

RESUMEN

Desde el origen de los cítricos, hibridaciones naturales ancestrales, miles de años de cultivo y fenómenos de mestizaje han dado como resultado la complejidad de la biología reproductiva de los cítricos cultivados hoy en día, que a menudo involucra esterilidad femenina y masculina, autoincompatibilidad y apomixis en diferentes grados. El objetivo global de esta tesis doctoral es aumentar nuestro conocimiento sobre diferentes aspectos reproductivos que son cruciales para la mejora y propagación de los cítricos y su interacción con las condiciones ambientales.

La temperatura en la fase progámica es crítica para el éxito de la reproducción sexual de las plantas. La germinación del grano de polen, la receptividad estigmática y el crecimiento del tubo polínico son los principales componentes de esta fase. El análisis del efecto de la temperatura sobre la fase progámica de los cítricos fue nuestro primer objetivo. Desarrollamos un método innovador basado en la observación microscópica de cortes transversales de pistilos polinizados recolectados diariamente, lo que permite un análisis más completo de la cinética y dinámica de crecimiento del tubo polínico a lo largo del pistilo. Usando tres cruces compatibles dentro del género *Citrus*, evaluamos, con este método, el efecto de cuatro regímenes de temperatura en cada proceso durante la fase progámica. Las temperaturas altas redujeron el tiempo que necesitaban los tubos polínicos para llegar a los óvulos y también aceleraron la degeneración del pistilo, mientras que las temperaturas frías produjeron los efectos opuestos. Sin embargo, los tubos polínicos pudieron llegar a los óvulos en todos los cruces estudiados. Curiosamente, observamos por primera vez en cítricos tanto la germinación del polen como el crecimiento del tubo polínico a 10°C.

Las mandarinas representan el 24% de la producción total de cítricos y la ausencia de semillas es un criterio de calidad para el mercado de las mandarinas de fruta fresca. La aptitud partenocárpica (AP) es la clave para la producción de frutos sin semillas cuando se combina con la autoincompatibilidad (AI) o la esterilidad. El segundo objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar AP y AI para variedades de mandarina con características relevantes como progenitores para el mejoramiento de mandarinas sin semillas. Para ello, desarrollamos un protocolo eficiente basado en la emasculación, la autopolinización manual y la polinización cruzada manual. El rendimiento del polen se analizó mediante observaciones histológicas, junto con el cuajado de frutos y la producción de semillas. Se observaron seis comportamientos diferentes entre las nueve variedades analizadas. Las mandarinas 'Clemenules' y 'Moncada' son estrictamente autoincompatibles con partenocarpia facultativa y vegetativa; El mandarino 'Imperial' y el tangor 'Ellendale' mostraron una autoincompatibilidad parcial y se clasifican como partenocarpicos de tipo facultativa y vegetativa; El mandarino 'Fortune' es autoincompatible y con partenocarpia facultativa y estimulativa; Las mandarinas 'Campeona' y 'Salteñita' son autocompatibles con partenocarpia vegetativa; satsuma 'Serafines' se asocia con esterilidad masculina junto con partenocarpia facultativa y vegetativa; La clementina 'Monreal' es autocompatible y no partenocárpica.

Más allá de la importancia crítica de la AI para la producción de frutos sin semillas, la AI es un obstáculo para los programas de mejoramiento basados en hibridación, ya que reduce las posibilidades de cruzamiento. El tercer objetivo de esta tesis doctoral fue comparar la eficiencia de la descomposición de la reacción de AI por tres factores previamente identificados en otras especies de plantas: estrés por temperatura, polinización de yemas y poliploidización. El fenotipo AI se caracterizó para dos variedades autoincompatibles 'Fortune' y 'Clemenules' mediante un estudio histológico del crecimiento del tubo polínico y la fertilización del óvulo. Un

análisis de marcadores moleculares con SSRs y SNPs nos permitió demostrar que todas las plantas obtenidas eran cigóticas por autofecundación. Los tres métodos tuvieron éxito en la recuperación de plantas autofecundadas, y la polinización de yemas fue el enfoque más eficiente. La duplicación de cromosomas también fue eficiente, pero implicó el desarrollo de plantas tetraploides. El estrés por bajas temperaturas nos permitió obtener unas pocas plantas autofecundadas diploides. Sin embargo, este método resultó mucho más complejo de aplicar que la polinización de yemas en programas de mejoramiento específicos.

La selección asistida por marcadores (MAS) permite la selección de genotipos en la etapa de plántula, lo que la convierte en una herramienta poderosa, especialmente en especies de árboles con un largo período juvenil, como los cítricos. El 4º objetivo de esta tesis doctoral se centra en el desarrollo de marcadores SNPs asociados a poliembrionía y esterilidad masculina. La poliembrionía (una forma de apomixis) es un rasgo deseado para la producción de portainjertos, mientras que la monoembrionía se investiga para parentales en proyectos de reproducción sexual. La esterilidad masculina es útil junto con la partenocarpia para la producción de frutos sin semillas y la esterilidad masculina nucleocitoplasmática (CMS) derivada de satsuma es la más frecuente en las mandarinas. En el Capítulo 4, una descendencia segregante derivada de 'Kiyomi' (una variedad monoembrionaria y CMS) x 'Murcott' (una variedad poliembriónica y fértil masculina) fue genotipada por GBS. También se fenotipó la poliembrionía y la esterilidad masculina mediante la evaluación del número de granos de polen por antera (NPGA) y la fertilidad aparente del polen (APF). Mediante estudios exhaustivos de asociación genética, identificamos una región genómica en el grupo de ligamiento 1 asociado con poliembrionía y una región genómica en el grupo de ligamiento 8 asociado con NPG. Se desarrollaron marcadores SNP cercanos a genes que tienen funciones relacionadas con la esterilidad masculina y con la poliembrionia para las dos regiones genómicas.

En general, esta tesis doctoral proporciona nuevos conocimientos sobre la biología reproductiva de los cítricos y la influencia de la temperatura en ella. El conocimiento generado permitirá implementar de manera más eficiente los programas de mejoramiento, particularmente aquellos destinados a la obtención de variedades sin semillas. Este conocimiento puede usarse eventualmente para responder a algunos de los desafíos más apremiantes que plantea el escenario actual de calentamiento global.