mixed pollination, unreduced gametes, and mentor effects. *Biol. J. Linn. Soc.* 104, 93–106. doi:10.1111/j.1095-8312.2011.01707.x.
- Kozaki, I., and Hirai, M. (1981). Pollen ultrastructure of citrus cultivars. in *Proceedings of the International Society of Citriculture* /, ed. Matsumoto, K. (Tokyo, Japan: Shimizu, Japan : International Society of Citriculture, 1982-1983.), 19–22.
- Krajewski, A. J., and Rabe, E. (1995). Citrus flowering: A critical evaluation. *J. Hortic. Sci.* 70, 357–374. doi:10.1080/14620316.1995.11515306.
- Kreiner, J. M., Kron, P., and Husband, B. C. (2017). Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: associations with reproductive mode, life history and genome size. *New Phytol.* 214, 879–889. doi:10.1111/nph.14423.

-
- Kron, P., Suda, J., and Husband, B. C. (2007). Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 847–876. doi:10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095504.
- Kron, P., and Husband, B. C. (2012). Using flow cytometry to estimate pollen DNA content: Improved methodology and applications. *Ann. Bot.* 110, 1067–1078. doi:10.1093/aob/mcs167.
- Kron, P., and Husband, B. C. (2015). Distinguishing 2N gamete nuclei from doublets in pollen using flow cytometry and pulse analysis. *Cytom. Part A* 87, 943–957. doi:10.1002/cyto.a.22696.
- Krueger, R., and Navarro, L. (2007). "Citrus Germplasm Resources," in *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, ed. Khan, I. A. (CABI), 370.
- Krug, C. A. (1943). Chromosome Numbers in the Subfamily Aurantioideae with Special Reference to the Genus Citrus. *Bot. Gaz.* 104, 602–611. doi:10.1086/335173.
- La Cour, L. F. (1949). Nuclear differentiation in the pollen grain. *Heredity* 3, 319–337. doi:10.1038/hdy.1949.24.
- Lambing, C., Franklin, F. C. H., and Wang, C.-J. R. (2017). Understanding and Manipulating Meiotic Recombination in Plants. *Plant Physiol.* 173, 1530–1542. doi:10.1104/pp.16.01530.
- Lander, E. S., and Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185–99.
- Lasken, R. S., and Egholm, M. (2003). Whole genome amplification: Abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends Biotechnol.* 21, 531–535. doi:10.1016/j.tibtech.2003.09.010.
- Lee, L. (1988). Citrus polyploidy - origins and potential for cultivar improvement. *Aust. J. Agric. Res.* 39, 735. doi:10.1071/AR9880735.
- Li, X., Wang, X., Wei, Y., and Brummer, E. C. (2011). Prevalence of segregation distortion in diploid alfalfa and its implications for genetics and breeding applications. *Theor. Appl. Genet.* 123, 667–679. doi:10.1007/s00122-011-1617-5.
- Li, G., Serba, D. D., Saha, M. C., Bouton, J. H., Lanzatella, C. L., and Tobias, C. M. (2014). Genetic linkage mapping and transmission ratio distortion in a three-generation four-founder population of *Panicum virgatum* (L.). *G3 (Bethesda)*. 4, 913–23. doi:10.1534/g3.113.010165.
- Li, F., De Storme, N., and Geelen, D. (2017). Dynamics of male meiotic recombination frequency during plant development using Fluorescent Tagged Lines in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 7, 42535. doi:10.1038/srep42535.
- Liang, G., Xiong, G., Guo, Q., He, Q., and Li, X. (2007). AFLP analysis and the taxonomy of Citrus. *Acta Hortic.* 760, 137–142. doi:10.17660/ActaHortic.2007.760.17.
- Liang, M., Cao, Z., Zhu, A., Liu, Y., Tao, M., Yang, H., et al. (2020). Evolution of self-compatibility by a mutant Sm-RNase in citrus. *Nat. Plants* 6, 131–142. doi:10.1038/s41477-020-0597-3.
-

- Lim, K. B., Ramanna, M. S., De Jong, J. H., Jacobsen, E., and Van Tuyl, J. M. (2001). Indeterminate meiotic restitution (IMR): A novel type of meiotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH. *Theor. Appl. Genet.* 103, 219–230. doi:10.1007/s001220100638.
- Lindholm, A. K., Dyer, K. A., Firman, R. C., Fishman, L., Forstmeier, W., Holman, L., et al. (2016). The Ecology and Evolutionary Dynamics of Meiotic Drive. doi:10.1016/j.tree.2016.02.001.
- Lopes, S. A., Frare, G. F., Camargo, L. E. A., Wulff, N. A., Teixeira, D. C., Bassanezi, R. B., et al. (2010). Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: Incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacters. *Plant Pathol.* 59, 1044–1053. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02349.x.
- Lotfy, S., Luro, F., Carreel, F., Froelicher, Y., Rist, D., and Ollitrault, P. (2003). Application of cleaved amplified polymorphic sequence method for analysis of cytoplasmic genome among Aurantioideae intergeneric somatic hybrids. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128, 225–230.
- Lu, X., Zhou, H., Pan, Y., Chen, C., Zhu, J., Chen, P., et al. (2015). Segregation analysis of microsatellite (SSR) markers in sugarcane polyploids. *Genet. Mol. Res.* 14, 18384–18395. doi:10.4238/2015.December.23.26.
- Luo, L., and Xu, S. (2003). Mapping viability loci using molecular markers. *Heredity* 90, 459–467. doi:10.1038/sj.hdy.6800264.
- Luro, F., Lorieux, M., Laigret, F., Bove, J. M., and Ollitrault, P. (1994). Genetic mapping of an intergeneric citrus hybrid using molecular markers. in *Fruits* (France: FAO), 404–408.
- Luro, F., Rist, D., and Ollitrault, P. (2001). Evaluation of Genetic Relationships in Citrus Genus by Means of Sequence Tagged Microsatellites. *Acta Hortic.*, 237–242. doi:10.17660/ActaHortic.2001.546.27.
- Luro, F., Maddy, F., Jacquemond, C., Froelicher, Y., Morillon, R., Rist, D., et al. (2004). Identification and evaluation of diployny in clementine (*Citrus Clementina*) for use in breeding. *Acta Hortic.*, 841–848. doi:10.17660/ActaHortic.2004.663.152.
- Luro, F. L., Costantino, G., Terol, J., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., et al. (2008). Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics* 9, 287. doi:10.1186/1471-2164-9-287.
- Mabberley, D. (1997). A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea* 7, 167–172. doi:10.7751/telopea19971007.
- MAPA, M. de A. P. y A. (2019). Superficies y producciones anuales de cultivos. *Datos Av. frutales Cítricos año 2018*.
- Marsden, J. E., Schwager, S. J., and May, B. (1987). Single-Locus Inheritance in the Tetraploid Treefrog *Hyla versicolor* With an Analysis of Expected Progeny Ratios in Tetraploid Organisms. *Genetics* 116.

- Martin, C., Viruel, M. A., Lora, J., and Hormaza, J. I. (2019). Polyploidy in Fruit Tree Crops of the Genus *Annona* (Annonaceae). *Front. Plant Sci.* 10, 99. doi:10.3389/fpls.2019.00099.
- Mase, N., Sawamura, Y., Yamamoto, T., Takada, N., Nishio, S., Saito, T., et al. (2014). Direct genotyping of single pollen grains of a self-compatible mutant of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) revealed inheritance of a duplicated chromosomal segment containing a second S-haplotype. *Euphytica* 200, 297–304. doi:10.1007/s10681-014-1168-3.
- Mason, A. S., Nelson, M. N., Yan, G., and Cowling, W. A. (2011). Production of viable male unreduced gametes in Brassica interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures. *BMC Plant Biol.* 11, 103. doi:10.1186/1471-2229-11-103.
- Mather, K. (1935). Reductional and equational separation of the chromosomes in bivalents and multivalents. *J. Genet.* 30, 53–78. doi:10.1007/BF02982205.
- Mather, K. (1936). Segregation and linkage in autotetraploids. *J. Genet.* 32, 287–314. doi:10.1007/BF02982683.
- Matsuki, Y., Isagi, Y., and Suyama, Y. (2007). The determination of multiple microsatellite genotypes and DNA sequences from a single pollen grain. *Mol. Ecol. Notes* 7, 194–198. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01588.x.
- Matsunaga, S., Schutze, K., Donnison, I. S., Grant, S. R., Kuroiwa, T., and Kawano, S. (1999). Single pollen typing combined with laser-mediated manipulation. *Plant J.* 20, 371–378. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00612.x.
- McClure, B., Cruz-García, F., and Romero, C. (2011). Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann. Bot.* 108, 647–658. doi:10.1093/aob/mcr179.
- McCollum, T. (2007). Update on the USDA , ARS Citrus Scion Improvement Project. *Proc. Fla. State Hort. Soc* 120, 285–287.
- McCormick, S. (1993). Male Gametophyte Development. *Plant Cell* 5, 1265–1275. doi:10.1105/tpc.5.10.1265.
- McCormick, S. (2004). Control of male gametophyte development. *Plant Cell* 16 Suppl, S142-53. doi:10.1105/tpc.016659.
- McCoy, T. J., and Smith, L. Y. (1983). Genetics, cytology, and crossing behavior of an alfalfa (*Medicago sativa*) mutant resulting in failure of the postmeiotic cytokinesis. *Can. J. Genet. Cytol.* 25, 390–397. doi:10.1139/g83-060.
- McDermott, S. R., and Noor, M. A. F. (2010). The role of meiotic drive in hybrid male sterility. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 1265–72. doi:10.1098/rstb.2009.0264.
- Meirmans, P. G., and Van Tienderen, P. H. (2013). The effects of inheritance in tetraploids on genetic diversity and population divergence. *Heredity* 110, 131–137. doi:10.1038/hdy.2012.80.
- Mézard, C. (2006). Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 34,

531–4. doi:10.1042/BST0340531.

- Mishiba, K.-I., Ando, T., Mii, M., Watanabe, H., Kokubun, H., Hashimoto, G., et al. (2000). Nuclear DNA Content as an Index Character Discriminating Taxa in the Genus *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). *Ann. Bot.* 85, 665–673. doi:10.1006/ANBO.2000.1122.
- Mok, D. W. S., and Peloquin, S. J. (1975). Three mechanisms of 2n pollen formation in diploid potatoes. *Heredity* 35, 295–302. doi:10.1038/hdy.1975.100.
- Montañola, M. J., Gambardella, A. G. M., and Mártiz, J. (2015). New low seeded mandarin (*Citrus reticulata*) and lemon (*C. limon*) selections obtained by gamma irradiation. *Acta Hort.* 1065, 543–548. doi:10.17660/ActaHortic.2015.1065.68.
- Morgan, C. H., Zhang, H., and Bomblies, K. (2017). Are the effects of elevated temperature on meiotic recombination and thermotolerance linked via the axis and synaptonemal complex? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160470. doi:10.1098/rstb.2016.0470.
- Muller, H. J. (1914). A new mode of segregation in Gregory's tetraploid primulas. *Am. Nat.* 48, 508–512.
- Nadori, E. (2004). Nadorcott mandarin: a promising new variety. in *Proceedings International Society of Citriculture*, 356–359.
- Nakamura, M. (1943). Cytological and ecological studies on the genus *Citrus*, with special reference to the occurrence of sterile pollen grains. *Mem. Fac. Sci. Agr. Taihoku Imp. Univ.* 27, 53–159.
- Navarro, L., Roistacher, C. N., and Murashine, T. (1975). Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 100, 471–479.
- Navarro, L., Pina, J. A., Juárez, J., Ballester-Olmos, J. F., Arregui, J. M., Ortega, C., et al. (2002). The Citrus Variety Improvement program in Spain in the period 1975–2001. in *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, 306–316.
- Navarro, L., Juárez Roldán, J., Cuenca, J., Olivares-Fuster, O., Aleza Gil, P., and Julve, J. (2005). Programa de obtención de híbridos triploides de mandarina en España. *Phytoma España La Rev. Prof. Sanid. Veg.*, 36–41.
- Navarro, L., Aleza, P., Cuenca, J., Juárez, J., Pina, J. A., Ortega, C., et al. (2015). The mandarin triploid breeding program in Spain. *Acta Hort.* 1065, 389–395. doi:10.17660/ActaHortic.2015.1065.48.
- Nawaschin, S. (1898). Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium Martagon* und *Fritillaria tenella*. *Bull. l'Académie Impériale des Sci.* 9, 377–382.
- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J. D. G., and Kamoun, S. (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31, 691–693. doi:10.1038/nbt.2655.
- Nesumi, H., Nakano, M., Yoshioka, T., Omura, M., and Yoshida, T. (2000). Genetic analysis of female sterility from satsuma. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 69, 192.

- Newbigin, E., Anderson, M. A., and Clarke, A. E. (1993). Gametophytic Self-Incompatibility Systems. *Plant Cell* 5, 1315–1324. doi:10.1105/tpc.5.10.1315.
- Ngo, X. B., Wakana, A., Kim, J. H., Mori, T., and Sakai, K. (2010). Estimation of self-incompatibility S genotypes of Citrus cultivars and plants based on controlled pollination with restricted number of pollen grains. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 55, 67–72.
- Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., and Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, 1155–1166. doi:10.1007/s001220051419.
- Nishiura, M. (1967). Citrus Breeding through Nucellar Seedling Selection. *ARQ Japan Agric Res Q* 2, 15–19.
- Nunney, L., Ortiz, B., Russell, S. A., Ruiz Sánchez, R., and Stouthamer, R. (2014). The Complex Biogeography of the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*: Genetic Evidence of Introductions and Subspecific Introgression in Central America. *PLoS One* 9, e112463. doi:10.1371/journal.pone.0112463.
- Ochatt, S. J. (2008). Flow cytometry in plant breeding. *Cytom. Part A* 73A, 581–598. doi:10.1002/cyto.a.20562.
- Olga, R., Agostini, J. P., Timmer, L. W., and et al (1993). Survey of Sharpshooters in Citrus Orchards with Decline Diseases in Misiones , Argentina *. in *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* (International Organization of Citrus Virologists), 320–326.
- Ollitrault, P., and Michaux-Ferrière, N. (1992). Application of flow cytometry for citrus genetic and breeding. *Int. Citrus Congr.* 7, 20.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Jacquemond, C., Allent, V., and Luro, F. (1996a). In vitro rescue and selection of spontaneous triploids by flow cytometry for easy peeler citrus breeding. in *Proceedings International Society Citriculture. Volume 2* (Sun City, Afrique du Sud: s.n.), 254–258.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Sudahono, and Luro, F. (1996b). Somatic hybridisation in citrus : some new hybrid and alloplasmic plants.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Sudahono, Mademba-Sy, F., Vanel, F., Luro, F., et al. (1999). Biotechnology for triploid mandarin breeding. in *5th world congress of the International Society of Citrus Nurserymen. Proceedings of the congress* (CIRAD), 337.
- Ollitrault, P., Vanel, F., Froelicher, Y., and Dambier, D. (2000). Creation of triploid citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. *Acta Hort.*, 191–198. doi:10.17660/ActaHortic.2000.535.23.
- Ollitrault, P., Luro, F., and Yamamoto, M. (2007). “Seedlessness and Ploidy Manipulations,” in *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, ed. Khan, I. A. (London, UK: CABI), 197–233. doi:https://doi.org/10.1017/S0014479708006820.

- Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F., and Froelicher, Y. (2008). "Ploidy Manipulation for Breeding Seedless Triploid Citrus," in *Plant Breeding Reviews* (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 323–352. doi:10.1002/9780470380130.ch7.
- Ollitrault, F., Terol, J., Pina, J. A., Navarro, L., Talon, M., and Ollitrault, P. (2010). Development of SSR markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in Citrus. *Am. J. Bot.* 97, e124–e129. doi:10.3732/ajb.1000280.
- Ollitrault, P., Terol, J., Chen, C., Federici, C., Lotfy, S., Hippolyte, I., et al. (2012a). A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics* 13, 593. doi:10.1186/1471-2164-13-593.
- Ollitrault, P., and Navarro, L. (2012a). "Citrus," in *Fruit Breeding*, eds. Badenes, M. L. and D. H. Byrne (Boston, MA: Springer US), 1–875. doi:10.1007/978-1-4419-0763-9.
- Ollitrault, P., and Navarro, L. (2012b). "Citrus," in *Fruit Breeding: Handbook of Plant Breeding*, eds. Badenes, M. and D. Byrne, 623–662.
- Ollitrault, P., Terol, J., Garcia-Lor, A., Bérard, A., Chauveau, A., Froelicher, Y., et al. (2012b). SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC Genomics* 13, 13. doi:10.1186/1471-2164-13-13.
- Omura, M., and Shimada, T. (2016). Citrus breeding, genetics and genomics in Japan. *Breed. Sci.* 66, 3–17. doi:10.1270/jsbbs.66.3.
- Orbović, V., Čalović, M., Vilorija, Z., Nielsen, B., Gmitter, F. G., Castle, W. S., et al. (2008). Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica* 161, 329–335. doi:10.1007/s10681-007-9559-3.
- Osawa, I. (1912). *Cytological and Experimental Studies in Citrus.*, ed. Osawa, I. Tokyo, Japan: Imperial University of Tokyo.
- Otto, S. P., and Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34, 401–437. doi:10.1146/annurev.genet.34.1.401.
- Oueslati, A., Salhi-Hannachi, A., Luro, F., Vignes, H., Mournet, P., and 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, e0185618. doi:10.1371/journal.pone.0185618.
- Outi, Y., Cortese, P., Santinoni, L., Palma, L., Gastaminza, G., Perez, G., et al. (2014). HLB in Argentina: a New Disease Outbreak.
- Pan, G., Zhou, Y., Fowke, L. C., and Wang, H. (2004). An efficient method for flow cytometric analysis of pollen and detection of 2n nuclei in *Brassica napus* pollen. *Plant Cell Rep.* 23, 196–202. doi:10.1007/s00299-004-0830-y.
- Pang, X. M., Hu, C. G., and Deng, X. X. (2007). Phylogenetic relationships within Citrus and its related genera as inferred from AFLP markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54, 429–

-
436. doi:10.1007/s10722-006-0005-5.
- Parducci, L., Suyama, Y., Lascoux, M., and Bennett, K. D. (2005). Ancient DNA from pollen: A genetic record of population history in Scots pine. *Mol. Ecol.* 14, 2873–2882. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02644.x.
- Parrott, W. A., Smith, R. R., and Smith, M. M. (1985). Bilateral sexual tetraploidization in red clover. *Can. J. Genet. Cytol.* 27, 64–68. doi:10.1139/g85-011.
- Peloquin, S. J., Yerk, G. L., Werner, J. E., and Darmo, E. (1989). Potato breeding with haploids and 2n gametes. *Genome* 31, 1000–1004. doi:10.1139/g89-174.
- Peña, L., Martín-Trillo, M., Juárez, J., Pina, J. A., Navarro, L., and Martínez-Zapater, J. M. (2001). Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nat. Biotechnol.* 19, 263–267. doi:10.1038/85719.
- Peña, L., Cervera, M., Fagoaga, C., Romero, J., Ballester, A., Soler, N., et al. (2008). “Citrus,” in *Compendium of Transgenic Crop Plants*, eds. Kole, C. and T. C. Hall (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 1–61.
- Peng, A., Chen, S., Lei, T., Xu, L., He, Y., Wu, L., et al. (2017). Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. *Plant Biotechnol. J.* 15, 1509–1519. doi:10.1111/pbi.12733.
- Peres, N. A. R., Agostini, J. P., and Timmer, L. W. (2003). Outbreaks of Alternaria Brown Spot of Citrus in Brazil and Argentina. *Plant Dis.* 87, 750–750. doi:10.1094/PDIS.2003.87.6.750C.
- Perrier, X., and Jacquemound-Collet, J. P. (2018). DARwin 6.0.18. Available at: <http://darwin.cirad.fr>.
- Pfeiffer, T. W., and Bingham, E. T. (1983). Abnormal meiosis in alfalfa, *Medicago sativa*: cytology of 2 N egg and 4 N pollen formation. *Can. J. Genet. Cytol.* 25, 107–112. doi:10.1139/g83-021.
- Phillips, W. D., Ranney, T. G., Touchell, D. H., and Eaker, T. A. (2016). Fertility and Reproductive Pathways of Triploid Flowering Pears (*Pyrus* sp.). *HortScience* 51, 968–971. doi:10.21273/HORTSCI.51.8.968.
- Pichot, C., and El Maïtaoui, M. (2000). Unreduced diploid nuclei in *Cupressus dupreziana* A. Camus pollen. *Theor. Appl. Genet.* 101, 574–579. doi:10.1007/s001220051518.
- Pons, E., Navarro, A., Ollitrault, P., and Peña, L. (2011). Pollen competition as a reproductive isolation barrier represses transgene flow between compatible and co-flowering citrus genotypes. *PLoS One* 6, e25810. doi:10.1371/journal.pone.0025810.
- Price, H., Hodnett, G., and Johnston, J. S. (2000). Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves Contain Compounds that Reduce Nuclear Propidium Iodide Fluorescence. *Ann. Bot.* 86, 929–934. doi:10.1006/anbo.2000.1255.
- Puite, K. J., and Ten Broeke, W. R. R. (1983). DNA staining of fixed and non-fixed plant protoplasts for flow cytometry with hoechst 33342. *Plant Sci. Lett.* 32, 79–88. doi:10.1016/0304-4211(83)90101-3.
-

- Raga, V., Bernet, G. P., Carbonell, E. A., and Asins, M. J. (2012). Segregation and linkage analyses in two complex populations derived from the citrus rootstock Cleopatra mandarin. Inheritance of seed reproductive traits. *Tree Genet. Genomes* 8, 1061–1071. doi:10.1007/s11295-012-0486-7.
- Raghavan, V. (2003). Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. *New Phytol.* 159, 565–583. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00846.x.
- Ramanna, M. S., Kuipers, A. G. J., and Jacobsen, E. (2003). Occurrence of numerically unreduced (2n) gametes in *Alstroemeria* interspecific hybrids and their significance for sexual polyploidisation. *Euphytica* 133, 95–106. doi:10.1023/A:1025652808553.
- Ramsey, J., and Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 467–501. doi:10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467.
- Ramsey, J., and Schemske, D. W. (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33, 589–639. doi:10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150437.
- Ramsey, J. (2007). Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). *Heredity* 98, 143–150. doi:10.1038/sj.hdy.6800912.
- Recupero, R.-G., and Sarrantino, A. (1982). Characterization with SEM of the pollen of some Italian lemon cultivars. *Proc. Int. Soc. Citric. / [International Citrus Congr. Novemb. 9-12, 1981, Tokyo, Japan ; K. Matsumoto, Ed.*
- Recupero, G. R., Russo, G., and Recupero, S. (2005). New Promising Citrus Triploid Hybrids Selected from Crosses between Monoembryonic Diploid Female and Tetraploid Male Parents. *HortScience* 40, 516–520. doi:10.21273/HORTSCI.40.3.516.
- Robinson, R. T. (1931). New citrus hybrids for Florida. *Hort. Soc.* 44, 110–116.
- Robinson, P. J., and Grégori, G. (2007). “Principles of Flow Cytometry,” in *Flow Cytometry with Plant Cells*, eds. Doležel, J., J. Greilhuber, and J. Suda (Germany: Wiley), 19–40. doi:10.1002/9783527610921.
- Rodrigo, M. J., Lado, J., Alós, E., Alquézar, B., Dery, O., Hirschberg, J., et al. (2019). A mutant allele of ζ-carotene isomerase (Z-ISO) is associated with the yellow pigmentation of the “pinalate” sweet orange mutant and reveals new insights into its role in fruit carotenogenesis. *BMC Plant Biol.* 19, 1–16. doi:10.1186/s12870-019-2078-2.
- Ronfort, J., Jenczewski, E., Bataillon, T., and Rousset, F. (1998). Analysis of Population Structure in Autotetraploid Species. *Genetics* 150, 921–930.
- Roose, M. L. (1988). Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in citrus breeding and systematics. in *Citriculture : proceedings of the Sixth International Citrus Congress* (Middle-East, Tel Aviv, Israel, : Rehovot, Israel : Balaban, c1989.), 6–11.
- Roose, M. L., Williams, T. E., Cameron, J. W., and Soost, R. K. (2000). ‘Gold Nugget’ Mandarin, A Seedless, Late-maturing Hybrid. *HortScience* 35, 1176–1178. doi:10.21273/HORTSCI.35.6.1176.

- Roose, M. L., Williams, T. A., Soost, R. K., and Cameron, J. W. (2002). US Patents: USPP 15,461, USPP 15,703, USPP 16,289.
- Roose, M. L., and Williams, T. E. (2007). "Mutation Breeding," in *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, ed. Khan, I. A. (London, UK: CABI), 345–352.
doi:<https://doi.org/10.1017/S0014479708006820>.
- Rosenberg, O. (1927). Die semiheterotypische teilung und ihre bedeutung für die entstehung verdoppelter chromosomenzahlen. *Hereditas* 8, 305–338.
doi:10.1111/j.1601-5223.1927.tb03165.x.
- Rouiss, H., Cuenca, J., Navarro, L., Ollitrault, P., and Aleza, P. (2017a). Tetraploid citrus progenies arising from FDR and SDR unreduced pollen in 4x X 2x hybridizations. *Tree Genet. Genomes* 13, 10. doi:10.1007/s11295-016-1094-8.
- Rouiss, H., Cuenca, J., Navarro, L., Ollitrault, P., and Aleza, P. (2017b). Unreduced Megagametophyte Production in Lemon Occurs via Three Meiotic Mechanisms, Predominantly Second-Division Restitution. *Front. Plant Sci.* 8, 1211.
doi:10.3389/fpls.2017.01211.
- Rouiss, H., Bakry, F., Froelicher, Y., Navarro, L., Aleza, P., and Ollitrault, P. (2018). Origin of *C. latifolia* and *C. aurantiifolia* triploid limes: the preferential disomic inheritance of doubled-diploid "Mexican" lime is consistent with an interploidy hybridization hypothesis. *Ann. Bot.* 121, 571–585. doi:10.1093/aob/mcx179.
- Rounsaville, T. J., Touchell, D. H., and Ranney, T. G. (2011). Fertility and reproductive pathways in diploid and triploid miscanthus sinensis. *HortScience* 46, 1353–1357.
- Ruiz, C., and Asins, M. (2003). Comparison between Poncirus and Citrus genetic linkage maps. *Theor. Appl. Genet.* 106, 826–836. doi:10.1007/s00122-002-1095-x.
- Ruiz, M., Quiñones, A., Martínez-Alcántara, B., Aleza, P., Morillon, R., Navarro, L., et al. (2016). Tetraploidy Enhances Boron-Excess Tolerance in Carrizo Citrange (*Citrus sinensis* L. Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Front. Plant Sci.* 7, 1–16.
doi:10.3389/fpls.2016.00701.
- Russo, G., Licciardello, C., Caruso, P., Russo, M. P., Paolo, D. Pietro, Recupero, G. R., et al. (2016). New CREA citrus hybrids. *Citrus Res. Technol.* 37, 98–101.
doi:10.4322/crt.ICC076.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 44, 406–425.
doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sanford, J. (1983). "Ploidy manipulations," in *Methods in Fruit Breeding*, eds. Moore, J. and J. Janick (West Lafayette, USA: Purdue University Press), 100–123.
- Saunt, J. (1990). *Citrus varieties of the world. An illustrated guide*. Sinclair International Ltd.
- Sax, K. (1935). The effect of temperature on nuclear differentiation in microspore development. *J. Arnold Arbor.* 16, 301–310.
- Schneider, H. (1968). "The anatomy of Citrus," in *The Citrus Industry - Vol. II*, eds. Reuther,

- W., L. D. Batchelor, and H. J. Webber (California, United States of America: University of California, Division of Agricultural Sciences), 2–22.
- Schubert, T. S., Rizvi, S. a, Sun, X., Gottwald, T. R., Graham, J. H., and Dixon, W. N. (2001). Meeting the challenge of Eradicating Citrus Canker in Florida—Again. *Plant Dis.* 85, 340–356. doi:10.1094/PDIS.2001.85.4.340.
- Scora, R. W. (1975). On the History and Origin of Citrus. *Bull. Torrey Bot. Club* 102, 369. doi:10.2307/2484763.
- Seker, M., Tuzcu, O., and Ollitrault, P. (2003). Comparison of nuclear DNA content of citrus rootstock populations by flow cytometry analysis. *Plant Breed.* 122, 169–172. doi:10.1046/j.1439-0523.2003.00821.x.
- SENASA (2020). HLB | Argentina.gob.ar. *Minist. Agric. Ganad. y Pesca*. Available at: <https://www.argentina.gob.ar/senasa/micrositios/hlb> [Accessed March 29, 2020].
- Seymour, D. K., Chae, E., Arioz, B. I., Koenig, D., and Weigel, D. (2018). Transmission ratio distortion is frequent in Arabidopsis thaliana controlled crosses. *Heredity* 122, 294–304. doi:10.1038/s41437-018-0107-9.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., et al. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31, 686–688. doi:10.1038/nbt.2650.
- Sherman, J. D., and Stack, S. M. (1995). Two-dimensional spreads of synaptonemal complexes from solanaceous plants. VI. High-resolution recombination nodule map for tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genetics* 141, 683–708.
- Shirasawa, K., Isobe, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Fukuoka, H., Just, D., et al. (2010). SNP Discovery and Linkage Map Construction in Cultivated Tomato. *DNA Res.* 17, 381–391. doi:10.1093/dnares/dsq024.
- Shneider, H. (1968). “Anatomy, Physiology, Genetics, and Reproduction.,” in *The Citrus Industry. Vol. II*, eds. Reuther, W., L. D. Batchelor, and H. J. Webber (University of California, Division of Agricultural Sciences), 1–23.
- Sliwinska, E., Zielinska, E., and Jedrzejczyk, I. (2005). Are seeds suitable for flow cytometric estimation of plant genome size? *Cytom. Part A* 64A, 72–79. doi:10.1002/cyto.a.20122.
- Sliwinska, E. (2018). Flow cytometry – a modern method for exploring genome size and nuclear DNA synthesis in horticultural and medicinal plant species. *Folia Hortic.* 30, 103–128. doi:10.2478/fhort-2018-0011.
- Soler, N., Plomer, M., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., et al. (2019). “Methods for Producing Transgenic Plants Resistant to CTV,” in *Citrus Tristeza Virus: Methods and Protocols*, eds. Catara, A. F., M. Bar-Joseph, and G. Licciardello (New York, NY: Springer New York), 229–243. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., and Rieseberg, L. H. (1993). Molecular Data and the Dynamic Nature of Polyploidy. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 12, 243–273.

doi:10.1080/07352689309701903.

- Soltis, D. E., Segovia-Salcedo, M. C., Jordon-Thaden, I., Majure, L., Miles, N. M., Mavrodiev, E. V., et al. (2014). Are polyploids really evolutionary dead-ends (again)? A critical reappraisal of Mayrose et al. (2011). *New Phytol.* 202, 1105–1117. doi:10.1111/nph.12756.
- Soost, R. K. (1965). Incompatibility alleles in genus *Citrus*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 87, 176–180.
- Sora, D., Kron, P., and Husband, B. C. (2016). Genetic and environmental determinants of unreduced gamete production in *Brassica napus*, *Sinapis arvensis* and their hybrids. *Heredity* 117, 440–448. doi:10.1038/hdy.2016.69.
- Souza, M. M., Palomino, G., Pereira, T. N. S., Pereira, M. G., and Viana, A. P. (2004). Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. *Hereditas* 141, 31–38. doi:10.1111/j.1601-5223.2004.01739.x.
- Spiegel-Roy, P., and Goldschmidt, E. E. (1996). *Biology of Citrus*. Cambridge: Cambridge University Press doi:10.1017/CBO9780511600548.
- Starrantino, A., and Recuperero, R. G. (1982). Citrus hybrids obtained in vitro from 2X females X 4X males. in *Proceedings of the International Society of Citriculture*, ed. Matsumoto, K. (Tokyo, Japan: Shimizu, Japan : International Society of Citriculture, 1982-1983.), 31–32.
- Starrantino, A. (1996). Tarocco Tapi a new nucellar sweet orange selection [Sicily]. Catania, Italy.
- Stebbins, G. L. (1947). Types of Polyploids: Their Classification and Significance. *Adv. Genet.* 1, 403–429. doi:10.1016/S0065-2660(08)60490-3.
- Stebbins, G. L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold Ltd., London.
- Stehlik, I., Kron, P., Barrett, S. C. H. H., and Husband, B. C. (2007). Sexing pollen reveals female bias in a dioecious plant. *New Phytol.* 175, 185–194. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02093.x.
- Stift, M., Berenos, C., Kuperus, P., and 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, 2113–23. doi:10.1534/genetics.107.085027.
- Suda, J., Kron, P., Husband, B. C., and Trávníček, P. (2007). “Flow Cytometry and Ploidy: Applications in Plant Systematics, Ecology and Evolutionary Biology,” in *Flow Cytometry with Plant Cells*, eds. Doležel, J., J. Greilhuber, and J. Suda (germany: Wiley-VCH), 103–130.
- Sugiura, A., Ohkuma, T., Choi, Y. A., Tao, R., and Tamura, M. (2000). Production of Nonaploid (2n = 9x) Japanese Persimmons (*Diospyros kaki*) by Pollination with Unreduced (2n = 6x) Pollen and Embryo Rescue Culture. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 125, 609–614. doi:10.21273/JASHS.125.5.609.

- Sun, H., Rowan, B. A., Flood, P. J., Brandt, R., Fuss, J., Hancock, A. M., et al. (2019). Linked-read sequencing of gametes allows efficient genome-wide analysis of meiotic recombination. *bioRxiv*, 484022. doi:10.1101/484022.
- Suyama, Y., Kawamuro, K., Kinoshita, I., Yoshimura, K., Tsumura, Y., and Takahara, H. (1996). DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. from Pleistocene peat.pdf. *Genes Genet. Syst.* 71, 145–149.
- Suyama, Y. (2011). "Procedure for Single-Pollen Genotyping," in *Single-Pollen Genotyping Ecological Research Monographs.*, eds. Isagi, Y. and Y. Suyama (Tokyo: Springer Japan), 7–16. doi:10.1007/978-4-431-53901-8.
- Sweigart, A. L., and Willis, J. H. (2012). Molecular evolution and genetics of postzygotic reproductive isolation in plants. *F1000 Biol. Rep.* 4, 23. doi:10.3410/B4-23.
- Swingle, W. (1943). "The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily.," in *The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily.* (University of California), 129–474.
- Swingle, W., and Reece, P. (1967). *The botany of citrus and its wild relations.* Division of Agricultural Sciences, University of California.
- Sybenga, J. (1996). Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist? *Genome* 39, 1176–1184. doi:10.1139/g96-148.
- Sybenga, J. (2012). "Cytogenetics in Genetics and Plant Breeding," in (Springer Berlin Heidelberg), 1–5. doi:10.1007/978-3-642-84083-8_1.
- Tai, G. C. C. (1982a). Estimation of double reduction and genetic parameters in autotetraploids based on $4x-2x$ and $4x-4x$ matings. *Heredity* 49, 331–335. doi:10.1038/hdy.1982.106.
- Tai, G. C. C. (1982b). Estimation of double reduction and genetic parameters of autotetraploids. *Heredity* 49, 63–70. doi:10.1038/hdy.1982.65.
- Tanaka, T. (1954). Species problem in Citrus. *Japanese Soc. Promot. Sci.*
- Tanaka, T. (1977). Fundamental discussion of Citrus classification. *Study Citrol.* 14, 1–6.
- Tanaka, I. (1997). Differentiation of generative and vegetative cells in angiosperm pollen. *Sex. Plant Reprod.* 10, 1–7. doi:10.1007/s004970050060.
- Tang, X. Y., and Luo, Z. R. (2002). Cytology of $2n$ Pollen Formation in Nonstringent Persimmon. *Agric. Sci. China* 1, 680–683. Available at: <http://www.paper.edu.cn>.
- Tavoletti, S., Bingham, E. T., Yandell, B. S., Veronesi, F., and Osborn, T. C. (1996). Half tetrad analysis in alfalfa using multiple restriction fragment length polymorphism markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10918–22. doi:10.1073/pnas.93.20.10918.
- Tavoletti, S., Pesaresi, P., Barcaccia, G., Albertini, E., and Veronesi, F. (2000). Mapping the *jp* (jumbo pollen) gene and QTLs involved in multinucleate microspore formation in diploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 101, 372–378. doi:10.1007/s001220051493.
- Terol, J., Conesa, A., Colmenero, J. M., Cercos, M., Tadeo, F., Agustí, J., et al. (2007). Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and

-
- salinity tolerance. *BMC Genomics* 8, 31. doi:10.1186/1471-2164-8-31.
- Terol, J., Naranjo, M. A., Ollitrault, P., and Talon, M. (2008). Development of genomic resources for *Citrus clementina*: characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. *BMC Genomics* 9, 423. doi:10.1186/1471-2164-9-423.
- Timmer, L. W., Zitko, S. E., and Gottwald, T. R. (1996). Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on symptomatic and asymptomatic citrus leaves under various environmental conditions. in *Proceedings International Society Citriculture. Volume 1*, 448–451.
- Torres, A. M., Soost, R. K., and Diedenhofen, U. (1978). Leaf Isozymes as Genetic Markers in *Citrus*. *Am. J. Bot.* 65, 869–881. doi:10.1002/j.1537-2197.1978.tb06149.x.
- Tran, N. T., Miles, A. K., Dietzgen, R. G., and Drenth, A. (2016). Citrus black spot: sexual reproduction provides new insights into an old problem. in *Proceedings of the 13th International Citrus Congress (Foz do Iguacu, Brazil: International Society of Citriculture)*, 128.
- Traub, H. P., and Robinson, R. T. (1937). "Improvement of subtropical fruit crops: Citrus," in *Yearbook of Agriculture* (US Department of agriculture), 749–826.
- Treff, N. R., Su, J., Tao, X., Northrop, L. E., and Scott, R. T. (2011). Single-cell whole-genome amplification technique impacts the accuracy of SNP microarray-based genotyping and copy number analyses. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 335–343. doi:10.1093/molehr/gaq103.
- Tribulato, E., and La Rosa, G. (1993). Primosole e Simeto: Due nuovi ibridi di mandarino. *Italus Hortus*, 1, 21–25.
- Van de Peer, Y., Mizrahi, E., and Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nat. Rev. Genet.* 18, 411–424. doi:10.1038/nrg.2017.26.
- Van Laere, K., Dewitte, A., Van Huylenbroeck, J., and Van Bockstaele, E. (2009). Evidence for the occurrence of unreduced gametes in interspecific hybrids of *Hibiscus*. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 84, 240–247. doi:10.1080/14620316.2009.11512511.
- Van Tuyl, J. M., de Vries, J. N., Bino, R. J., and Kwakkenbos, T. A. M. (1989). Identification of 2n-pollen producing interspecific hybrids of *Lilium* using flow cytometry. *Cytologia (Tokyo)*. 54, 737–745. doi:10.1508/cytologia.54.737.
- Vardi, A., Spiegel-Roy, P., and Elchanati, A. (1993). Mandarin tree named Mor. 378.
- Volk, G. M. (2011). "Chapter 25: Collecting pollen for genetic resources conservation," in *Collecting Plant Diversity: Technical Guidelines* -, eds. Guarino, L., V. Ramanatha Rao, and E. Golbert (Fort Collins, USA: CAB International), 1–10.
- Wakana, A., and Uemoto, S. (1987). Adventive embryogenesis in *Citrus* I. The occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. *Am. J. Bot.* 74, 517–530. doi:10.1002/j.1537-2197.1987.tb08672.x.
- Wang, J., Li, D., Shang, F., and Kang, X. (2017). High temperature-induced production of unreduced pollen and its cytological effects in *Populus*. *Sci. Rep.* 7, 5281.
-

- doi:10.1038/s41598-017-05661-x.
- Wang, Y., and Copenhaver, G. P. (2018). Meiotic Recombination: Mixing It Up in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 577–609. doi:10.1146/annurev-arplant-042817-040431.
- Welch, J. E., Jenczewski, E., Bataillon, T., Rousset, F., and Wilson, W. (1960). Linkage in Autotetraploid Maize. *Genetics* 47, 367–396.
- Weterings, K., and Russell, S. D. (2004). Experimental Analysis of the Fertilization Process. *Plant Cell* 16, S107–S118. doi:10.1105/TPC.016873.
- Williams, T., and Roose, M. (2004). 'TDE2' Mandarin hybrid (Shasta Gold® Mandarin), 'TDE3' Mandarin hybrid (Tahoe Gold® Mandarin) and 'TDE4' Mandarin hybrid (Yosemite Gold® Mandarin): three new mid and late-season triploid seedless mandarin hybrids from California. in *Proceedings of 10th international citrus congress* (Agadir, Maroc: International Society of Citriculture), 394–398.
- Wu, R., Gallo-Meagher, M., Littell, R. C., and Zeng, Z.-B. B. (2001). A general polyploid model for analyzing gene segregation in outcrossing tetraploid species. *Genetics* 159, 869–882.
- Wu, G. a., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., et al. (2014). Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat. Biotechnol.* 32, 656–662. doi:10.1038/nbt.2906.
- Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., et al. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature* 554, 311–316. doi:10.1038/nature25447.
- Xu, Y., Zhu, L., Xiao, J., Huang, N., and 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.). *Mol. Gen. Genet. MGG* 253, 535–545. doi:10.1007/s004380050355.
- Xu, X., Li, L., Dong, X., Jin, W., Melchinger, A. E., and Chen, S. (2013a). Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through in vivo induction of a maternal haploid in maize. *J. Exp. Bot.* 64, 1083–1096. doi:10.1093/jxb/ers393.
- Xu, Q., Chen, L.-L., Ruan, X., Chen, D., Zhu, A., Chen, C., et al. (2013b). The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat. Genet.* 45, 59–66. doi:10.1038/ng.2472.
- Yamamoto, M., Kubo, T., and Tominaga, S. (2006). Self- and cross-incompatibility of various citrus accessions. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 75, 372–378. doi:10.2503/jjshs.75.372.
- Yamamoto, M. (2014). Progress on studies for seedless breeding of citrus in Japan. *Adv. Hortic. Sci.* 28, 64–72. doi:10.13128/ahs-22796.
- Yinmin, Y., Yan, K., and Xianghong, Z. (1981). Studies on the pollen morphology of Citrus plants. *Sci. Agric. Sin.* 5, 23–25.
- Yuan, Y., Lee, H., Hu, H., Scheben, A., and Edwards, D. (2018). Single-Cell Genomic Analysis in Plants. *Genes (Basel)*. 9, 50. doi:10.3390/genes9010050.

-
- Zamariola, L., Tiang, C. L., De Storme, N., Pawlowski, W., and Geelen, D. (2014). Chromosome segregation in plant meiosis. *Front. Plant Sci.* 5, 279. doi:10.3389/fpls.2014.00279.
- Zhang, G., Williams, C. M., Campenot, M. K., McGann, L. E., and Cass, D. D. (1992a). Improvement of longevity and viability of sperm cells isolated from pollen of Zea mays L. *Plant Physiol.* 100, 47–53. doi:10.1104/pp.100.1.47.
- Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W., and Arnheim, N. (1992b). Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5847–51. doi:10.1073/pnas.89.13.5847.
- Zhang, S.-W., Huang, G.-X., Ding, F., He, X.-H., and Pan, J.-C. (2012). Mechanism of seedlessness in a new lemon cultivar ‘Xiangshui’ [Citrus limon (L.) Burm. F.]. *Sex. Plant Reprod.* 25, 337–345. doi:10.1007/s00497-012-0201-8.
- Zhang, S., Liang, M., Wang, N., Xu, Q., Deng, X., and Chai, L. (2018). Reproduction in woody perennial Citrus: an update on nucellar embryony and self-incompatibility. *Plant Reprod.* 31, 43–57. doi:10.1007/s00497-018-0327-4.
- Zhou, W., Tang, Z., Hou, J., Hu, N., and Yin, T. (2015). Genetic Map Construction and Detection of Genetic Loci Underlying Segregation Distortion in an Intraspecific Cross of *Populus deltoides*. *PLoS One* 10, e0126077. doi:10.1371/journal.pone.0126077.
- Zielinski, M. L., and Mittelsten Scheid, O. (2012). “Meiosis in Polyploid Plant,” in *Polyploidy and Genome Evolution*, eds. Soltis, P. S. and D. E. Soltis (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 1–415. doi:10.1007/978-3-642-31442-1.