

Resumen de la Tesis Doctoral

El género *Citrus*, perteneciente a la subfamilia Aurantioideae, abarca un número aún desconocido de especies puras, extremadamente diversas, que crecen salvajes en un amplio territorio que se extiende desde la India hasta Japón y Australia. La taxonomía y evolución de este género son cuestiones que han permanecido sin resolver durante décadas, en parte debido al origen mestizo de las variedades comerciales de cítricos y a la enorme diversidad fenotípica que existe entre ellas. Además de las especies puras, un gran número de variedades comerciales de cítricos, como mandarinas, naranjas, pomelos o limones, han sido tradicionalmente incluidas en el género *Citrus*. Hoy sabemos que los cítricos comerciales son el producto de múltiples cruces interespecíficos entre las especies puras del género que ocurrieron al inicio del proceso de domesticación del mismo. Además, la estructura básica de la filogenia del género *Citrus* ha sido publicada recientemente. Este estudio propone que las especies actuales de cítricos surgieron desde un ancestro común en un proceso de radiación rápida, desencadenado por un cambio climático global que tuvo lugar en el Mioceno tardío, hace aproximadamente 8 millones de años. Una mejor comprensión de los procesos involucrados en la evolución y posterior domesticación del género *Citrus* podría ser de utilidad para los mejoradores, además de proporcionar nuevas perspectivas dentro del ámbito de la evolución del genoma de plantas.

Para ello, se ha anclado el género *Citrus* dentro la subfamilia Aurantioideae, generando una filogenia de cítricos que incluye distintas especies pertenecientes a todos los clados de cítricos conocidos, siendo así la filogenia más completa presentada hasta la fecha. Se ha empleado un método de inferencia filogenética libre de alineamiento para generar una filogenia de las aurantioideas empleando datos de todo el genoma. Esta filogenia ha revelado que la distribución geográfica de estas especies es compatible con la existencia de varios eventos de dispersión de largo alcance, desde Asia hacia África u Oceanía. La filogenia del género *Citrus* ha sido estudiada bajo un modelo evolutivo novedoso, considerando el proceso de coalescencia profunda para que la filogenia obtenida refleje la variabilidad inherente a los procesos de radiación rápida, como es el caso del género *Citrus*. Los resultados aquí presentados sugieren que la radiación original del género *Citrus* ocurrió de una forma tan súbita que la mayoría de las especies de cítricos que existen hoy en día aparecieron de manera simultánea, migrando en varias direcciones y

colonizando prácticamente la totalidad del sudeste asiático. La datación de estos eventos ha permitido hacer nuevas propuestas sobre los eventos paleogeográficos y climatológicos que dieron lugar a estas migraciones.

Las consecuencias de la radiación de los cítricos se ven reflejadas en la enorme diversidad genética y fenotípica que existe entre las especies puras del género. Para investigar los efectos del enfriamiento global durante el Mioceno tardío en la estructura genómica de los cítricos, se ha analizado la actividad y la evolución de los retrotransposones en distintas especies de cítricos, dado que estos elementos representan una enorme fuente de variabilidad genética. La mayoría de los retrotransposones de los cítricos también se encuentran en *Severinia*, un género de las aurantioideas cuya divergencia con el ancestro de los cítricos data de hace 10 millones de años, lo que sugiere que tan sólo unas pocas familias de retrotransposones fueron adquiridas desde entonces. Sin embargo, la estimación de las tasas de inserción de los retrotransposones en las distintas especies de cítricos durante los últimos 15 millones de años sugiere que, poco después de la radiación de los cítricos, la actividad de estos elementos sufrió cambios drásticos incluso entre especies próximas. Por tanto, es posible que dicha actividad esté ligada al estrés causado por el enfriamiento global a finales del Mioceno, aunque también parece verse afectada por las condiciones evolutivas particulares de cada una de las especies estudiadas. De todo esto se deduce que la actividad de los retrotransposones podría estar sustancialmente asociada al proceso de la especiación de los cítricos.

Por último, también se ha estudiado la expresión génica diferencial en cítricos de variedades domesticadas y especies puras, para así elucidar cómo las hibridaciones interespecíficas que generaron las variedades comerciales de cítricos alteraron la expresión de genes clave en la domesticación de este género. Los datos obtenidos sugieren que estas hibridaciones jugaron un papel esencial en este proceso, posiblemente en conjunción con la propagación clonal de los individuos híbridos o mestizos. Los resultados también han permitido proponer un mecanismo que explica la acidez de la pulpa de cidros y limones basado en el flujo de protones al lumen vacuolar. Por otra parte, el color de la piel de los cítricos no parece estar controlado por un único gen o mecanismo, sino que el efecto aditivo de varios genes en conjunto parece determinar la concentración final de carotenoides. Finalmente, se ha encontrado una copia del gen de la chalcona sintasa, enzima limitante en la ruta de biosíntesis de flavonoides, que tan solo se expresa en mandarinas y variedades derivadas. Esto permite sugerir la existencia de un proceso

evolutivo escalonado para el perfil de acumulación de flavonoides de las mandarinas. En resumen, la estrategia de análisis transcriptómico empleada en este trabajo ha permitido generar hipótesis más amplias que se sostienen para todo el género *Citrus*.

A lo largo de esta Tesis Doctoral se han empleado diversas estrategias genómicas para ampliar el conocimiento existente sobre los procesos que dirigieron la evolución, diversificación y domesticación de los cítricos. Los resultados presentados aportan un marco de trabajo global para las relaciones filogenéticas del género *Citrus*. Estos análisis se completan con el descubrimiento de la asociación entre los transposones y la especiación de los cítricos, y con el estudio de la expresión génica durante el proceso de maduración en cítricos salvajes y domesticados, y cómo esto se asocia con sus rasgos fenotípicos. Los datos presentados en este trabajo revelan la complejidad inherente a la historia evolutiva de este género tan fascinante.