

# **Identificación de caracteres fisiológicos y moleculares para la tolerancia a estreses abióticos en portainjertos de cítricos tetraploides**

**Marta Ruiz Valdés**

## Directores

**Dr. Raphaël Morillon  
Prof. Luis Navarro Lucas  
Prof. Eduardo Primo Millo**



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

**Valencia, Octubre de 2016**







UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

Identificación de caracteres fisiológicos  
y moleculares para la tolerancia a  
estreses abióticos en portainjertos de  
cítricos tetraploides

Tesis presentada por

**Marta Ruiz Valdés**

Para optar al grado de Doctora por la  
Universidad Politècnica de Valencia

Directores

Dr. Raphaël Morillon  
Prof. Luis Navarro Lucas  
Prof. Eduardo Primo Millo

Tutora Académica

Dra. Rosa Peiró Barber

Valencia, Octubre de 2016



*A mis padres, a Manu y a mis tías Asun y Tité*







“The scientist is a lover of truth for the very  
love of truth itself, wherever it may lead”

Luther Burbank (1849-1926)



Kahlo, Frida. *Retrato de Luther Burbank*.  
1931. Museo Dolores Olmedo, Ciudad de  
Mexico, Mexico.



# INDICE DE CONTENIDOS

---

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>1</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>5</b>
<b>RESÚMENES</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>19</b>
<b>1. El cultivo de cítricos</b>	<b>19</b>
1.1. Importancia económica	19
1.2. Taxonomía	20
1.3. Origen, diversificación y difusión del cultivo	22
<b>2. Portainjertos de cítricos</b>	<b>26</b>
2.1. Importancia	26
2.2. Historia	28
2.3. Situación actual	31
2.3.1. Portainjertos más utilizados en España	32
2.3.1.1. Citranges Troyer y Carrizo	33
2.3.1.2. <i>C. macrophylla</i>	34
2.3.1.3. Citrange C-35	34
2.3.1.4. Limonero Volkameriana	34
2.3.1.5. Mandarino Cleopatra	35
2.3.1.6. Citrumelo ‘Swingle’	35
<b>3. Poliploidía</b>	<b>35</b>
3.1. Definición y trascendencia en plantas	35
3.2. Incidencia en cítricos	38
3.2.1. Aprovechamiento	38
3.2.2. La tetraploidía en cítricos	40
3.2.2.1. Tipos	40
3.2.2.1.1. Autotetraploidía natural	41
3.2.2.1.2. Autotetraploidía inducida	43
3.2.2.1.3. Alotetraploidía	43
3.2.2.2. Aspectos morfológicos	44
3.2.2.3. Aspectos fisiológicos	45
3.2.2.4. Utilización de portainjertos tetraploides	45
3.2.2.4.1. Portainjertos autotetraploides	47
3.2.2.4.1.1. Estudios agronómicos previos	48
3.2.2.4.1.2. Estudios fisiológicos previos	48
3.2.2.4.2. Portainjertos alotetraploides	50
<b>4. Tolerancia del cultivo de cítricos a estreses abióticos</b>	<b>52</b>
4.1. La clorosis férrica	52
4.1.1. El hierro en el suelo y su solubilidad	52
4.1.2. Disponibilidad del hierro en suelos calizos	53
4.1.3. Papel del hierro en la nutrición vegetal	53
4.1.4. Impacto en la fisiología de la planta	54

4.1.5.	Fisiopatía y prevención	54
<b>4.2.</b>	<b>La salinidad del suelo</b>	<b>56</b>
4.2.1.	Origen	56
4.2.2.	Impacto en la agricultura	57
4.2.3.	Efecto en las plantas	58
4.2.4.	Mecanismos de tolerancia	58
4.2.5.	La toxicidad por exceso de boro	62
<b>5.</b>	<b>Utilidad del portainjerto para prevenir fisiopatías</b>	<b>63</b>
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>		<b>65</b>
<b>CAPÍTULO I</b>		
<b>Efecto de la tetraploidía del portainjerto en la variedad de naranjo ‘Valencia’ late (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.)</b>		<b>67</b>
<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>67</b>
<b>2.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>69</b>
2.1.	Condiciones ambientales	69
2.2.	Condiciones agronómicas	69
2.2.1.	Características del suelo	69
2.2.2.	Características del agua de riego	70
2.3.	Material vegetal	70
2.4.	Análisis foliar	71
2.5.	Estudio morfométrico	72
2.6.	Producción	72
2.7.	Calidad del fruto	72
2.8.	Análisis estadístico	73
<b>3.</b>	<b>Resultados</b>	<b>74</b>
3.1.	Análisis foliar	74
3.2.	Estudio morfométrico	79
3.3.	Producción	80
3.4.	Calidad del fruto	81
<b>4.</b>	<b>Discusión</b>	<b>83</b>
<b>5.</b>	<b>Información suplementaria</b>	<b>89</b>
<b>CAPÍTULO II</b>		
<b>Efecto de la salinidad en los genotipos 2x y 4x de <i>Citrus macrophylla</i> Wester.</b>		<b>93</b>
<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>93</b>
<b>2.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>95</b>
2.1.	Material vegetal	95
2.2.	Comprobación del nivel de ploidía	95
2.3.	Condiciones experimentales	96

## ÍNDICES

2.3.1.	Experimento I: salinidad moderada	96
2.3.2.	Experimento II: salinidad elevada	96
2.4.	Análisis de iones	97
2.5.	Tasas de absorción y transporte de $\text{Cl}^-$ , $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$	97
2.6.	Componentes del potencial hídrico de las hojas	98
2.7.	Medida del intercambio de gases	98
2.8.	Análisis estadístico	99
<b>3.</b>	<b>Resultados</b>	<b>99</b>
3.1.	Experimento I: salinidad moderada	99
3.1.1.	Crecimiento de las plantas	99
3.1.2.	Concentración de iones	99
3.1.3.	Tasas de absorción y transporte de iones	101
3.1.4.	Potencial hídrico e intercambio de gases	103
3.2.	Experimento II: salinidad elevada	105
3.2.1.	Concentración de iones	105
3.2.2.	Daño foliar	105
<b>2.</b>	<b>Discusión</b>	<b>109</b>
<b>CAPITULO III</b>		
<b>La tetraploidía mejora la exclusión de cloruro en citrange Carrizo (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.)</b>		
<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>115</b>
<b>2.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>118</b>
2.1.	Material vegetal	118
2.2.	Comprobación del nivel de ploidía	119
2.3.	Condiciones experimentales	119
2.4.	Evaluación de daños y abscisión	120
2.5.	Análisis de iones	120
2.6.	Tasas de absorción y transporte de $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ y $\text{K}^+$	121
2.7.	Medida de la conductancia hidráulica de la raíz	121
2.8.	Medida de la tasa de transpiración	122
2.9.	Medida de la asimilación neta y factores relacionados	122
2.10.	Histología	123
2.10.1.	Corte	123
2.10.2.	Preparación de soluciones	123
2.10.3.	Transparentado y tinción	123
2.10.4.	Microscopía y fotografía	124
2.11.	Análisis estadístico	124
<b>3.</b>	<b>Resultados</b>	<b>124</b>
3.1.	Concentración de iones	124
3.2.	Tasas de absorción y transporte de iones	125
3.3.	Transpiración y conductancia hidráulica de las raíces	127
3.4.	Estudio morfológico e histológico de las raíces	128

3.5.	Tasa de asimilación neta y factores relacionados	129
3.6.	Daño foliar	130
3.7.	Crecimiento	131
<b>4.</b>	<b>Discusión</b>	<b>135</b>

## **CAPÍTULO IV**

### **La tetraploidía mejora la tolerancia al estrés por exceso de boro en citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)**

<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>141</b>
<b>2.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>145</b>
2.1.	Material vegetal	145
2.2.	Condiciones experimentales	146
2.2.1.	Experimento 1: ensayo <i>in vitro</i>	146
2.2.2.	Experimento 2: ensayo en invernadero	146
2.2.3.	Experimento 3: ensayo en campo	148
2.3.	Métodos de análisis	149
2.3.1.	Comprobación del nivel de ploidía	149
2.3.2.	Extracción de ARN y análisis qRT-PCR	149
2.3.3.	Concentración total de B	150
2.3.4.	Fraccionamiento de B	150
2.3.5.	Tasas de absorción y transporte de B	151
2.3.6.	Histología	151
2.3.6.1.	Corte	152
2.3.6.2.	Preparación de soluciones	152
2.3.6.3.	Transparentado y tinción	152
2.3.6.4.	Microscopía y fotografía	152
2.4.	Análisis estadístico	152
<b>3.</b>	<b>Resultados</b>	<b>153</b>
3.1.	Experimento 1: ensayo <i>in vitro</i>	153
3.1.1.	Crecimiento de las plantas	153
3.1.2.	Concentración de B	154
3.1.3.	Tasas de absorción y transporte de B	156
3.1.4.	Análisis de la expresión génica	157
3.1.5.	Fracciones de B soluble e insoluble	158
3.1.6.	Histología de las raíces	158
3.2.	Experimento 2: ensayo en invernadero	160
3.2.1.	Morfología de las plantas	160
3.2.2.	Acumulación de B en las hojas	160
3.2.3.	Efecto en el crecimiento, daño foliar y abscisión	162
3.3.	Experimento 3: ensayo en campo	164
<b>4.</b>	<b>Discusión</b>	<b>167</b>

<b>CAPÍTULO V</b>	<b>173</b>
<b>La tolerancia a la clorosis férrica no se modifica en portainjertos de cítricos autotetraploides</b>	<b>173</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>173</b>
<b>2. Material y métodos</b>	<b>176</b>
2.1. Material vegetal	176
2.2. Cultivo en invernadero	177
2.3. Comprobación del nivel de ploidía	177
2.4. Condiciones experimentales del ensayo en invernadero	178
2.5. Medida del crecimiento de las plantas	178
2.6. Medida del verdor foliar	179
2.7. Actividad reductasa de quelato férrico en las raíces	179
2.8. Muestreo foliar en campo	179
2.9. Determinación del contenido en hierro total	180
2.10. Análisis estadístico	180
<b>3. Resultados</b>	<b>181</b>
3.1. Crecimiento, verdor foliar y concentración de hierro	181
3.2. Actividad reductasa de quelato férrico (FC-R)	182
3.3. Concentración de hierro en naranjos ‘Valencia’ late	183
<b>4. Discusión</b>	<b>185</b>
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>Evaluación morfológica, fisiológica y genética de los portainjertos alotetraploides SMC-58 y SMC-73 obtenidos mediante la hibridación somática de citrange Carrizo (<i>Citrus sinensis</i> L. Osb. × <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.) y <i>C. macrophylla</i> Wester.</b>	<b>187</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>187</b>
<b>2. Material y métodos</b>	<b>192</b>
2.1. Material vegetal y cultivo en invernadero	192
2.2. Caracterización genética	193
2.2.1. Marcadores SSR	193
2.2.2. Marcadores SNP	194
2.2.3. Genotipado de los híbridos somáticos	194
2.3. Caracterización morfológica	194
2.4. Evaluación de la tolerancia a la clorosis férrica	195
2.5. Evaluación de la tolerancia a la salinidad	196
2.6. Evaluación de la tolerancia a CTV	197
2.7. Análisis estadístico	197
<b>3. Resultados</b>	<b>198</b>
3.1. Caracterización genética	198
3.2. Caracterización morfológica	209

3.3	Evaluación de la tolerancia a la clorosis férrica	211
3.4	Evaluación de la tolerancia a la salinidad	212
3.5	Evaluación de la tolerancia a CTV	216
<b>4.</b>	<b>Discusión</b>	<b>219</b>
4.1	Caracterización genética	219
4.2	Morfología y respuesta fisiológica al estrés	222
4.3	Importancia de la caracterización	224
4.4	Posible utilización como portainjertos de cítricos	226
	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>229</b>
	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>237</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>241</b>



# INDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura I.1.</b> Producción local, nacional y mundial de los principales grupos de cítricos .....	20
<b>Figura I.2.</b> Especies tradicionalmente consideradas originales de las que deriva la diversidad del género <i>Citrus</i> .....	23
<b>Figura I.3.</b> Diversificación de los cítricos mediante hibridación. ....	26
<b>Figura I.4.</b> Mecanismos de tetraploidización .....	42
<b>Figura I.5.</b> Características morfológicas típicas que diferencian a los cítricos tetraploides de sus correspondientes diploides .....	46
<b>Figura 1.1</b> Concentración de boro en hojas de primavera de los árboles de naranjo ‘Valencia’ late (VL) injertados sobre los portainjertos citrange Carrizo y <i>Citrus macrophylla</i> en sus versiones diploide y tetraploide .....	77
<b>Figura 1.2</b> Diferencias en la relación entre los cationes antagónicos potasio, calcio y magnesio en hojas de primavera de naranjo ‘Valencia’ late injertado sobre los genotipos diploide o tetraploide de citrange Carrizo y <i>Citrus macrophylla</i> .....	78
<b>Figura 1.3</b> Diámetro y volumen de copa de naranjo ‘Valencia’ late injertado sobre los genotipos diploide o tetraploide de citrange Carrizo y <i>Citrus macrophylla</i> .....	80
<b>Figura 2.1.</b> Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl durante 30 días en el peso seco de plantas de <i>Citrus macrophylla</i> diploides y tetraploides.....	100
<b>Figura 2.2.</b> Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl durante 30 días en las tasas de absorción y transporte de Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en plantas de <i>Citrus macrophylla</i> diploides y tetraploides. ....	102
<b>Figura 2.3</b> Conductancia estomática, transpiración y asimilación neta de CO <sub>2</sub> medidas cada 10 días en hojas de plantas diploides y tetraploides de <i>Citrus macrophylla</i> cultivadas en medio salino con 40 mM de NaCl durante 30 días. ....	104
<b>Figura 2.4</b> Efecto sobre la concentración sub-estomática de CO <sub>2</sub> del tratamiento con un medio salino con 40 mM de NaCl durante 30 días en plantas diploides y tetraploides de <i>Citrus macrophylla</i> .....	105
<b>Figura 2.5</b> Concentración foliar de cloruro y sodio en plantas diploides y tetraploides de <i>Citrus macrophylla</i> cultivadas en un medio con salinidad elevada durante 30 días. ....	106
<b>Figura 2.6</b> Verdor foliar relativo medido en plantas diploides y tetraploides de <i>Citrus macrophylla</i> cultivadas en un medio con salinidad elevada (80 mM de NaCl) durante 30 días.. ....	107

<b>Figura 3.1</b> Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl durante 20 días en las tasas de absorción y transporte de Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en plantas de citrange Carrizo diploides y tetraploides .....	126
<b>Figura 3.2.</b> Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl durante 20 días en la tasa de transpiración y conductancia hidráulica de las raíces de plantas de citrange Carrizo diploides y tetraploides. ....	127
<b>Figura 3.3</b> Cortes de raíz tomados a 20 mm del ápice, realizados a mano en tejido fresco de raíces de plantas diploides y tetraploides de citrange Carrizo, teñidas con hemisulfato de berberina y Safranina O y visualizadas mediante microscopía óptica o microscopía de fluorescencia con luz UV.....	129
<b>Figura 3.4</b> Síntomas en plantas de citrange Carrizo diploides y tetraploides sometidas al tratamiento con NaCl 40 mM NaCl durante 20 días. ....	131
<b>Figura 3.5.</b> Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl durante 20 días en el daño foliar y la abscisión, medidas en plantas de citrange Carrizo diploides y tetraploides.. ....	132
<b>Figura 3.6</b> Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl durante 30 días en el peso seco de plantas de citrange Carrizo diploides y tetraploides .....	133
<b>Figura 4.1</b> Concentración de boro medida en plantas diploides y tetraploides de citrange Carrizo cultivadas <i>in vitro</i> durante 45 días, en el medio nutritivo suplementado con 50 μM o 400 μM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ....	155
<b>Figura 4.2</b> Tasa de absorción y tasa de transporte de boro medida en plantas diploides y tetraploides de citrange Carrizo cultivadas <i>in vitro</i> durante 45 días en el medio nutritivo suplementado con 50 μM o 400 μM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> . ....	156
<b>Figura. 4.3</b> Expresión relativa de los genes <i>NIP5</i> y <i>BOR1</i> estimada mediante un análisis de qRT-PCR en raíces de plantas diploides y tetraploides de citrange Carrizo cultivadas <i>in vitro</i> durante 45 días, en el medio nutritivo suplementado con 50 μM o 400 μM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .. ...	157
<b>Figura 4.4.</b> Cortes de raíz tomados a 9-12 mm del ápice, realizados a mano en tejido fresco de raíces de plantas diploides y tetraploides de citrange Carrizo cultivadas <i>in vitro</i> , teñidas con hemisulfato de berberina y azul de anilina y visualizadas mediante microscopía de fluorescencia con luz UV.....	160
<b>Figura 4.5</b> Diferencias en la arquitectura de la raíz entre citrange Carrizo 2x y 4x.....	161

**Figura 4.6** Concentración de boro en hojas desarrolladas de plantas de seis meses de edad de citrange Carrizo diploide y tetraploide, cultivadas en invernadero durante 5 semanas, irrigadas con solución nutritiva suplementada con 50, 200, 400 u 800  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ . .....163

**Figura 4.7** Síntomas visibles de toxicidad por exceso de boro en hojas de plantas diploides y tetraploides de citrange Carrizo de seis meses de edad, cultivadas en invernadero durante 10 semanas, irrigadas con solución nutritiva suplementada con 50  $\mu\text{M}$  u 800  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ . .....164

**Figura 4.8** Daño foliar y abscisión en plantas diploides y tetraploides de citrange Carrizo cultivadas en invernadero durante 10 semanas, irrigadas con solución nutritiva suplementada con 50  $\mu\text{M}$  u 800  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ . .....165

**Figura 4.9** Concentración de boro en hojas de la brotación de primavera de los años 3º, 4º y 5º tras el establecimiento de la parcela de árboles de naranjo ‘Valencia’ late, injertados sobre citrange Carrizo diploide y tetraploide cultivados en condiciones de campo. ....166

**Figura 6.1.** Electroferogramas del marcador SSR Ci07D06 analizado en *Citrus macrophylla*, citrange Carrizo y los híbridos somáticos SMC-73 y SMC-58.. .....205

**Figura 6.2** Análisis gráfico de los marcadores SNP PSY-C461 y AOC-C593 analizados en *Citrus macrophylla*, citrange Carrizo y los híbridos somáticos SMC-73 y SMC-58.....208

**Figura 6.3** Electroferogramas del marcador cloroplástico SSR NTCP7 analizado en el híbrido SMC-58 y sus parentales citrange Carrizo y *Citrus macrophylla* .....209

**Figura 6.4** Plantas de citrange Carrizo, *Citrus macrophylla* y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73, cultivadas durante 5 meses en condiciones de invernadero.....210

**Figura 6.5.** Crecimiento, daños por quemaduras foliares y daños por abscisión en plantas de citrange Carrizo, *Citrus macrophylla* y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73, cultivadas durante 20 días en invernadero en condiciones salinas (NaCl 40 mM).....213

**Figura 6.6.** Crecimiento en altura y biomasa de plantas de citrange Carrizo, *Citrus macrophylla* y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 inoculadas con la raza T388 del virus de la tristeza de los cítricos y de las plantas control no inoculadas, cultivadas durante 12 meses en condiciones de invernadero. ....217

**Figura 6.7** Síntomas en las plantas de citrange Carrizo, *Citrus macrophylla* y los híbridos somáticos inoculadas con la raza T388 de CTV. ....218

## INDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.1</b> Efectos del portainjerto y su ploidía y del año de muestreo en las concentraciones de macronutrientes en hojas de primavera de naranjo ‘Valencia’ late. ....	74
<b>Tabla 1.2</b> Efectos del portainjerto y su ploidía y del año de muestreo en las concentraciones de micronutrientes en hojas de primavera de naranjo ‘Valencia’ late. ....	76
<b>Tabla 1.3</b> Efectos del del portainjerto y su ploidía y del año de muestreo en las relaciones entre macronutrientes en hojas de primavera de naranjo ‘Valencia’ late. ....	78
<b>Tabla 1.4</b> Efectos del portainjerto y de su ploidía en el tamaño de los árboles de naranjo ‘Valencia’ late alcanzado el 6° año tras el establecimiento de la parcela. ....	79
<b>Tabla 1.5</b> Efectos del portainjerto y de su ploidía en la producción anual, en la producción acumulada hasta el 6° año tras el establecimiento de la parcela y en la eficiencia productiva en el 6° año de los árboles de naranjo ‘Valencia’ late.....	81
<b>Tabla 1.6</b> Efectos del portainjerto y de su ploidía en la calidad morfológica del fruto cosechado el 6° año. ....	82
<b>Tabla 1.7</b> Efectos del portainjerto y de su ploidía en la calidad organoléptica del fruto cosechado el 6° año. ....	82
<b>Tabla 1.S1</b> Composición y características del suelo de la parcela experimental.....	89
<b>Tabla 1.S2</b> Calidad del agua de riego empleada en la parcela experimental.....	89
<b>Tabla 1.S3</b> Valores medios de las concentraciones foliares de macronutrientes y micronutrientes en los árboles de naranjo injertados sobre citrange Carrizo y <i>Citrus macrophylla</i> diploide y tetraploide. ....	90
<b>Tabla 2.1</b> Concentración de Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en las hojas, tallo y raíz de plantas diploides y tetraploides de <i>Citrus macrophylla</i> cultivadas en medio salino con 40 mM de NaCl durante 30 días.....	101
<b>Tabla 2.2</b> Potencial hídrico, potencial osmótico y potencial de turgencia en hojas de plantas diploides y tetraploides de <i>Citrus macrophylla</i> cultivadas en medio salino con 40 mM de NaCl o en medio control durante 30 días.....	103
<b>Tabla 3.1</b> Concentración de Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en plantas diploides y tetraploides citrange Carrizo, cultivadas en medio salino con 40 mM de NaCl o en medio control durante 20 días. ....	125

<b>Tabla 3.2</b> Dimensiones de las raíces fibrosas de plantas de citrange Carrizo diploides y tetraploides, cultivadas durante 10 semanas en condiciones de invernadero con riego normal.....	128
<b>Tabla 3.3</b> Tasa de asimilación neta, concentración sub-estomática de CO <sub>2</sub> , concentración foliar de clorofilas y rendimiento cuántico del fotosistema II en las hojas de citrange Carrizo diploides y tetraploides tratadas con NaCl 40 mM durante 30 días. ....	130
<b>Tabla 4.1</b> Cebadores utilizados para la RT-PCR cuantitativa.....	150
<b>Tabla 4.2</b> Peso seco de los órganos y de las plantas completas, longitud de tallos y raíces y longitud específica de raíces relativa al peso seco (SRL) de plantas diploides y tetraploides de citrange Carrizo cultivadas <i>in vitro</i> durante 45 días, en el medio nutritivo suplementado con 50 µM o 400 µM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	153
<b>Tabla 4.3</b> Medidas de la sección transversal a 20 mm del ápice de la raíz de plantas de citrange Carrizo diploides y tetraploides cultivadas <i>in vitro</i> durante 20 días. ....	154
<b>Tabla 4.4</b> Concentración de boro en las fracciones soluble y fibrosa de hojas y raíces, medida en plantas diploides y tetraploides de citrange Carrizo cultivadas <i>in vitro</i> durante 45 días, en el medio nutritivo suplementado con 50 µM o 400 µM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	158
<b>Tabla 4.5</b> Peso seco de los órganos y de las plantas completas de citrange Carrizo diploides y tetraploides, cultivadas en invernadero durante 10 semanas, irrigadas con solución nutritiva suplementada con 50 µM u 800 µM de H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	161
<b>Tabla 4.6</b> Características de los árboles de seis años de edad de naranjo injertados sobre citrange Carrizo diploide y tetraploide y cultivados en condiciones de campo .....	166
<b>Tabla 5.1</b> Crecimiento en plantas de citrange Carrizo y <i>Citrus macrophylla</i> diploides y tetraploides cultivadas en condiciones de invernadero durante 7 semanas en condiciones de hierro suficiente y en condiciones clorosantes. ....	181
<b>Tabla 5.2</b> Verdor foliar (SPAD f:i) en plantas de citrange Carrizo y <i>Citrus macrophylla</i> diploides y tetraploides cultivadas en condiciones de invernadero durante 7 semanas en condiciones de hierro suficiente y en condiciones clorosantes.....	182
<b>Tabla 5.3</b> Concentración de hierro foliar en plantas de citrange Carrizo y <i>Citrus macrophylla</i> diploides y tetraploides cultivadas en condiciones de invernadero durante 7 semanas en condiciones de hierro suficiente y en condiciones clorosantes.....	182

**Tabla 5.4** Actividad del enzima reductasa de quelato férrico en puntas de raíz fibrosa de plantas de citrange Carrizo y *Citrus macrophylla* diploides y tetraploides cultivadas en condiciones de invernadero durante 2 semanas en condiciones de hierro suficiente o ausente. ....183

**Tabla 5.5** Concentración de hierro en hojas de la brotación de primavera de nueve meses de edad, tomadas de árboles de naranjo ‘Valencia’ late injertados sobre citrange Carrizo y *Citrus macrophylla* diploides y tetraploides en los años 3° (2012) y 4° (2013) tras el establecimiento de la parcela. ....183

**Tabla 6.1a** Marcadores analizados localizados en los grupos de ligamiento 1 y 2.....199

**Tabla 6.1b** Marcadores analizados localizados en los grupos de ligamiento 3, 4 y 5.....200

**Tabla 6.1c** Marcadores analizados localizados en los grupos de ligamiento 6 y 7.....201

**Tabla 6.1d** Marcadores nucleares analizados localizados en los grupos de ligamiento 8 y 9 y marcadores citoplasmáticos. ....202

**Tabla 6.2a** Análisis genético con marcadores nucleares SNP y SSR ubicados en los GL 1, 2 y 3 de los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 obtenidos de la fusión de protoplastos de *C. macrophylla* y citrange Carrizo. ....203

**Tabla 6.2b** Análisis genético con marcadores nucleares SSR y SNP ubicados en los GL 4, 5 y 6 de los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 obtenidos de la fusión de protoplastos de *C. macrophylla* y citrange Carrizo. ....204

**Tabla 6.2c** Análisis genético con marcadores nucleares SNP y SSR ubicados en los GL 7, 8 y 9 y marcadores mitocondrial y cloroplásticos de los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 obtenidos de la fusión de protoplastos de *Citrus macrophylla* y citrange Carrizo. ....207

**Tabla 6.3** Caracterización morfológica de los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 obtenidos mediante fusión de protoplastos de citrange Carrizo y *Citrus macrophylla*. ....210

**Tabla 6.4** Verdor foliar (f/i), crecimiento en biomasa del brote y concentración foliar de hierro en el brote de plantas de citrange Carrizo, *Citrus macrophylla* y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73, cultivadas durante 10 semanas en invernadero en condiciones control y en condiciones clorosantes .....212

**Tabla 6.5** Concentración foliar de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en plantas de citrange Carrizo, *Citrus macrophylla* y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73, cultivadas durante 20 días en invernadero en condiciones salinas ( $\text{NaCl}$  40 mM).....214

**Tabla 6.6** Tasas de transpiración y asimilación neta en plantas de citrange Carrizo, *Citrus macrophylla* y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73, cultivadas durante 20 días en invernadero en condiciones control o en condiciones salinas ( $\text{NaCl}$  40 mM).....215



## RESUMEN

---

La poliploidía es una característica muy común en plantas superiores y actúa como motor evolutivo promoviendo su adaptación. En cítricos, la mejora genética a nivel poliploide agiliza el desarrollo de portainjertos tetraploides (4x) y permite obtener variedades sin semilla triploides.

El portainjerto es un elemento fundamental en la citricultura para proporcionar al cultivo la tolerancia a estreses bióticos y abióticos. En España, el alto contenido en caliza y sales de la mayoría de los suelos citrícolas y el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) limitan en el número de portainjertos adecuados para el cultivo de cítricos. El desarrollo de nuevos portainjertos tiene como objetivo reunir en un genotipo las características de interés. La hibridación sexual ha sido el método tradicionalmente empleado, aunque en cítricos plantea inconvenientes debido a su compleja biología reproductiva y a su alta heterocigosidad.

La autotetraploidía, que aparece espontáneamente en los cítricos apomícticos, posibilita la selección y evaluación de las variantes 4x de cada portainjerto como un método de mejora relativamente sencillo. El efecto de la tetraploidía es variable entre las diferentes especies de cítricos y apenas ha sido descrito. Conocer su influencia sobre la fisiología y morfología de los cítricos permitiría valorar su utilidad agronómica. Por su parte, la alotetraploidía, obtenida mediante fusión de protoplastos, permite hibridar especies sexualmente incompatibles y reunir los genomas completos de los parentales, acumulando sus caracteres dominantes complementarios con independencia de su heterozigosidad.

El propósito de ésta tesis ha sido evaluar las variantes 4x de los portainjertos más utilizados en España, citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) (CC) y *C. macrophylla* (CM) para valorar su utilidad agronómica y describir sus propiedades. Además se han caracterizado dos híbridos alotetraploides obtenidos mediante fusión de protoplastos de CM y CC para valorar su posible utilización como portainjertos para la citricultura mediterránea.

La tetraploidía en CC y CM modifica la composición mineral foliar de la variedad injertada y mejora la tolerancia de éstas plantas a la salinidad, mientras que la capacidad de hacer frente a la clorosis férrica no difiere entre ploidías en éstos portainjertos. El portainjerto CC4x ejerce un efecto reductor del tamaño de copa en árboles de naranjo sin modificar su eficiencia productiva ni la calidad del fruto y reduce la absorción y transporte de boro a la variedad injertada en condiciones de exceso, mejorando su tolerancia. La mayor capacidad de exclusión de sales y boro en las plantas 4x se relaciona con su menor transpiración. En CC interviene también en este comportamiento la menor conductancia hidráulica de las raíces 4x inducida por sus modificaciones anatómicas.

Los híbridos alotetraploides obtenidos mediante fusión de protoplastos de CC y CM difieren en la composición de su genoma, indicando que se han producido pérdidas puntuales y reorganizaciones durante el proceso de fusión. Ambos reúnen los genomas nucleares parentales, han heredado de CC la tolerancia a las acanaladuras en la madera causadas por CTV, son similares a CM en su tolerancia a la clorosis férrica y manifiestan mayor tolerancia a la salinidad que CC. Por ello, reúnen características de gran interés para la citricultura mediterránea.

La evaluación y selección de portainjertos tetraploides permitiría obtener árboles más pequeños y más tolerantes a ciertos estreses que mantengan el comportamiento general ya conocido de los diploides originales. La reducción del tamaño de copa contribuiría a mejorar el rendimiento productivo y a facilitar el manejo de las plantaciones citrícolas. El conocimiento generado a cerca de los efectos de la tetraploidización y de la hibridación somática en la anatomía, fisiología, comportamiento agronómico y genética de los portainjertos de cítricos será de gran utilidad en los programas de mejora en base a necesidades actuales y futuras.

## RÉSUMÉ

---

La polyploïdie est très fréquente chez les plantes supérieures. C'est l'une des principales forces évolutive pouvant induire des changements anatomiques, physiologiques et d'expression des génomes et qui peut conduire *in fine* à une meilleure adaptation des plantes. Chez les agrumes, les programmes d'amélioration ont permis le développement au cours des dernières décennies de nouveaux porte-greffes tétraploïdes et de nouvelles variétés triploïdes sans pépins. Les programmes de sélection de porte-greffes visent à cumuler des caractères d'intérêt chez un seul génotype et d'ajouter les tolérances aux contraintes biotiques et abiotiques requises en fonction des zones de culture. De bonnes performances agronomiques permettant d'induire une bonne qualité des fruits de la variété greffée sont également essentielles.

En Espagne, la présence du virus de la Tristeza des agrumes (CTV), l'abondance de sols calcaires et le problème de la salinisation des sols limite aujourd'hui le nombre de porte-greffes adaptés à la culture des agrumes. La salinité du sol peut avoir un impact critique sur la culture d'arbres à feuilles persistantes en raison de l'accumulation préférentielle de sels dans les parties aériennes, ce qui peut entraîner des dommages très importants au niveau des plantations. Cependant, l'absorption de l'eau et des solutés au niveau des racines et leur transport vers le scion est contrôlée par le porte-greffe, qui détermine en grande partie l'accumulation de sels dans les feuilles.

L'amélioration des agrumes a traditionnellement été réalisée par hybridation sexuelle. Toutefois cette méthode a plusieurs limitations qui sont principalement liées à la biologie de la reproduction qui est complexe chez les agrumes, mais également au taux élevé d'hétérozygotie. Pour surmonter ces problèmes, certains programmes d'amélioration utilisent la tétraploïdie pour développer de nouveaux porte-greffes. L'apparition spontanée de plantes diploïdes doublés dans les semis de génotypes d'agrumes apomictiques permet de sélectionner et d'évaluer rapidement ces nouveaux idéotypes de porte-greffe pouvant être utilisés dans différentes zones pédoclimatiques. De même, c'est une méthode de sélection relativement simple. L'impact que peut avoir la duplication du génome sur l'anatomie, la physiologie et l'expression des génomes chez les agrumes est variable entre les différentes espèces et reste pour l'heure encore mal décrit.

Pour évaluer l'utilité potentielle des porte-greffes d'agrumes tétraploïde (4x), il est d'une importance primordiale d'évaluer l'effet que peut avoir la duplication du génome sur la physiologie du stress, la vigueur des arbres et leur comportement agronomique. De plus, la fusion de protoplastes permet de générer des hybrides somatiques entre des espèces sexuellement incompatibles, conduisant à combiner des génomes entiers de parents dans un seul génotype. Ce procédé est également adapté pour ajouter des caractères dominants complémentaires, quelle que soit l'hétérozygotie parentale.

Le but de cette thèse a été d'évaluer l'intérêt de génotypes diploïdes doublés des principaux porte-greffes utilisés dans l'agrumiculture Espagnole, l'hybride citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. ) (CC) et le *C. Macrophylla* (CM), afin d'évaluer leur intérêt potentiel en agriculture et de décrire les caractéristiques anatomiques, les déterminants physiologiques et moléculaires des différences observées. De plus, la caractérisation moléculaire et physiologique de deux hybrides somatiques allotétraploïdes obtenus par fusion de protoplastes de ces parents a également été réalisée. Cette étude est une étape préliminaire pour leur éventuelle utilisation comme porte-greffes dans l'agrumiculture Méditerranéenne.

Les résultats montrent que lorsqu'ils sont greffés avec de l'oranger, les porte-greffes CC 4x induisent une réduction de la taille des arbres sans pour autant changer les rendements et la qualité des oranges produites. Ces effets pourraient contribuer à accroître la productivité et à faciliter la gestion des vergers. Pour les deux porte-greffes étudiés (CC et CM), la duplication du génome a induit une modification de la composition minérale dans les feuilles de la variété greffée, conduisant à un ratio K/(Ca + Mg) plus élevé. Ceci indique une meilleure capacité à maintenir une alimentation minérale adéquate dans des conditions de sol alcalin. De même l'absorption de B dans des conditions excédentaires en B a été réduite chez les CC 4x, l'accumulation dans les parties aériennes étant réduite de 20%. Toutefois cette propriété n'a pas été observée chez les CM 4x par rapport aux CM 2x. La moindre absorption de B chez les CC 4x n'a pas été associée à des changements d'expression des transporteurs membranaires NIP5 et BOR1 au niveau des racines, ni à des différences de concentration en B dans les fractions solubles ou dans les fractions où le B est lié aux parois cellulaires.

Nos travaux suggèrent que le taux de transpiration inférieur des porte-greffes CC 4x par rapport au CC 2x et les modifications anatomiques mises en évidence au niveau racinaire des 4x sont impliquées dans le taux d'absorption de bore inférieure, en réduisant le flux apoplastique d'eau et de solutés. Ces caractéristiques anatomiques sont également impliquées dans la tolérance à la salinité accrue des CC 4x, et peut être considéré comme le principal mécanisme identifié pour expliquer l'augmentation de l'exclusion des  $\text{Cl}^-$ , associées à une réduction de la conductivité hydraulique des racines des CC 4x. La duplication du génome chez CM 4x améliore également la tolérance à la salinité, dans la mesure où elle induit une réduction du taux de transpiration et par la même induit une diminution de l'accumulation en  $\text{Cl}^-$  dans les parties aériennes, et limite ainsi les dommages toxiques. Cependant, la capacité de tolérance des CC et CM 4x pour faire face à la chlorose ferrique n'est pas différente de celles des génotypes 2x. Des porte-greffes tétraploïdes de ces espèces conduisent donc au développement d'arbres plus petits présentant des tolérances accrues à divers stress, tout en induisant des propriétés de qualité des fruits similaires au 2x.

En outre, les hybrides SCM-58 et SMC-73, obtenus par hybridation somatique entre CC et CM, combinent les deux génomes nucléaires parentaux, mais des pertes alléliques sous-chromosomiques ont toutefois pu être identifiées. Ces hybrides diffèrent également dans la composition de leur génome cytoplasmique, ce qui indique que des réarrangements et des exclusions des matériels génétiques au cours du processus de fusion ont pu avoir lieu. Néanmoins, ces événements ont affecté indépendamment chaque hybride somatique obtenu. Les deux hybrides somatiques ont hérité de la tolérance au CTV venant de leur parent CC, sont tolérants à la chlorose ferrique comme CM et présente une plus grande tolérance à la salinité que CC. Par conséquent, ces génotypes ont un grand potentiel pour l'agrumiculture Méditerranéenne.

Les connaissances acquises sur les effets de la duplication du génome mais également dans le cas d'hybridations somatiques sur l'anatomie, la physiologie, l'expression des génomes, sur la performance agronomique des porte-greffes d'agrumes, fournis dans le présent travail seront un élément clé pour le développement des programmes de sélection visant à répondre aux besoins actuels et futurs de l'agrumiculture.



La poliploidia és molt comuna en plantes superiors i es un dels principals motors evolutius per promoure canvis que afavoreixen la adaptació. En cítrics, la millora genètica a nivell poliploide ha contribuït agilitzant el desenvolupament de nous portaempelts tetraploides (4x) i de varietats sense llavors triploides.

En Espanya, el virus de la tristesa dels cítrics (CTV) i l'alt contingut salí i calcari de la majoria dels sols limiten el nombre de portaempelts adequats per al cultiu. La millora de portaempelts de cítrics té l'objectiu de reunir el major nombre de característiques d'interés en un únic cultivar. La millora genètica tradicional de cítrics, duta a terme mitjançant hibridació sexual, planteja inconvenients deguts a la seua complexa biologia reproductiva i a l'alta heterocigositat. Per aixó s'han iniciat programes de millora de portaempelts a nivell 4x, amb l'objectiu d'agilitzar el seu desenvolupament.

La autotetraploidia, que apareix de manera espontània en espècies apomíctiques de cítrics, permet seleccionar les variants 4x dels portaempelts, com un mètode de millora relativament senzill. L'efecte de la tetraploidia és variable entre les espècies de cítrics i la seua incidència a penes havia sigut descrita. Conèixer la seua repercussió en la tolerància a estressos i el vigor de l'arbre permetria avaluar la utilitat de les versions 4x de cada portaempelt. D'altra banda, l'al·lotetraploidia, obtinguda mitjançant la fusió de protoplastos, possibilita l'obtenció d'híbrids d'espècies sexualment incompatibles i reunir en una sola hibridació els genomes complets de les parentals d'interés, permetent l'addició de caràcters dominants complementaris amb independència de l'heterozigositat dels parentals.

La finalitat d'esta tesi ha sigut avaluar les propietats d'interés agronòmic de les variants 4x dels portaempelts més utilitzats en la citricultura espanyola, citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) (CC) i *C. macrophylla* (CM), per valorar la seua utilitat i descriure els determinants de les diferències trobades.

A més a més, s'ha pretés realitzar una caracterització molecular i fisiològica de dos híbrids al·lotetraploides obtinguts de la fusió de protoplastos de CM i CC, com un pas previ per a la seua possible utilització com a portaempelts.

El portaempelt CC4x exerceix un efecte reductor de la grandària de copa en arbres de taronger sense modificar l'eficiència productiva ni la qualitat del fruit. Este caràcter milloraria el rendiment productiu i a facilitaria el maneig de les plantacions cítriques. En els dos portaempelts estudiats, la tetraploidia modifica la composició mineral foliar de la varietat empeltada i proporciona major tolerància a la salinitat. En CC, la tetraploidia redueix l'absorció del boro en excés, metre que esta propietat no s'ha observat en CM4x. La menor absorció del boro i l'exclusió del clorur es troben associades a la menor transpiració, a la reduïda conductivitat hidràulica i a les característiques anatòmiques de les arrels 4x. No obstant això, la tolerància a la clorosi fèrrica no difereix entre ploïdes en estos portaempelts.

La selecció de portaempelts 4x permetria obtenir arbres més menuts i més tolerants a certs estressos que mantenen el comportament ja conegut, de la variant diploide. Per la seua banda, els híbrids somàtics difereixen en la composició del genoma, indicant que s'han produït reorganitzacions i pèrdues puntuals durant el procés de fusió. Els dos han heretat de CC la tolerància a les estries en la fusta provocades per CTV, son tolerants a la clorosi fèrrica com CM i toleren la salinitat millor que CC. Per tot, reuneixen un conjunt de característiques de gran interès potencial per a la citricultura mediterrània.

El coneixement generat en esta tesi serà de gran utilitat en els programes de millora basades en necessitats actuals i futures.



## ABSTRACT

---

Polyploidy is very common in higher plants and is one of the main forces driving evolution, as it leads to changes that may favor plant adaptation. In citrus, polyploid breeding has provided great advantage, enabling the development of new tetraploid (4x) rootstocks and triploid seedless varieties.

Rootstock breeding programs aim to combine the characters of interest in a single genotype to provide the required tolerances to biotic and abiotic constraints. In Spain, the presence of citrus tristeza virus (CTV) and the abundance of calcareous and saline soils limit the number of suitable citrus rootstocks. Citrus breeding has been traditionally carried out by sexual hybridization but this method has limitations which are mainly imposed by their complex reproductive biology and their high heterozygosity. To overcome these restrictions, some breeding programs working at tetraploid level have been initiated to facilitate the development of new citrus rootstock ideotypes.

The spontaneous appearance of autotetraploid plants in seedlings of apomictic citrus genotypes brings a relatively simple breeding method, offering the opportunity of evaluating their properties and selecting them as new rootstocks. The impact of genome duplication on citrus is variable between species and remains poorly described. To assess the usefulness of 4x citrus rootstocks it is required to evaluate the effect of genome duplication on stress physiology, tree vigor and agronomical behavior. Citrus protoplast fusion allows the somatic hybridization between sexually incompatible species, leading to combine the whole genomes of parents in a single genotype and adding complementary dominant characters, regardless of parental heterozygosity.

The purpose of this thesis was to assess the potential interest of the 4x versions of the main rootstocks used in Spanish citrus industry, which are citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) (CC) and *C. macrophylla* W. (CM) and describe the anatomical, physiological and molecular determinants of the differences found. Additionally, the characterization of two allotetraploid somatic hybrids obtained by protoplast fusion from these parents was also performed, as a preliminary step for their possible use as rootstocks.

Results show that 4xCC has a reducing effect on the size of orange trees without changing the productive efficiency or the fruit quality, effects that might contribute to increase the productivity and facilitate the orchard management. In both rootstocks, genome duplication modified the mineral composition in the leaf of the grafted variety and enhanced the salinity tolerance of seedlings. Boron uptake in excess conditions was reduced in 4xCC when compared to 2x, while this property was not observed in 4xCM. The salt and boron exclusion abilities are associated to lower transpiration rates, reduced root hydraulic conductivity and root anatomical changes observed in 4x roots. However, the ability of 4x CC and CM to cope with iron chlorosis is not different from the 2x genotypes. These 4x rootstocks might therefore provide smaller citrus trees more tolerant to certain stresses, while maintaining the general behavior of the diploid genotype.

Furthermore, somatic hybrids differ from each other in their genome composition, indicating that losses and rearrangements of the genetic material occurred during the fusion process. Both inherited the tolerance to stem pitting caused by CTV from CC, are tolerant to iron chlorosis like CM and have a higher tolerance to salinity than CC. Thus, these hybrids have a great potential for Mediterranean citrus industry.

The provided knowledge on the effects of genome duplication and somatic hybridization on the anatomy, physiology, agronomic performance and molecular biology of citrus rootstocks will be key for developing breeding programs that aim to address current and future needs of citrus industry.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

---

## 1. El cultivo de cítricos

### 1.1. Importancia económica

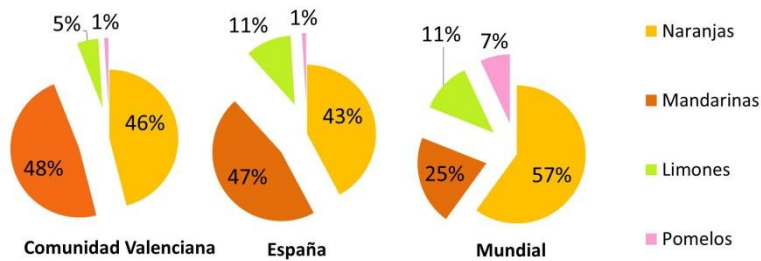
Los cítricos son el cultivo frutal de mayor producción en España y en el mundo; la producción global en 2013 alcanzó la cifra de 119 Mt de cosecha, ocupando una extensión total de 9.2 Mha. Los principales países productores en la actualidad son China Brasil, Estados Unidos, India, México y España (FAO, 2016). Desde el punto de vista comercial existen cuatro grupos: naranjas, mandarinas, limones/limas y pomelos. Las naranjas encabezan la producción mundial con 68 Mt (57%); le siguen las mandarinas con 30.4 Mt (25%), limones/limas con 13 Mt (11%) y pomelos con 8 Mt (7%) (FAO, 2016) (**Fig. I.1.**).

Un tercio de la producción citrícola global se destina a la industria del zumo de naranja, cuya actividad se ubica en un 85% en EE.UU. y Brasil. En la cuenca mediterránea, sin embargo, la producción se destina mayoritariamente al consumo en fresco y países como España o Turquía son grandes exportadores de cítricos (FAO, 2016). En el año 2013, la producción citrícola en España fue de 8.3 Mt, ocupó una extensión de 391 550 ha y consistió mayoritariamente en mandarinas (46.7%), naranjas (42.8%) y limones (10%). De la producción total se destinó el 57% a la exportación, un 20% al consumo en fresco y un 18% a la industrialización (Navarro, 2015). La Comunidad Valenciana es la principal productora de cítricos en España (42%), con 3.5 Mt cosechadas en el año 2013, que ocupan un área de cultivo de 299 478 ha (MAGRAMA, 2014). En ésta región, se producen mayoritariamente mandarinas (48%) y naranjas (46%), siendo el 70% de las mandarinas de tipo clementina y el 81% de las naranjas de tipo navel (GVA, 2013).

## 1.2. Taxonomía

Los cítricos se clasifican en la familia Rutaceae y subfamilia Aurantioideae, que se subdivide en las tribus Clauseneae y Citreae. La tribu Citreae contiene tres subtribus: Triphasiinae, Balsamocitrinae y Citrinae. En ésta última se clasifican los llamados ‘cítricos verdaderos’ que se distribuyen en los géneros *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Clymenia*, *Fortunella*, *Poncirus* y *Citrus*. La mayor parte de especies cultivadas pertenecen a los tres últimos géneros citados.

*Eremocitrus* es un género monoespecífico que contiene a *Eremocitrus glauca* (Lindl.) Swing, arbusto xerófito endémico que habita en las regiones áridas y semiáridas de Australia. Su fruto, conocido como lima del desierto, es un ingrediente tradicionalmente utilizado en la cocina aborígen.



**Figura I.1.** Producción local, nacional y mundial de los principales grupos de cítricos (FAO, 2016).

El género *Microcitrus* está constituido por seis especies: *Microcitrus australasica* (F. Muell.) Swing., *M. australis* (Planch.) Swing., *M. garrowayi* (F.M. Bail.) Swing., *M. inodora* (F.M. Bail.) Swing., *M. maideniana* (Domin) Swing. y *M. warburgiana* (F.M. Bail.) Tan. (Krueger y Navarro, 2007). Todas son arbustos xerófitos, nativos de zonas desérticas de Australia y Nueva Guinea. El *M. australasica*, denominado lima del desierto, tiene diversas aplicaciones culinarias en Australia, donde se han realizado selecciones de clones que se cultivan a pequeña escala. Actualmente está teniendo cierta relevancia por su uso en recetas de alta cocina y se le denomina popularmente ‘caviar vegetal’ en referencia a las vesículas redondeadas del fruto que se separan fácilmente.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

*Clymenia* es, posiblemente, el género más primitivo dentro de los cítricos verdaderos. Originalmente se consideró dentro del género *Citrus*, pero tanto Swingle (Swingle, 1943; Swingle y Reece, 1967) como (Tanaka, 1977) lo consideraron independiente. Un estudio reciente (Berhow et al., 2000) sugiere su carácter híbrido, entre *Fortunella* y *Citrus*, basándose en datos bioquímicos y taxonómicos.

En el género *Fortunella* se agrupan 4 especies denominadas kumquats, cultivadas tradicionalmente en China y apreciadas por su pequeño fruto comestible de corteza dulce: *Fortunella margarita* (Lour.) Swing., *F. japonica* (Thunb.) Swing., *F. polyandra* (Ridl.) Tan. y *F. hindsii* (Champ.) Swing. (Krueger y Navarro, 2007).

El género *Poncirus* contiene únicamente la especie *Poncirus trifoliata* (L.) Raf, o naranjo trifoliado. Se utiliza como portainjerto y como parental en programas de mejora de portainjertos, por conferir un conjunto de caracteres agronómicos de interés. Los más destacados son la reducción del vigor de la variedad injertada, la tolerancia a la Tristeza (*Citrus tristeza virus* o CTV), al nematodo *Tylenchulus* spp. y al hongo *Phytophthora* spp., la resistencia al frío y la buena calidad de fruto que confiere a la variedad injertada (Bitters, 1986). Sin embargo, es susceptible a la clorosis férrica, especialmente en suelos con alto contenido en carbonatos y su tolerancia a la salinidad del suelo es muy limitada. El naranjo trifoliado es el progenitor de algunos de los portainjertos más utilizados en España, como son los citranges Troyer y Carrizo (*C. sinensis* × *P. trifoliata*) y el citrumelo 4475 (*C. paradisi* × *P. trifoliata*).

En el género *Citrus*, existe controversia en cuanto a la taxonomía. Las clasificaciones que actualmente tienen mayor aceptación son las propuestas por Swingle (Swingle, 1943; Swingle y Reece, 1967) y Tanaka (Tanaka, 1977), que diferencian 16 y 162 especies respectivamente.

Swingle dividió el género *Citrus* en 2 subgéneros, *Papeda* y *Eucitrus*. Estos se distinguen, *grosso modo*, por sus frutos. Los de *papeda* no son comestibles porque contienen agregados de aceites esenciales que confieren un sabor amargo al zumo, mientras que los frutos de *Eucitrus* son comestibles y tienen sabor ácido o dulce.

El subgénero *Eucitrus* cuenta con 10 especies: *Citrus medica* L. (cidro), *C. aurantium* L. (naranja amargo), *C. limon* (L.) Burn. f. (limón), *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. (lima), *C. grandis* (L.) Osb. (zambo), *C. sinensis* (L.) Osb. (naranja dulce), *C. reticulata* Blanco (mandarina), *C. paradisi* Macf. (pomelo), *C. indica* Tan. y *C. tachibana* (Mak) Tan. A excepción de las dos últimas especies citadas, todas tienen importancia económica.

La clasificación de Tanaka, sin embargo, diferencia en *Citrus* 2 subgéneros: *Archicitrus* y *Metacitrus*. En relación a las especies comerciales, sus diferencias de criterio respecto a Swingle, afectan principalmente a los limones, limas y mandarinas, que quedan subdivididas en un alto número de especies.

### 1.3. Origen, diversificación y difusión del cultivo

Actualmente se considera que todas las especies de *Citrus* excepto el pomelo y los géneros relacionados *Fortunella* y *Poncirus* se originaron en regiones tropicales y subtropicales de Asia y el archipiélago malayo; mientras que los géneros *Eremocitrus*, *Microcitrus* y *Clymenia* serían originarios de Australia y Oceanía (García-Lor et al., 2013b). Desde estas localizaciones, los cítricos se extendieron a otros continentes llevados por la civilización (Webber, 1967; Chapot, 1975; Calabrese, 1992; Ollitrault y Navarro, 2012).

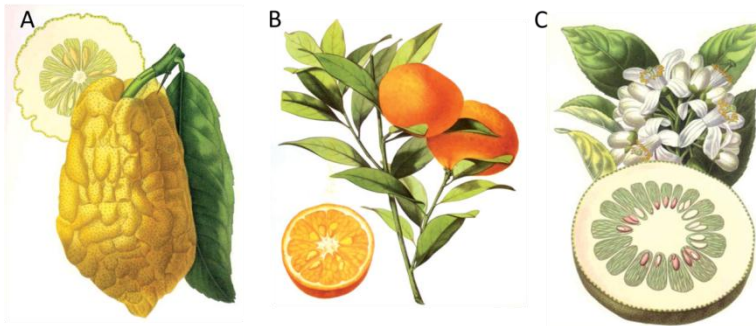
Tradicionalmente se ha propuesto que las especies originales de las que deriva la diversidad del género *Citrus* son 3: *C. medica*, *C. reticulata* y *C. máxima* (**Fig. I.2.**) (Scora, 1975; Barrett y Rhodes, 1976). Esta hipótesis ha sido respaldada por numerosos estudios bioquímicos y moleculares (Herrero et al., 1996; Federici et al., 1998; Nicolosi et al., 2000; Gulsen y Roose, 2001b; Barkley et al., 2006; Li et al., 2010; Penjor et al., 2013) y los datos más recientes añaden un ancestro más: el Papeda *C. micrantha* (Nicolosi et al., 2000; García-Lor et al., 2013b; Wu et al., 2014).

El resto de especies del género *Citrus*, denominadas secundarias, derivan de la hibridación directa o sucesiva entre las especies originales (Scora, 1975; Barrett y Rhodes, 1976; Nicolosi et al., 2000; Gmitter et al., 1992; Davies y Albrigo, 1994; Ollitrault y Navarro, 2012; Uzun y Yesiloglu, 2012; García-Lor et al., 2012; García-Lor et al., 2013a) (**Fig. I.3.**).

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Además existen cultivares híbridos, obtenidos por cruzamiento deliberado o espontáneo; es el caso de los tangors (mandarino × naranjo dulce), tangelos (mandarino × pomelo) (Hodgson, 1967), citranges (naranjo dulce × naranjo trifoliado) (Savage y Gardner, 1965; Cameron y Soost, 1986) o citrumelos (pomelo × naranjo trifoliado) (Hutchiston, 1974).

El cultivo de los cítricos se inició en China, donde también se produjo la domesticación de muchas de las especies hoy conocidas (Calabrese, 1998). La mención más antigua a los cítricos en la literatura, según relata la obra *Chu lu* de Han Yen-Chih (1178 a. C.) traducida al inglés en 1923, se encuentra en el libro *Yu Kun* ('Tributo de Yu'), que describe la ofrenda de cestas con dos clases de cítricos al emperador Ta Yu (2205-2197 a. C.), pudieran ser, por el tamaño, zamboas y mandarinas, (Webber, 1967). Probablemente, el cidro fue el primer cítrico conocido en Europa (Swingle y Reece, 1967). Sucesivamente, fue difundido desde Asia, llegando probablemente a Egipto (1500-1200 a. C.) y Oriente Medio y alcanzando Oriente Próximo y Grecia durante el reinado de Alejandro Magno (S. IV a. C.). En España, el cidro se cultivaba en Andalucía ya en el S. VII y fue, probablemente, introducido desde Italia por los romanos en el S.V (Zaragoza, 2007).



**Figura 1.2.** Especies tradicionalmente consideradas originales de las que deriva la diversidad del género *Citrus*: **A)** *C. medica*, **B)** *C. reticulata*, **C)** *C. máxima*.

El naranjo amargo, híbrido natural de mandarina y zamboa (Fang, 1993; Nicolosi et al., 2000; Barkley et al., 2006; Bayer et al., 2009), fue extendido por mercaderes árabes desde la India hacia Irak, Siria, Palestina, Egipto y norte de África; desde allí fue introducido a la península ibérica, Sicilia y la isla de Cerdeña. El limón (*C. limon*), híbrido de cidro y naranjo amargo (Nicolosi et al., 2000; Gulsen y Roose, 2001a; García-Lor et al., 2012; Ollitrault et al., 2012b; García-Lor et al., 2013b; Curk et al., 2014, 2015) se introdujo en Europa, posiblemente, por las mismas vías que el naranjo amargo. En España fue citado por primera vez por el geopono toledano Ibn Bassāl (1048-1075 d. C.) en su *Libro de Agricultura*. En la obra de Ibn al-Awwan (S. XII) se describe que, ya entonces, el cidro, el naranjo amargo y el limonero eran populares y cultivados en la región de Sevilla (Zaragoza, 2007).

A partir del año 1150, los árabes contribuyeron de forma importante a la difusión de los cítricos en el norte de África y sur de Europa, dando origen a la citricultura en éstas zonas. Otra ruta de difusión más tardía fue la llevada a cabo por los cruzados, quienes en el siglo XIII descubrieron en oriente medio naranjas amargas, limones, zamboas y algunos híbridos de identificación incierta y los introdujeron en Europa (Zaragoza, 2007). Durante este periodo, los frutos eran más apreciados como medicamento que como alimento, ya que la acidez de la pulpa y la sequedad de la corteza los hacían poco apetecibles.

El naranjo dulce, que actualmente se considera un híbrido entre parentales a su vez híbridos entre zamboa y mandarino (García-Lor et al., 2013b; Wu et al., 2014), llegó a Europa traído por los comerciantes genoveses y venecianos de finales del siglo XV, así como por las expediciones portuguesas a China (Zaragoza, 2007). Fue también a partir de entonces cuando los cítricos alcanzaron América, introducidos por las expediciones colombinas. La primera plantación se realizó en Haití (1493) y desde allí se distribuyeron a México (1518), Brasil (1540), Florida (1565), California (1769), Perú (1609) y Texas (1890). Al continente africano, las naranjas, limones y zamboas llegaron a mediados del S. XVII al ser introducidas en Sudáfrica; mientras que a Australia, los cítricos llegaron en 1788 traídos desde Brasil. (Webber, 1967).

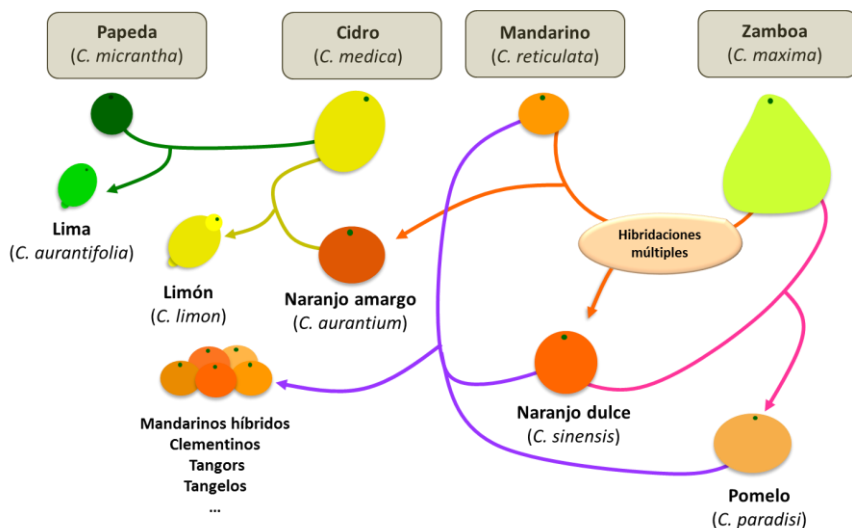


## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las mandarinas, uno de los tres principales grupos ancestrales de los cítricos cultivados (Barrett y Rhodes, 1976; Nicolosi et al., 2000 Krueger y Navarro, 2007;), son un grupo muy polimórfico, tanto genotípicamente (Luro et al., 2004) como fenotípicamente. Su germoplasma fue clasificado como *C. reticulata* por algunos autores (Swingle y Reece, 1967; Mabberley, 1997) y clasificado en distintas especies por otros autores. Webber las agrupó en los tipos king, satsuma, mandarina y tangerina (Webber, 1943), mientras que Tanaka las clasificó en 5 grupos con un total de 36 especies (Tanaka, 1954). La enorme diversidad de este grupo varietal, deriva de la combinación de cruces intraespecíficos e interespecíficos dirigidos por el hombre o naturales (Nicolosi et al., 2000). Trabajos recientes del grupo proponen que ésta diversidad parece haber sido favorecida por las introgresiones adquiridas al hibridar con otros grupos de cítricos (Curk et al., 2015; García-Lor, 2013c).

Las mandarinas fueron los cítricos más tardíamente introducidos en Europa; llegaron a Inglaterra en en 1805, desde donde se llevaron a Malta, Sicilia e Italia (Webber, 1967). En España comenzaron a cultivarse en Málaga, procedentes de Italia, aunque el cultivo comercial se inició en Valencia hacia 1845 (Zaragoza, 2007).

A mediados del S. XIX, el comercio mundial de cítricos se incrementó e impulsó el desarrollo de las zonas dónde el cultivo era fácilmente viable gracias a la climatología. A finales de éste mismo siglo, el comercio de España, sobre todo con Francia, comenzó a ser relevante y la citricultura se trasformó en una actividad lucrativa (Zaragoza, 2007).



**Figura I.3.** Diversificación de los cítricos mediante hibridación.

## 2. Portainjertos de cítricos

### 2.1. Importancia

El portainjerto, patrón o pie es la planta que aporta la sección basal al árbol, incluyendo el sistema radical y una porción de tallo, sobre la que se injerta la variedad a cultivar. La utilización del portainjerto es imprescindible en la citricultura comercial por varios motivos. Por un lado la propagación por injerto de varetas de material adulto, evita la aparición de caracteres juveniles en las variedades y adelanta la entrada en producción. Además, ésta técnica permite que la plantación adquiera las características necesarias para su adecuado cultivo, ya que la mayoría de variedades no resistirían ser plantadas directamente en el suelo sobre sus propias raíces. El portainjerto proporciona la capacidad de adaptación a las condiciones ambientales (frío, sequía, salinidad, encharcamiento...) y puede modificar la susceptibilidad del cultivo a agentes patógenos. Además, influye en otras muchas características de la variedad, como son el vigor, el rendimiento productivo y el tamaño de los frutos, así como en su calidad organoléptica (Barry et al., 2004; Liu et al., 2015) o su calendario de maduración (Castle, 2010).

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Otro aspecto relevante para que una especie sea apta como portainjerto es su manejo en el vivero. Idealmente la multiplicación debe ser fácil, económica y uniforme, lo que depende en gran medida del grado de poliembrionía nucelar propio de la especie y de la producción de semillas. Esta cualidad, permite mantener el tipo al propagar mediante semilla y mejora la eficiencia. Además, el cultivo del portainjerto debe ser sencillo, el prendimiento del injerto debe tener una tasa de éxito elevada y su establecimiento en el campo y adaptación al terreno definitivo deben ser fáciles de lograr (Castle, 2010). No obstante, los portainjertos de cítricos también pueden multiplicarse actualmente mediante micropropagación *in vitro*. Aunque esta técnica es más cara que la propagación por semillas, permite utilizar genotipos con baja poliembrionía o con baja producción de semillas e iniciar la evaluación de nuevos portainjertos que aún están en periodo juvenil y no fructifican (Bordas et al., 2015). De hecho, la micropopagación se ha utilizado en esta tesis para propagar híbridos somáticos juveniles, lo que ha permitido obtener plantas para su evaluación (**véase capítulo VI**).

Ningún portainjerto reúne todas las características idealmente requeridas por un productor, pero realizar una elección adecuada es clave para el aprovechamiento óptimo de la plantación durante los años de su explotación (Bitters, 1986). No en vano, varios de los problemas graves de la citricultura mundial han estado relacionados con la susceptibilidad de los portainjertos a distintos patógenos. Los portainjertos han sido también determinantes para que haya podido implantarse la citricultura en muchas áreas del mundo con problemas específicos de estreses abióticos. Es muy difícil que un portainjerto sea resistente o tolerante a los diversos estreses bióticos y abióticos existentes en zonas de cultivo específicas y además se adapte a los condicionantes de producción de la misma. De hecho, el número de portainjertos disponibles para las distintas zonas de cultivo es muy escaso, lo que provoca situaciones que se aproximan al monocultivo, haciendo a la citricultura vulnerable a las adversidades emergentes. Por ello, es conveniente que cada zona citrícola disponga de varios portainjertos adaptados a sus características y bien caracterizados, que permitan obtener buenas producciones de frutos de calidad de forma sostenible.

## 2.2. Historia

El injerto en cítricos ya se practicaba en China en épocas anteriores al comienzo de la era Cristiana (Schenk, 1962). Las referencias a ésta técnica en la literatura griega y romana también son múltiples, sin embargo, no era una práctica rutinaria, sino más bien anecdótica. El cultivo de cítricos se realizó mayoritariamente sin injertar las variedades hasta el S. XIX (Bitters, 1986). Desde entonces, el injerto fue reemplazando al cultivo de la variedad sin injertar, propagada por semillas, de manera generalizada, como medida para evitar la gomosis causada por el hongo *Phytophthora* spp. (Fawcet, 1936). El portainjerto más utilizado en éste reemplazo fue el naranjo amargo, por ser resistente a la enfermedad y su uso se extendió en la citricultura mediterránea, en Sudamérica, EE.UU y, en menor medida, en otras áreas cítricas como Australia, Centroamérica, Irán, Iraq y Jordania (Bitters, 1986). A partir de 1940, la epidemia de CTV que afectó a las variedades de naranjo, mandarino y pomelo injertadas sobre naranjo amargo (Bitters y Parker, 1953; Wallace, 1978), limitó la utilización de éste portainjerto, que fue sustituido por portainjertos tolerantes a CTV con el propósito de controlar la enfermedad en Sudáfrica, Sudamérica, EE.UU, España e Israel; mientras que, en otras áreas cítricas, particularmente en países de la cuenca del Mediterráneo continuó siendo el portainjerto más utilizado hasta épocas recientes.

En España existían, en 1882, unas 4000 ha de plantaciones cítricas comerciales, fundamentalmente naranjos dulces, cultivados sobre su propia raíz o injertados sobre limonero, naranjo dulce, cidro, o naranjo amargo. La epidemia de gomosis causó la muerte de la mayoría de los árboles excepto los injertados sobre naranjo amargo, que es tolerante a la enfermedad. A partir de entonces fue usado de forma generalizada en las nuevas plantaciones (Zaragoza, 2007) y el ejemplo fue seguido en otras áreas cítricas del mundo. Ya a principios del S. XX, se cultivaban en España unas 18000 ha de cítricos y gran parte de la producción se exportaba a países europeos. La rentabilidad y expectativas del cultivo promovieron, entre 1910 y 1930, la importación de variedades de más calidad de otros países para adaptarse a la demanda.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En aquellos años, dado el desconocimiento de las enfermedades virales y transmisibles por injerto y la consecuente ausencia de controles sanitarios, se importaron numerosos agentes patógenos con las nuevas variedades. En 1930 se describieron los primeros síntomas de algunas virosis y en 1956, cuando la citricultura española tenía unas 90000 ha cultivadas, se observaron las primeras muertes de naranjos y mandarinos injertados sobre naranjo amargo causadas por el CTV, cuya transmisión esta mediada por pulgones. Desde 1957, la epidemia ha obligado a arrancar 44 millones de árboles (Cambra et al., 2000; Moreno et al., 2008) y a prohibir el uso del naranjo amargo como portainjerto.

El reemplazo de portainjertos, así como el desarrollo de nuevos cultivares, ha sido muy frecuentemente motivado por la incidencia de enfermedades o la resolución de limitaciones en el cultivo (Castle, 2010). A nivel mundial, el control de enfermedades marcó, durante la primera mitad del S. XX, el comienzo de la era moderna de los portainjertos de cítricos, caracterizada por la búsqueda de alternativas en las especies silvestres (Webber, 1967) como el mandarino Cleopatra (*C. reshni* Hort ex Tan), el limonero rugoso (*C. jambhiri* Lush), el limonero Volkameriana (*C. limonia* Osbeck), *C. macrophylla* o *P. trifoliata*, entre otras (Castle, 2010).

Hacia mediados del S. XX se inició una nueva etapa con la selección de los antiguos híbridos, procedentes de programas de mejora, como los citranges (*C. sinensis* × *P. trifoliata*) y citrumelos (*C. paradisi* × *P. trifoliata*), obtenidos de hibridaciones realizadas por USDA en torno a 1900 (Savage y Gardner, 1965). Éstos híbridos son los únicos portainjertos procedentes de programas de mejora que han sido ampliamente comercializados y utilizados a nivel mundial. Destacan los citranges Troyer y Carrizo, que comenzaron a comercializarse en torno a 1950 y 1970 respectivamente (Castle, 2010), el citrumelo CPB-4475 que se incorporó al mercado en 1974 (Wutscher, 1979) y el citrange C-35 (Cameron y Soost, 1986) que ha comenzado a utilizarse más recientemente. A mediados del siglo pasado comenzó también el desarrollo y evaluación de nuevos híbridos en programas de mejora, llevados a cabo en varios países. Las primeras obtenciones de éstos programas han ido incorporándose al mercado en los últimos años (Forner et al., 2003; Bowman y Rouse, 2006; Castle, 2010).

En España, con la detección del CTV, fue necesario seleccionar nuevos patrones tolerantes al virus, que además debían tolerar los estreses abióticos presentes en nuestra citricultura y proporcionar fruta de calidad para permitir un rendimiento económico adecuado. Sin embargo, en torno a 1970, el hallazgo de que un gran número de enfermedades transmisibles por injerto, causadas por virus y viroides, se encontraban infectando a la totalidad de variedades de cítricos, limitó enormemente la elección de nuevos portainjertos (Navarro, 2015). Inicialmente se realizaron ensayos con el naranjo dulce, el mandarino común (*C. deliciosa*), el mandarino Cleopatra y el citrange Troyer. Los dos primeros se descartaron rápidamente por su sensibilidad a la gomosis y el citrange Troyer y el mandarino Cleopatra se seleccionaron para su propagación comercial en viveros. El uso del naranjo amargo se limitó únicamente a portainjerto de limonero, ya que esta combinación es tolerante a CTV (Zaragoza, 2007). También se realizaron ensayos para el cultivo de limonero sobre el portainjerto *C. macrophylla* que dieron buenos resultados, por lo que se autorizó su uso con variedades de limonero libres de virus.

En 1975, la puesta en marcha de un programa de obtención de plantas libres de patógenos mediante la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (Navarro et al., 1975; Navarro, 1990; Navarro et al., 2004; Navarro, 2015), permitió sanear todas las variedades existentes en España e importar variedades de otros países a través de la estación de cuarentena de cítricos, que se distribuían libres de patógenos a todos los viveros de cítricos para su propagación comercial en el marco de un programa de certificación (Navarro et al., 1984). Desde principios de los años 80, cuando todas las variedades propagadas por los viveros de cítricos estaban ya libres de patógenos, se eliminaron los limitantes sanitarios para la elección de portainjertos a excepción del CTV, que al ser transmitido por pulgones continúa impidiendo la utilización de portainjertos sensibles como el naranjo amargo (Pina et al., 2015).

A principios de los años 90, en España se utilizaban como portainjerto mayoritariamente los citranges (77%), seguidos por el mandarino Cleopatra (19%), que se usaba fundamentalmente en suelos calizos y salinos.

El citrange Carrizo fue progresivamente sustituyendo al Troyer y comenzaron a buscarse alternativas para el mandarino Cleopatra. Dado su comportamiento agronómico indeseable en algunos aspectos (véase apartado I.2.3.1.5), se introdujeron el limonero Volkameriana (4%) y el *C. macrophylla*. Este último, se utilizaba como patrón de limoneros desde mediados de los años 70, con excelentes resultados agronómicos en suelos salinos con alto contenido de caliza. Sin embargo, su utilización con mandarinos y naranjos se descartaba porque la información disponible indicaba que era sensible a CTV (Moreno et al., 2008) e inducía baja calidad organoléptica al fruto de la variedad injertada. No obstante, a principios de los años 90 se iniciaron, promovidas por los agricultores, algunas plantaciones experimentales para evaluar su comportamiento con naranjo y mandarino en éste tipo de suelos. Los resultados indicaron que la sensibilidad de *C. macrophylla* a CTV era menor de la que se había descrito en otros países, debido fundamentalmente a que la mayoría de las razas de CTV presentes en España son relativamente suaves (Ballester-Olmos et al., 1993; Vidal et al., 2012). Algunos árboles mostraron reducción del crecimiento y los síntomas de acanaladuras en el tronco típicos de la virosis, pero el impacto en la producción fue escaso. La adaptación de *C. macrophylla* a los suelos ensayados fue muy buena y la reducción en la calidad de la fruta fue menor de la esperada. Además, los arboles presentaban una rapidísima entrada en producción y una cosecha abundante, lo que permitía el retorno rápido de la inversión. Considerando estas observaciones, a partir de mediados de los años 90 se inició la propagación comercial de naranjos y mandarinos sobre *C. macrophylla* y su utilización ha aumentado desde entonces de forma continua.

### 2.3. Situación actual

Los portainjertos que en los últimos años han formado parte de la citricultura a nivel mundial y que hoy en día siguen teniendo un uso mayoritario son fundamentalmente naranjo amargo, mandarino Cleopatra, limonero Rugoso, naranjo trifoliado, los citranges Carrizo, Troyer y C-35, *C. macrophylla*, citrumelo Swingle y lima Rangpur (Castle, 2010). El desarrollo de nuevos portainjertos, se centra en reunir el mayor número de características de interés en un solo cultivar.

Son esenciales las tolerancias a estreses bióticos y abióticos requeridas en cada zona de cultivo e inducir buen rendimiento y buena calidad al fruto (Castle, 2010).

El portainjerto tiene una influencia fundamental en la calidad del fruto (Albrigo, 1977; Barry et al., 2004) y su efecto en la producción es también notable (Castle, 1995). El tiempo necesario para lograrse la primera cosecha comercial desde el establecimiento de la plantación así como la producción final alcanzada varían enormemente dependiendo del portainjerto utilizado y contribuyen de manera importante a la rentabilidad del cultivo. El rendimiento puede también optimizarse aumentando la densidad de la plantación a costa de la disminución del tamaño de los árboles, seleccionando portainjertos reductores del vigor. Ésta cualidad es muy apreciada porque además contribuye a economizar los costes de recolección, poda y tratamientos fitosanitarios (Castle, 2010; Grosser y Gmitter, 2011).

Existe también un componente social que interviene en relación a la innovación en portainjertos de cítricos (Castle, 2010). Los reemplazos masivos de portainjertos, cuando no han sido motivados por la necesidad extrema, no han resultado fáciles de llevar a cabo. Suelen enfrentarse al obstáculo de la opinión tradicionalista y basada en la experiencia propia del agricultor, que habitualmente percibe el cambio como un riesgo que no está dispuesto a correr. En este sentido, el reemplazo con portainjertos ya conocidos podría tener mejor acogida que el reemplazo con cultivares nuevos. Es frecuente que durante la evaluación de portainjertos se describan solamente algunas de sus características, mientras que otras se descubren *a posteriori*, al exponerse el portainjerto a multitud de condiciones durante su explotación comercial (Castle, 2010). Esto plantea la posibilidad de considerar los portainjertos ya conocidos y reevaluarlos para determinar su utilidad en nuevas circunstancias.

### 2.3.1. Portainjertos más utilizados actualmente en España

En España, la presencia de CTV y Phytophthora, así como el alto contenido en caliza de la mayoría de los suelos citrícolas, limitan el número de portainjertos adecuados para el cultivo. Para una citricultura competitiva, el portainjerto debe reunir las capacidades de tolerar a éstos patógenos, adaptarse al cultivo en suelo con alto contenido en caliza y salinidad, e inducir alta producción y buena calidad de la fruta de la variedad injertada.



Actualmente los citranges Carrizo y Troyer se utilizan en un 75% de las plantaciones, mientras que en el resto se utilizan fundamentalmente *C. macrophylla* (8%), mandarino Cleopatra (6%) y *C. volkameriana* (5%) (MAGRAMA, 2014). Sin embargo, en las nuevas plantaciones, el Carrizo se ha reducido a un 52% y el Troyer no se utiliza, mientras que el *C. macrophylla* se ha incrementado hasta alcanzar un 23%, el mandarino Cleopatra se ha reducido a un 5% y el limonero Volkameriana se mantiene en un 6%. Además se ha iniciado la propagación sobre citrange C-35 (7%) y sobre citrumelo Swingle (5%) (Navarro, 2015). Sin embargo, persiste la necesidad de incorporar nuevos portainjertos que ofrezcan un conjunto más completo de cualidades de interés. Recientemente se han comenzado a comercializar portainjertos nuevos, como el FA-5 (*C. reshni* × *P. trifoliata*) (Forner et al., 2003), procedentes del programa de mejora de portainjertos de cítricos del IVIA, iniciado en 1974. En los apartados siguientes se detallan los principales atributos y limitaciones de los portainjertos utilizados actualmente en España.

#### 2.3.1.1. Citranges Troyer y Carrizo

Estos híbridos, obtenidos en torno a 1900 en un programa de mejora de USDA (Savage y Gardner, 1965), son prácticamente idénticos. De acuerdo con los datos existentes, son dos propagaciones de un híbrido original. El Carrizo es el patrón más utilizado por su vigor y buena producción en todos los suelos, excepto en los que presentan contenido elevado de caliza o salinidad. Quizá su característica más apreciada es conferir al fruto una muy buena calidad comercial, aunque la calidad de la fruta madura de las clementinas, fundamentalmente ‘Clemenules’, se deteriora rápidamente en el árbol. Esto, en la práctica, reduce el periodo de recolección, contribuyendo al exceso de oferta de estas variedades, con la consecuente reducción de precios pagados al agricultor. El Carrizo también tolera bien el encharcamiento y las heladas (Platt y Bitters, 1971; Yelenosky et al., 1973) y confiere tolerancia a CTV (Bitters, 1986), al virus de la psoriasis de los cítricos (*Citrus psorosis virus* o CPsV), a la xyloporosis (*Hop stunt viroid* o HSVd), al virus de las protuberancias nerviales y agallas leñosas (*Citrus enation woody-gall virus* o CEWGV) y a *Phytophthora* spp. Sin embargo, es sensible al viroide de la exocortis de los cítricos (*Citrus exocortis viroid* o CEVd) y a los nematodos que afectan a las raíces de cítricos *Tylenchulus* spp. (Bitters, 1986; Castle, 2010).

Presenta muy buena compatibilidad con las variedades de naranjo dulce, mandarino y pomelo cultivadas en España (GVA, 2014), con las que tiene una unión de tipo cuello de botella.

#### 2.3.1.2. *C. macrophylla*

Esta especie es originaria de Filipinas y proviene probablemente del cruce de *C. celebica* Koord. × *C. medica* (Swingle y Reece, 1967). En España es el segundo portainjerto más utilizado desde que, en la década de los 70, sustituyera al naranjo amargo para el cultivo de limonero y mostrara su excelente comportamiento en suelo salino (García-Legaz et al., 1993; Fernández-Ballester et al., 2003; García-Sánchez et al., 2005) y en suelo calcáreo (Castle et al., 2009; Pestana et al., 2011) (véase apartado 2.2). Sus principales inconvenientes son la reducción de la calidad organoléptica del fruto (Fallahi et al., 1991; Fallahi y Rodney, 1992) y la sensibilidad a CTV, a *Tylenchulus* spp., HSVd y a las heladas. Tolera bien al CPsV, CEVd, CEWGV y a *Phytophthora* spp. (Matheron et al., 1998) e induce el crecimiento vigoroso de la variedad. Tiene muy buena productividad, la entrada en producción es temprana (Castle, 2010; GVA, 2014) y el tipo de unión que desarrolla con la variedad es liso.

#### 2.3.1.3. *Citrange C-35*

Este cultivar, híbrido de *C. sinensis* ‘Ruby’ × *P. trifoliata* ‘Webber-Fawcett’ fue obtenido en 1951 en el programa de mejora de portainjertos de la Universidad de California. Se caracteriza por inducir buena calidad de fruto y buena producción en naranjo, mandarino y pomelo y tener un efecto reductor del tamaño de copa. Es tolerante a la sequía y al frío, a *Phytophthora* spp. y al CTV y resistente a *Tylenchulus* spp. Sin embargo, no es apto para el cultivo en suelos calcáreos o salinos (Cameron y Soost, 1986).

#### 2.3.1.4. *Limonero Volkameriana*

Este portainjerto comenzó a utilizarse para limonero en Italia a mediados del S. XX. Su taxonomía es controvertida ya que algunos autores lo consideran una especie (*C. volkameriana* Pasq.) y otros un cultivar de *C. limon* (Swingle, 1943) o de *C. jambhiri* (Tanaka, 1977). Sin embargo, trabajos recientes indican que es un híbrido de *C. reticulata* × *C. medica* (Curk et al., 2014). Destaca por su buena adaptación a suelos con elevado contenido en caliza o con salinidad, en combinación con su moderada tolerancia al frío.

Es tolerante también a CTV, sin embargo es sensible a *Phytophthora* spp. y a *Tylenchulus* spp. Induce el crecimiento vigoroso de la variedad, la entrada en producción precoz y muy buena productividad (Bitters, 1986; Salibe y Cereda, 1984), pero la calidad organoléptica de los frutos de la variedad injertada es relativamente baja.

### 2.3.1.5. *Mandarino Cleopatra*

El mandarino Cleopatra (*C. reshni* Hort. ex Tan.) es el cuarto portainjerto más utilizado en España. Es tolerante a suelo calizo y salino por su capacidad de exclusión de iones cloruro (Walker y Douglas, 1983). Es tolerante a todas las enfermedades transmisibles por injerto existentes en España (CTV, CPsV, CEVd, CEWGV, HSVd), confiere buena calidad de fruto a naranjos, mandarinos y pomelos pero es de lenta entrada en producción y difícil establecimiento en campo. Induce un tamaño de fruto menor que otros portainjertos, aunque es considerado un buen patrón para naranjo. Es sensible a *Phytophthora* spp., *Tylenchulus* spp. y a la asfixia radicular (Castle, 2010; GVA, 2014), por lo que solo es apto para el cultivo en suelos francos o arenosos.

### 2.3.1.6. *Citrumelo 'Swingle'*

Es un híbrido de *C. paradisi* 'Duncan' y *P. trifoliata*, obtenido en Florida en 1907 y comenzó a comercializarse promovido por el USDA en 1974 (Hutchiston, 1974). Es muy sensible a la caliza del suelo y moderadamente sensible a la salinidad y a la sequía. No tolera bien los suelos arcillosos ni el encharcamiento pero es muy tolerante al frío. Es resistente a *Thylenchulus* spp, a CTV y a *Phytophthora* spp. Confiere el crecimiento vigoroso del árbol y buena productividad (Bitters, 1986; GVA, 2014).

## 3. Poliploidía

### 3.1. Definición y trascendencia en plantas

La poliploidía es la condición heredable de poseer más de dos juegos completos de cromosomas y es un fenómeno muy común en plantas (Wood et al., 2009).

Clásicamente se ha considerado que su origen principal es la duplicación cromosómica (Stebbins, 1980), aunque algunos autores ya apuntaban que la hibridación de gametos no reducidos, o poliploidización sexual, debía ser el mecanismo predominante (Harlan y DeWet, 1975; De Storme y Geelen, 2013). Esta hipótesis ha ganado importancia en los últimos años (Bretagnolle y Thompson, 1995; Otto y Whitton, 2000; Ramsey, 2011). En eucariotas, la poliploidía es uno de los principales motores evolutivos, especialmente en plantas superiores (Grant, 1981; Soltis y Soltis, 1995; Wendel y Doyle, 2005; Cui et al., 2006; Chen, 2007; Husband et al., 2008; Soltis y Soltis, 2009; Chen, 2010; Hollister et al., 2012). Se estima que ha intervenido en la evolución de entre un 50% y un 70% de las especies de angiospermas (Masterson, 1994), confirmando plasticidad genotípica al aumentarse del número de copias del genoma (autopoliploidía) o complementarse genomas diferentes (alopoliploidía), favoreciendo así el potencial de adaptación al ambiente (Leitch y Leitch, 2008) y propiciando su selección (Feldman y Levy, 2012). Por ello, se ha propuesto que la poliploidía favorece la evolución adaptativa a las condiciones ambientales cambiantes (Ramsey, 2011) a través de la expresión diferencial de los genes duplicados (Dong y Adams, 2011; Tan et al., 2015).

También se han descrito cambios anatómicos y fisiológicos asociados a la poliploidía (Warner y Edwards, 1989; Warner y Edwards, 1993; Li et al., 1996), que pueden ofrecer ventajas frente a determinadas condiciones ambientales (Buggs y Pannell, 2007; Maherali et al., 2009; Ramsey, 2011; Manzaneda et al., 2012). Las plantas poliploides tienen, frecuentemente, nichos ecológicos más amplios por ser más tolerantes a determinadas condiciones estresantes (Stebbins, 1950; Stebbins, 1980) como la escasez hídrica (Baldwin, 1942; Nassar, 1992; Li et al., 1996; Pustovoitova et al., 1996; Nassar, 2006; Del Pozo y Ramírez-Parra, 2014), la salinidad del suelo (Meng et al., 2011; Chao et al., 2013; Wang et al., 2013; Yildiz y Terzi, 2013; Tu et al., 2014; Yang et al., 2014) y el calor o frío extremos (Zhang et al., 2010; Deng et al., 2012). El Ártico es una de las áreas del planeta más rica en organismos poliploides. Su éxito evolutivo se ha relacionado con la posesión de genomas con elevada heterocigosis fija (Mackey, 1970).

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Esta configuración alélica amortigua la depresión consanguínea y la deriva genética que propician las condiciones ambientales extremas (Brochmann et al., 2004). Dada su repercusión, la poliploidía es considerada un mecanismo de especiación simpátrica (Otto y Whitton, 2000).

En cuanto al impacto sobre el genoma, en alopoliploides se ha descrito que se asemeja al afecto de la hibridación interespecífica, porque ambos dan lugar a cambios de expresión no aditivos, tanto a nivel transcriptómico (Wang et al., 2006a; Stupar et al., 2007; Flagel et al., 2008; Allario et al., 2011) como a nivel proteómico (Albertin et al., 2009). Éste *shock* genómico (McClintock, 1984), que ocurre inmediatamente tras configurarse el alopoliploide, pone en marcha cambios epigenéticos que modifican la metilación de retroelementos, alteran la impronta genómica e inducen cambios en la expresión de genes homeólogos, afectando incluso a genes ribosomales, cuyo dominio es nucleolar (Chen, 2007). En ésta reorganización de la expresión génica, que sucede en organismos neo-poliploides, parecen tener un papel fundamental los pequeños RNA interferentes y los elementos transponibles (TEs) (Lu et al., 2012; Bennetzen y Wang, 2014; Li et al., 2014), así como los micro RNAs (Ha et al., 2009), los cambios de metilación (Salmon y Ainouche, 2010) y las remodelaciones de la cromatina (Aversano et al., 2012). En definitiva, la neo-regulación se encuentra más influenciada por la interespecificidad de los genomas que por su multiplicación. En los generos *Spartina* (Salmon et al., 2005), *Helianthus* (Lai et al., 2006) o *Arabidopsis* (Wang et al., 2006b) se han observado cambios drásticos al realizarse cruces interespecíficos sin variar la ploidía, mientras que los cambios asociados a la autoploidización detectados en el transcriptoma (Stupar et al. 2007) y proteoma (Albertin et al., 2005) son ligeros.

En *Arabidopsis*, la alotetraploidía también promueve la actividad transcripcional en TEs y la desmetilación de citosinas (Yaakov y Kashkush, 2011). En muchos neo-alopoliploides se han documentado cambios genómicos rápidos (Doyle et al., 2008) aunque en otros, como el algodón, no han sido detectados (Liu et al., 2001). Algunos genomas poliploides experimentan la pérdida de genes homeólogos (Soltis y Soltis, 2009; Buggs et al., 2012), mientras que en otros el efecto dominante es el cambio en la expresión génica (Flagel y Wendel, 2010).

En poliploides cuyo genoma se encuentra ya consolidado, se observan pérdidas en regiones del genoma distribuidas irregularmente y mayor expresión de los genes localizados en el genoma o en las regiones dominantes (Garsmeur et al., 2014). Estos datos sugieren que los cambios asociados a la poliploidía dependen de la estructura genómica de los parentales diploides de origen (Yu et al., 2010).

### 3.2. Incidencia en cítricos

Los cítricos y las especies emparentadas de la subfamilia Aurantioideae, son generalmente diploides ( $2n$ ) y tienen un número cromosómico básico de  $n=9$  (Krug, 1943). Sin embargo se han encontrado genotipos euploides con dotaciones superiores, siendo las más comunes la triploide ( $2n=3x=27$ ) y la tetraploide ( $2n=4x=36$ ) (Lee, 1988).

El kumquat (*F. hindsii* Swing.)  $4x$  ‘Hong Kong’ fue el primer cítrico silvestre poliploide identificado (Longley, 1925). Otros poliploides naturales descritos son la lima ‘Tahiti’ (*C. latifolia*) que es  $3x$ , (Jackson y Sherman, 1975), algunas accesiones  $4x$  de *P. trifoliata* (Iwasaki, 1943), el alotetraploide *Clausena excavata* Burm. F., el tetraploide *C. harmandiana* Pierre (Guill) y el hexaploide *Glycosmis pentaphylla* Retz. (Corre^a) (Ollitrault et al., 2008).

#### 3.2.1. Aprovechamiento

El antiguo hallazgo de la existencia de poliploides naturales en cítricos ha adquirido importancia en la actualidad al considerarse su explotación en programas de obtención de variedades  $3x$  sin semillas y en programas de mejora de portainjertos a nivel  $4x$  (Ollitrault et al., 2008). La ausencia de semillas en el fruto es una característica muy valorada por el consumidor, por lo que actualmente es prioritario el desarrollo de nuevas variedades de cítricos que no produzcan semillas en ninguna condición de cultivo (Navarro et al., 2015b). Esta cualidad se consigue eficazmente en las progenies  $3x$  por ser sus gametos estériles (Cameron y Frost, 1968). Para la obtención de cítricos  $3x$  la principal estrategia utilizada es la poliploidización sexual (Ollitrault et al., 2008), que consiste, bien en la realización de cruzamientos  $2x \times 2x$  (Cameron y Frost, 1968; Geraci et al., 1975; Navarro et al., 2015b) o bien de cruzamientos interploides  $2x \times 4x$  (Esen et al., 1978; Starrantino y Recupero, 1981; Navarro et al., 2015b) o  $4x \times 2x$  (Cameron y Burnett, 1978).

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La hibridación  $2x \times 2x$ , cuya progenie  $3x$  proviene de la unión de un megagametófito no reducido ( $2n$ ) y polen haploide ( $n$ ), permite prescindir de parentales  $4x$  (Esen y Soost, 1971; Geraci et al., 1975). Sin embargo, el éxito en éste tipo de hibridaciones depende de la frecuencia de formación de gametos femeninos no reducidos ( $2n$ ), que en cítricos varía entre un 1% y un 20% entre los diferentes genotipos (Esen et al., 1979). Los gametos no reducidos se originan debido a la interrupción errónea durante la meiosis, que restituye el núcleo sin reducción de la ploidía y puede suceder tras la primera división meiótica (Chen et al., 2008b) o tras la segunda división meiótica (Esen et al., 1979; Luro et al., 2004; Chen et al., 2008b). Estos mecanismos de restitución se denominan FDR y SDR respectivamente, correspondiendo éstas siglas a sus nombres en inglés (First Division Restitution y Second Division Restitution). El genotipo de los gametos  $2n$  varía dependiendo de su origen FDR o SDR (Mendiburu y Peloquin, 1979; Park et al., 2007) y conocer cuál es permite planificar el programa de mejora y diseñar los cruces para alcanzar el objetivo deseado eficientemente (Cuenca et al., 2011).

No obstante, se ha determinado que el método más adecuado para mantener los caracteres del parental donante del gameto  $2n$  en la progenie es la realización de cruzamientos interploides  $4x \times 2x$  o  $2x \times 4x$  (Esen et al., 1979; Luro et al., 2004; Ollitrault et al., 2008; Cuenca et al., 2011). Para ello es necesario disponer de genotipos  $4x$  y, si se utilizan como parental femenino, deben ser no apomícticos, ya que el desarrollo de los embriones nucelares impide el desarrollo normal del embrión zigótico (Frost y Soost, 1968; Koltunow, 1993). El mayor limitante para llevar a cabo cruzamientos interploides es la disponibilidad de parentales  $4x$  (Navarro et al., 2015b), que pueden obtenerse mediante hibridación somática, cruzamientos interploides o selección de plántulas  $4x$  espontáneas en los semilleros (véase apartado I-3.2.2.1.1). Éste último método solo es posible en genotipos apomícticos y tiene como inconveniente el largo periodo juvenil, que retrasa varios años la primera floración, necesaria para poder realizar los cruzamientos. Para facilitar la obtención de plantas  $4x$  en genotipos no apomícticos, así como para evitar la juvenilidad, se desarrolló una técnica que combina el microinjerto de ápices caulinares y el tratamiento con colchicina u orizalina (Aleza et al., 2009). Otra utilidad emergente de la tetraploidía es su aprovechamiento para la mejora de portainjertos de cítricos (véase apartado I-3.2.2.4).

En cualquier caso el manejo de la poliploidía en cítricos comprende procesos cuya frecuencia de éxito es baja y necesita de una metodología minuciosa y eficaz. Los avances realizados en las últimas décadas han permitido el establecimiento de programas de mejora a nivel 3x (Navarro et al., 2015b) y 4x (Grosser et al., 1995) a gran escala. De éstos avances, destaca el desarrollo de la citometría de flujo, que permitió automatizar el cariotipado, haciéndolo mucho más rápido y fiable (Arumuganathan y Earle, 1991; Hopping, 1993; Navarro et al., 2003). Más recientemente, el desarrollo de marcadores moleculares en cítricos, sobre todo los de tipo SSR y SNP, ha agilizado la elección de parentales y la selección de progenies en los programas de mejora (Ollitrault et al., 2010; García-Lor et al., 2012; Cuenca et al., 2013a; Cuenca et al., 2013b; Aleza et al., 2015). Además la puesta a punto de técnicas de cultivo *in vitro*, como el rescate de embriones o la regeneración (Aleza et al., 2010; Aleza et al., 2012a; Aleza et al., 2012b), ha permitido llevar a cabo éstos programas a gran escala, haciendo posible que la poliploidía en cítricos sea un carácter de utilidad para la mejora del cultivo.

### 3.2.2. *La tetraploidía en cítricos*

#### 3.2.2.1. *Tipos*

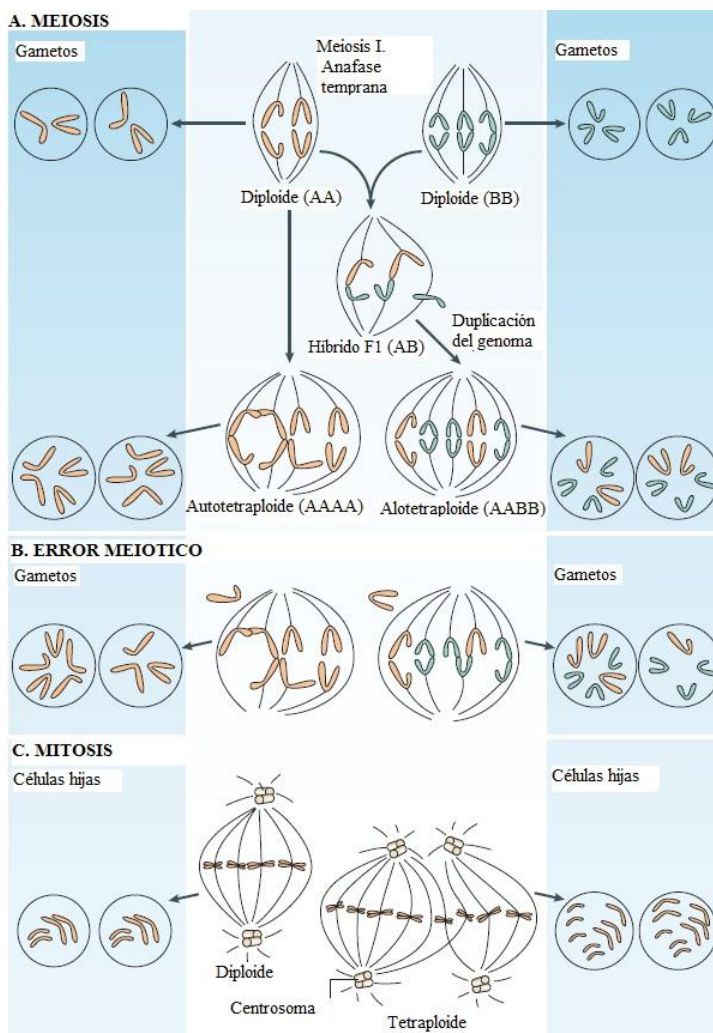
En general, se define que las plantas son autotetraploides si los juegos de cromosomas que poseen repetidos son idénticos y tienen el mismo origen. Por el contrario serán alotetraploides si los juegos de cromosomas repetidos son diferentes y tienen un origen distinto (**Fig. I.4A**). Generalmente, el origen de las plantas autotetraploides es la duplicación del genoma completo (**Fig. I.4C**), mientras que las alotetraploides se originan, bien por la hibridación sexual de individuos con genomas diferentes y posterior autoduplicación, bien mediante hibridación somática (véase apartado I-3.2.2.1.3) o bien mediante hibridación sexual con gametos no reducidos (véase apartado I-3.2.1). No obstante ésta división entre autotetraploides y alotetraploides no debe tomarse como absoluta ya que cuanto más parecidos sean los genomas de los parentales reunidos en la hibridación, más similar es el concepto de alotetraploide al de autotetraploide (Comai, 2005). Ante la disyuntiva algunos autores proponen considerar el modo de segregación del 4x para clasificarlo.



Si es mayoritariamente tetrasómica, puede calificarse de autotetraploide, mientras que si es disómica se denominaría alotetraploide. Otros autores proponen una categoría intermedia, el alotetraploide segmental, cuando el genoma, formado por los juegos de cromosomas reunidos *de novo*, combina segmentos homólogos y heterólogos que segregan de un modo distinto (Chen, 2007). El uso de esta definición puede resultar controvertido en cítricos debido al origen híbrido de muchos cultivares y especies. Los términos que comúnmente se emplean para denominar a los distintos tipos de cítricos 4x se describen en los apartados siguientes (I-3.2.2.1.1, I-3.2.2.1.2 y I-3.2.2.1.3).

### *3.2.2.1.1. Autotetraploidía natural*

La duplicación espontánea del genoma en cítricos sucede asociada a la apomixis o reproducción asexual mediante semillas. La mayor parte de las especies y variedades que componen el amplio germoplasma de los cítricos son apomícticas. En ellas, los embriones de origen asexual se originan en la semilla a partir de células nucelares del tejido materno que envuelve al saco embrionario y dan lugar a plantas idénticas a la progenitora (Frost y Soost, 1968). En éste contexto, puede suceder que los embriones apomícticos procedan de células nucelares que previamente han sufrido una duplicación espontánea del genoma nuclear completo (Cameron y Frost, 1968; Aleza et al., 2011). Las plantas resultantes son autotetraploides: genéticamente idénticas al ancestro excepto en el número de cromosomas (Barrett y Hutchison, 1978). Este fenómeno se describió en semilleros de cítricos, al observarse algunas plantas notablemente distintas pero cuyos rasgos distintivos eran compartidos entre variedades y especies. Se calificaron de aberrantes, se postuló que el origen de la aberración debía ser común a todas ellas y se describió cuál era el determinante genético (Frost, 1925). Varios estudios indican que la frecuencia de la tetraploidización espontánea depende de condicionantes fisiológicos y ambientales. Parece verse favorecida por las bajas temperaturas, ya que su prevalencia es mayor en las regiones de cultivo templadas de la cuenca mediterránea que en áreas de cultivo tropicales (Aleza et al., 2011). Difiere también entre variedades, pudiendo ser menor del 1% en naranjo dulce o hasta del 20% en híbridos intergenéricos como el citrange Carrizo (Lapin, 1937; Frost, 1943; Cameron y Frost, 1968; Saleh et al., 2008; Aleza et al., 2011).



**Figura I.4.** Mecanismos de tetraploidización que dan lugar a individuos **A)** alotetraploides **B)** aneuploides **C)** autotetraploides. Adaptado de Comai (2005).

En la propagación por semilla, la condición tetraploide se mantiene y la mayor parte de la progenie es  $4x$  e idéntica a la planta madre. En ocasiones, en los semilleros de plantas  $4x$ , se han encontrado, en frecuencia muy baja, individuos  $8x$  (Schwartz et al., 2001b).

### 3.2.2.1.2. *Autotetraploidía inducida*

En los cítricos no apomícticos (cidros, zamboas, clementinos y algunos híbridos de mandarina) no se han encontrado plantas autotetraploides espontáneas; no obstante se pueden producir artificialmente, tanto en cítricos apomícticos como en no apomícticos, si se induce la duplicación cromosómica empleando colchicina u orizalina (Tachikawa et al., 1971; Barrett, 1974; Gmitter et al., 1991; Aleza et al., 2009). El material vegetal de origen pueden ser yemas y tratarse *in vivo* (Barrett, 1974; Jaskani et al., 1996; Wakana et al., 2005), pero este método favorece la formación de citoquimeras. Sin embargo, utilizando protoplastos de callo embriogénico, se obtienen plantas 4x estables de genotipos apomícticos pero los regenerantes han de superar el largo periodo juvenil (Gmitter y Ling, 1991; Zhang et al., 2007). La metodología que permite evitar éstos inconvenientes consiste en el tratamiento con colchicina u orizalina de ápices de plantas adultas microinjertados, obteniendo autotetraploides estables de genotipos apomícticos o no apomícticos y evitando el largo periodo de juvenilidad (Aleza et al., 2009).

### 3.2.2.1.3. *Alotetraploidía*

Para obtener plantas 4x en cítricos, otra posibilidad es recurrir a la hibridación somática mediante fusión de protoplastos (Grosser y Gmitter, 2011; Dambier et al., 2011). Empleando ésta técnica, se ha logrado obtener nuevos genotipos aloploiploides, que reúnen los genomas nucleares de dos parentales y cuya dotación cromosómica es la suma de las que aportan las células fusionadas. Esta técnica requiere del aislamiento de células de los dos parentales, la eliminación de la pared celular mediante tratamientos con enzimas y la inducción de la fusión de células mediante tratamientos químicos o eléctricos. Después de la fusión, se forma una nueva célula resultante de la unión de los nucleos de los parentales (heterocarionte). A partir de ésta, se pueden regenerar plantas completas mediante cultivo *in vitro*, explotando la totipotencia celular. El material vegetal de origen que posee ésta propiedad en cítricos es el callo embriogénico nuclear (Vardi et al., 1982; Kobayashi et al., 1983). Las plantas regeneradas incorporan normalmente los genomas completos de los dos parentales y, en consecuencia, pueden presentar los caracteres de ambos.

En el proceso no hay recombinación o ésta es muy escasa y constituyen nuevo germoplasma disponible para su utilización, directa como portainjertos, o como parentales en programas de mejora (Grosser y Gmitter, 2011).

#### 3.2.2.2. Aspectos morfológicos

Desde que se descubrieron los cítricos autotetraploides, se han realizado varias descripciones morfológicas que tratan de definir los rasgos distintivos de éste tipo de plantas que las diferencian de sus ancestros 2x (Cameron y Frost, 1968; Barrett y Hutchison, 1978; Frost, 1925). Hasta el momento, se ha apreciado que las plantas 4x son, en general, más pequeñas en altura (**Fig. I.5A.**), con un tallo más corto y grueso que contiene un número de hojas menor y espinas de mayor tamaño. Las raíces son de menor longitud y más gruesas (**Fig. I.5B.**). La copa del árbol tiene una relación altura/anchura menor y está más densamente poblada pero suele desarrollar menor número de ramas. También se ha descrito que las plantas 4x tienen mayor relación raíz/parte aérea, debido al mayor crecimiento relativo de la raíz. La brotación suele ser más tardía que en árboles 2x. Las hojas tienen una relación longitud/anchura menor, que les da una apariencia más redondeada e incrementa su superficie y son más espesas (**Fig. I.5A.**). Los peciolos son más cortos y gruesos y las venaciones de la hoja tienen mayor calibre y son más conspicuas. Las hojas son frecuentemente más verdes y contienen una densidad de estomas menor. El tamaño de las flores es mayor, pero los frutos no siempre son más grandes (**Fig. I.5C.**), aunque contienen menor número de semillas pero más grandes (**Fig. I.5D.**). La maduración del fruto 4x es más temprana y suelen tener la corteza más espesa y una forma más achatada que los 2x, aunque la calidad no siempre difiere (Barrett y Hutchison, 1978). Tienen estomas y glándulas de aceite más grandes, ya que el tamaño celular es generalmente mayor (Romero-Aranda et al., 1997; Schwartz et al., 2001a) (**Fig. I.5.**). El contenido en agua de los tejidos es superior al de las plantas 2x, lo que disminuye la relación entre el peso seco (PS) y el peso fresco (PF), especialmente en las hojas (Barrett y Hutchison, 1978). Sería previsible que ésta morfología se asociara a diferencias en la fisiología y expresión génica de las plantas 4x respecto a las 2x. Algunos trabajos han tratado de identificarlas y describirlas.

### 3.2.2.3. Aspectos fisiológicos

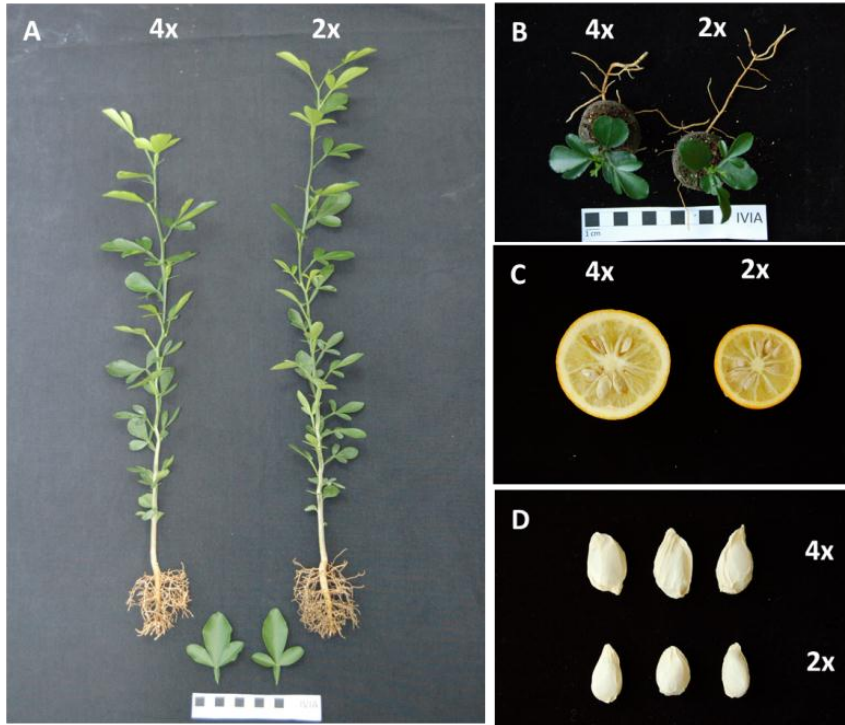
El crecimiento de las plantas autotetraploides es, en general, más lento que el de sus correspondientes 2x (Cameron y Frost, 1968; Guerra et al., 2014), rasgo que se ha relacionado con el menor tamaño de copa que alcanzan los árboles 4x (Barrett y Hutchison, 1978). El estudio de los determinantes fisiológicos del efecto enanizante asociado a la tetraploidía ha sido objeto de varios estudios, por ser un carácter de interés creciente en la citricultura moderna (Lee, 1990). No existen, por el momento, datos concluyentes, pero se ha sugerido que el efecto reductor del tamaño de copa podría asociarse a las diferencias observadas en las raíces 4x. La menor longitud específica de raíces, relativa a su peso seco, determinaría menor conductancia hidráulica, limitando el transporte de agua y minerales (Syvertsen y Graham, 1985; Syvertsen et al., 2000). Otro factor que se ha propuesto es que existieran diferencias en la regulación del intercambio de gases. Se han documentado tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> ( $A_{CO_2}$ ) más bajas y tasas de transpiración ( $E$ ) menores.

Las tasas de intercambio de gases más reducidas podrían tener relación con las diferencias estomáticas y con las diferencias descritas en la anatomía de la raíz. Sin embargo la falta de control sobre el tamaño y porte de las plantas complica la tarea de tomar medidas puntuales del intercambio de gases que resulten representativas y que permitan realizar comparaciones concluyentes (Romero-Aranda et al., 1997; Syvertsen et al., 2000). Otros caracteres fisiológicos que se han encontrado en cítricos autotetraploides y que coinciden con lo observado en otras especies, son la mayor abundancia de cloroplastos por célula y la concentración de clorofila más elevada (Jellings y Leech, 1984; Warner et al., 1987; Romero-Aranda et al., 1997; Mathura et al., 2006). Éstos, junto con el mayor espesor foliar, explicarían que las plantas 4x sean más verdes.

### 3.2.2.4. Utilización de portainjertos 4x

De igual manera que sucede en muchas especies vegetales, la tetraploidía confiere a los cítricos caracteres de potencial interés agronómico (Maherali et al., 2009; Li et al., 2009; Chandra y Dubey, 2010; Deng et al., 2012; Graciano-Ribeiro y Nassar, 2012). Se ha sugerido su posible utilidad como portainjertos de cítricos (Lee, 1988; Lee, 1990).

La propiedad más destacada que confieren es la reducción del tamaño de la copa de la variedad injertada y ha sido explorada también en otros cultivos como en manzano (Beakbane, 1967), vid (Chadha y Mukherjee, 1975) y melón cantalupo (Batra, 1952).



**Figura 1.5.** Características morfológicas típicas que diferencian a los cítricos tetraploides (4x) de sus correspondientes diploides (2x); material vegetal de citrange Carrizo **A)** Altura de las plantas, características de las raíces y morfología de las hojas. **B)** Grosor y longitud de las raíces. **C)** Tamaño del fruto y espesor de la corteza. **D)** Tamaño de las semillas.

En cítricos, la reducción del tamaño de copa se cita ya en los estudios más antiguos que exploran la tetraploidía (Furusato, 1953; Cameron y Frost, 1968; Lee, 1988, 1990; Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). El control del tamaño del árbol es un atributo deseable que ha ganado importancia en los últimos años porque permite maximizar la producción y reducir los costes de recolección y protección de la plantación. (Grosser y Chandler, 2003; Grosser et al., 2007).

Esta propiedad se considera imprescindible en los nuevos sistemas de producción avanzada y ha motivado el interés creciente en la mejora de portainjertos de cítricos a nivel 4x.

En los últimos años, han surgido evidencias de que, tanto la autotetraploidía como la alotetraploidía ofrecen ventajas en la mejora de portainjertos de cítricos frente a la diploidía, por lo que se han iniciado algunos programas de mejora de portainjertos de cítricos a nivel 4x (Grosser y Gmitter, 2011; Dambier et al., 2011). No obstante, para promover estos programas es fundamental conocer con más detalle aquellas propiedades de la tetraploidía en cítricos que pudieran aportar características de interés agronómico. En los apartados siguientes se detallan los principales estudios realizados al respecto.

### 3.2.2.4.1. *Portainjertos autotetraploides*

Las versiones autotetraploides de los portainjertos que se utilizan actualmente podrían ser una alternativa para obtener árboles más pequeños sobre patrones ya conocidos (Barrett y Hutchison, 1978; Mukherjee y Cameron, 1958; Ollitrault y Michaux-Ferriere, 1992). Se ha postulado que las características de interés que confiere el portainjerto, como la producción y calidad fruto, la resistencia a enfermedades o la adaptación a los estreses ambientales, no se verían modificadas por la tetraploidía, ya que el genoma de la variante 4x es idéntico al de la 2x (Lee, 1990).

Actualmente ya se dispone de la mayoría de genotipos 4x de los cultivares utilizados como portainjertos, que en las últimas décadas se han detectado y seleccionado fácilmente gracias a la citometría de flujo. Además estudios recientes en otras especies corroboran que los cambios producidos por la autoploidización son muy limitados, tanto en el genoma (Stupar et al., 2007; Wang et al., 2006b) como en el proteoma (Albertin et al., 2005). Sin embargo, las observaciones preliminares y algunos estudios realizados en cítricos autotetraploides indican que podría modificarse en algunos aspectos el comportamiento del portainjerto, ofreciendo caracteres de utilidad. Conocer con detalle el comportamiento de las variantes autotetraploides de los portainjertos 2x actualmente utilizados permitiría considerar la posibilidad de su uso comercial si se confirmaran las ventajas que se han observado en estudios y ensayos preliminares.

#### 3.2.2.4.1.1. Estudios agronómicos previos

El efecto del portainjerto 4x en la calidad de fruto y rendimiento productivo de la variedad injertada ha sido escasamente estudiado. Nuestro grupo de investigación realizó un estudio preliminar en campo sobre el comportamiento de los mandarinos ‘Clemenules’ y ‘Nova’ y de los naranjos ‘Washington navel’ y ‘Navelate’, injertados sobre citrange Carrizo 2x y 4x. La tetraploidía del portainjerto redujo el tamaño de los árboles sin afectar a su eficiencia productiva ni a la calidad de los frutos (Schwartz, 2001a). Sin embargo, éste estudio no se realizó siguiendo un diseño experimental, sino sobre arboles localizados en plantaciones comerciales.

En otro estudio posterior, se comprobó que la producción de clementina (*C. clementina* Hort. ex Tan.) sobre *P. trifoliata* 4x fue inferior que sobre el 2x, aunque no se modificó la calidad de la fruta. (Hussain et al., 2012a). Este estudio se realizó en suelos ácidos y arenosos, que no son comunes en la mayoría de las zonas citrícolas de la cuenca del Mediterráneo. En cuanto al comportamiento en vivero, no se encontraron diferencias en el prendimiento del injerto ni en la obtención de plantones aptos para su comercialización en portainjertos 2x y 4x de citrange Carrizo (Schwartz et al., 2001a). En la propagación mediante semilla, la progenie fue muy homogénea: el 99.5% mantuvo el carácter 4x (Schwartz, 2001b).

Estos resultados sugieren que el efecto de la tetraploidía del portainjerto en la producción y la calidad de la fruta depende de cada combinación variedad-portainjerto y de las condiciones propias de cada área citrícola. No obstante, la escasa información disponible plantea la necesidad de realizar ensayos de campo que evalúen éstas características a nivel local, con la finalidad de recomendar o desaconsejar el uso de patrones autotetraploides y para plantear un posible control adicional de las plantas autotetraploides que se producen en los viveros, que actualmente no se eliminan durante el proceso de producción de plantones.

#### 3.2.2.4.1.2. Estudios fisiológicos previos

Desde que se sugiriera su posible utilidad como portainjertos reductores del vigor (Lee, 1988; Barrett y Hutchison, 1978), varios autores se han interesado por describir los determinantes fisiológicos de las diferencias morfológicas que estos genotipos presentan respecto a sus versiones 2x.



## INTRODUCCIÓN GENERAL

El mayor grosor foliar y el color verde más intenso que caracteriza a los genotipos 4x en cítricos motivó el estudio anatómico del mesófilo foliar y su composición bioquímica en naranja ‘Valencia’ 4x y limonero ‘Feminello’ 4x para determinar posibles diferencias en la tasa de asimilación ( $A_{CO_2}$ ) asociadas a la tetraploidía (Romero-Aranda et al., 1997). Se determinó que, aunque las hojas 4x tienen mayor concentración de nitrógeno (N) y clorofila, la  $A_{CO_2}$ , expresada en función del área foliar, es entre un 25% y un 35% más alta en las hojas 2x que en las 4x, debido al mayor grosor del tejido, que dificulta la difusión de gases y al mayor tamaño celular asociado a la tetraploidía. Sin embargo, otros estudios predicen que, al aumentar el grosor del mesófilo foliar, debería aumentar la  $A_{CO_2}$  como sucede en algunas especies (Warner y Edwards, 1993).

En otro estudio, llevado a cabo con las versiones 4x del limonero Volkameriana, citrange Troyer y mandarino Cleopatra, la  $A_{CO_2}$  no fue diferente entre ploidías y las plantas 4x tuvieron menor contenido en N por área foliar, menor transpiración por planta completa ( $E_{PC}$ ) y menor longitud específica de raíz (SRL). Estas características podrían explicar el menor desarrollo de tamaño que se asocia a la tetraploidía (Syvertsen et al., 2000).

Algunos estudios sugieren que los portainjertos de cítricos autotetraploides podrían tener mayor tolerancia al estrés salino e hídrico que sus correspondientes 2x (Saleh et al., 2008; Mouhaya et al., 2010; Allario et al., 2013), pero los determinantes fisiológicos y moleculares de la tolerancia apenas han sido descritos. En trabajos previos, realizados por nuestro grupo de investigación, se observó que las plantas autotetraploides de *P. trifoliata*, citrange Carrizo y mandarino Cleopatra toleran mejor el estrés salino que sus correspondientes 2x (Saleh et al., 2008). También se vio que el portainjerto lima Rangpur 4x injertado con naranja ‘Valencia’ (V/LR4x) es más tolerante al estrés hídrico que su correspondiente 2x (V/LR2x). Esta mayor tolerancia en plantas V/LR4x que en V/LR2x, se relacionó con la mayor producción de ácido abscísico (ABA) y la menor conductancia estomática ( $g_s$ ) (Allario et al., 2011, 2013) y se determinó que la expresión constitutiva del gen *CsNCDE1*, involucrado en la ruta de biosíntesis de ésta hormona, es más elevada en las raíces 4x que en las 2x. Estos resultados sugieren que los portainjertos 4x tienen una expresión constitutiva de ABA más elevada que los predispone a una mejor tolerancia al estrés hídrico.

Coincidiendo con éstos resultados, un estudio reciente del grupo señala que la expresión constitutiva de proteínas antioxidantes y de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés salino es más elevada en los genotipos 4x de los mandarinos Cleopatra y ‘Willowleaf’ que en sus correspondientes 2x (Podda et al., 2013).

Conocer el comportamiento fisiológico de las versiones 4x de los portainjertos utilizados en cada área citrícola frente a los estreses más incidentes sería de gran utilidad. Si se confirmara una mayor tolerancia en las versiones 4x, junto con su propiedad reductora del tamaño de copa, sería motivo para diferenciar éstos genotipos de sus ancestros 2x y proponer su utilización comercial cuando resulte conveniente. Probablemente la intensidad del efecto de la tetraploidía sobre la fisiología de la planta y su comportamiento agronómico sea dependiente del cultivar y se vea modificada por las condiciones ambientales, lo que plantea la necesidad de realizar evaluaciones para cada portainjerto de interés en sus condiciones de cultivo.

#### 3.2.2.4.2. *Portainjertos alotetraploides*

La obtención de nuevos portainjertos de cítricos mediante hibridación sexual tiene dos inconvenientes principales de naturaleza inherente a los cítricos. Por un lado, su compleja biología reproductiva impide en muchos casos la realización de los cruzamientos deseados debido, fundamentalmente, a la apomixis y a la incompatibilidad sexual existente entre muchos genotipos. Por otro lado, la alta heterocigosidad provoca una gran segregación de caracteres en la progenie, lo que hace muy complicada la obtención y selección de individuos que reúnan los caracteres deseados de ambos parentales (Herrero et al., 1996; Ollitrault et al., 2003; Barkley et al., 2006).

La hibridación somática mediante fusión de protoplastos (véase apartado I-3.2.2.1.3) ha permitido, en los últimos años, sortear éstos inconvenientes, incluyendo la obtención de híbridos de especies sexualmente incompatibles (Louzada et al., 1993; Grosser et al., 1996b; Guo y Deng, 1999). La tetraploidía obtenida mediante hibridación somática ofrece la ventaja de reunir en un solo cruce los genomas de 3 o 4 parentales, permitiendo la adición de caracteres dominantes complementarios con independencia de la heterocigosidad de los parentales (Ollitrault et al., 2000).

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Estos híbridos somáticos alotetraploides pueden resultar útiles directamente o como germoplasma avanzado para generar nuevas progenies con mayor agilidad, mediante cruces convencionales, en los programas de mejora de portainjertos de cítricos a nivel 4x (Ollitrault et al., 2000; Grosser et al., 2000; Grosser y Gmitter, 2011; Dambier et al., 2011).

Cuando se realizan hibridaciones somáticas, la identificación de los genomas nuclear y citoplásmico en las progenies es un procedimiento indispensable para comprobar el origen de los híbridos obtenidos. El análisis se realiza habitualmente con marcadores moleculares, pero suele utilizarse únicamente un número reducido de marcadores, necesario para verificar su origen híbrido. Sin embargo, entre las progenies se han identificado en ocasiones individuos aneuploides (**Fig. I.4B.**) o con adiciones asimétricas del genoma nuclear (Gmitter et al., 1992; Miranda et al., 1997; Pensabene-Bellavia et al., 2015) y su origen se atribuye a la inestabilidad que los genomas sufren durante el proceso de fusión y regeneración. Este fenómeno ha sido descrito también en híbridos somáticos de *Brassica* spp., *Hordeum vulgare* L., *Daucus carota* L. y *Solanum tuberosum* L., en los que las pérdidas cromosómicas durante el proceso se correlacionan directamente con la distancia genética existente entre los parentales (Sundberg y Glimelius, 1991; Kisaka et al., 1997; Oberwalder et al., 1998). Esto plantea la necesidad de realizar caracterizaciones moleculares más detalladas de los híbridos obtenidos utilizando un número mayor de marcadores moleculares.

Durante los últimos años, ha aumentado el número de marcadores moleculares disponibles en cítricos, destacando, por su efectividad, los de tipo microsatélite o Simple Sequence Repeat (SSR) (Ahmad et al., 2003; Barkley et al., 2006; Chen et al., 2006; Luro et al., 2008; Chen et al., 2008a; Gulsen et al., 2010; Ollitrault et al., 2010; Ollitrault et al., 2012a; Ollitrault et al., 2012b; García-Lor et al., 2013a; Liu et al., 2013; Biswas et al., 2014; Curk et al., 2015) y los basados en polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) (Jiang et al., 2010; Distefano et al., 2012; Ollitrault et al., 2012b; García-Lor et al., 2013a; Cuenca et al., 2013a; Distefano et al., 2013; Bernardi et al., 2013; Curk et al., 2015; Guo et al., 2015).

Éstos marcadores ofrecen un conjunto de características (alto polimorfismo, codominancia, reproducibilidad, especificidad y distribución al azar) que los hacen adecuados para la caracterización de híbridos somáticos. La reciente publicación del mapa genético de clementino (Ollitrault et al., 2012a), que contiene una alta densidad de marcadores SSR, posibilita la caracterización precisa necesaria para determinar si los genomas han sufrido alteraciones durante el proceso de hibridación. Por su parte los SNP, cuyo desarrollo se ha potenciado con la secuenciación masiva de genomas, pueden ser analizados con mayor agilidad que los SSR, gracias al desarrollo del ensayo KASP (Kompetitive Allele Specific Polimerase chain reaction) (Semagn et al., 2014).

Además del análisis molecular, es imprescindible la realización de evaluaciones fisiológicas y agronómicas exhaustivas que verifiquen los caracteres de la progenie tanto para para determinar su utilidad como germoplasma para su uso en programas de mejora, como para evaluar su aptitud como nuevo portainjerto para comercializar (Dambier et al., 2011). No en vano, en cítricos, se ha documentado la existencia de híbridos somáticos que no expresan los caracteres dominantes de los parentales (Bassene et al., 2009, 2010; Mouhaya et al., 2010). Para ésta evaluación, se requiere de la disponibilidad de un alto número de plantas y obtener semillas pasa, necesariamente, por la espera de varios años para que los nuevos híbridos pierdan los caracteres juveniles y se inicie la floración y fructificación. Para solventar ésta limitación se ha descrito recientemente un método de micropropagación vegetativa para híbridos somáticos de cítricos que permite obtener eficientemente plántulas para su evaluación (Bordas et al., 2015), al cual se hace referencia en el apartado I-2.1.

## **4. Tolerancia del cultivo de cítricos a estreses abióticos**

### **4.1. La clorosis férrica**

#### *4.1.1. El hierro en el suelo y su solubilidad*

El hierro (Fe) es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre constituyendo el 5% de su peso y el 3.8% de la composición del suelo (Lindsay, 1979; Benavides, 2000).

Se encuentra en la forma Fe (II) en la mayoría de los minerales primarios pero precipita en forma de óxidos e hidróxidos de Fe(III) que hacen variable su solubilidad y por tanto su disponibilidad en el suelo (Lindsay, 1979). La solubilidad del Fe en el suelo está muy influenciada por su pH. El aumento en una unidad puede disminuir la solubilidad de los compuestos de Fe hasta 1000 veces, lo que reduce su concentración a valores inferiores a  $10^{-20}$ M para un valor de pH en torno a 7.5 (Lindsay, 1995); además tiene dos posibles estados de oxidación: férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En condiciones ácidas y no oxidantes predomina la forma  $\text{Fe}^{2+}$  que es soluble, mientras que en presencia de oxígeno y en medio alcalino, el  $\text{Fe}^{2+}$  es oxidado rápidamente a  $\text{Fe}^{3+}$ , con lo que precipita en forma de óxidos e hidróxidos de  $\text{Fe}^{3+}$ .

#### 4.1.2. Disponibilidad del hierro en suelos calizos

El pH alcalino (7.5-8.5) y la presencia de  $\text{HCO}_3^-$ , que caracterizan a los suelos calcáreos, ejercen un efecto sobre el Fe haciéndolo deficitario para las plantas. En éste rango de pH la concentración de Fe soluble es inferior a  $10^{-20}$ M, mientras que la requerida por la planta oscila entre  $10^{-9}$  y  $10^{-4}$  M (Guerinot y Yi, 1994). Además, la abundancia de  $\text{HCO}_3^-$  en la solución del suelo puede inducir *per se* la deficiencia de Fe en las plantas, desacoplando su absorción y transporte (Coulombe et al., 1984; White y Robson, 1990; Cinelli, 1995).

#### 4.1.3. Papel del hierro en la nutrición vegetal

El Fe es un micronutriente esencial para las plantas por estar implicado en procesos bioquímicos fundamentales. Forma parte de un buen número de sistemas enzimáticos y es cofactor en otros tantos. Los compuestos en los que está presente pueden clasificarse en sistemas de tipo hémico (citocromos, leghemoglobina, catalasa, peroxidasa y fitocromos) y no-hémico (ferredoxina, aconitasa, riboflavina, superóxido dismutasa, ácido aminolevulínico sintetasa, coproporfirinógeno oxidasa, xantina oxidasa o ribonucleótido reductasa, entre otras).

La facilidad del Fe para cambiar de estado de oxidación es determinante para su implicación en tal variedad de procesos. En términos cuantitativos, el 65% del Fe presente en las hojas de las plantas se asocia a proteínas; de esta cantidad, el 35% se acumula en la fitoferritina, el 10% está unido a hemo-proteínas y otro 20% a sistemas enzimáticos no-hémicos (Price, 1968).

Dentro de la hoja, el 80% del Fe se localiza en el cloroplasto (Tiffin y Brown, 1962). En la fotosíntesis desempeña un papel fundamental, participando en varias reacciones de la ruta biosintética de clorofilas y regulando la actividad de sistemas enzimáticos que intervienen en la síntesis de varios pigmentos (Miller et al., 1984; Marschner y Römheld, 1995).

#### *4.1.4. Impacto en la fisiología de la planta*

Los pigmentos fotosintéticos se localizan en las membranas tilacoidales de los cloroplastos asociados con proteínas, con las que forman complejos que tienen como función la intercepción y canalización de energía luminosa a energía química durante el proceso de la fotosíntesis (Seibert, 1993). La cantidad de Fe disponible para la planta influye en la morfología, estructura y mantenimiento de los cloroplastos, aunque no parece que afecte al número de éstos por peso fresco de hoja (Terry y Abadía, 1986; Marschner y Römheld, 1995; Abadía, 1992). Al deteriorarse el sistema por la falta de Fe, los fotones absorbidos que no son canalizados, son disipados eficientemente mediante procesos no fotoquímicos (emisión de calor y fluorescencia).

En condiciones de estrés férrico, la tasa de fotosíntesis disminuye y aumenta proporcionalmente la fluorescencia emitida por las clorofilas. Este parámetro puede ser utilizado como indicador de la reducción de la eficiencia fotosintética de las plantas sometidas a deficiencia de hierro (Belkhdja et al., 1998; Morales et al., 1991). Otro efecto es la reducción drástica del número de ribosomas, disminuyendo en consecuencia la síntesis de proteínas que afecta en mayor medida a las proteínas cloroplásticas que a las citoplásmicas (Funkhouser y Price, 1974). La reducción de la capacidad fotosintética en condiciones de deficiencia de Fe determina la disminución de la producción de azúcares y de las reservas de almidón y deriva en una alteración de amplio alcance del metabolismo que afecta al funcionamiento fisiológico de la planta (Terry y Abadía, 1986; Abadía, 1992; Terry y Zayed, 1995).

#### *4.1.5. Fisiopatía y prevención*

La deficiencia en Fe desencadena la reducción de los pigmentos fotosintéticos y afecta especialmente a la clorofila. Se manifiesta como amarilleamiento, al predominar otros pigmentos de color amarillo como las xantofilas y carotenos frente a las clorofilas.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En cítricos, la deficiencia se aprecia visualmente en las hojas jóvenes. Las nerviaciones suelen mantener el color verde oscuro y aparecen remarcadas sobre un fondo amarillento, semejando una especie de malla o retículo (Chaney, 1984). Esta carencia afecta también al desarrollo y crecimiento de los órganos nuevos de la planta. Las nuevas brotaciones reducen su tamaño como consecuencia de la escasa translocación de hierro desde las hojas adultas u otros órganos y son progresivamente menos vigorosas, con entrenudos más cortos y hojas más pequeñas. Si la clorosis se agudiza aparece necrosis y defoliación prematura de los brotes que comienza por su zona apical. El crecimiento del sistema radical también se puede ver reducido (Bertoni et al., 1992) así como la producción, disminuyendo el éxito en el cuajado de frutos y la calidad de los que logran desarrollarse (Tagliavini y Rombolá, 2001; Pestana et al., 2003). En deficiencia aguda, las naranjas y mandarinas maduras suelen ser de menor tamaño, con la piel suave y falta de color. Es característico que el flavedo adquiera color amarillento, sin alcanzar las tonalidades anaranjadas-rojizas de los frutos normales y que el contenido en sólidos solubles totales del zumo disminuya (Legaz et al., 2008). El ciclo fenológico del árbol se acorta dando lugar a fases productivas de duración inferior a la normal (Álvarez-Fernández et al., 2003, 2005) y pudiéndose alcanzar la muerte prematura del árbol en casos de deficiencia extrema. La consecuencia en una plantación comercial es la reducción más o menos acusada de la rentabilidad económica (Miller et al., 1984).

Dado que los suelos calizos ocupan aproximadamente el 30% de la superficie terrestre, ésta es una deficiencia considerablemente frecuente (Chen y Barak, 1984). En Europa afecta a la mayor parte de plantaciones de frutales, que se desarrollan en la cuenca mediterránea, donde son habituales este tipo de suelos (Jaegger et al., 2000), siendo España el país más afectado. Se estima que unas 280000 ha destinadas a cultivo de cítricos, melocotoneros, tomate y frutales sufren clorosis férrica (MAGRAMA, 2014). La solución más efectiva para evitar la clorosis férrica es la utilización de patrones tolerantes. En el caso de los cítricos, se han descrito diferencias entre distintas especies en el comportamiento en medios clorosantes. Las especies más tolerantes se utilizan como patrones para minimizar la deficiencia de Fe (Castle et al., 2009; Cooper et al., 1962).

El naranjo amargo proporciona tolerancia alta a un buen conjunto de condiciones adversas impuestas por el suelo de cultivo, incluida la caliza, pero no se utiliza por su sensibilidad a CTV. Otros patrones tolerantes son el mandarino Cleopatra y el *C. macrophylla*. Los citranges, apreciados por otras cualidades, son moderadamente sensibles (Castle et al., 2009).

La alcalinidad del suelo, que afecta a muchas zonas de la cuenca mediterránea, es determinante para desaconsejar el uso de portainjertos que sean sensibles al suelo calizo (*P. trifoliata*, citrumelo 4475). En general, la disponibilidad de portainjertos adecuados al conjunto de necesidades concretas de cada zona citrícola es muy limitada actualmente. Por éste motivo, la técnica comúnmente utilizada para combatir la clorosis férrica, es la corrección mediante la aplicación al suelo de quelatos férricos de síntesis. La mayoría de fórmulas están basadas en Fe-EDDHA y Fe-EDDHMA. Estos compuestos son los más eficaces en condiciones alcalinas por ser altamente estables en el rango de pH entre 7 y 9 (Norvell, 1991) y por ser mínimamente reactivos con cualquier componente del suelo (Álvarez-Fernández et al., 2002). El coste añadido que supone su aplicación, limita su utilización a cultivos de rentabilidad alta. Actualmente, España es el mayor consumidor europeo de quelatos de Fe. Su consumo se estima en unas 3000 Tm anuales y constituye hasta el 50% del gasto anual en fertilizantes en explotaciones agrícolas (Sanz et al., 1992).

## 4.2. La salinidad del suelo

### 4.2.1. Origen

El término salinidad del suelo se refiere a la presencia de cationes tales como el sodio ( $\text{Na}^+$ ) o el boro ( $\text{HBO}_3^-$ ) y de aniones como el cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) disueltos en la solución, en concentración suficientemente elevada como para reducir el crecimiento y rendimiento del cultivo (Ferguson y Grattan, 2005) debido a su efecto osmótico y/o tóxico. La toxicidad se atribuye a los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HBO}_3^-$ , siendo el NaCl la sal más frecuente y abundantemente solubilizada.

La magnitud de la salinidad puede determinarse de diferentes formas, la más usual es estimarla midiendo la conductividad eléctrica (CE) de la solución del suelo, expresada habitualmente en microsiemens por centímetro ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), que es proporcional a la concentración total de sólidos disueltos (TSD) a 25 °C según la relación:



$$\begin{aligned} \text{TDS (ppm)} &= \alpha \text{ CE } (\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}) \\ \alpha &= 0.64, \text{ CE} \leq 5000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1} \\ \alpha &= 0.80, \text{ CE} > 5000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1} \end{aligned}$$

La acumulación de sales en el suelo tiene un origen natural cuando determinadas condiciones geológicas o bioclimáticas inciden en un área durante largos periodos de tiempo fomentando un aporte elevado de sales solubles y una eliminación reducida (salinización de acuíferos costeros, estación seca y calurosa, movimiento del nivel freático, aridez, etc). Este tipo de salinización es la denominada primaria. No obstante, en muchos casos el origen de la salinización es de tipo secundario o derivado de la actividad humana y está estrechamente vinculado a las técnicas agrícolas utilizadas, la deforestación, la sobrepoblación y especialmente al uso de sistemas de irrigación inapropiados. En las zonas agrícolas costeras, es frecuente la sobreexplotación de los acuíferos para el riego en los años más secos. Esta práctica hace descender el nivel freático, aumentando el riesgo de salinización de los acuíferos por intrusión de agua marina. El uso de aguas de riego procedentes de acuíferos salinizados, propicia también la acumulación de sales en las capas superficiales del suelo. En las zonas agrícolas de suelo salino, es necesario proporcionar riegos abundantes que excedan las necesidades del cultivo para lixiviar las sales en exceso, pero ésta práctica, en ocasiones, no es viable si el agua de riego es un recurso escaso. Se considera que un suelo es salino cuando en su extracto de saturación se obtiene una  $\text{CE} \geq 4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  (USDA, 2013), que equivale a una solución 40 mM de NaCl y genera una presión osmótica de 0.2 MPa.

#### 4.2.2. *Impacto en la agricultura*

La salinidad del suelo es uno de los principales factores limitantes de la producción agrícola en el mundo (Epstein et al., 1980) por disminuir severamente el rendimiento o incluso ocasionar daños irreparables. Un 6% de la superficie terrestre es considerada salina (FAO, 2013) y, en la mayoría de casos, el origen de la salinidad es primario. De los 230 Mha cultivadas en regadío en el mundo, un 20% se encuentra salinizado. El cultivo en regadío supone un 15% del total de la superficie cultivada del planeta, pero en él se produce la tercera parte de los alimentos que abastecen a la población mundial.

Por ello, la salinidad supone una amenaza para la agricultura y el suministro de alimentos (Munns y Tester, 2008). La recuperación de suelos salinos es muy costosa. Por ello, en las últimas décadas el interés por mejorar la tolerancia de los cultivos al estrés salino ha sido creciente.

#### 4.2.3. *Efecto en las plantas*

Las plantas se clasifican como halófitas si toleran suelos cuya solución tenga una  $CE \geq 12 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ , o como glicófitas si son sensibles a partir de una  $CE \geq 4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ . La mayoría de cultivos hortícolas y frutales pertenecen a éste último grupo y en general muestran un umbral de tolerancia de  $3 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ . Los cítricos se encuentran entre las especies de uso agrícola más sensibles, con un umbral de tolerancia promedio de  $1.4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  y una reducción de la producción del 13% por cada incremento en un  $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$  (Maas, 1993). En áreas cítricas áridas como Israel o Australia y en aquellas donde el agua es generalmente de mala calidad, como Florida, California, Pakistán o España, la salinidad es una amenaza para la citricultura, especialmente porque en los cultivos arbóreos perennes tiene un componente acumulativo (Levy y Syvertsen, 2004).

El efecto de la salinidad en el crecimiento de las plantas puede descomponerse en 2 fases, una inicial y rápida en la que el potencial osmótico de la solución salina induce la inhibición del crecimiento de las hojas jóvenes y otra fase más lenta motivada por la composición y la concentración de iones de la solución absorbidos por la planta, que acelera la senescencia de las hojas maduras al acumularse. En la primera fase, la reducción del potencial hídrico de la planta provoca el cierre de los estomas reduciendo el intercambio de gases. En la segunda fase, las hojas maduras afectadas por la toxicidad causada por la acumulación de iones y la detención del crecimiento apical reducen la superficie foliar efectiva y por ende la asimilación de  $\text{CO}_2$  de la planta. El efecto final es la reducción o inhibición completa de la producción.

#### 4.2.4. *Mecanismos de tolerancia*

La tolerancia de un cultivo al estrés salino puede definirse como la capacidad para soportar los efectos de un exceso de sales en las raíces u hojas sin mostrar un efecto significativamente adverso (Shannon y Grieve, 1999).

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Estudiar el fenómeno de tolerancia a la salinidad resulta complejo, ya que intervienen un elevado número de factores (especie, edad de la planta, órgano estudiado, composición y concentración de la solución salina aplicada, clima, nutrición, tipo de sustrato, método de riego empleado y combinación injerto-patrón) (Asíns et al., 1993; Munns, 2002; Adnan, 2004; Lauchli y Grattan, 2007; Syvertsen y García-Sánchez, 2014). Tradicionalmente la tolerancia de un cultivo a la salinidad se ha evaluado cuantificando su producción, sin embargo, esto es difícil de valorar en cultivos de vida larga como los cítricos y los estudios han ido valiéndose de otros índices que permiten analizar el proceso más detalladamente. Actualmente se entiende que la tolerancia puede ser de 3 tipos: osmótica, tisular o debida a exclusión iónica (Munns y Tester, 2008).

El primer componente del estrés salino citado se refiere al aumento del potencial osmótico del suelo al concentrarse las sales en su solución, que ocasiona la detención del crecimiento de los brotes apicales y el cierre estomático. La capacidad de tolerancia osmótica se correlaciona directamente con el crecimiento y puede estimarse con la medida de los brotes apicales en el tiempo. El descenso en las tasas de intercambio gaseoso es un indicador de la incidencia de estrés osmótico (Munns y Tester, 2008) avalado por numerosos estudios en cítricos (Walker y Douglas, 1983; Walker et al., 1982; Behboudian et al., 1986; Lloyd et al., 1987a; Lloyd et al., 1987b; Syvertsen y Yelenosky, 1988; Lloyd y Howie, 1989; Lloyd et al., 1990; Bañuls y Primo-Millo, 1992; García-Legaz et al., 1993; Bañuls y Primo-Millo, 1995; Banuls et al., 1997; García-Sánchez y Syvertsen, 2006; Gimeno et al., 2009). El componente osmótico, en definitiva, contribuiría a alterar el metabolismo y las relaciones hídricas de la planta induciendo cambios anatómicos y morfológicos (Flowers, 2004) como el aumento de la relación raíz/parte aérea, la disminución del tamaño foliar, la succulencia del tejido y cambios en la densidad cloroplástica, entre otros.

El segundo tipo de tolerancia, la tisular, se refiere a la capacidad que tiene el tejido foliar de tolerar la concentración de sales. Puede estimarse midiendo la concentración de iones acumulados necesaria para iniciarse el daño y abscisión de las hojas maduras.

Determinando el descenso del verdor, la aparición de quemaduras y la abscisión, y registrando la concentración de iones en las hojas más maduras (Munns y Tester, 2008), pueden establecerse los umbrales de tolerancia que manifiesta cada especie. Para la obtención de datos representativos, deben seleccionarse en el muestreo foliar hojas de características comparables (edad, tamaño etc) (Embleton y Jones, 1964) y debe tenerse en cuenta la cantidad de agua del tejido para expresar la concentración de iones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), ya que el contenido hídrico puede diferir entre muestras y el  $\text{Cl}^-$  es un elemento completamente soluble (Cassidy, 1966). Cuando los síntomas foliares aparecen, indican que la planta ha acumulado una concentración límite de iones y el daño comienza a ser irreversible. En cítricos, el ión que determina mayoritariamente la afección de la planta es el  $\text{Cl}^-$  y no tanto el  $\text{Na}^+$ , a diferencia de la mayoría de especies vegetales (Banuls et al., 1997). El nivel máximo de acumulación tolerada en la parte aérea depende en cítricos de la variedad injertada (Levy y Syvertsen, 2004).

Un carácter relacionado con los dos mecanismos de tolerancia anteriores, que podría tener una contribución importante, pero del que todavía no existe mucha información, es el contenido en  $\text{K}^+$ . La capacidad de las plantas de mantener una relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  citosólico elevada es uno de los factores determinantes de tolerancia (Maathuis y Amtmann, 1999; Zhang et al., 2015). Numerosos estudios recientes encuentran correlación entre las concentraciones de  $\text{K}^+$  foliar elevado y la tolerancia (Meng et al., 2011; Chao et al., 2013; Wang et al., 2013). Probablemente esta propiedad esté relacionada con su papel en la homeostasis celular de cationes junto con el  $\text{H}^+$  y el  $\text{Na}^+$ , que contribuye a la compartimentalización del  $\text{Na}^+$  y al ajuste osmótico para mantener el turgor celular (Basil y Blumwald, 2014).

El tercer mecanismo de tolerancia es la exclusión de iones  $\text{Cl}^-$ , entendida como la capacidad de restringir su absorción y transporte desde la raíz hacia las hojas. Este es el mecanismo, definido en cítricos como el principal contribuyente a la tolerancia (Maas, 1993; Banuls et al., 1997; Storey y Walker, 1999; Garcia-Sánchez et al., 2002; Gómez-Cadenas et al., 2002; Moya et al., 2002 Levy y Syvertsen, 2004).

## INTRODUCCIÓN GENERAL

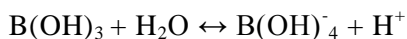
Existe poca información concluyente sobre su modo de operar, pero se correlaciona en gran medida con las tasas de transpiración y uso de agua propias de la planta (Walker y Douglas, 1983; Syvertsen y Graham, 1985; Graham y Syvertsen, 1989; Moya et al., 2003).

Esto es así porque el grueso del flujo xilemático de  $\text{Cl}^-$  en las plantas parece ser de tipo pasivo (Moya et al., 1999; Gilliham y Tester, 2005). Sin embargo, algunos estudios se han centrado en analizar los limitantes al transporte de  $\text{Cl}^-$  y han determinado que pueden existir puntos de regulación a nivel de carga al xilema, eflujo desde las raíces o compartimentalización intracelular (Teakle y Tyerman, 2010), aunque su papel en la respuesta tolerante no se ha concretado, por el momento.

En cítricos se ha descrito que la morfología de la planta puede tener un efecto importante en la capacidad de tolerancia. Por un lado, la abundancia, anatomía e histología de las raíces podría determinar la magnitud del flujo transpiratorio o uso del agua. En general las especies de portainjerto de mayor vigor tienen un mayor uso de agua y por tanto debieran ser menos tolerantes, pero existen numerosas excepciones, lo que apunta a una regulación más compleja (Levy y Lifshitz, 2000). La existencia de diferencias entre especies en la cantidad de  $\text{Cl}^-$  transportado a la parte aérea por volumen de agua transpirado sugiere que el  $\text{Cl}^-$  pueda ser retenido en las raíces como sucede en la vid (Tregeagle et al., 2010), pero el modo y lugar de acumulación no ha sido descrito por el momento. El vigor y hábito de crecimiento de la parte aérea determinarían la partición del flujo transpiratorio y por tanto influirían en la acumulación (Cooper, 1961; Altman y Mendel, 1973; Walker y Douglas, 1983; Bañuls y Primo-Millo, 1995; Moya et al., 1999). De este modo, la tasa de absorción de agua y capacidad de exclusión de  $\text{Cl}^-$  parece determinada por el portainjerto (Cerdá et al., 1979; Vardí y Galun, 1988; Nieves et al., 1991; García-Legaz et al., 1993), mientras que el grado de acumulación y el nivel máximo tolerado en la parte aérea dependen de la variedad injertada (Levy y Syvertsen, 2004).

#### 4.2.5. *La toxicidad por exceso de boro*

El boro (B) es un elemento con propiedades intermedias entre metales y no metales y uno de los ocho micronutrientes esenciales requeridos por las plantas superiores para su funcionamiento fisiológico normal, crecimiento y desarrollo (Frommer y von Wiren, 2002). En la mayoría de los fluidos biológicos, el B existe principalmente como ácido bórico,  $B(OH)_3$  (96%), acompañado de una pequeña cantidad del anión borato,  $B(OH)_4^-$ , de acuerdo al equilibrio de disociación:



Debido a la deficiencia de electrones del B, ambas especies reaccionan rápidamente para formar complejos con una variedad de azúcares y otros compuestos que contienen grupos cis-diol, generando ésteres de boratos cíclicos estables, sugiriéndose que la clave de la esencialidad del B radica en la estabilización de moléculas de importancia biológica en diferentes organismos (Bolaños et al., 2004), papael que permanece aún en debate (Goldbach y Wimmer M. A., 2007). La primera molécula enlazada por borato identificada en el reino de las plantas es el ramnogalacturonano II, un componente péctico de la pared celular, estable en condiciones fisiológicas, el cual es un dímero donde el B une los dos monómeros de a través de un puente borato para proporcionar estabilidad a la matriz de la pared celular (O'Neill et al., 2004).

El conocimiento detallado de los roles que desempeña el B en plantas superiores permanece aún incompleto, pero se sabe que está involucrado en la formación de la pared celular (Matoh, 1997; O'Neill et al., 2004), en algunas funciones de la membrana celular (Goldbach et al., 2001) y de defensa antioxidante (Cakmak y Römheld, 1997), en la elongación de la raíz, el metabolismo de carbohidratos, la acumulación de fenoles o el crecimiento del tubo polínico. Los mecanismos para su absorción y transporte han sido descritos en estudios relativamente recientes (Brown y Shelp, 1997; Brown et al., 2002; Takano et al., 2002; Takano et al., 2005b; Takano et al., 2005a; Takano et al., 2006).

Los cítricos son sensibles al exceso de boro en el suelo, que causa toxicidad y daños en la cosecha (Liu et al., 2013).

Este exceso tiene su origen en la utilización de aguas de riego con elevado contenido de B, como es el caso del agua desalada, combinado con la aridez. En zonas con tasas de evaporación elevadas y escasas lluvias se produce su acumulación en las capas superficiales del suelo, que puede llegar a ser excesiva con el tiempo y dañar el cultivo.

El B absorbido por las plantas se acumula en las hojas de manera proporcional a su edad. Los síntomas de toxicidad aparecen, en primer lugar, en las hojas más antiguas y consisten en el amarilleamiento de la parte más distal de la hoja, seguida de los márgenes creando un patrón en forma de punta de flecha que avanza hacia el nervio central del limbo. Aparecen simultáneamente puntos cloróticos circulares y los síntomas pasan de color amarillo a marrón y finalmente a necrosis con la intensidad de la toxicidad y el tiempo, hasta que sufren abscisión (Papadakis et al., 2004). El exceso de B afecta al crecimiento, causando el acortamiento de los entrenudos. Este síntoma en los árboles se traduce en la pérdida de vigor, aparición de ramas cortas y secado de los ápices. Al entrar en la raíz, el B es transportado en el xilema y se destina, en su mayoría, a la formación de paredes celulares o se acumula en el fluido apoplastico. Solamente una pequeña parte se destina al interior celular (Liu et al., 2013). Su homeostasis parece estar regulada por un conjunto de genes que codifican canales transportadores de membrana, involucrados en su absorción, transporte y distribución en la parte aérea de las plantas (Hajiboland et al., 2013). La compartimentalización en la vacuola celular podría asimismo jugar un papel importante en la tolerancia tisular a concentraciones de boro elevadas (Kaur et al., 2006). Los portainjertos de cítricos, así como las variedades, difieren en su nivel de tolerancia a la toxicidad por acumulación de boro (Papadakis et al., 2004; Gimeno et al., 2012).

### **5. Utilidad del portainjerto para prevenir fisiopatías**

En la citricultura mediterránea, el desarrollo de los árboles y su rendimiento productivo se encuentra limitado por los estreses que imponen el suelo y el clima.

La sensibilidad que manifieste el árbol frente a éstos estreses ambientales está profundamente influenciada por la fisiología del portainjerto, que regula el suministro de agua, carbono y nutrientes a la parte aérea y por tanto actúa modulando el impacto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento, floración y fructificación del árbol (véase apartado I-2.1). Dos de los estreses edáficos con mayor incidencia son la deficiencia en hierro, debido al alto contenido en carbonatos del suelo (véase apartado I-4.1) y la salinidad del suelo a causa de la aridez y la intensa actividad agrícola (véase apartado I-4.2).

Para un aprovechamiento óptimo de las plantaciones cítricas es fundamental acertar en la elección del portainjerto utilizado, considerando el conjunto de factores limitantes que incidan en el área de cultivo. En España, la mayor parte de la citricultura se desarrolla en suelos con alto contenido en caliza y en muchas zonas con salinidad. Para minimizar el efecto adverso de éstas condiciones y rentabilizar la plantación, la utilización de portainjertos tolerantes es la solución, a día de hoy, más efectiva. Sin embargo, el número de cultivares aptos para ser utilizados como portainjertos es muy limitado (véase apartado I-2.3.1) y ninguno reúne el perfil ideal requerido para la mayoría de áreas cítricas. Las especies más utilizadas, citrange Carrizo y *C. macrophylla* presentan limitaciones. La primera no presenta buen comportamiento en suelo salino y calizo, pero en cuanto al resto de caracteres es el portainjerto más adecuado (véase apartado 2.3.1.1); la segunda tolera satisfactoriamente el suelo salino y calcáreo, tiene una rápida entrada en producción y una elevada productividad, pero no proporciona al fruto una calidad organoléptica óptima (véase apartado 2.3.1.2). Esta situación, hace necesaria la incorporación de nuevos portainjertos que combinen los caracteres requeridos.



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

Una alternativa a los métodos clásicos de mejora de portainjertos de cítricos que ha emergido recientemente es la mejora a nivel tetraploide. En ésta línea se han planteado dos estrategias:

- Explorar las diferencias agronómicas y fisiológicas de los genotipos autotetraploides respecto a los genotipos originales diploides (Lee, 1990) (véase apartado I-3.2.2.4.1).
- Explorar las ventajas que ofrece la hibridación somática frente a la hibridación tradicional (Grosser et al., 1998) (véase apartado I-3.2.2.4.2).

La tetraploidía del portainjerto se ha relacionado con la capacidad reductora del tamaño de copa (Mukherjee y Cameron, 1958; Barrett y Hutchison, 1978; Lee, 1990; Ollitrault y Michaux-Ferriere, 1992; Schwartz, 2001a) y con la mejora de la tolerancia a estreses abióticos (Saleh et al., 2008; Mouhaya et al., 2010; Allario et al., 2013). Sin embargo, las características principales de los portainjertos no se ven modificadas por la tetraploidía, lo que minimiza el riesgo de que aparezcan comportamientos no deseados y por tanto favorece la aceptación del cultivar.

Por otro lado, la hibridación somática mediante fusión de protoplastos para obtener nuevo germoplasma de cítricos es una metodología que está demostrando ser de gran utilidad, ya que permite obtener híbridos entre parentales sexualmente compatibles o incompatibles, que en teoría expresan los caracteres dominantes de ambos parentales sin recombinación de los genomas (Grosser y Gmitter, 2011). No obstante es necesario realizar una evaluación genética y fisiológica exhaustiva para que se pueda valorar su utilidad, ya que se han descrito varios casos en los que la integración y expresión de los genomas en los híbridos no es la esperada.

En la mejora portainjertos a nivel tetraploide, se han realizado avances en los últimos años que incluyen la caracterización de las plántulas autotetraploides que aparecen de manera espontánea en los semilleros de cítricos (Schwartz, 2001b), la metodología para llevar a cabo hibridación somática (Olivares-Fuster et al., 2000, 2002, 2005) y su utilidad para el desarrollo de nuevo germoplasma (Pensabene-Bellavia, 2009).

Asimismo, se ha evaluado el comportamiento de algunos portainjertos tetraploides frente al estrés salino (Saleh et al., 2008; Mouhaya et al., 2010) e hídrico (Allario et al., 2011).

En éste trabajo se pretende ampliar la información existente en cuanto al comportamiento diferencial de los portainjertos autotetraploides en aspectos relacionados con la morfología, fisiología, agronomía y biología molecular; haciendo énfasis en la tolerancia a estreses abióticos. El trabajo se ha centrado en el estudio de los portainjertos citrange Carrizo y *C. macrophylla*, que son actualmente los más utilizados en las nuevas plantaciones de la citricultura española. Además, se han estudiado dos híbridos somáticos alotetraploides de *C. macrophylla* y citrange Carrizo, obtenidos con la idea de reunir en un único genotipo los caracteres de interés de ambos portainjertos

El objetivo general es determinar qué rasgos de potencial interés para la mejora de portainjertos aporta la tetraploidía en cítricos.

Los objetivos específicos que se abordan en éste estudio son:

1. Evaluar el efecto de la autotetraploidía del portainjerto en el comportamiento agronómico de una plantación de naranjo ‘Valencia’ en condiciones de aridez y alto contenido en caliza del suelo.
2. Evaluar el efecto de la tetraploidía en la tolerancia a la salinidad del suelo de los portainjertos citrange Carrizo y *C. macrophylla*.
3. Evaluar el efecto de la tetraploidía en la tolerancia al exceso de boro en citrange Carrizo.
4. Evaluar el efecto de la autotetraploidía en la tolerancia a la clorosis férrica de citrange Carrizo y *C. macrophylla*.
5. Realizar una caracterización morfológica, fisiológica y genómica de 2 híbridos somáticos alotetraploides (*C. macrophylla* + citrange Carrizo) para valorar su utilidad como portainjertos de cítricos.

## **Efecto de la tetraploidía del portainjerto en la variedad de naranjo ‘Valencia’ late (*Citrus sinensis* (L.) Osb.)**

### **1. Introducción**

Los portainjertos citrange Carrizo (CC) y *C. macrophylla* (CM) se caracterizan por reunir un conjunto de propiedades de interés y por ser actualmente los más utilizados en la citricultura española (Navarro, 2015). El CC es un portainjerto muy valorado por favorecer la productividad de las variedades injertadas y la producción de frutos de tamaño y calidad organoléptica óptima. Además, confiere tolerancia a un espectro amplio de estreses abióticos y enfermedades incidentes en la citricultura española, entre los que destaca la tolerancia a la Tristeza, enfermedad causada por el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (véase apartado I-2.2). El portainjerto CM induce un crecimiento vigoroso a la variedad injertada, adelanta su entrada en producción y proporciona cosechas abundantes. Estas características rentabilizan tanto la producción de plantones en vivero, como el rendimiento de las plantaciones. También destaca por su adaptación a suelos con contenido elevado de caliza elevado y facilita el cultivo en suelos salinos por restringir el transporte de solutos potencialmente tóxicos, como son el cloruro (Cl<sup>-</sup>) o el boro (B). Sin embargo es un portainjerto sensible al frío y moderadamente sensible al CTV, que puede ocasionar problemas en el cultivo de naranjo y mandarino, aunque no afecta al cultivo de limonero. Otra característica que restringe su utilización es la disminución de la calidad organoléptica del fruto, al conferir generalmente menor contenido en zumo y sólidos solubles que CC (Fallahi y Rodney, 1992).

Por sus características, CM es el portainjerto más habitualmente utilizado en las regiones cítricas áridas del sureste español.

Sin embargo, para la citricultura en regiones que presentan niveles moderados de caliza y salinidad en el suelo, el portainjerto más utilizado es CC, que reúne las cualidades idóneas para el cultivo de naranjo y mandarino.

Algunos estudios señalan, que la tetraploidía del portainjerto podría aportar ventajas agronómicas que permitirían optimizar el cultivo de los cítricos (véase apartado I-3.2.2.4). Los árboles con portainjerto 4x suelen desarrollar menor tamaño de copa, característica que ha ganado interés en los últimos años. Por un lado, permitiría maximizar la producción al permitir el establecimiento de un marco de plantación menor en las parcelas de cultivo; por otro lado, contribuye a la disminución de los costes de cultivo y posibilita un control más eficiente del estado de la plantación (Grosser y Chandler, 2003; Grosser et al., 2007).

Estudios recientes señalan que la tetraploidía en algunos portainjertos de cítricos podría mejorar la tolerancia del árbol al estrés salino por promover una exclusión más eficiente de los iones tóxicos  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Saleh et al., 2008; Grosser et al., 2012a) y al estrés hídrico, debido a la expresión constitutiva más elevada de ácido abscísico (ABA) (Allario et al., 2013). Por otra parte, algunos trabajos indican que la tetraploidía del portainjerto no modifica la producción del árbol adulto ni la calidad del fruto de la variedad injertada (Schwartz et al., 2001a; Hussain et al., 2012a). No obstante, sería esperable que los efectos asociados a la tetraploidía variaran su intensidad en función del portainjerto considerado y de las condiciones de cultivo. Para valorarlo y determinar su posible utilización es necesaria la evaluación específica de cada portainjerto tetraploide en las condiciones de cultivo locales.

Por tanto, con el objetivo de caracterizar el efecto de la tetraploidía sobre el comportamiento agronómico en los portainjertos más utilizados en la citricultura española se estableció una parcela experimental, localizada en la región citrícola del sureste español, que presenta condiciones edafoclimáticas adversas. Previsiblemente, la disponibilidad de algunos nutrientes se encontraría restringida por el pH básico del suelo y la aridez propiciaría la acumulación de solutos potencialmente tóxicos y la escasez hídrica. Además, en la zona es habitual el uso de aguas de riego de baja calidad. En ésta parcela se estableció el cultivo de naranjos de la variedad 'Valencia' late injertados sobre los portainjertos CC y CM, en sus variantes 2x y 4x.

En este estudio se presenta el seguimiento de la plantación durante los primeros seis años para determinar los efectos del portainjerto y su ploidía sobre la nutrición, desarrollo y entrada en producción de los árboles en las condiciones de cultivo impuestas.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Condiciones ambientales

La parcela experimental, establecida en el año 2009, se localiza en el término municipal de Elche (Alicante) en la estación experimental del IVIA (38°14'53.57''N, 0°41'46.9''O). En ésta ubicación, el clima es de tipo mediterráneo árido con temperaturas altas, irradiación solar elevada (2900 h·año<sup>-1</sup>), oscilaciones térmicas muy suaves y precipitaciones escasas e irregulares. La temperatura media anual es de 17.9 °C, la humedad relativa media del 65% y la precipitación media anual es de 290.2 mm, siendo la primavera y el otoño las estaciones más húmedas frente a la práctica sequía del verano. La comarca se caracteriza por una intensa actividad agrícola e industrial; actividad que, junto con la elevada densidad de población (508 hab·km<sup>-2</sup>) y la expansión urbanística, determinan un grado elevado de presión sobre el suelo y sobre el uso del agua. Estas características favorecen el desarrollo de procesos de contaminación puntual del suelo y el agua, así como la implantación de fuentes de abastecimiento alternativas, como es el uso de aguas depuradas o procedentes del parque natural de El Hondo.

### 2.2. Condiciones agronómicas

#### 2.2.1. Características del suelo

El suelo de la parcela, en sus primeros 50 cm de profundidad, posee una textura franco arcillosa (USDA) y un pH básico (> 8.0) debido al alto porcentaje de caliza activa (6.4%) procedente de materiales carbonatados de origen sedimentario, que constituyen un 32.7% de la composición mineral del suelo. El contenido en materia orgánica es de 1.63% (v/v) y los nutrientes fundamentales tienen concentraciones adecuadas (**Tabla 1.S1**).

Sin embargo las características del suelo podrían afectar al desarrollo normal del cultivo, ya que la mayoría de nutrientes, especialmente el fósforo (P) y los microelementos, tienen muy baja disponibilidad en estas condiciones, aún en concentraciones adecuadas. Además, destaca la condición salina del suelo ( $CE > 4 \text{ dS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), originada por la acumulación de solutos procedentes del uso de aguas de riego locales, parcialmente depuradas y facilitada por largos periodos de sequía (Micó et al., 2005). El porcentaje de materia orgánica es el adecuado para mantener un complejo de cambio efectivo que favorezca la estructura del suelo. La cantidad de nitrógeno (N) procedente del abonado y el ritmo de mineralización de la materia orgánica son adecuados, como indica la relación carbono:nitrógeno. Las concentraciones de los macronutrientes P, calcio (Ca), magnesio (Mg) y potasio (K) y su disponibilidad son adecuadas. Sin embargo la concentración de boro (B) en el suelo, evaluada en el extracto soluble en agua caliente fue alta ( $0.56 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) según las referencias bibliográficas (Sikora et al., 2014; Grattan et al., 2015) que establecen que el B en el suelo puede ser perjudicial para la actividad agrícola a partir de  $0.5\text{-}0.7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

### 2.2.2. Características del agua de riego

El agua habitualmente empleada para el riego de la parcela procede de la comunidad general de regantes *Riegos de Levante*, que se abastece alternativamente de aguas procedentes del trasvase Tajo-Segura (ATS) y de aguas locales (AL) de origen residual, procedentes la estación depuradora de Algorós u ocasionalmente tomadas del parque natural de El Hondo. El ATS tiene CE reducida e índice SAR óptimo siendo apta para el riego de la mayoría de cultivos (**Tabla 1.S2**), mientras que el AL tiene parámetros de calidad alejados de los valores óptimos.

## 2.3. Material vegetal

El estudio se realizó empleando 48 árboles de la variedad de naranjo dulce ‘Valencia’ late (VL) (*C. sinensis*) (IVIA-363) injertada sobre dos portainjertos: citrange Carrizo (*C. sinensis* × *P. trifoliata*) (CC) y *C. macrophylla* (CM) en sus variantes 2x y 4x, que son las accesiones IVIA-387 (CC2x), IVIA-503 (CC4x), IVIA-288 (CM2x) e IVIA-518 (CM4x) del banco de germoplasma del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Navarro, 2015; Navarro et al., 2002).

Las plantas se prepararon en los invernaderos del IVIA y se trasplantaron al campo en 2009. El diseño experimental de la parcela consistió en 3 bloques con 2 unidades de muestreo en cada uno que contienen los 2 portainjertos en sus 2 ploidías a estudiar. Cada unidad de muestreo se compuso de 4 árboles situados en 2 filas adyacentes. Una fila extra de árboles separó cada bloque experimental de los adyacentes. Los árboles se cultivaron según los estándares locales de fertirrigación, poda y control de plagas, evitando la aplicación de quelatos de hierro.

#### **2.4. Análisis foliar**

Para determinar el estado nutricional de los árboles, en el mes de noviembre, se tomaron entre 5 y 10 hojas de la brotación de primavera por árbol, de brotes sin fruto terminal, seleccionados al azar alrededor de la copa. Se evitaron aquellas hojas que mostraran signos de enfermedad, plagas u otro tipo de daño. Cada muestra se compuso de unas 20 hojas, tomadas de los 4 árboles que componen la unidad de muestreo. Cada año se tomó una muestra por unidad ( $n=6$ ). Las hojas se lavaron en una solución de agua destilada y detergente no iónico Tween 20 (Sigma-Aldrich Co.) al 10% (p/v), se desecaron en un horno de aire caliente (Memmert co., Germany) a 65 °C durante 48 h y se molieron. A continuación las muestras se calcinaron en un horno mufla a 500 °C durante 12 h y las cenizas se disolvieron en  $\text{HNO}_3$  al 2% y Triton-X 100 (Sigma-Aldrich Co.) al 0.1% (p/v).

Se determinó el contenido en los macronutrientes P, K, azufre (S), Mg y Ca; y de los micronutrientes cobre (Cu), B, manganeso (Mn), zinc (Zn) y hierro (Fe) mediante espectroscopía de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) utilizando un equipo iCAP 6000 (Thermo scientific, USA). El contenido en N total de las muestras se determinó mediante el método Kjeldahl (Bradstreet, 1954). El muestreo se repitió de la misma manera en los años 3° (2012), 4° (2013) y 5° (2014) tras el establecimiento de la parcela. Los valores obtenidos se interpretaron según Legaz et al. (2008) para determinar el estado nutricional de la plantación. Los resultados se expresaron en función del peso seco (PS) de la muestra, utilizando las unidades habitualmente empleadas para macronutrientes ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y micronutrientes (ppm).

Las relaciones entre nutrientes se calcularon partiendo de su concentración en miliequivalentes ( $\text{meq}\cdot\text{g}^{-1}$  PS) según indica Weir (1969).

## **2.5. Estudio morfométrico**

Pasados 6 años tras el establecimiento de la parcela (2015), se midió la altura total de cada árbol (HT) y su diámetro máximo de copa (D). A partir de éstas medidas se calculó el volumen de la copa ( $\text{m}^3$ ) según la ecuación de Turrell y Vanselow (1946):

$$V (\text{m}^3) = 0.5236 \cdot \text{HT} \cdot \text{D}^2$$

De tronco, se midió el diámetro de la variedad a 5 cm por encima de la unión injerto-patrón y el diámetro del portainjerto a 5 cm bajo la unión.

## **2.6. Producción**

Entre los años 3º y 6º tras el establecimiento de la parcela, se registró el peso de la cosecha de cada árbol y se determinó la producción por año y la producción acumulada. El 6º año, considerando el volumen de copa (véase apartado anterior), se determinó la eficiencia productiva ( $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ).

## **2.7. Calidad del fruto**

En la campaña del 6º año, se tomaron muestras de fruto procedentes de cada bloque experimental que consistieron en 15 frutos y se determinaron los caracteres de calidad.

Se determinó el peso medio, el diámetro (d), la altura (a) y la relación d/a, que expresa las diferencias en las proporciones del fruto y en su forma y el grosor de la piel de los frutos. Se determinó el color de los frutos utilizando el sistema Hunter Lab que evalúa el brillo (L), el tono de color en el eje rojo-verde (a) y el tono de color en el eje amarillo-azul (b) proporcionando el índice de color (IC) mediante el cálculo descrito por Jiménez-Cuesta et al. (1981):

$$\text{IC} = (1000 \cdot a) \cdot (\text{L} \cdot b)^{-1}$$



Para ésta medida se utilizó el colorímetro CR-400 (Konica Minolta, Japón) que previamente fue calibrado con el estándar blanco No: 21733001.

Se extrajo el zumo total de cada fruto mediante prensa manual y se determinó el porcentaje de su peso respecto al peso fresco total del fruto. Se determinó la acidez total del zumo (AT, %) titulando las muestras a pH 8.0 con NaOH 1 M y utilizando fenolftaleína como indicador (AOAC, 1984). Se determinó el contenido en sólidos solubles totales (SST, °Brix) a 20 °C utilizando un refractómetro PR-101α (Atago, Japón). Estas variables son las principales contribuyentes al sabor final del fruto. Además, a partir de ellas se calculó el índice de madurez (IM) según la relación:

$$IM = SST \cdot AT^{-1}$$

## 2.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) y la separación de medias, para  $P \leq 0.05$  se realizó mediante el test Duncan de rango múltiple utilizando el software Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics, Inc. USA). Para el estudio del estado nutricional de los árboles y de su producción, se realizaron ANOVA de triple vía, considerando los efectos principales portainjerto, ploidía y año. Las interacciones entre los efectos principales se consideraron en el modelo cuando fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) y sus componentes también lo fueron de forma individual. La interacción triple no fue significativa en ningún caso analizado y se excluyó de los modelos. Para analizar las variables morfométricas y de calidad del fruto se realizaron ANOVA de doble vía, considerando los efectos cultivar y ploidía. Las interacciones no fueron significativas y se excluyeron de los modelos.

En cualquier caso, se consideraron aquellas interacciones entre efectos principales cuando éstos resultaron ambos significativos ( $P \leq 0.05$ ) de manera independiente, en caso contrario las interacciones se indican como no incluidas (ni).

### 3. Resultados

Se evaluó el efecto de la ploidía (2x y 4x) y del portainjerto (CC y CM) en el estado nutricional de los árboles de VL durante los años 3º, 4º y 5º tras el establecimiento de la parcela, la producción durante los seis años, el tamaño de los árboles alcanzado a los 6 años y la morfología y calidad organoléptica de los frutos en el sexto año.

#### 3.1. Análisis foliar

Se encontraron diferencias entre los árboles en la mayoría de macronutrientes y micronutrientes analizados, tanto asociadas al portainjerto utilizado y su ploidía, como dependiendo de los años transcurridos tras el establecimiento de la parcela. En cuanto a la concentración foliar de macronutrientes, se encontró que los árboles VL/CM tuvieron concentraciones más altas de N que los árboles VL/CC (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1** Efectos del portainjerto y su ploidía (n=18) y del año de muestreo (n=12) en las concentraciones (mg·g<sup>-1</sup>PS) de macronutrientes en hojas de primavera de naranjos ‘Valencia’ late injertados sobre citrange Carrizo (CC) o *C. macrophylla* (CM) diploide (2x) o tetraploide (4x).

Factor	Nivel	N	P	K	Ca	Mg	S
Portainjerto	CC	19.8 a	1.6 b	8.0 a	41.6 b	4.2 b	2.7 b
	CM	21.3 b	0.8 a	9.2 b	34.9 a	2.5 a	2.0 a
Ploidía	2x	20.4	1.2	7.3 a	43.9 b	3.6 b	2.5
	4x	20.7	1.2	10.0 b	32.5 a	3.1 a	2.2
Año	3º	24.3 b	1.4 b	10.8 b	35.9 a	2.8 a	2.3 b
	4º	18.2 a	1.0 a	8.2 a	34.4 a	3.2 b	1.6 a
	5º	19.1 a	1.2 a	6.9 a	44.4 b	4.0 c	3.1 c
Portainjerto		<sup>x</sup> 0.002	< 0.001	0.047	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Ploidía		0.400	0.673	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.011
Año		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Portainjerto x Año		ni	ni	ni	ni	0.012	0.001

a, b, c. diferencias entre niveles de cada factor en el test de Duncan para  $P \leq 0.05$ ; ni. Efecto no incluido en el modelo. <sup>x</sup>P-valor.

Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ploidías. En general el nivel de N en los árboles fue normal (23-25  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  PS) en el 3<sup>er</sup> año y se redujo ligeramente en los años 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup>. La concentración foliar de P (**Tabla 1.1**) en árboles VL/CC fue óptima (1.3-1.6  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  PS) y más alta que la de VL/CM. Las diferentes ploidías del portainjerto no dieron lugar a diferencias significativas en la concentración foliar de P. El nivel general de P en la parcela fue óptimo en el año 3<sup>o</sup> y se redujo ligeramente en los años siguientes. El K fue un 15% más alto en VL/CM que en VL/CC y los árboles con portainjerto 4x tuvieron una concentración un 40% más alta que los árboles con portainjerto 2x. El nivel de K general de la parcela fue óptimo en el año 3<sup>o</sup> (7-10  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  PS) y se redujo ligeramente en los años siguientes.

El portainjerto CC dio lugar a concentraciones foliares más altas de Ca y Mg que CM y la ploidía también influyó en las concentraciones de éstos dos elementos, que fueron más bajos en árboles con portainjerto 4x que con 2x. Además, los valores de Ca se mantuvieron dentro del rango óptimo (30-50  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  PS), así como los de Mg (2.5-4.5  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  PS) y ambos fueron en aumento con el paso de los años. En el caso del Mg se observó un aumento mayor en VL/CM que en VL/CC el 5<sup>o</sup> año. La concentración foliar de S fue más alta en VL/CC que en VL/CM y osciló con los años. La tetraploidía del portainjerto determinó concentraciones foliares de S más bajas que en los árboles con portainjerto 2x.

En cuanto a los micronutrientes (**Tabla 1.2**), las concentraciones foliares de B fueron altas (100-260 ppm) respecto a los valores de referencia y aumentaron en VL/CC pero no en VL/CM en los años 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup>. La ploidía afectó a la acumulación de B de forma diferente según el portainjerto considerado (**Fig. 1.1**). En VL/CC4x la concentración de B fue un 20% inferior que en VL/CC2x; mientras que en VL/CM4x fue ligeramente superior a VL/CM2x.

La concentración de Cu fue baja ( $\leq 6$  ppm) en VL/CM (**Tabla 1.2**) y no varió con los años, mientras que en VL/CC fue óptima y aumentó entre el 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> año. La tetraploidía determinó concentraciones mayores que en los portainjertos 2x. El Mn se encontró a concentraciones reducidas ( $\leq 26$  ppm) en VL/CC y no varió con los años. Sin embargo en VL/CM la concentración fue óptima y en ascenso. No hubo diferencias significativas en función de la ploidía del portainjerto.

El nivel de Zn fue bajo ( $\leq 26$  ppm) en todos los árboles y las concentraciones fueron estables en VL/CC, mientras que descendieron con los años en VL/CM. La ploidía no afectó a la concentración de éste micronutriente. El Fe foliar tuvo valores óptimos (61-100 ppm) que aumentaron en el 5° año, pero el portainjerto y la ploidía no afectaron a su concentración.

**Tabla 1.2** Efectos del portainjerto y su ploidía (n=18) y del año de muestreo (n=12) en las concentraciones (ppm) de micronutrientes en hojas de primavera de naranjos ‘Valencia’ late injertados sobre citrange Carrizo (CC) o *C. macrophylla* (CM) diploide (2x) o tetraploide (4x).

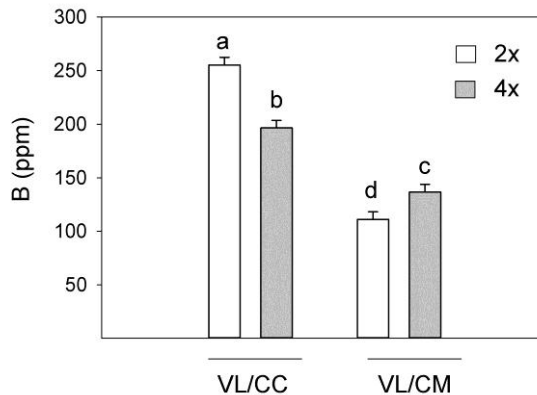
Factor	Nivel	B	Cu	Mn	Zn	Fe
Portainjerto	CC	225.8 b	9.2 b	13.2 a	13.9 b	60.8
	CM	123.8 a	4.8 a	34 b	10.8 a	66.7
Ploidía	2x	183.1 b	6.5 a	25.3	12	62.7
	4x	166.5 a	7.5 b	21.9	12.7	64.8
Año	3°	146.6 a	5.6 a	19.7 a	13.9 b	61.7 a
	4°	192.6 b	6.3 a	24.2 ab	11.4 a	52.6 a
	5°	185.3 b	9.1 b	26.9 b	11.8 a	76.8 b
Portainjerto		< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.002	0.252
Ploidía		<sup>x</sup> 0.028	0.005	0.068	0.331	0.683
Año		< 0.001	< 0.001	0.011	0.016	0.002
Portainjerto × Año		0.002	< 0.001	0.003	0.009	ni
Portainjerto × Ploidía		< 0.001	ni	ni	ni	ni
Ploidía × año		ni	ni	ni	ni	ni

a, b, c. diferencias entre medias de cada factor en el test de Duncan para  $P \leq 0.05$ ; ni. Efecto no incluido en el modelo. <sup>x</sup>P-valor.

Por otro lado, considerando que las concentraciones de nutrientes pueden ser interdependientes, se analizaron las relaciones algunos nutrientes en función del portainjerto, su ploidía y los años transcurridos tras el establecimiento de la parcela, para contribuir a la interpretación de los resultados.

La relación del K con sus dos antagonicos Ca y Mg ( $K/(Ca+Mg)$ ) fue más alta en VL/CM que en VL/CC, así como en los árboles con portainjerto 4x respecto a los árboles con portainjerto 2x (**Tabla 1.3**).

La combinación VL/CM4x tuvo los valores más altos de  $K/(Ca+Mg)$ , como se observa en la **Fig. 1.2**. Esta relación también disminuyó con los años hasta un 43%. En cuanto al ratio  $K/Mg$  (**Tabla 1.3**), se observaron valores más altos en VL/CM que en VL/CC pero en VL/CM4x fue particularmente elevado, mientras que la tetraploidía en VL/CC no modificó los valores respecto a los 2x. En el tiempo, la relación disminuyó hasta un 60%, especialmente en VL/CM. Por su parte, el cociente  $K/Ca$  no fue diferente entre los árboles VL/2xCC y VL/CM2x, pero los 4x tuvieron relaciones  $K/Ca$  más altas que los 2x. Los valores más altos se alcanzaron en la combinación VL/CM 4x y en general, con los años, la relación disminuyó hasta un 44%.



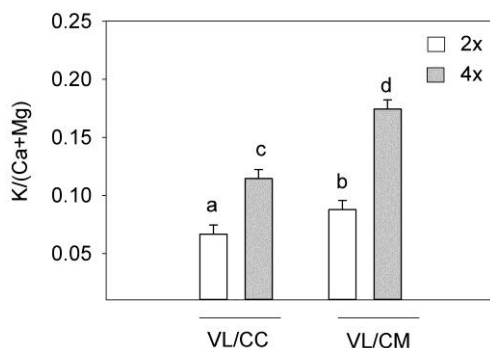
**Figura 1.1** Concentración de B (ppm) en hojas de primavera de los árboles de naranjo ‘Valencia’ late (VL) injertados sobre los portainjertos citrange Carrizo (CC) y *C. macrophylla* (CM) en sus versiones diploide (2x) y tetraploide (4x). <sup>a,b,c</sup> diferencias significativas en el test de Duncan para  $P \leq 0.001$ .

En cuanto a  $Mg/Ca$ , fue más alta en VL/CC que en VL/CM, aunque los valores se igualaron en el 5° año. Entre ploidías no hubo diferencias en VL/CM; mientras que en VL/CC 4x, la relación fue ligeramente mayor que en VL/CC 2x. En general,  $Mg/Ca$  fue el cociente entre nutrientes menos variable con los años.

**Tabla 1.3** Efectos del del portainjerto y su ploidía (n=18) y del año de muestreo (n=12) en las relaciones entre macronutrientes en hojas de primavera. de naranjos ‘Valencia’ late injertados sobre citrange Carrizo (CC) o *C. macrophylla* (CM) diploide (2x) o tetraploide (4x).

Factor	Nivel	K/(Ca+Mg)	K/Mg	Mg/Ca	K/Ca
Portainjerto	CC	0.09 a	0.62 a	0.17 b	0.11 a
	CM	0.13 b	1.35 b	0.12 a	0.14 b
Ploidía	2x	0.08 a	0.72 a	0.13 a	0.09 a
	4x	0.14 b	1.25 b	0.15 b	0.16 b
Año	3°	0.14 c	1.44 c	0.13 a	0.16 c
	4°	0.11 b	0.93 b	0.15 b	0.13 b
	5°	0.08 a	0.58 a	0.15 b	0.09 a
Portainjerto		<0.001	<0.001	0.004	0.003
Ploidía		<0.001	<0.001	0.004	<0.001
Año		<0.001	<0.001	0.026	<0.001
Portainjerto × Ploidía		<sup>x</sup> 0.019	0.003	0.003	0.038
Portainjerto × Año		ni	0.004	<0.001	ni

a, b, c. diferencias entre medias de cada factor en el test de Duncan para  $P \leq 0.05$ . ni. Efecto no incluido en el modelo. <sup>x</sup>P-valor.



**Figura 1.2** Diferencias en la relación entre los cationes antagónicos potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg) en hojas de primavera de naranjo ‘Valencia’ late (VL) injertado sobre los genotipos diploide (2x) o tetraploide (4x) de citrange Carrizo (CC) y *C. macrophylla* (CM). <sup>a,b,c,d</sup> diferencias significativas en el test de Duncan para  $P \leq 0.05$ .

### 3.2. Estudio morfométrico

Transcurridos 6 años tras el establecimiento de la parcela se evaluó el tamaño de los árboles, para determinar la influencia del portainjerto y su ploidía sobre el crecimiento. Se observó que la altura de los árboles no fue significativamente distinta en función del portainjerto (**Tabla 1.4**), mientras que la tetraploidía dio lugar a una reducción de altura del 8%. El diámetro de la copa y su volumen fueron similares entre árboles con portainjerto 2x, sin embargo la tetraploidía en VL/CC redujo el diámetro de copa en un 18% y el volumen en un 42%, mientras que en VL/CM no alteró las dimensiones (**Fig. 1.3**). El diámetro de tronco, tanto en el portainjerto como en la variedad fue en torno a un 13% menor en VL/CM que en VL/CC y entre un 6.2% y un 8.9% inferior en 4x que en 2x, pero no varió la relación entre el diámetro de la variedad y el del portainjerto.

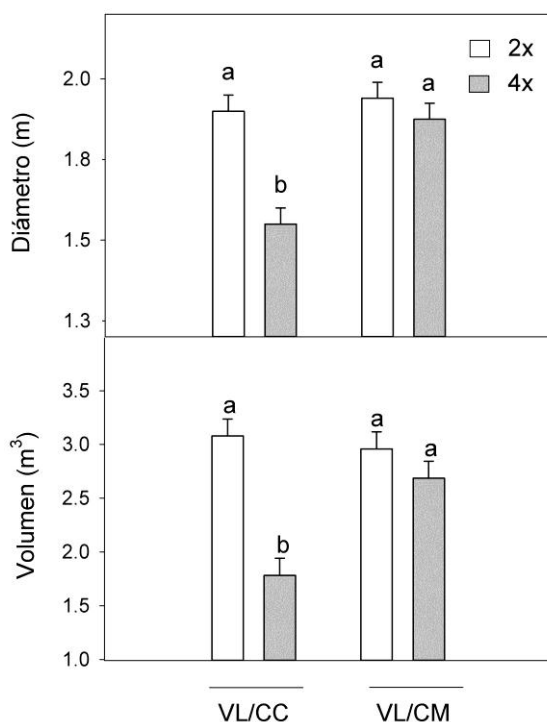
**Tabla 1.4** Efectos del portainjerto citrange Carrizo (CC) o *C. macrophylla* (CM) y de su ploidía (n=24) en el tamaño de los árboles de naranjo ‘Valencia’ late alcanzado el 6º año tras el establecimiento de la parcela.

Factor	Nivel	Altura (m)	Diámetro de copa (m)	Volumen de copa (m <sup>3</sup> )	Diámetro de tronco Var. (mm)	Portainj. (mm)
Portainjerto	CC	1.67	1.73 a	2.43 a	89.9 b	92.2 b
	CM	1.59	1.91 b	2.82 b	78.8 a	79.5 a
Ploidía	2x	1.70 b	1.92 b	3.02 b	88.4 b	89.8 b
	4x	1.56 a	1.71 a	2.23 a	82.9 a	81.8 a
Portainjerto		<sup>x</sup> 0.087	< 0.001	0.018	< 0.001	< 0.001
Ploidía		0.0076	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Portainjerto × Ploidía		ni	0.006	0.002	0.002	0.001

a, b. diferencias entre medias de cada factor en el test de Duncan para  $P \leq 0.05$ . ni. Efecto no incluido en el modelo. <sup>x</sup>P-valor.

### 3.3. Producción

A partir del año 3º, tras el establecimiento de la parcela, se registró anualmente el peso de la fruta cosechada por árbol. Los árboles VL/CM tuvieron una producción mayor que los VL/CC (Tabla 1.5), de manera que la producción acumulada transcurridos 4 años fue un 70% mayor en árboles con portainjerto CM. La tetraploidía del portainjerto determinó, en general, menores producciones, dando lugar a una reducción de la producción acumulada de un 20% respecto a los árboles con portainjerto 2x. Sin embargo, considerando los volúmenes de copa, la eficiencia productiva en VL/CM fue un 61% mayor que en VL/CC; mientras que por ploidías no se observaron diferencias.



**Figura 1.3** Diámetro (m) y volumen de copa (m<sup>3</sup>) de naranjo ‘Valencia’ late (VL) injertado sobre los genotipos diploide (2x) o tetraploide (4x) de citrange Carrizo (CC) y *C. macrophylla* (CM). a,b,c diferencias significativas en el test de Duncan para  $P \leq 0.01$ .



### 3.4. Calidad del fruto

En la cosecha del 5° año se analizó la calidad de los frutos, producidos en árboles con diferente portainjerto. El peso de los frutos fue un 28% mayor en los árboles VL/CM que en los VL/CC (**Tabla 1.6**), pero no hubo diferencias entre ploidías. El diámetro (d) y la altura (a) fueron un 11% mayores en los frutos de VL/CM que en los VL/CC. La ploidía del portainjerto tampoco modificó éstas características del fruto. La forma del fruto, evaluada a partir de la relación d/a, no varió en función de ninguno de los factores considerados. Por otro lado, la corteza de los frutos de árboles VL/CM fue un 20% más gruesa que la de VL/CC.

**Tabla 1.5** Efectos del portainjerto (Port.) citrange Carrizo (CC) o *C. macrophylla* (CM) y de su ploidía (Plo.) (n=24) en la producción (Kg) por años y acumulada hasta el 6° año tras el establecimiento de la parcela (Ac) y en la eficiencia productiva en el 6° año (Ef) (Kg·m<sup>-3</sup>).

		Producción (Kg)					
		3° (2012)	4° (2013)	5° (2014)	6° (2015)	Ac	Ef
Port.	CC	0.37 a	4.61 a	5.92 a	11.29 a	22.18 a	4.50 a
	CM	2.10 b	15.35 b	23.46 b	32.13 b	73.04 b	11.60 b
Plo.	2x	1.60 b	11.42 b	14.25	25.38 b	52.64 b	8.5
	4x	0.87 a	8.54 a	15.13	18.04 a	42.58 a	7.6
Port.		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Plo.		0.054	0.013	0.502	< 0.001	0.004	0.273
Port. × Plo.		ni	ni	ni	ni	ni	ni

a, b. diferencias entre medias de cada factor en el test de Duncan para  $P \leq 0.05$ . ni. Efecto no incluido en el modelo.

Se evaluó también el color de los frutos en el momento de la cosecha, su contenido en zumo y la calidad de éste atendiendo a su acidez total (AT) y su contenido en sólidos solubles totales (SST) y al índice de madurez (SST/AT) (**Tabla 1.7**). El índice de color de los frutos fue significativamente mayor en VL/CM que en VL/CC sin embargo no varió entre los frutos de árboles con portainjerto de ploidía diferente. En cuanto al contenido en zumo

de los frutos, su acidez, contenido en sólidos solubles y madurez, no se observaron diferencias significativas debidas al portainjerto o a la ploidía.

**Tabla 1.6** Efectos del portainjerto citrange Carrizo (CC) o *C. macrophylla* (CM) y de su ploidía (n=6) en la calidad morfológica del fruto cosechado el 6° año.

Factor	Nivel	Peso (g)	Diámetro (cm)	Altura (cm)	Relación d/a	Grosor de la piel (mm)
Portainjerto	CC	132.2 a	62.3 a	63 a	0.989	3.10 a
	CM	183.0 b	69.9 b	70.8 b	0.987	3.87 b
Ploidía	2x	157.2	65.8	66.8	0.984	3.62
	4x	158	66.4	66.9	0.992	3.36
Portainjerto		<0.001	<0.001	<0.001	0.849	0.003
Ploidía		0.912	0.582	0.947	0.452	0.227

a, b. diferencias entre medias de cada factor en el test de Duncan para  $P \leq 0.05$ .

**Tabla 1.7** Efectos del portainjerto citrange Carrizo (CC) o *C. macrophylla* (CM) y de su ploidía (n=6) en la calidad organoléptica del fruto cosechado el 6° año.

Factor	Nivel	Índice de color	Contenido de zumo (%)	Acidez	Solidos Solubles (°Brix)	Índice de madurez
Portainjerto	CC	5.6 a	58.7	1.58	12.75	8.14
	CM	8.6 b	58.3	1.59	12.60	7.95
Ploidía	2x	7.6	58.3	1.63	12.93	7.97
	4x	6.6	58.7	1.54	12.42	8.12
Portainjerto		<0.001	0.563	0.856	0.606	0.622
Ploidía		0.055	0.563	0.301	0.678	0.113

a, b. diferencias entre medias de cada factor en el test de Duncan para  $P \leq 0.05$ .

#### 4. Discusión

El análisis por años del estado nutricional de la parcela permitió determinar su evolución y contextualizar el comportamiento de los árboles en función del portainjerto y de su ploidía. Con el transcurso de los años, descendió la concentración foliar de algunos nutrientes mientras que aumentó la de otros. El descenso de N, P y K se debió, probablemente, al comienzo del crecimiento vigoroso de los plántones y a su entrada en producción. Los nutrientes en aumento con los años fueron Ca, Mg y B. El Ca aumenta su concentración foliar como consecuencia del desarrollo de las raíces que, al explorar el suelo a profundidades mayores, donde el contenido en caliza suele ser más alto, absorben éste elemento en mayor cantidad. La concentración foliar de Mg tiene una relación antagonista con la de K que se observó en éste estudio. El B aumentó su concentración foliar debido a la acumulación en el suelo y al riego con aguas que contienen concentraciones altas ( $>0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (MAGRAMA, 2014; Grattan et al., 2015).

Se observó también que las variaciones en N, K, Ca y Mg suceden de acuerdo a los antagonismos clásicos del balance de nutrientes (Bar-Akiva y Gotfried, 1971; Embleton et al., 1973), como es el caso general, de los suelos donde se cultivan cítricos en el sureste español. En los árboles, al descender la concentración foliar de K, de forma antagonista, aumentaron las de Ca y Mg. Este desequilibrio puede analizarse a través de la relación  $K/(Ca+Mg)$ . Sin embargo, es bien conocido que en cítricos el principal antagonista del K es el Mg (Weir, 1969; Marschner, 1995; Brady y Weil, 1999; Epstein y Bloom, 2005). Por éste motivo se analizaron también las relaciones K/Mg, K/Ca y Mg/Ca. Nuestros resultados coinciden en que el catión con un efecto mayor sobre la absorción de K fue el Mg; siendo su relación la más variable, con independencia del factor considerado. Con el transcurso de los años, las relaciones del K con sus bases antagonistas descendieron, mientras que la relación Ca/Mg aumentó ligeramente. Éste desequilibrio, típico de suelos con pH alcalino, interfiere, a su vez, en la captación de micronutrientes (Shear et al., 1948), lo que pudo ocasionar la deficiencia que observamos en Cu, Mn y Zn.

Otro rasgo destacado es la acumulación de B en los árboles, alcanzando concentraciones altas. Esto puede atribuirse a su

acumulación en el suelo y a la concentración excesiva presente en el agua de riego. Varios estudios establecen que la concentración de B en el suelo para evitar la acumulación foliar en cultivos, determinada mediante extracción en agua caliente, no debe exceder de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  (Sikora et al., 2014). En la parcela de estudio se detectó una concentración de  $0.56 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , que puede considerarse excesiva.

El B presenta cierta afinidad por el suelo pudiendo quedar adsorbido en las arcillas y en la materia orgánica, en función de otros factores como la textura del suelo, el pH, contenido hídrico o la temperatura (Goldberg et al., 2000). El drenaje promedio necesario para desprenderlo debe ser tres veces más abundante que en el caso de otras sales (Ayers y Westcot, 1985). En cultivos a largo plazo, como es el caso de los cítricos y especialmente debido a la larga vida de sus hojas y a su alta sensibilidad, es fundamental restringir el suministro de B en el agua de riego para evitar la acumulación y favorecer el drenaje. En la parcela de estudio se alternó el riego con aguas del trasvase Tajo-Segura, cuya concentración de B es adecuada (**Tabla S.2**), con aguas locales, cuya concentración de B, según indica el análisis es de  $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Esta cifra coincide con el límite recomendado en España (MAGRAMA, 2004), aunque duplica los límites establecidos en otras zonas citrícolas del mundo que también sufren el riesgo de acumulación de B.

En el sur de California (USA) e Israel, coinciden en establecer la concentración límite de B en el agua de riego en  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . En estas regiones, el riego con aguas desaladas se ha implantado con éxito en las últimas décadas, pero ha sido necesario replantear la recomendación respecto a la concentración de B en aguas de riego para evitar su acumulación en el suelo y favorecer la sostenibilidad de las plantaciones citrícolas (Grattan et al., 2015). Estos datos sugieren, coincidiendo con estudios recientes (Pedrero et al., 2013), que los límites actualmente establecidos quizá no sean suficientemente restrictivos, ya que se observó una acumulación foliar alta, que en cítricos se correlaciona con la aparición del efecto tóxico.

En éste contexto, analizamos el efecto del portainjerto y de su ploidía en la nutrición, tamaño de los árboles, producción y calidad de la fruta.

El estado nutricional de los árboles fue variable en función del portainjerto y de su ploidía. Los árboles VL/CM tuvieron concentraciones de N, K y Mn más altas y de P, S, Ca, Mg, B, Cu y Zn más bajas que los VL/CC. Estas variaciones en la composición mineral foliar de la variedad injertada, dependiendo del portainjerto son habituales en cítricos (Ahmed y Al-Shurafa, 1984) y podrían estar relacionadas con la morfología de las raíces. El sistema radicular de CM explora mejor los estratos profundos, mientras que el de CC se desarrolla en superficie (Bitters, 1986). Esto sugiere que CM pueda ser más eficiente en la captación de nutrientes que tienden a lixiviarse, como el N; mientras que CC absorbe mejor los nutrientes de la capa superficial, como el P. Sin embargo, la absorción de algunos nutrientes depende de la afinidad específica que tenga por ellos la raíz y no tanto de su estructura. Es el caso del K, Ca y B cuya concentración foliar también varía frecuentemente en cítricos en función del portainjerto (Smith, 1975).

Los resultados obtenidos indican que la tetraploidía, en éste estudio favorece el mantenimiento de concentraciones foliares de K altas, mientras que la diploidía se asoció a concentraciones más bajas; también se observó que CM promueve niveles foliares de K más altos que CC. Esto podría ser debido a la diferente afinidad de las raíces para facilitar su absorción. Las variaciones en la concentración foliar de K asociadas a la tetraploidía se han descrito en algunos trabajos (Mouat y Anderson, 1973; Shafieizargar et al., 2013). Recientemente se ha descrito que la ploidía de las raíces determina en gran medida la concentración foliar de K en *Arabidopsis thaliana* Heynh. y que la tetraploidía induce concentraciones foliares más elevadas que las del 2x. (Chao et al., 2013). Además de tener una concentración de K elevada, los árboles sobre CM y portainjerto 4x, tuvieron relaciones  $K/(Ca+Mg)$  más altas que sobre CC y portainjerto 2x. Este dato sugiere que la capacidad de mantener concentraciones de K más altas contribuye a mantener un balance entre cationes antagonistas más equilibrado, en las condiciones desfavorables que impone el suelo calcáreo de la parcela experimental, favoreciendo la nutrición equilibrada (Shear et al., 1948).

Si consideramos por separado las relaciones K/Mg y K/Ca, se observa que son más altas en VL/CM que en VL/CC y en árboles 4x que en 2x.

Esta observación indica que el catión que está actuando como principal antagonista del K es el Mg, como se ha descrito ampliamente (Weir, 1969; Pathak y Kalra, 1971). La tetraploidía no modifica la relación K/Mg en CC, pero en CM la duplica.

La relación K/Ca, similar entre portainjertos 2x, aumentó en los árboles con portainjerto 4x, probablemente debido a que la tetraploidía aumenta el K a la vez que desciende el Ca foliar. Los estudios sobre el efecto de la tetraploidía en la composición mineral foliar son escasos, pero varios autores coinciden en señalar éste efecto (Mouat and Anderson, 1973; Chao et al., 2013).

En relación con el B foliar, la concentración en VL/CC fue un 80% superior a la encontrada en VL/CM, debido a la capacidad de exclusión tan diferente que tienen éstos portainjertos; CM es uno de los portainjertos más tolerantes al exceso de B en el suelo, mientras que CC es uno de los más sensibles (Grattan et al., 2015). Estas diferencias probablemente estén justificadas por propiedades específicas de la raíz de cada portainjerto, aunque la capacidad del portainjerto de proveer una nutrición adecuada también podría influir en el impacto del exceso de B sobre la variedad. Algunos estudios señalan que las deficiencias de N y de K aumentan la sensibilidad del cultivo a la salinidad del suelo y al exceso de B (Shear et al., 1948; Pathak y Wallace y Bear, 1949; Cooper, 1961; Kalra, 1971; Grattan et al., 2015) y que su absorción y toxicidad aumentan cuando existe deficiencia en algún nutriente o desequilibrio en el balance de Ca, Mg y K (Wallace y Bear, 1949). Estas características nutricionales, que en nuestro estudio se encontraron más favorables en VL/CM que en VL/CC, podrían ser un factor que contribuyera a la mayor tolerancia de CM al exceso de B en el suelo.

En el caso del CC, la tetraploidía redujo en un 20% la acumulación de B en la variedad injertada. No hay estudios que relacionen la tetraploidía con la menor absorción de B en cítricos y son muy escasos en otras especies (Jones et al., 1995). Este hallazgo sugiere que la tetraploidía del portainjerto contribuye a mejorar la tolerancia en cítricos al exceso de B en el suelo. La capacidad del portainjerto de reducir el transporte a la variedad injertada es el principal mecanismo de tolerancia al exceso de B en cítricos.

Para contrastar ésta hipótesis e identificar sus determinantes morfológicos, fisiológicos y moleculares, se plantearon los experimentos presentados en el capítulo IV.

En relación con el tamaño de los árboles y su productividad, nuestro estudio coincide con datos previos (Bitters, 1986) indicando que CM es un portainjerto que induce mayor vigor y una entrada en producción más temprana que CC. También corrobora que la tetraploidía del portainjerto determina una altura menor del árbol (Lee, 1990; Grosser y Gmitter, 2011), aunque desvela que el efecto reductor del tamaño de copa puede darse o no en función del portainjerto considerado. En nuestro estudio, el volumen de copa de VL/4xCC fue un 42% inferior al 2x, mientras que en VL/CM no hubo diferencias entre ploidías.

Por otro lado, la producción fue un 20% inferior en árboles 4x que en los 2x, tanto de VL/CC, como de VL/CM, pero no se observaron diferencias en la eficiencia productiva. Estos datos sugieren que podría mejorarse el rendimiento de las plantaciones cítricas utilizando CC4x y reduciendo el marco de plantación, como proponen algunos estudios con otros portainjertos (Grosser y Gmitter, 2011). Sin embargo, no se observó una reducción del tamaño de copa en CM4x como sería esperable. Estos datos coinciden con estudios previos (Lee, 1994), en los que se sugiere que el efecto de la tetraploidía en la fisiología de los árboles es dependiente de la especie considerada. No obstante, la plantación se encuentra en desarrollo y para disponer de datos concluyentes habrá que realizar medidas cuando alcance un estado maduro. Por otro lado, dado que el estudio se realiza en una única localización, no es posible valorar la interacción de la tetraploidía con las condiciones ambientales.

El tamaño de los frutos producidos en árboles VL/CM fue un 28% mayor que la de los árboles VL/CC. Esto podría estar relacionado con el estado nutricional más equilibrado que se observó en VL/CM, pero habría que esperar a que los árboles VL/CC alcancen una producción comparable a la observada en VL/CM para poder realizar una comparación concluyente. La ploidía, sin embargo, no modificó la calidad del fruto, como señalan otros estudios (Schwartz, 2001a; Hussain et al., 2012a).

En conclusión, el suelo calizo y con exceso de B en el que se llevó a cabo éste estudio, pudo promover el desequilibrio de algunos nutrientes en los árboles.

En éste contexto, CM tuvo una nutrición más equilibrada, un crecimiento más vigoroso, una entrada en producción más temprana y frutos de mayor tamaño que CC. En CC la tetraploidía contribuyó a mejorar la tolerancia al exceso de B en el suelo y determinó una reducción considerable del tamaño de la copa, efectos que no se observaron en CM. Este resultado indica que las modificaciones inducidas por la tetraploidía son variables en función del genotipo, aunque no puede descartarse que intervenga algún efecto ambiental. Los resultados obtenidos en CC sugieren que las variantes 4x pueden ser de utilidad para mejorar el cultivo en cítricos en algunas condiciones puntuales.



## 5. Información suplementaria

**Tabla 1.S1** Composición y características del suelo de la parcela experimental.

Nitrógeno ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	1183	Zinc ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	1.47
Fósforo ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )*	52.6	Boro ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	0.56
Calcio ( $\text{meq}\cdot\text{g}^{-1}$ )*	12.3	Carbono/Nitrógeno	8
Magnesio ( $\text{meq}\cdot\text{g}^{-1}$ )*	4.04	Calcio/Sodio	8.3
Potasio ( $\text{meq}\cdot\text{g}^{-1}$ )*	1.88	Caliza activa (%)	6.36
Sodio ( $\text{meq}\cdot\text{g}^{-1}$ )*	1.48	Carbonato cálcico (%)	32.7
Hierro ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	5.6	Materia orgánica (%)	1.63
Manganeso ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	5.63	Ph	8.54
Cobre ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	2.08	Tex. USDA	Franco-arcillosa

\*Fracción disponible

**Tabla 1.S2** Calidad del agua de riego empleada en la parcela experimental.

	Origen del agua		Restricción
	Trasvase Tajo-Segura (ATS)	Local (AL)	
<sup>1</sup> CE ( $\text{dS}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	0.69	3.5	> 0.7
<sup>2</sup> SAR	0.78	3.8	> 3
Sodio ( $\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1.32	13.7	> 3
Cloruro ( $\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0.97	12.9	> 4
Boro ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0.05	0.7	> 0.7
Nitratos ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	7.29	25	> 5
Hierro ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0.05	2.2	-
Potasio ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1.68	32.8	-

<sup>1</sup>conductividad eléctrica; <sup>2</sup>relación de absorción de sodio.

**Tabla 1.S3** Valores medios y su error estándar de las concentraciones foliares de **A)** macronutrientes ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  PS) y **B)** micronutrientes (ppm) en los árboles de naranjo ‘Valencia’ late injertados sobre citrange Carrizo (CC) o *C. macrophylla* (CM) diploides (2x) y tetraploides (4x).

(A)	Pl.	A.	N	P	S	K	Mg	Ca	
CC	2x	3°	23.8 ± 1.00	1.9 ± 0.24	2.6 ± 0.31	10.4 ± 1.76	3.9 ± 0.08	46.6 ± 2.20	
		4°	17.3 ± 0.09	1.5 ± 0.15	2.9 ± 0.18	6.0 ± 0.35	4.5 ± 0.07	43.6 ± 1.03	
		5°	16.7 ± 0.52	1.3 ± 0.07	3.5 ± 0.24	5.0 ± 0.67	5.0 ± 0.30	54.5 ± 0.76	
	4x	3°	24.9 ± 0.31	1.9 ± 0.14	2.4 ± 0.16	9.8 ± 0.50	3.7 ± 0.18	30.9 ± 1.31	
		4°	17.6 ± 0.12	1.2 ± 0.07	1.8 ± 0.09	9.3 ± 0.12	3.8 ± 0.07	30.7 ± 0.79	
		5°	18.5 ± 1.18	1.6 ± 0.15	3.3 ± 0.04	7.7 ± 0.55	4.3 ± 0.12	43.4 ± 3.43	
	CM	2x	3°	24.5 ± 0.77	0.8 ± 0.09	2.1 ± 0.23	9.1 ± 1.49	1.9 ± 0.16	37.8 ± 4.46
			4°	19.1 ± 0.64	0.7 ± 0.02	0.9 ± 0.05	6.9 ± 0.47	2.8 ± 0.08	35.6 ± 0.32
			5°	20.8 ± 1.03	0.8 ± 0.02	3.1 ± 0.11	6.2 ± 0.41	3.7 ± 0.38	45.6 ± 1.66
4x		3°	24.2 ± 0.37	1.0 ± 0.04	2.2 ± 0.15	13.8 ± 1.91	1.6 ± 0.11	28.5 ± 1.40	
		4°	18.8 ± 0.12	0.8 ± 0.03	0.9 ± 0.03	10.6 ± 0.69	1.9 ± 0.04	27.6 ± 0.90	
		5°	20.4 ± 0.51	0.9 ± 0.03	2.6 ± 0.16	8.8 ± 0.36	3.0 ± 0.14	34.1 ± 1.13	

(B)	Pl.	A.	B	Cu	Mn	Zn	Fe
CC	2x	3°	211.2 ± 31.41	6.0 ± 0.15	13.3 ± 1.44	2.1 ± 1.20	45.5 ± 2.10
		4°	273.0 ± 15.14	7.7 ± 0.21	18.3 ± 0.60	0.8 ± 0.44	43.0 ± 1.42
		5°	281.3 ± 22.26	11.7 ± 0.33	13.0 ± 0.00	1.7 ± 1.00	92.7 ± 17.94
	4x	3°	144.1 ± 11.42	7.1 ± 0.46	12.5 ± 0.47	1.4 ± 0.80	54.1 ± 2.34
		4°	210.3 ± 7.54	8.9 ± 0.27	11.4 ± 0.86	0.7 ± 0.42	51.5 ± 6.11
		5°	235.0 ± 1.00	13.7 ± 1.76	10.7 ± 0.33	3.2 ± 1.86	77.7 ± 11.86
CM	2x	3°	107.5 ± 4.34	4.5 ± 0.32	29.3 ± 4.61	2.7 ± 1.57	72.6 ± 6.51
		4°	126.0 ± 3.61	4.1 ± 0.10	36.8 ± 5.14	0.4 ± 0.23	57.9 ± 6.21
		5°	99.7 ± 1.86	5.0 ± 0.58	41.3 ± 6.23	0.6 ± 0.33	64.3 ± 2.60
	4x	3°	123.6 ± 9.38	4.6 ± 0.22	23.6 ± 1.13	1.7 ± 0.98	74.7 ± 3.13
		4°	161.0 ± 2.52	4.7 ± 0.17	30.4 ± 1.76	1.5 ± 0.84	57.9 ± 6.43
		5°	125.0 ± 3.00	6.0 ± 0.58	42.7 ± 6.12	0.6 ± 0.33	72.7 ± 3.84



# Efecto de la salinidad en los genotipos 2x y 4x de *Citrus macrophylla* Wester<sup>1</sup>.

### 1. Introducción

Los cítricos se cultivan en clima semiárido, donde muchos suelos tienen el inconveniente de ser salinos o reúnen condiciones favorables a la salinización (véase apartado I-4.2). La salinidad del suelo ocasiona la reducción del crecimiento y altera el funcionamiento fisiológico normal de los cítricos (Maas, 1993; Gómez-Cadenas et al., 2003; Syvertsen y García-Sánchez, 2014), aunque se han encontrado diferencias en el grado de tolerancia entre las especies de cítricos y los géneros afines (Maas, 1993).

Los efectos del estrés salino están causados, en parte, por la alteración de las relaciones hídricas. La disminución del potencial osmótico de la solución del suelo afecta al intercambio de gases de la planta, ya que reduce su potencial hídrico ( $\psi_s$ ) y con ello la conductancia estomática ( $g_s$ ), la tasa de transpiración ( $E$ ) y la tasa de asimilación ( $A_{CO_2}$ ) de las hojas (Walker y Douglas, 1983; Behboudian et al., 1986; Lloyd et al., 1987a; Lloyd et al., 1990; Bañuls y Primo-Millo, 1992; García-Legaz et al., 1993; Bañuls y Primo-Millo, 1995; Bañuls et al., 1997; García-Sánchez et al., 2002a).

---

<sup>1</sup>El contenido de éste capítulo se ha publicado en el siguiente artículo:

Ruiz, M., Quiñones, A., Martínez-Alcántara, B., Aleza, P., Morillon, R., Navarro, L., Primo-Millo, E., Martínez-Cuenca, M. R., 2016. **Effects of salinity on diploid (2x) and doubled diploid (4x) *Citrus macrophylla* genotypes.** *Scientia Horticulturae* 207:33-40.

Por otro lado, la concentración excesiva en las hojas de los iones salinos absorbidos ocasiona toxicidad específica y desequilibrios nutricionales (Walker y Douglas, 1983; Grieve y Walker, 1983; Walker et al., 1983; Walker et al., 1983; Behboudian et al., 1986; Bañuls et al., 1990; Romero-Aranda et al., 1998). La absorción de iones salinos por las raíces y su transporte a la parte aérea son procesos controlados por el portainjerto que determina, en gran medida, el grado de acumulación de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) en las hojas (Walker et al., 1983; Walker y Douglas, 1983; Lloyd et al., 1987b; Lloyd et al., 1990; Bañuls et al., 1990; García-Legaz et al., 1993; Bañuls y Primo-Millo, 1995; Bañuls et al., 1997; García-Sánchez et al., 2002a; García-Sánchez et al., 2006; Forner-Giner et al., 2009). En cítricos, el ión cuya acumulación es mayoritariamente responsable del daño es el  $\text{Cl}^-$  (Bañuls y Primo-Millo, 1992; Hussain et al., 2012b), por lo que el grado de tolerancia a la salinidad proporcionada por un portainjerto se establece en función de su capacidad de excluir  $\text{Cl}^-$  para mantener reducida su concentración en la parte aérea (Ream y Furr, 1976; Walker et al., 1982; Walker et al., 1983; Walker y Douglas, 1983; Bañuls et al., 1990; Bañuls y Primo-Millo, 1995; Bañuls et al., 1997; Romero-Aranda et al., 1998).

Las plantas autotetraploides (4x) difieren de sus ancestros 2x únicamente por contener un número duplicado de cromosomas somáticos, aunque pueden considerarse clones de sus respectivos genotipos 2x, por ser su composición génica idéntica. En cítricos se han identificado diferencias fenotípicas entre las plantas 2x y sus correspondientes 4x (Cameron y Frost, 1968; Barrett y Hutchison, 1978; Romero-Aranda et al., 1997; Allario et al., 2011). Entre ellas, se ha propuesto que las raíces de las plantas 4x, más gruesas y cortas, podrían modificar la capacidad de absorción de iones (Syvertsen y García-Sánchez, 2014). Se ha descrito que puedan retrasar la intoxicación salina por favorecer una acumulación menor en la parte aérea (Saleh et al., 2008). Este comportamiento, plantea la posibilidad de utilizar genotipos 4x como portainjertos para mejorar la tolerancia a la salinidad del cultivo, ya que otras características de interés atribuidas al genotipo 2x no se modifican con la tetraploidía (Lee, 1990).

El objetivo de éste trabajo fue estudiar el comportamiento de plantas 2x y 4x de *Citrus macrophylla* Wester (CM), cultivadas en condiciones de estrés salino, para determinar si la tetraploidía mejora la respuesta al estrés salino inducido por NaCl y cuáles son los mecanismos fisiológicos que diferencian a las plantas 2x de las 4x en su respuesta a este estrés.

El objetivo último fue determinar si la utilización como portainjerto de CM4x podría mejorar la tolerancia de los árboles a la salinidad respecto a CM2x. Se eligió esta especie porque actualmente es el portainjerto utilizado en el 23% de las nuevas plantaciones (Navarro, 2015) y proporciona tolerancia a la salinidad del suelo, permitiendo el cultivo de cítricos en zonas afectadas por esta condición (García-Legaz et al., 1993; Fernandez-Ballester et al., 2003). Para ello se realizaron dos experimentos. En el primero las plantas se sometieron a concentraciones moderadas de NaCl y se evaluó el efecto del tratamiento en la concentración de iones en los órganos, las relaciones hídricas, el intercambio de gases y el crecimiento de las plantas. En el segundo experimento se aplicó una concentración salina alta para evaluar el daño en las hojas causado por la acumulación de iones.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Material vegetal**

Se utilizaron plantas 2x y 4x de *C. macrophylla* (CM) obtenidas por germinación de semillas procedentes de árboles del banco de germoplasma de plantas libres de patógenos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (Navarro, 2015; Navarro et al., 2002).

### **2.2. Comprobación del nivel de ploidía**

La ploidía de las plantas se comprobó mediante citometría de flujo, utilizando una muestra de tejido foliar de 0.5 mm<sup>2</sup> aproximadamente, junto con una muestra similar de plantas control 2x o 4x (Aleza et al., 2009). En una placa Petri, se depositó la muestra y una gota de la solución de aislamiento de núcleos (High Resolution DNA Kit Type P, solution A; Partec). Con ayuda de una cuchilla, se troceó la muestra finamente y se filtró para separar los núcleos a través de una malla de nylon de 30 µm. El tampón de aislamiento filtrado se recogió en un tubo nuevo y se añadió la solución de DAPI (4',6-diamine-2-phenylindol) (High-Resolution DNA Kit Type P, solution B; Partec) para teñir los núcleos. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras se introdujeron en el citómetro de flujo Ploidy Analyzer (PA; Partec), equipado con una bombilla de mercurio de alta presión HBO 100-W y los filtros KG1 y BG38. Los histogramas se analizaron con el software dpac, v2.0 (Partec), que a partir de los picos obtenidos y su coeficiente de variación, determina el nivel de ploidía de las muestras.

## 2.3. Condiciones experimentales

Las semillas de CM 2x y 4x se germinaron en el invernadero, utilizando un sustrato previamente esterilizado, compuesto de turba, fibra de coco, arena y perlita (50:25:20:5) y con 1.38 g kg<sup>-1</sup> de superfosfato de cal. Los semilleros se regaron dos veces por semana con una solución nutritiva compuesta de 5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.4 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.6 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 20 μM Fe-EDDHA, 7.6 μM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.50 μM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 50 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.50 μM MoO<sub>3</sub> y 54 μM MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O y ajustada a pH 6.0 con 1 M KOH. Las concentraciones de Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> en la solución de riego fueron de 3.8 mM y 2.4 mM, respectivamente. Se aplicó la solución de riego diluida 1:1 con agua desionizada durante las primeras 8 semanas. Tras este periodo, se seleccionaron las plantas por su uniformidad y se trasplantaron a macetas de plástico de 0.5 L con sustrato compuesto por turba, fibra de coco, arena y perlita (40:25:25:10). Las plantas se regaron con la solución nutritiva descrita durante dos semanas y tras este periodo se sometieron a los experimentos que se describen a continuación. Durante todo el proceso, las plantas se cultivaron en un invernadero equipado con luz suplementaria PAR de PPDF 250 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> suministrada para alargar el fotoperiodo a 16 h de luz. El rango de temperaturas osciló entre 16° y 18° C durante la noche y entre 26° y 28° C durante el día y la humedad relativa se mantuvo aproximadamente al 80%. Cada maceta se regó dos veces por semana durante los 30 días de duración de los tratamientos con 300 mL de la solución para favorecer el drenaje y evitar la acumulación de sales en el sustrato.

### 2.3.1. Experimento I: salinidad moderada

Se seleccionaron 24 plantas homogéneas de cada ploidía, que se distribuyeron al azar en el área destinada al experimento. Una fila adicional de plantas no sometidas al experimento se colocó rodeando las anteriores para favorecer la homogeneidad de las condiciones. Las plantas de cada ploidía se separaron en dos grupos y se regaron con la solución nutritiva descrita, suplementada con 40 mM NaCl (+S) o sin modificar (Ct), respectivamente para cada tratamiento. Seis plantas de cada tratamiento y ploidía se destinaron al análisis mineral y otras seis se utilizaron para medir el intercambio de gases (conductancia estomática, *g<sub>s</sub>*; transpiración, *E*; asimilación neta, *A<sub>CO<sub>2</sub></sub>*; y concentración sub-estomática de CO<sub>2</sub>, *C<sub>i</sub>*), los componentes del potencial hídrico y el crecimiento en peso seco.

### 2.3.2. Experimento II: salinidad elevada

Se seleccionaron 12 plantas homogéneas de cada ploidía, que se distribuyeron al azar en el área destinada al experimento.



Una fila adicional de plantas no sometidas al experimento se colocó rodeando las anteriores para favorecer la homogeneidad de las condiciones. Las plantas de cada ploidía se separaron en dos grupos y se regaron con la solución nutritiva descrita, suplementada con 80 mM NaCl (+HS) o sin modificar (Ct), respectivamente para cada tratamiento. Seis plantas de cada tratamiento y ploidía se utilizaron para tomar las medidas de verdor foliar y posteriormente se destinaron al análisis mineral.

#### 2.4. Análisis de iones

Tras la aplicación de los tratamientos, las plantas se sacaron de la maceta y se lavaron con agua desionizada. Se separaron las hojas, raíces y tallos y se pesaron en fresco individualmente. Los órganos se secaron en una estufa a 70 °C durante 48 h, hasta alcanzar un peso seco (PS) constante. Para determinar la concentración de iones de cada órgano, las muestras secas se molieron por separado en un molino de bolas y se almacenaron a temperatura ambiente. La concentración de  $\text{Cl}^-$  se determinó mediante titulación con iones plata en un cloridómetro Corning 926 (Corning, Inc. NY) según describe (Gilliam, 1971). Las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se midieron en muestras de 0.5 g de PS, que se incubaron previamente con 10 mL de  $\text{HNO}_3$  durante 12 h y se digirieron a 120 °C. Tras atemperarse, se trataron a 220 °C con 2.0 mL de  $\text{HClO}_4$  al 70% hasta cesar la emisión de humos. Las digestiones se enrasaron con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 25 mL (Campbell y Plank, 1998). Se determinó en ellas el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) en un equipo iCAP 6000 (Thermo Scientific).

#### 2.5. Tasas de absorción y transporte de $\text{Cl}^-$ , $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$

La tasa de absorción neta ( $A_n$ ,  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS raíz día}^{-1}$ ) se calculó a partir del  $B_T$  acumulado en las plantas, utilizando la ecuación de Pitman (1976):

$$A_n = \left[ \frac{\ln R_{30} - \ln R_0}{R_{30} R_0} \right] \times \left[ \frac{C_{T_{30}} - C_{T_0}}{t_{30} - t_0} \right]$$

Donde R es el PS de la raíz y  $C_T$  es el contenido total del ión en la planta completa, al inicio del tratamiento ( $t_0$ ) y al final ( $t_{30}$ ).

La tasa de transporte neto ( $T_n$ ,  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PS raíz día}^{-1}$ ), que cuantifica la translocación del elemento, se calculó según la ecuación siguiente:

$$T_n = \left[ \frac{\ln R_{30} \ln R_0}{R_{30} R_0} \right] \times \left[ \frac{C_{A30} C_{A0}}{t_{30} t_0} \right]$$

Donde R es el PS de la raíz y  $C_T$  es el contenido total del ión en la parte aérea, al inicio del tratamiento ( $t_0$ ) y al final ( $t_{30}$ ).

## 2.6. Componentes del potencial hídrico de las hojas

El potencial hídrico de las hojas ( $\psi_s$ ) se midió con una cámara de presión de Scholander (Soilmoisture Equipment Corp. Santa Barbara, CA, USA), equipada con lupa para observar el punto de compensación (Scholander et al., 1965). Las medidas se tomaron en dos hojas de cada planta, que se escindieron a las 10:30 am y se envasaron inmediatamente en una bolsa de plástico. El potencial osmótico ( $\psi_\pi$ ) se midió con un osmómetro (Wescor, USA) utilizando hojas que se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de ser arrancadas y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  envasadas en aluminio. Para extraer la savia, las hojas se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL agujereado en su base y colocado sobre otro tubo similar a modo de recipiente colector. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min siguiendo el método modificado de Callister et al. (2006). A partir de la concentración de osmolitos ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) obtenida se calculó el  $\psi_\pi$  mediante la ecuación de Van't Hoff:

$$\psi_\pi \text{ (MPa)} = \frac{c \cdot R \cdot T}{1000}$$

Donde c es la concentración molar de la solución ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), R es la constante  $8.314 \text{ kPa} \cdot \text{L} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  y T es la temperatura (K).

El potencial de turgencia ( $\psi_p$ ) de las hojas en el instante que fueron arrancadas se calculó como la diferencia entre el  $\psi_\pi$  y el  $\psi_s$  medidos en dos hojas adyacentes del tallo de las plantas.

## 2.7. Medida del intercambio de gases

La conductancia estomática ( $g_s$ ), la tasa de fotosíntesis o asimilación neta de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{CO}_2}$ ), la tasa de transpiración ( $E$ ) de las hojas y la concentración sub-estomática de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) se midieron en el exterior del invernadero entre las 10:30 y las 11:30 am en días soleados, para facilitar la homogeneidad y estabilidad de las medidas. El registro se realizó con un analizador de gases mediante luz infrarroja LC-pro-SD (ADC Bioscientific Ltd, UK).

La hoja se iluminó con radiación fotosintéticamente activa, fijando la densidad de flujo de fotones a  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}$ , cifra que excede el valor de saturación para cítricos (Jifon y Syvertsen, 2003). Se registró el intercambio de gases cada 3 s, realizando 10 réplicas consecutivas en cada hoja. Las medidas se realizaron al final del periodo experimental, en dos hojas maduras de la porción media del tallo de cada planta. El valor medio por planta se consideró representativo para el análisis.

### **2.8. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de la varianza (ANOVA) y las medias se clasificaron utilizando el test de rango múltiple de Duncan para  $P \leq 0.05$ , con el software Statgraphics Plus, version 5.1 (Statistical Graphics, Englewood Cliffs). Las interacciones entre efectos principales fueron únicamente consideradas en el caso de que los efectos principales fueran significativos de manera independiente, en caso contrario no fueron incluidos en el modelo (ni).

## **3. Resultados**

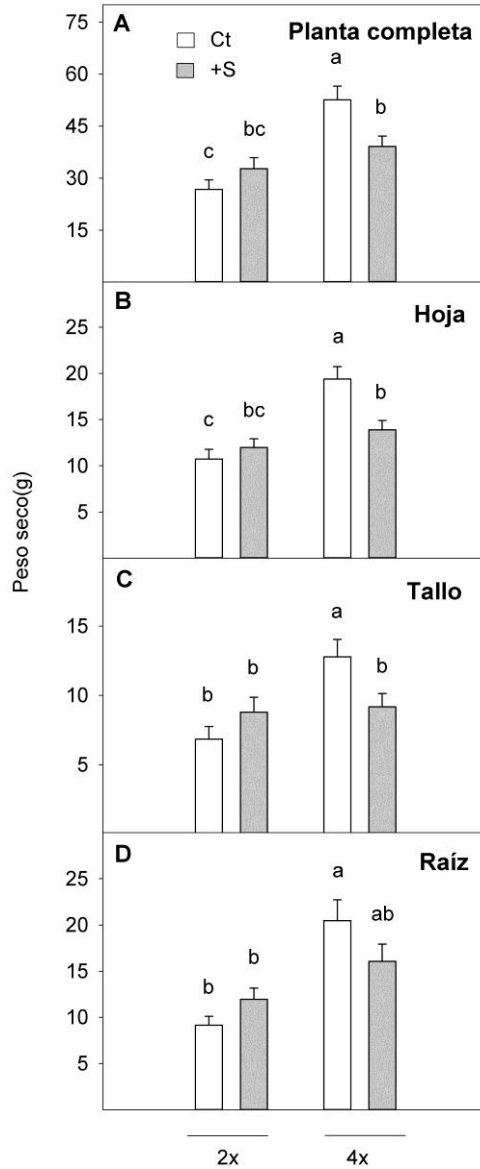
### **3.1. Experimento 1: salinidad moderada**

#### *3.1.1. Crecimiento de las plantas*

En la **Fig. 2.1** se muestra el peso seco (PS) de cada órgano (hojas, tallo y raíz) y de las plantas completas de CM 2x y 4x regadas con la solución nutritiva sin modificar (Ct) o con 40 mM NaCl (+S) durante 30 días. El PS total de las plantas 4xCt fue 1.96 veces mayor que el de las 2xCt, debido principalmente a la contribución de la parte aérea (hojas y tallo). El tratamiento salino no redujo el PS de las plantas 2x+S en comparación con el de las 2xCt, mientras que el PS de las plantas 4x+S fue un 25.6% menor que el de las 4xCt. Entre las plantas salinizadas 2x+S y 4x+S, no hubo diferencias en el PS.

#### *3.1.2. Concentración de iones*

Las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en las hojas, tallos y raíces aumentaron en ambos genotipos al aumentar la concentración salina de la solución de riego de 0 a 40 mM de NaCl (**Tabla 2.1**). En las plantas salinizadas (+S), las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en las hojas fueron, en ambos casos, en torno a 1.4 veces más altas en plantas 2x+S que en 4x+S.



**Figura 2.1.** Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl (+S) durante 30 días en el peso seco (g) de **A**) la planta completa, **B**) hojas, **C**) tallos y **D**) raíces de plantas de *C. macrophylla* diploides (2x) y tetraploides (4x). Ct: plantas control. Los valores son la media de seis plantas (n=6). Letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

Las plantas 2xCt tuvieron las concentraciones más altas de  $K^+$ , que fueron, tanto en las hojas como en las raíces, 1.9 y 2.1 veces, respectivamente mayores que en 4xCt (**Tabla 2.1**). La concentración de  $K^+$  se redujo en un 36.7% en las hojas de plantas 2x+S, comparadas con las de 2xCt; sin embargo, no se encontraron diferencias en la concentración de  $K^+$  entre las hojas de plantas 4x sometidas al tratamiento Ct y +S.

**Tabla 2.1** Concentración (mM en agua del tejido) de cloruro ( $Cl^-$ ), sodio ( $Na^+$ ) y potasio ( $K^+$ ) en las hojas, tallo y raíz de plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de *C. macrophylla* cultivadas en medio salino (+S) con 40 mM de NaCl o en medio control (Ct) durante 30 días.

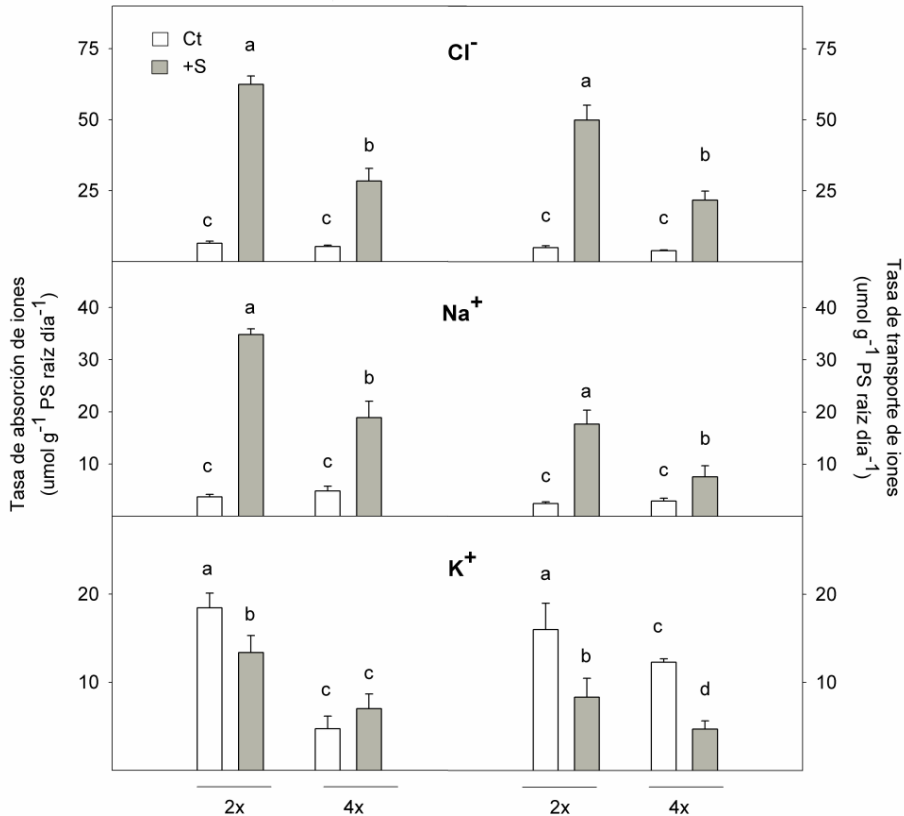
	2x		4x		ANOVA		
	Ct	+S	Ct	+S	T	P	TxP
<b>Hoja</b>							
$Cl^-$	37.8 c	127.0 a	29.6 d	89.1 b	*	*	ns
$Na^+$	83.2 c	154.4 a	82.3 c	107.9 b	*	ns	ni
$K^+$	574.7 a	363.7 b	302.9 b	317.6 b	ns	*	ni
<b>Tallo</b>							
$Cl^-$	43.5 c	173.9 a	35.0 d	133.0 b	*	*	ni
$Na^+$	10.4 c	104.7 a	11.9 c	78.0 b	*	*	ni
$K^+$	138.3 a	123.1 b	102.2 b	138.4 a	ns	*	ni
<b>Raíz</b>							
$Cl^-$	52.8 b	111.9 a	50.0 b	115.2 a	*	ns	ni
$Na^+$	33.1 c	162.9 a	71.3 b	183.3 a	*	ns	ni
$K^+$	81.4 a	59.2 b	38.0 c	47.4 b	ns	*	ni

Los valores son la media de seis plantas (n=6). Los efectos de la ploidía (P) y el tratamiento (T), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican: \* $P \leq 0.05$ ; ns, no significativo; ni, no incluido en el modelo. Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

### 3.1.3. Tasas de absorción y transporte de iones

Las plantas que no recibieron el tratamiento salino, mostraron tasas de absorción y transporte de  $Na^+$  y  $Cl^-$  similares (**Fig. 2.2A y 2.2B**). Con el tratamiento salino, aumentaron ambas tasas en las plantas ambas tasas, pero las 2x+S tuvieron una absorción y transporte de  $Cl^-$  2.2 y 2.3 veces, respectivamente, más altos que las plantas 4x+S (**Fig. 2.2A**).

De igual modo, los valores de  $\text{Na}^+$  para las mismas tasas fueron 1.8 y 2.3 veces, respectivamente, más altos que en las plantas 4x+S (**Fig. 2.2B**). Las plantas 2x, también mostraron tasas de absorción y transporte de  $\text{K}^+$  más elevadas (entre 2 y 4 veces) que las 4x, a pesar del tratamiento salino.



**Figura 2.2.** Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl (+S) durante 30 días en las tasas de absorción y transporte ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  PS raíz día $^{-1}$ ) de **A)**  $\text{Cl}^-$  **B)**  $\text{Na}^+$  y **C)**  $\text{K}^+$  de plantas de *C. macrophylla* diploides (2x) y tetraploides (4x). Ct: plantas control. Los valores son la media de seis plantas (n=6). Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan

Sin embargo, en plantas 2xCt hubo mayor absorción que en las 2x+S, mientras que las tasas no variaron entre plantas 4xCt y 4x+S. El transporte de  $\text{K}^+$ , a diferencia de su absorción, se redujo tanto en plantas 2x+S como en 4x+S respecto a sus correspondientes plantas control (**Fig. 2.2C**).

### 3.1.4. Potencial hídrico e intercambio de gases

El potencial hídrico de las hojas de plantas sometidas al tratamiento +S descendió en comparación con el de las plantas Ct y fue 1.6 veces menor en plantas 2x y 1.2 veces menor en plantas 4x. Sin embargo no hubo diferencias significativas entre las plantas 2x+S y las 4x+S (**Tabla 2**). El potencial osmótico ( $\psi_{\pi}$ ) fue menor en las plantas salinizadas que en las control, siendo las diferencias proporcionales a las anteriores. El  $\psi_{\pi}$  más reducido se encontró en las plantas 2x+S, mientras que el  $\psi_p$  fue similar entre plantas 2x+S y 4x+S (**Tabla 2.2**).

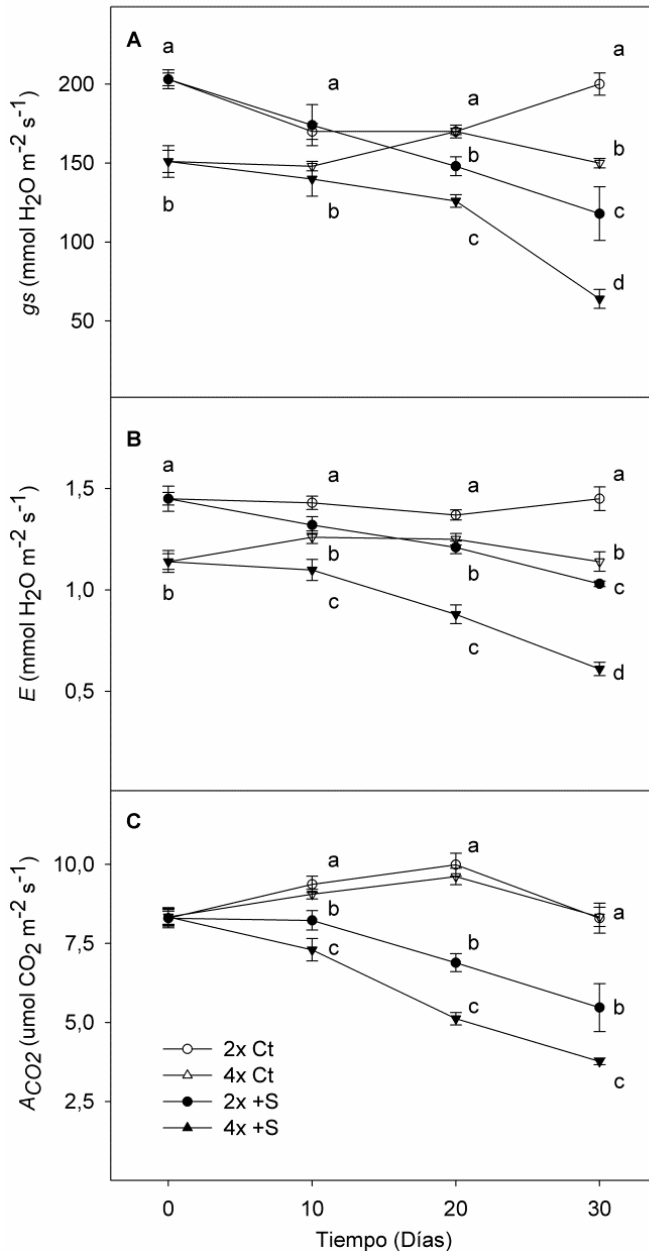
**Tabla 2.2** Potencial hídrico ( $\psi_s$ , MPa), potencial osmótico ( $\psi_{\pi}$ , MPa) y potencial de turgencia ( $\psi_p$ , MPa) en hojas de plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de *C. macrophylla* cultivadas en medio salino (+S) con 40 mM de NaCl o en medio control (Ct) durante 30 días.

	2x				4x			
	Ct		+S		Ct		+S	
$\psi_s$	- 0.98	a	-1.53	b	-1.13	a	-1.37	b
$\psi_{\pi}$	- 2.11	a	-3.18	c	- 2.17	a	-2.65	b
$\psi_p$	1.13	a	1.65	a	1.04	a	1.28	a

Los valores son la media de seis plantas (n=6). Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

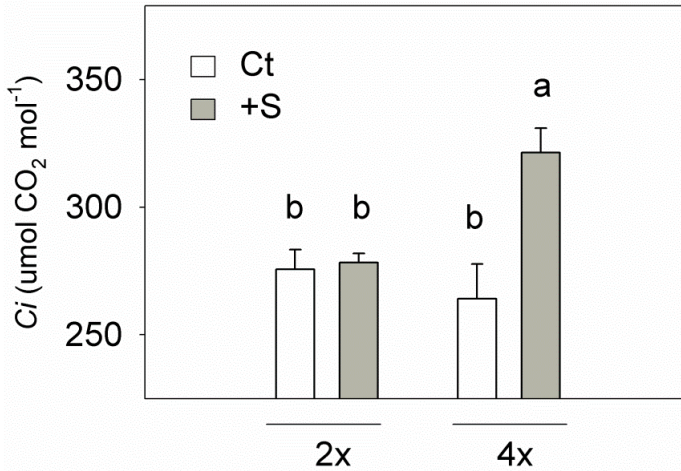
La conductancia estomática ( $g_s$ ) fue un 25.6% mayor en las hojas 2xCt que en las 4xCt (**Tabla 2.2**). El tratamiento salino redujo la  $g_s$  en un 41.9% en las hojas 2x, mientras que el descenso en las hojas 4x fue del 57.6% (**Fig. 2.3A**). Entre ploidías, la  $g_s$  fue 1.9 veces mayor en las hojas 2x+S que en las 4x+S. La transpiración ( $E$ ) fue proporcional a los valores de  $g_s$  y en 2xCt fue un 21.4% mayor que en 4xCt (**Fig. 2.3B**). En las plantas sometidas al tratamiento salino, se redujo un 29% en plantas 2x, mientras que el descenso en plantas 4x fue del 46.5% respecto a sus correspondientes plantas Ct. Entre ploidías, la  $E$  fue 1.7 veces más alta en 2x+S que en 4x+S. Sin embargo, la tasa de asimilación ( $A_{CO_2}$ ) fue similar entre las plantas Ct y también se redujo al aplicar el tratamiento +S (**Fig. 2.3C**).

El descenso fue menor en las plantas 2x que en las 4x, siendo un 34.1% menor y un 54.8% menor, respectivamente. Entre ploidías, la  $A_{CO_2}$  fue 1.5 veces mayor en plantas 2x+S que en las 4x+S. La  $C_i$  fue similar entre plantas 2xCt y 4xCt, mientras que el tratamiento +S aumentó éste parámetro en las plantas 4x en torno a un 20% y no lo modificó en las plantas 2x (**Fig. 2.4**).



**Figura 2.3** **A)** Conductancia estomática ( $g_s$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), **B)** transpiración ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y **C)** asimilación neta de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{CO}_2}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) medidas cada 10 días en hojas de plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de *C. macrophylla* cultivadas en medio salino (+S) con 40 mM de NaCl o en medio control (Ct) durante 30 días. Los valores son la media de 6 plantas ( $n=6$ ); letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  en el test de rango múltiple de Duncan.





**Figura 2.4** Efecto sobre la concentración sub-estomática de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) del tratamiento con un medio salino (+S) con 40 mM de NaCl o con un medio control (Ct) durante 30 días de plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de *C. macrophylla*. Los valores son la media de 6 plantas ( $n=6$ ); letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  en el test de rango múltiple de Duncan.

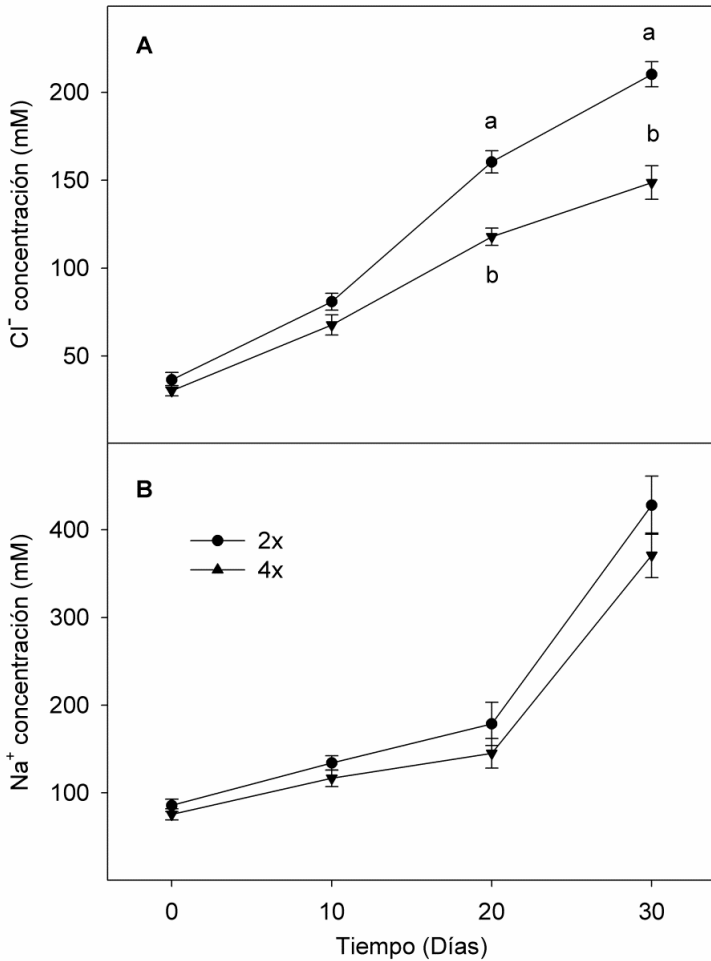
### 3.2.Experimento II: salinidad elevada

#### 3.2.1. Concentración de iones

Las plantas sometidas al tratamiento salino con NaCl 80 Mm (+HS) durante 30 días alcanzaron concentraciones foliares de  $\text{Cl}^-$  que fueron 1.4 veces más altas en plantas 2x+HS que en las 4x+HS (**Fig. 2.5A**). Estos resultados confirman que el genotipo 4x tiene una capacidad de exclusión de iones  $\text{Cl}^-$  mayor que el 2x. Sin embargo, en éstas condiciones de alta salinidad no se encontraron diferencias en la concentración foliar de  $\text{Na}^+$  entre las plantas salinizadas 2x y 4x (**Fig. 2.5B**). Este dato indica que la mayor capacidad de exclusión de  $\text{Na}^+$  en las plantas 4x no se mantiene cuando la salinidad del medio externo es elevada.

#### 3.2.2. Daño foliar

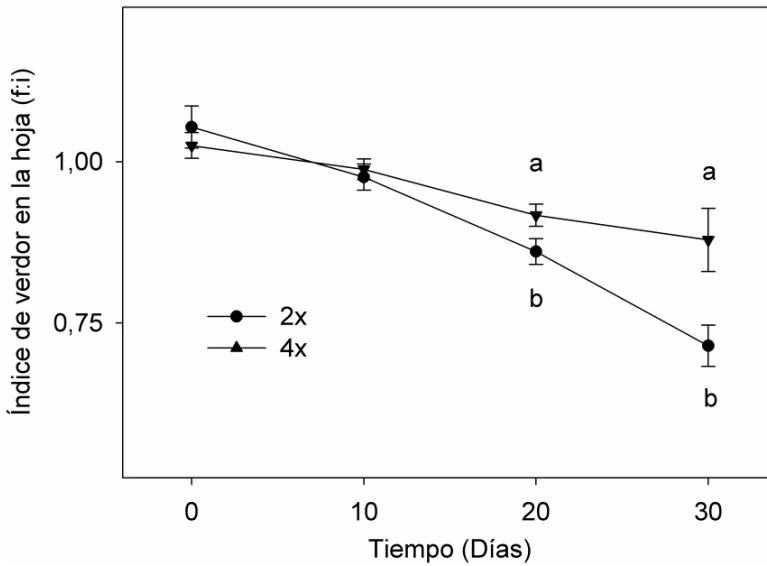
Las lecturas SPAD realizadas en las hojas, que miden su verdor y se correlacionan con la concentración de clorofilas se representan en la **Fig. 2.6** como la pérdida de verdor respecto al inicio del experimento (f:i).



**Figura 2.5** Concentración foliar de cloruro (Cl<sup>-</sup>) y sodio (Na<sup>+</sup>) en plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de *C. macrophylla* cultivadas en un medio con salinidad elevada (+HS; 80 mM de NaCl) o en un medio control (Ct) durante 30 días. Los valores son la media de 6 plantas (n=6); letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  en el test de rango múltiple de Duncan.

Transcurridos 30 días, los valores relativos fueron un 15% inferiores en las plantas 2x que en las 4x, indicando que la degradación de clorofilas debida al daño por toxicidad de los iones acumulados fue menor en las plantas 4x (**Fig. 2.6**).

Las hojas de las plantas 2x+HS mostraron síntomas de toxicidad ligeros como son la aparición de quemaduras incipientes en los márgenes y ápices foliares. Estos síntomas no se observaron en las plantas 4x+HS.



**Figura 2.6** Verdor foliar relativo (SPAD final/ inicial) medido en plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de *C. macrophylla* cultivadas en un medio con salinidad elevada (+HS; 80 mM de NaCl) durante 30 días. Los valores son la media de 6 plantas (n=6); letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  en el test de rango múltiple de Duncan.



## 4. Discusión

La salinidad del suelo ocasiona en las plantas dos alteraciones fundamentales: la toxicidad, debida a la acumulación de los iones salinos y la inhibición del crecimiento como consecuencia del efecto osmótico de las sales. Entre las adaptaciones desarrolladas por las plantas para hacer frente a éste estrés, destacan la exclusión de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y la tolerancia al estrés osmótico (Munns y Tester, 2008). Nuestros resultados muestran diferencias claras entre los genotipos 2x y 4x de CM en su capacidad de excluir los iones salinos de las hojas. En condiciones de salinidad moderada (+S), la concentración de  $\text{Cl}^-$  en las hojas fue más baja en las plantas 4x que en las 2x (**Tabla 2.1**), como consecuencia de la menor absorción y transporte del ión que manifestaron éstas plantas respecto a las 2x (**Fig. 2.2A**). Este efecto probablemente sea debido a la menor tasa de transpiración que manifiestan las plantas 4x respecto a las 2x (**Fig. 2.3B**), ya que varios estudios señalan que las tasas de absorción y transporte de  $\text{Cl}^-$  en cítricos están asociadas al uso de agua y a la tasa de transpiración respectivamente (Moya et al., 2003; Syvertsen et al., 2010). Este comportamiento se asemeja al descrito en el mandarino Cleopatra (*C. reshni* Hort. ex Tan.), considerado un portainjerto que confiere tolerancia a la salinidad (Maas, 1993). Cuando esta especie se cultiva en condiciones salinas, manifiesta una baja acumulación de  $\text{Cl}^-$  en la parte aérea, asociada a su tasa de transpiración reducida y la acumulación del ión se localiza preferentemente en el tejido de las raíces (Bañuls et al., 1997; Forner-Giner et al., 2009).

En condiciones salinas, las plantas de CM 4x+S también acumularon en las hojas concentraciones de  $\text{Na}^+$  menores que las 2x+S (**Tabla 2.1**), debido a su absorción y transporte reducidos (**Fig. 2.2B**). Sin embargo, ambos genotipos acumularon proporcionalmente más  $\text{Na}^+$  en las raíces que en las hojas (**Fig. 2.2C**), lo que sugiere que el mecanismo de exclusión de  $\text{Na}^+$  que mantiene baja la concentración en las hojas sea similar al descrito en *P. trifoliata*. En esta especie la acumulación de los iones  $\text{Na}^+$  se realiza, con más preferencia que en otros cítricos, en las raíces y la porción basal del tallo, manteniendo en las hojas concentraciones relativamente bajas (Walker, 1986). El mecanismo que permite ésta acumulación reside en las células parenquimáticas del xilema, que extraen  $\text{Na}^+$  del torrente xilemático para secuestrarlo en el tejido leñoso (Walker, 1986). No obstante, si fuera el caso, esta capacidad no parece modificarse por el nivel de ploidía en CM.

La concentración de  $\text{K}^+$  fue más alta en las hojas, tallos y raíces de las plantas 2xCt que en las 4xCt (**Tabla 2.1**).

El tratamiento salino redujo la concentración de  $K^+$  en todos los órganos de plantas 2x+S, pero este efecto no se observó en las 4x+S. Existen numerosos estudios que documentan el descenso de la concentración de  $K^+$  en los tejidos vegetales al aumentar la de  $Na^+$  (Grattan y Grieve, 1992). Esta reducción es consecuencia de la competición de estos dos iones por su absorción. En nuestro estudio, la tasa de absorción de  $K^+$  en plantas 2x+S se redujo con el tratamiento salino (**Fig. 2.3C**). Sin embargo la ausencia de éste comportamiento en las plantas 4x+S indica que la tetraploidía pudiera conferir una mayor selectividad del  $K^+$  sobre el  $Na^+$ . Coincidiendo con nuestras observaciones, en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn, se ha descrito recientemente que la tetraploidía confiere tolerancia a la salinidad, asociada al mantenimiento de concentraciones de  $K^+$  más elevadas y menor acumulación de  $Na^+$  en las hojas. Este estudio también indica que el órgano que determina esta capacidad es la raíz 4x (Chao et al., 2013).

Existe controversia en lo referente al comportamiento de los cítricos 4x frente a la salinidad, debido a la reciente publicación de varios estudios, cuyas conclusiones difieren (Syvertsen y García-Sánchez, 2014). En algunos portainjertos de cítricos (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf., citrange Carrizo (*C. sinensis* (L.) Osb. × *P. trifoliata*) y mandarino Cleopatra (*C. reshni* Hort. ex Tan.) las versiones 4x son más tolerantes a la salinidad que sus correspondientes 2x (Saleh et al., 2008). Sin embargo, en condiciones de salinidad elevada y abundante disponibilidad hídrica, los genotipos 4x de *P. trifoliata* y mandarino ‘Willowleaf’ (*C. deliciosa* Ten.) fueron menos tolerantes que los 2x, acumulando más  $Cl^-$  y resultando más afectados (Mouhaya et al., 2010). En otro estudio, que comparó híbridos somáticos alotetraploides con su parental 2x naranjo amargo (*C. aurantium* L.), las concentraciones de  $Na^+$  y  $Cl^-$  alcanzadas por éste último fueron más reducidas que en los híbridos (García-Sánchez et al., 2002b). Sin embargo, en la evaluación de híbridos alotetraploides cigóticos, procedentes del cruce de alotetraploides somáticos, e injertados con naranjo ‘Valencia’ (*C. sinensis*), se encontró que eran capaces de mantener las concentraciones iónicas foliares reducidas, evitar la aparición de síntomas y mantener el crecimiento más eficientemente que la mayoría de portainjertos 2x comparados (Grosser et al., 2012a).

En cuanto a las relaciones hídricas, de acuerdo con estudios anteriores (Walker et al., 1983; Lloyd et al., 1990; Perez-Perez et al., 2007), encontramos una reducción del potencial hídrico ( $\psi_s$ ) en las plantas sometidas a estrés salino, compensado por una reducción del potencial osmótico ( $\psi_\pi$ ).

Además la turgencia ( $\psi_p$ ) se mantuvo a valores similares o incluso más elevados que los que muestran las hojas en condiciones control (**Tabla 2.2**).

La reducción en  $\psi_\pi$  se atribuye a la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y por ello las hojas 2x alcanzaron valores menores que las 4x. Este mecanismo de ajuste osmótico, ampliamente descrito en cítricos, permite evitar la deshidratación (Perez-Perez et al., 2007).

Por otro lado, se ha descrito que el cierre estomático actúa limitando la translocación a las hojas de los iones tóxicos al reducirse la  $E$  (Syvertsen y García-Sánchez, 2014; Levy y Syvertsen, 2004). En nuestro experimento, la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la transpiración ( $E$ ) fueron menores en plantas 4x+S que en las 2x+S (**Fig. 2.3A y 2.3B**). Esto indica que, aunque las plantas 4x fueron capaces de limitar la acumulación foliar de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en mayor medida que las 2x, son más sensibles al cierre estomático impuesto por la salinidad. Basándonos en evidencias indirectas, pueden proponerse al menos dos explicaciones para este comportamiento.

Una posibilidad sería que el estrés salino afecte en mayor medida a las plantas 4x en la capacidad del tejido foliar para la difusión del  $\text{CO}_2$ , ocasionando la inhibición bioquímica de la fotosíntesis. Este fenómeno viene indicado por un aumento en la concentración sub-estomática de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) (Farquhar y Sharkey, 1982). En cítricos se ha documentado que, cuando la salinidad induce el cierre estomático, disminuyen conjuntamente la  $g_s$  y la  $A_{\text{CO}_2}$ , mientras que la  $C_i$  se mantiene o incluso aumenta en las plantas respecto a las control (García-Sánchez y Syvertsen, 2006). Estos comportamientos se observaron en las plantas 2x+S y 4x+S respectivamente (**Fig. 2.4**). El incremento en  $C_i$  registrado en éstas últimas podría contribuir a un cierre estomático más pronunciado, asociado con daños en la anatomía foliar y cambios en la fluorescencia de la clorofila que propiciarían una disfunción en la cadena de transporte de electrones (López-Climent et al., 2008), limitando la capacidad de asimilación del mesófilo (Farquhar y Sharkey, 1982).

Otra posibilidad es que la respuesta estomática entre de las plantas 4x se asocie a diferencias respecto al 2x en la capacidad para sintetizar ácido abscísico (ABA). Se ha documentado que los niveles de ABA aumentan en las raíces, la savia xilemática y en las hojas en condiciones de estrés salino, coincidiendo con el descenso en la  $g_s$  (Gómez-Cadenas et al., 1998). Este trabajo propone que la síntesis de ABA tiene lugar en las raíces y es transportado a las hojas, donde induce el cierre estomático.

La síntesis de ABA en las plantas 4x podría ser más abundante que en las 2x de manera constitutiva, tal y como se ha documentado en la lima Rangpur (*C. limonia* Osb.) (Allario et al., 2013). En éste estudio, se encontró una *gs* menor, asociada a contenidos más altos de ABA en las hojas de naranjo ‘Valencia’ injertado sobre lima Rangpur 4x (V/4xLR) respecto a las hojas de V/2xLR. En las raíces de plantas V/4xLR se encontró una síntesis constitutiva más alta de ABA que en las de V/2xLR, asociada con la sobreexpresión del gen *CsNCEDI*, clave en la regulación de la síntesis de ésta fitohormona.

Por otro lado, el cierre estomático inducido por estrés salino reduce necesariamente la tasa de asimilación neta ( $A_{CO_2}$ ) (Bañuls y Primo-Millo, 1995). En nuestro experimento, la  $A_{CO_2}$  fue más reducida en las plantas 4x+S que en las 2x+S, ocasionando la reducción del crecimiento que observamos en las plantas 4x+S (**Fig. 2.1**). El mesófilo foliar más grueso que caracteriza a los cítricos 4x, también puede incrementar la resistencia a la difusión de gases, reduciendo el intercambio respecto a genotipos 2x (Romero-Aranda et al., 1997). Los resultados de Syvertsen et al. (2000) respaldan que los cítricos 4x puedan tener menor  $A_{CO_2}$  que sus correspondientes 2x, incluso en condiciones de alto  $CO_2$ .

Además del estrés osmótico, que reduce el potencial hídrico y el crecimiento de las plantas, la salinidad ocasiona daños por toxicidad al acumularse en las hojas los iones absorbidos. Los daños se manifiestan como un descenso en el verdor y con la aparición de quemaduras. Los portainjertos de cítricos difieren en su capacidad para absorber  $Na^+$  y  $Cl^-$  y transportarlo a la parte aérea (Walker y Douglas, 1983; Lloyd et al., 1987b; Bañuls y Primo-Millo, 1995; Bañuls et al., 1997; García-Sánchez et al., 2002a; García-Sánchez et al., 2006) y la toxicidad en cítricos se debe principalmente a la acumulación de  $Cl^-$  en las hojas. Por ello, el principal mecanismo de tolerancia a la salinidad en cítricos es la restricción de la absorción y/o transporte a la parte aérea del ión  $Cl^-$  (Walker et al., 1982; Walker y Douglas, 1983; Walker et al., 1983; Hussain et al., 2012b). Dada la elevada tolerancia de CM a la salinidad, respecto a otras especies de cítricos (García-Legaz et al., 1993; Fernandez-Ballester et al., 2003), las condiciones del experimento I (40 mM NaCl durante 30 d) no fueron, aparentemente, suficientes para el desarrollo de síntomas de toxicidad.

En otro experimento, realizado con citrange Carrizo 2x cultivado en condiciones similares, las plantas acumularon 1.85 veces más  $Cl^-$  en las hojas que CM2x, alcanzándose concentraciones de 235.7 mM en agua del tejido en CC2x (Resultados no presentados), frente a 127.0 mM en CM2x.



En éste estudio, las plantas de CC sufrieron daños foliares severos y defoliación (véase capítulo III), lo que corrobora la mayor tolerancia de CM en éstas condiciones respecto a otras especies menos tolerantes (Maas, 1993). Para evaluar la tolerancia a la toxicidad de los iones de CM4x respecto a CM2x, se aplicó una concentración alta de NaCl (80 mM) en la solución nutritiva del experimento II. Estas condiciones confirmaron la mayor capacidad de exclusión de  $\text{Cl}^-$  del genotipo 4x respecto al 2x (**Fig. 2.5A**), sin embargo no se detectaron diferencias en la concentración foliar de  $\text{Na}^+$  (**Fig. 2.5B**), probablemente porque el mecanismo de exclusión de éste ión solamente opera a concentraciones bajas o moderadas (Walker, 1986). El descenso en el verdor foliar, debido a la degradación de clorofilas, es un indicador temprano de daño foliar por toxicidad (Lloyd et al., 1987a; García-Sánchez et al., 2002a). Las plantas 2x+HS sufrieron un descenso del verdor foliar más acusado que las 4x+HS (**Fig. 2.6**) y quemaduras incipientes, debido a su concentración de  $\text{Cl}^-$  más elevada.

Con éstos resultados, podemos concluir que *C. macrophylla* diploide parece tolerar mejor que su versión tetraploide el efecto osmótico inducido por la salinidad moderada, ya que no sufrió reducción del crecimiento. Sin embargo, *C. macrophylla* tetraploide es más tolerante al componente tóxico impuesto por la salinidad, por presentar una capacidad mayor que el genotipo diploide de excluir el  $\text{Cl}^-$ , manteniendo concentraciones bajas en las hojas y retrasando así el daño del tejido. Este efecto podría estar asociado a su menor tasa de transpiración, que limita la absorción de  $\text{Cl}^-$  y su transporte a la parte aérea.



# La tetraploidía mejora la exclusión de cloruro en citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)<sup>2</sup>

### 1. Introducción

Los cítricos se cultivan en zonas de clima semi-árido, donde requieren riego por ser las precipitaciones escasas y de distribución irregular. En estas zonas, muchos suelos son salinos o reúnen condiciones favorables a la salinización (véase apartado I-4.2).

El exceso de cloruro sódico (NaCl) en el entorno de las raíces, ocasiona en los cítricos la reducción del crecimiento y altera el funcionamiento fisiológico normal (Maas, 1993; Gómez-Cadenas et al., 2003; Syvertsen y García-Sánchez, 2014), aunque se han encontrado diferencias en el grado de tolerancia entre las diferentes especies de cítricos y sus géneros afines (Maas, 1993). Su respuesta a la salinidad parece depender de dos propiedades de la solución salina: las respuestas iniciales (Fase I) se atribuyen a un efecto de déficit hídrico, desencadenado por el descenso del potencial hídrico de la solución del suelo al aumentar su potencial osmótico por la presencia de las sales. El conjunto de respuestas que se manifiestan posteriormente (Fase II), se relacionan con la acumulación de los iones salinos en las hojas (Munns y Tester, 2008).

---

<sup>2</sup>El contenido de éste capítulo se ha publicado en el siguiente artículo:

Ruiz, M., Quiñones, A., Martínez-Cuenca, M. R., Aleza, P., Morillon, R., Navarro, L., Primo-Millo, E., Martínez-Alcántara, B. (2016). **Tetraploidy enhances the ability to exclude chloride from leaves in Carrizo citrange seedlings.** *Journal of Plant Physiology* 205, 1-10.

En la fase I, el estrés hídrico incide de inmediato al aumentar la concentración de sales en la solución del suelo por encima de un umbral, desencadenando respuestas fisiológicas adversas y disminuyendo la tasa de crecimiento de las plantas. Este efecto osmótico es el principal responsable de la reducción del potencial hídrico de las hojas, que en el caso del estrés salino, queda compensado por el reajuste osmótico al acumularse iones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y sodio ( $\text{Na}^+$ ) en las hojas, permitiendo mantener la turgencia en valores similares o incluso más altos que en hojas control (Walker et al., 1982; Walker y Douglas, 1983; Lloyd et al., 1990; Bañuls y Primo-Millo, 1992; Syvertsen y García-Sánchez, 2014;). En cítricos, el estrés osmótico inicial desencadena la síntesis de ácido abscísico (ABA) en las raíces, en el fluido xilemático y en las hojas (Gómez-Cadenas et al., 1998) coincidiendo con una reducción drástica de la conductancia estomática ( $g_s$ ). Esta observación sugiere que la síntesis de ABA, inducido por estrés salino, tiene lugar fundamentalmente en la raíz, para luego ser transportado a las hojas (Gómez-Cadenas et al., 1998), donde provoca el cierre estomático. La reducción en la  $g_s$ , implica un descenso en la transpiración ( $E$ ) y en la tasa de asimilación neta de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{CO}_2}$ ), contribuyendo a la citada reducción del crecimiento (Walker et al., 1982; Behboudian et al., 1986; Lloyd et al., 1987a; Lloyd et al., 1987b; Lloyd et al., 1990; Bañuls y Primo-Millo, 1992; García-Legaz et al., 1993; Bañuls y Primo-Millo, 1995; Romero-Aranda et al., 1998; García-Sánchez et al., 2006).

La fase II sucede de manera más tardía, cuando se alcanzan concentraciones de iones excesivas, preferentemente en las hojas más viejas, ocasionando daños visibles como resultado de la toxicidad. Este efecto también reduce la capacidad fotosintética de la planta, al disminuir el área foliar sana, con lo que desciende el suministro de carbohidratos y en consecuencia el crecimiento. Las especies de cítricos difieren en su capacidad de acumular  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en las hojas. En el trabajo de Walker y Douglas (1983) se observan grandes diferencias en la acumulación de  $\text{Cl}^-$  entre tres especies de cítricos que, por el contrario, alcanzaron concentraciones foliares de  $\text{Na}^+$  muy similares. En condiciones de salinidad moderada, Walker (1986) señaló que el mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) (MC) excluyó muy eficientemente el  $\text{Cl}^-$  de las hojas, mientras que el naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf) (NT) fue más eficiente excluyendo el  $\text{Na}^+$  y sin embargo acumuló  $\text{Cl}^-$ . El NT restringe el transporte de  $\text{Na}^+$  a las hojas, acumulándolo en la porción basal del tallo y en las raíces.

Estudios más recientes indican que la localización del  $\text{Na}^+$  en la raíz se debe a la retirada activa del ión del fluido xilemático, así como a la escasa translocación a la parte aérea, que se correlacionan con la expresión elevada de los genes *SOS1* y *HKT1*. Además, el aumento en la expresión de *NHX1*, junto con la mayor actividad de las bombas de protones del tonoplasto (V-ATPase y V-PPiase), se correlacionan con una concentración vacuolar de  $\text{Na}^+$  más elevada en las raíces de NT respecto a las de MC. Este mecanismo de compartimentalización del  $\text{Na}^+$  sería clave para la reducción de la acumulación del ión en la parte aérea (Martínez-Alcántara et al., 2015).

Sin embargo, en cítricos, el ión que se considera causante del efecto tóxico es el  $\text{Cl}^-$ , porque su acumulación se correlaciona claramente con la abscisión y el daño (Bañuls et al., 1990; Bañuls y Primo-Millo, 1992; Bañuls y Primo-Millo, 1995; Bañuls et al., 1997; Romero-Aranda et al., 1998). La abscisión, sucede en respuesta a la producción de etileno, cuyo precursor el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) debe ser estimulado por la acumulación de  $\text{Cl}^-$  en cítricos (Gómez-Cadenas et al., 1998). Por tanto, el efecto osmótico tiene una repercusión inmediata en el crecimiento, mientras que el efecto iónico (especialmente ocasionado por  $\text{Cl}^-$ ) incide en el crecimiento de manera más tardía e indirecta, al reducir la superficie foliar y la fotosíntesis mediante la abscisión y el daño (Munns y Tester, 2008).

En el cultivo de cítricos, el elemento que controla la absorción y el transporte a la parte aérea de iones salinos es el portainjerto, de manera que la tolerancia a la salinidad de cada combinación variedad/portainjerto viene determinada principalmente por la capacidad del portainjerto de excluir  $\text{Cl}^-$ , evitando su concentración en la parte aérea (Walker y Douglas, 1983; Bañuls et al., 1990; Lloyd et al., 1990; Bañuls y Primo-Millo, 1995; Bañuls et al., 1997; Ream y Furr, 1976; Forner-Giner et al., 2009). La capacidad de una especie para excluir  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  de la parte aérea, es un carácter que se mantiene inalterado cuando la especie se utiliza como portainjerto de una variedad. Como ejemplo pueden citarse multitud de trabajos, en los que las diferencias entre NT y MC en el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  se mantuvieron al ser injertados con naranjo (*C. sinensis* (L.) Osb.) (VL) (Walker y Douglas, 1983; Lloyd et al., 1987a; Lloyd et al., 1987b; Walker, 1986; Lloyd et al., 1990; Bañuls et al., 1997).

Respecto a la variedad, se ha estudiado que, tanto el naranjo 'Navel' (*C. sinensis*), como el Clementino (*C. clementina* Hort. ex Tan.) acumularon mucho más  $\text{Cl}^-$  en las hojas con el portainjerto citrange Troyer (*C. sinensis* × *P. trifoliata*) que con MC.

Mientras, la tendencia opuesta sucedió en el caso del  $\text{Na}^+$ . Sin embargo el  $\text{Cl}^-$  en las hojas de Clementino fue más bajo que en naranjo ‘Navel’, al injertarse ambos con el mismo portainjerto. Estos resultados indican que la variedad ejerce cierta influencia en la tolerancia a la salinidad, con independencia del portainjerto (Bañuls et al., 1990; Bañuls y Primo-Millo, 1995;).

En cuanto a las plantas autotetraploides (4x), se han identificado diferencias anatómicas y fisiológicas respecto a sus correspondientes diploides (Cameron y Frost, 1968; Barrett y Hutchison, 1978; Romero-Aranda et al., 1997; Syvertsen et al., 2000; Allario et al., 2011) y se ha propuesto que éstos cambios podrían afectar a la capacidad de absorción y transporte de elementos minerales (Syvertsen y García-Sánchez, 2014). En condiciones salinas, la absorción restringida de iones retrasaría la intoxicación de la parte aérea de la planta (Saleh et al., 2008). Esta hipótesis hace pensar también en la posible utilización de genotipos 4x como portainjertos, para mejorar la tolerancia a la salinidad del cultivo, manteniendo a la vez otras características del portainjerto original 2x que resulten favorables (Lee, 1990).

Los objetivos de este trabajo son: a) evaluar el comportamiento de plantas 2x y 4x de CC, sometidas a un tratamiento salino con NaCl; b) describir las posibles causas de las diferencias observadas entre ploidías en el comportamiento frente a la salinidad; c) identificar mecanismos que favorecen la exclusión de  $\text{Cl}^-$  en cítricos mediante la comparación de dos genotipos altamente similares y genéticamente idénticos. El objetivo último fue determinar la utilidad de CC4x como portainjerto de cítricos para mejorar la tolerancia de los árboles a la salinidad del suelo. Se eligió éste híbrido por ser el portainjerto más ampliamente utilizado en la citricultura española (Navarro, 2015), así como en otras zonas cítricas del mundo (Castle, 2010), a pesar de que su utilización se encuentra limitada por ser sensible a la salinidad del suelo (Maas, 1993).

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Material vegetal**

Se utilizaron plantas 2x y 4x de citrange Carrizo (CC) obtenidas de semillas de los árboles del banco de germoplasma de plantas libres de patógenos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (Navarro, 2015; Navarro et al., 2002).

## 2.2. Comprobación del nivel de ploidía

Se comprobó la ploidía de las plantas mediante citometría de flujo, utilizando una muestra de tejido foliar de 0.5 mm<sup>2</sup> aproximadamente junto con una muestra similar de plantas control 2x o 4x (Aleza et al., 2009). En una placa Petri, se depositó la muestra y una gota de la solución de aislamiento de núcleos (High Resolution DNA Kit Type P, solution A; Partec). Con ayuda de una cuchilla, se troceó la muestra finamente y se filtró para separar los núcleos a través de una malla de nylon de 30 µm. El tampón de aislamiento filtrado se recogió en un tubo nuevo y se añadió la solución de DAPI (4',6-diamine-2-phenylindol) (High-Resolution DNA Kit Type P, solution B; Partec) para teñir los núcleos. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras se introdujeron en el citómetro de flujo Ploidy Analyzer (PA; Partec), equipado con una bombilla de mercurio de alta presión HBO 100-W y los filtros KG1 y BG38. Los histogramas se analizaron con el software dpac, v2.0 (Partec), que a partir de los picos obtenidos y su coeficiente de variación, determina el nivel de ploidía de las muestras.

## 2.3. Condiciones experimentales

Las semillas de CC 2x y 4x se germinaron en el invernadero, utilizando un sustrato previamente esterilizado, compuesto de turba, fibra de coco, arena y perlita (50:25:20:5) y con 1.38 g kg<sup>-1</sup> de superfosfato de cal. Se regaron dos veces por semana con una solución nutritiva compuesta de 5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.4 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.6 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 20 µM Fe-EDDHA, 7.6 µM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.50 µM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 50 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.50 µM MoO<sub>3</sub> y 54 µM MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O y ajustada a pH 6.0 con 1 M KOH. Las concentraciones de Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> en la solución de riego fueron de 3.8 mM y 2.4 mM, respectivamente. La solución de riego se aplicó diluida 1:1 con agua desionizada durante las primeras 8 semanas. Tras este periodo, las plantas uniformes se trasplantaron a macetas de plástico de 0.5 L con sustrato compuesto por turba, fibra de coco, arena y perlita (40:25:25:10), se regaron con la solución nutritiva descrita durante dos semanas y transcurrido éste periodo, se separaron en dos grupos (2x y 4x) para recibir los tratamientos.

De cada grupo, seis plantas se destinaron al análisis mineral, otras seis fueron utilizadas para la medida de la fluorescencia foliar, intercambio de gases, cuantificación de clorofilas, daños en las hojas, la abscisión y las observaciones histológicas.

Con otro grupo de seis plantas se realizaron las medidas de transpiración y conductancia hidráulica de la raíz. En total, 18 plantas de cada ploidía y tratamiento se distribuyeron al azar en el área destinada al experimento, que se rodearon por una fila de plantas similares que no fueron incluidas en el experimento. Desde el inicio del experimento, las plantas se regaron con soluciones nutritivas suplementadas con 40 mM NaCl (+S) o sin modificar (Ct), según el correspondiente tratamiento aplicado a cada grupo. Las plantas se cultivaron en un invernadero equipado con luz suplementaria PAR de PPDF 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  suministrada para alargar el fotoperiodo a 16 h de luz. El rango de temperaturas osciló entre 16° y 18° C durante la noche y entre 26° y 28° C durante el día y la humedad relativa se mantuvo aproximadamente al 80%. Cada maceta se regó dos veces por semana durante 20 días con 300 mL de la solución para favorecer el drenaje y evitar la acumulación de sales en el sustrato.

#### **2.4. Evaluación de daños y abscisión**

Se cuantificó el daño foliar de las plantas sometidas al experimento midiendo el área foliar total de cada planta con un aparato LI-300 (LI-COR). A continuación se recortó de las hojas el área dañada y se midió el área restante sana. El daño se expresó como el porcentaje de área dañada sobre el área total de cada planta (%). Las hojas caídas se recolectaron y se calculó el % de abscisión frente al total de hojas de cada planta.

#### **2.5. Análisis de iones**

Tras la aplicación de tratamientos, las plantas se sacaron de la maceta y se lavaron con agua desionizada. Se separaron los órganos (hojas, raíces y tallos), se pesaron en fresco individualmente y se secaron en una estufa a 70 °C durante 48 h, hasta alcanzar un peso seco (PS) constante.

Para determinar la concentración de iones, las muestras secas se molieron por separado en un molino de bolas y se almacenaron a temperatura ambiente. Se determinó la concentración de  $\text{Cl}^-$  mediante titulación con iones plata en un cloridómetro Corning 926 (Corning, US) según describe Gilliam (1971). Las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se determinaron mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) en un equipo iCAP 6000 (Thermo Scientific). Para ello, las muestras (0.5 g PS) se incubaron previamente con 10 mL de  $\text{HNO}_3$  durante 12 h y se digirieron a 120 °C.



Tras atemperarse, se trataron a 220 °C con 2.0 mL de HClO<sub>4</sub> al 70% hasta cesar la emisión de humos. Las digestiones se enrasaron con agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 25 mL.

### 2.6. Tasas de absorción y transporte de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y K<sup>+</sup>

La tasa de absorción neta ( $A_n$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS raíz}\cdot\text{día}^{-1}$ ) de los iones Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y K<sup>+</sup> se calculó a partir del contenido total de cada ión acumulado en las plantas, utilizando la ecuación de Pitman (1976):

$$A_n = \frac{\ln R_{20} - \ln R_0}{R_{20} - R_0} \times \frac{C_{T_{20}} - C_{T_0}}{t_{20} - t_0}$$

Donde R es el PS de la raíz y C<sub>T</sub> es el contenido total del ión en la planta completa al inicio del tratamiento (t<sub>0</sub>) y al final (t<sub>20</sub>).

La tasa de transporte neto ( $T_n$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS raíz}\cdot\text{día}^{-1}$ ), que cuantifica la translocación del elemento a la parte aérea, se calculó según la ecuación siguiente:

$$T_n = \frac{\ln R_{20} - \ln R_0}{R_{20} - R_0} \times \frac{C_{A_{20}} - C_{A_0}}{t_{20} - t_0}$$

Donde R es el PS de la raíz y C<sub>T</sub> es el contenido total del ión en la parte aérea, al inicio del tratamiento (t<sub>0</sub>) y al final (t<sub>20</sub>).

### 2.7. Medida de la conductancia hidráulica de la raíz

La conductancia hidráulica ( $K_r$ ) se midió utilizando un aparato HPFM (High Pressure Flow meter) de Dinamax Inc. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente siguiendo el método descrito por Tyree et al. (1995). Se cortó el tallo de las plantas en su porción más próxima a la raíz y se insertó en el aparato, sellándolo con cinta impermeable. Para determinar la  $K_r$  se tomaron 5 medidas sucesivas del flujo de agua difundido a las raíces (F) y la presión aplicada (P) durante 3 s, realizando series de presión creciente a una tasa constante de 3-7 KPa s<sup>-1</sup>. La  $K_r$  se calculó como la pendiente de la regresión lineal de los valores obtenidos de F frente a P:

$$K_r = dF/dP$$

Todos los valores obtenidos de  $K_r$  se regularizaron por el peso fresco total de la raíz, para obtener  $K_r\cdot\text{g}^{-1}$ .

## 2.8. Medida de la tasa de transpiración

Se midió la tasa de transpiración ( $E$ ) basada en la planta completa. Para ello se regaron abundantemente las macetas, se dejaron drenar durante la noche y se introdujeron en bolsas de polipropileno que se sellaron con parafina en torno a la base del tallo. La pérdida de peso de cada maceta se midió a lo largo de periodos diurnos de 16 h de duración. Entre medidas, las macetas se mantuvieron fuera de las bolsas para evitar el posible daño en las raíces por anaerobiosis. Las medidas se realizaron al finalizar el experimento utilizando plantas de cada genotipo y tratamiento, cuya transpiración se midió por triplicado. Tras ello, se arrancaron las hojas para medir la superficie foliar de la planta completa utilizando un aparato LI-300 (LI-COR). La transpiración se expresó como el agua perdida por unidad de tiempo y superficie foliar ( $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

## 2.9. Medida de la tasa de asimilación neta ( $A_{\text{CO}_2}$ ), concentración intercelular de $\text{CO}_2$ ( $C_i$ ), rendimiento cuántico del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) y concentración foliar de clorofila.

La tasa de fotosíntesis o asimilación neta de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{CO}_2}$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y la concentración sub-estomática de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), se midieron en el exterior del invernadero entre las 10.30 y las 11.30 am en días soleados, para facilitar la homogeneidad y estabilidad de las medidas. El registro se realizó con un analizador de gases mediante luz infrarroja LC-pro-SD (ADC Bioscientific Ltd, UK). Se iluminó la hoja con radiación fotosintéticamente activa, fijando la densidad de flujo de fotones a  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ , cifra que excede el valor de saturación para cítricos. Se registró el intercambio de gases cada 3 s, realizando 10 réplicas consecutivas en cada hoja. Las medidas se realizaron al final del periodo experimental, en dos hojas maduras de la porción media del tallo de cada planta. El valor medio por planta se consideró representativo para el análisis.

Los parámetros de fluorescencia se midieron con un fluorímetro PAM-2100 (Heinz Walz, Germany) siguiendo las indicaciones descritas por Calatayud et al. (2002). Las medidas se realizaron al final del experimento en hojas similares a las utilizadas para medir la  $A_{\text{CO}_2}$ , entre las 10:30 y las 11:30 h tras someter a las plantas a un periodo de 30 min de adaptación en oscuridad. La iluminación utilizada para inducir la fluorescencia consistió en un pulso saturante de  $2100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de 5 s de duración. El rendimiento cuántico del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) se calculó según indican Maxwell y Johnson (2000):

$$Fv/Fm = (Fm - F_0) / Fm$$

Donde Fm es la fluorescencia máxima y F<sub>0</sub> la fluorescencia basal.

La concentración de clorofilas ([Chl]) por área foliar se midió mediante espectrofotometría en un aparato Lambda 25 de Perkin Elmer (USA). Se seleccionaron hojas similares a las utilizadas para medir la A<sub>CO<sub>2</sub></sub>, de las cuales se recortaron discos de 7 cm de diámetro con un sacabocados. Los discos se incubaron en 6 mL de N,N-dimethylformamida a 4 °C durante 24 h. Tras centrifugar a 6000 g durante 15 min, se incubó el sobrenadante a temperatura ambiente en presencia de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se midió su absorbancia a 664 y 647 nm para calcular la concentración total de clorofilas según indica el método descrito por Moran y Porath (1980).

## 2.10. Histología

### 2.10.1. Corte

Se extrajeron de la maceta las raíces de seis plantas de CC 2x y 4x, cultivadas en invernadero durante 10 semanas con riego Ct. Se cortaron dos raíces fibrosas de cada planta, atendiendo a su homogeneidad y se lavaron con agua destilada. De ellas se tomó la porción apical de 3 cm de longitud sobre una superficie humedecida. Se realizaron manualmente cortes transversales de la raíz, lo más finos posibles, a diferentes distancias del ápice con ayuda de una lupa Leica MZ8. Los cortes se colocaron inmediatamente en un portaobjetos y se cubrieron con una gota de agua hasta el momento de realizar el transparentado.

### 2.10.2. Preparación de soluciones

Para el transparentado se utilizó una disolución saturada de hidrato de cloral (cristalizado >98%, Sigma) en ácido láctico al 85% (Sigma). La tinción fluorescente se realizó con una disolución 0.1% (p/v) de hemisulfato de berberina (Sigma) en ácido láctico (85%). La tinción de contraste se realizó con una disolución de Safranina 0 (Merck) al 0.15% (p/v) en etanol al 15% (v/v).

### 2.10.3. Transparentado y tinción

El método usado está basado en el descrito por Lux et al. (2005) y consiste en aplicar una tinción fluorescente específica para suberina y lignina y una tinción posterior de contraste que facilita la visibilidad de las bandas de Caspary localizadas en la exodermis y endodermis de la raíz.

Los cortes realizados se cubrieron con la solución de transparentado y los portaobjetos se introdujeron en una placa Petri cerrada y se incubaron durante 1 h en un baño de agua a 70 °C. Tras retirar la solución de transparentado con un papel (Kimwipes, Kimberly-Clark, US), las muestras se lavaron con agua destilada y se secaron. Se aplicó la tinción fluorescente y se incubaron las muestras durante 1 h a 70 °C. Tras lavarlas y secarlas se aplicó la tinción de contraste, que se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Las muestras se enjuagaron y se montaron en agua destilada para su observación.

#### 2.10.4. Microscopía y fotografía

Las muestras se examinaron utilizando un microscopio de fluorescencia Eclipse e600 (Nikon), con iluminación ultravioleta (UV-2A: ex 330-380 filter). Se tomaron fotografías utilizando una cámara DS-Ri1 (Nikon) y el software suministrado por el fabricante.

### 2.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de la varianza (ANOVA) y las medias se clasificaron utilizando el test de rango múltiple de Duncan para  $P \leq 0.05$ , con el software Statgraphics Plus, version 5.1 (Statistical Graphics, Englewood Cliffs).

## 3. Resultados

### 3.1. Concentración de iones

Al recibir el tratamiento +S (40 mM NaCl) durante 20 días, las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , expresadas en términos molares y en referencia al agua del tejido, aumentaron en todos los órganos (hojas, tallo y raíz) de ambos genotipos respecto al tratamiento Ct (**Tabla 3. 1**). Tanto el  $\text{Cl}^-$  como el  $\text{Na}^+$ , se acumularon preferentemente en la parte aérea (hojas y tallo), en lugar de acumularse en las raíces. En las plantas salinizadas, la concentración de  $\text{Cl}^-$  en las hojas 2x fue 1.6 veces mayor que en las 4x, mientras que no se encontraron diferencias en la concentración de  $\text{Cl}^-$  entre los tallos y raíces de plantas de diferente ploidía. La concentración de  $\text{Na}^+$  en las plantas salinizadas fue similar entre plantas 2x y 4x, tanto en las hojas como en el tallo y en las raíces.

**Tabla 3.1** Concentración (mM en agua del tejido) de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) en las hojas, tallo y raíz de plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de citrange Carrizo, cultivadas en medio salino (+S) con 40 mM de NaCl o en medio control (Ct) durante 20 días.

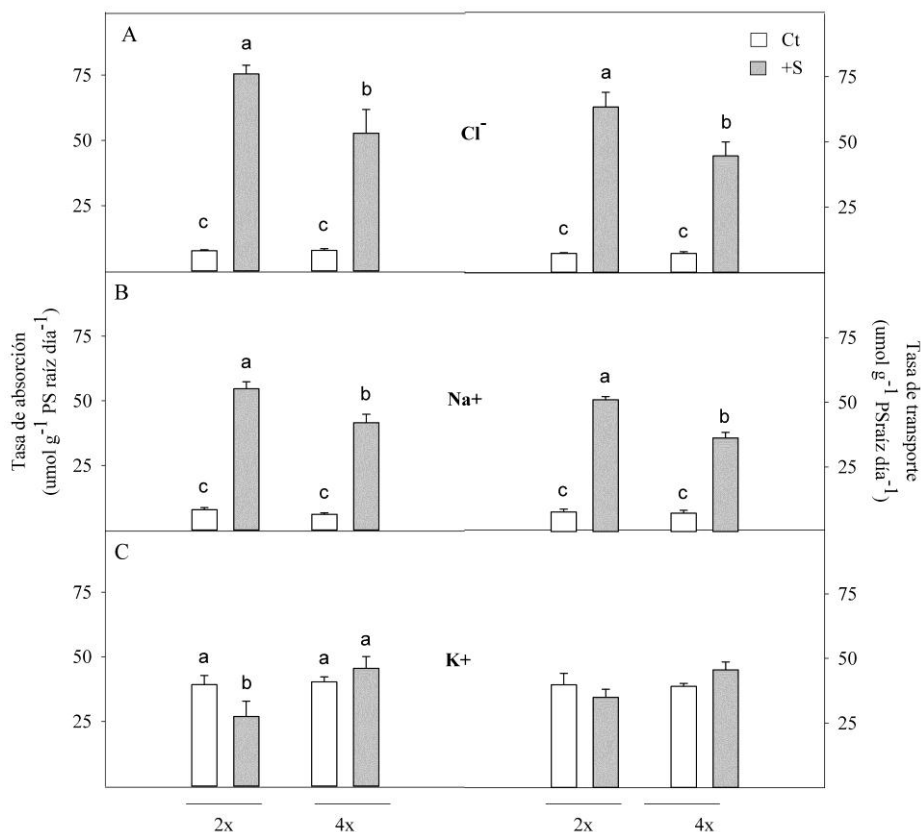
	Ct		+S		ANOVA		
	2x	4x	2x	4x	T	P	TxP
Hoja							
Cl-	56.3 a	48.2 a	232.9 c	146.8 b	*	*	*
Na+	139.6 a	141.5 a	367.0 b	317.1 b	*	ns	ni
K+	571.1 b	669.0 c	462.0 a	626.3 c	ns	*	ni
Tallo							
Cl-	69.6 a	41.6 a	222.7 b	210.9 b	*	ns	ni
Na+	36.1 a	26.0 a	174.8 b	174.0 b	*	ns	ni
K+	160.7 c	107.0 a	119.2 b	96.6 a	ns	*	ni
Raíz							
Cl-	48.8 a	40.5 a	114.0 b	108.1 b	*	ns	ni
Na+	15.0 a	24.6 a	85.8 b	85.5 b	*	ns	ni
K+	114.3 b	80.2 a	113.1 b	88.5 a	ns	*	ni

Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ). Las letras diferentes en cada fila y órgano indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan. ns. no significativo; ni. no incluido en el modelo

Las plantas Ct presentaron concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  similares entre ploidías en todos los órganos. La concentración de  $\text{K}^+$  en las plantas 4x fue más alta en las hojas y menor en los tallos y raíces, al compararla con las plantas 2x. La concentración de  $\text{K}^+$  en las hojas y el tallo de plantas 2x descendió en un 19.1% y un 25.8% respectivamente con el tratamiento +S, mientras que no se detectaron cambios en las raíces. Sin embargo, en las plantas 4x salinizadas no se modificó la concentración de  $\text{K}^+$  en ningún órgano (**Tabla 3.1**).

### 3.2. Tasas de absorción y transporte de iones

En cuanto a las tasas absorción y transporte de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , las plantas Ct presentaron tasas similares entre ploidías (**Fig. 3.1A** y **3.1B**). En condiciones salinas (+S), ambas tasas aumentaron tanto en 2x como en 4x. Sin embargo, las plantas 2x+S mostraron valores de absorción y transporte de  $\text{Cl}^-$  que fueron 1.4 veces más elevados que los de las plantas 4x+S (**Fig. 3.1A**).

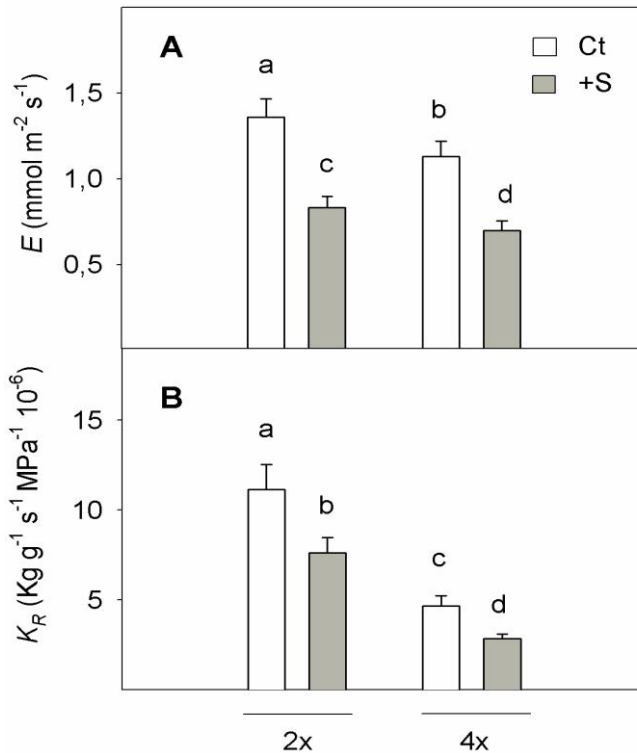


**Figura 3.1** Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl (+S) durante 20 días en las tasas de absorción y transporte ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  PS raíz·día<sup>-1</sup>) de **A)** Cl<sup>-</sup>, **B)** Na<sup>+</sup> y **C)** K<sup>+</sup> de plantas de citrange Carrizo diploides (2x) y tetraploides (4x). Ct: plantas control. Los valores son la media de seis plantas (n=6). Letras diferentes en cada sección indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

La absorción y el transporte de Na<sup>+</sup> también fueron 1.31 y 1.40 veces, respectivamente, más elevados en plantas 2x+S que en las 4x+S (**Fig. 3.1B**). Las plantas 4x+S, además presentaron tasas de absorción de K<sup>+</sup> 1.69 veces mayores que las plantas 2x+S, que redujeron su tasa de absorción de K<sup>+</sup> en un 31% respecto a las plantas 2xCt (**Fig. 3.1C**). El tratamiento salino no afectó a la absorción de K<sup>+</sup> en las plantas 4x, que mantuvieron los valores similares a los de las plantas Ct. En cuanto a la tasa de transporte de K<sup>+</sup> a la parte aérea, no se encontraron diferencias significativas entre ploidías ni entre tratamientos.

### 3.3. Transpiración y conductancia hidráulica de las raíces

La tasa de transpiración fue un 20.5% más alta en las plantas 2xCt que en las 4xCt. Durante los 20 días de tratamiento salino, la transpiración ( $E$ ) se redujo en un 38.5% en plantas 2x y en un 38.4% en las plantas 4x, de modo que en las plantas 2x+S la transpiración fue un 17% más alta que en las 4x+S (**Fig. 3.2A**). La conductancia hidráulica de las raíces ( $K_R$ ), fue un 58% menor en las plantas 4xCt que en las 2xCt. El tratamiento salino redujo éste parámetro en un 30-40% en ambos genotipos (4x+S y 2x+S) (**Fig. 3.2B**).



**Figura 3.2.** Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl (+S) durante 20 días en (A) tasa de transpiración ( $E$ ), (B) Conductancia hidráulica de las raíces ( $K_R$ ), medidas en plantas de citrange Carrizo diploides (2x) y tetraploides (4x). Ct: plantas control. Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ). Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

### 3.4. Estudio morfológico e histológico de las raíces

En la **tabla 3.2** se presentan los datos que describen la influencia del nivel de ploidía en la morfología de la raíz. La tetraploidía determina unas raíces más gruesas, más cortas y menos ramificadas que las 2x, por lo que el diámetro de la sección transversal y su área son menores en las raíces 2x que en las 4x. Como consecuencia de éstas dimensiones, la longitud específica de la raíz (SRL) fue 1.7 veces mayor en las raíces 2x que en las 4x. El número de ápices de las raíces 2x fue 2.9 veces mayor que el de las raíces 4x, indicando que la abundancia de ramificaciones también difiere entre los genotipos.

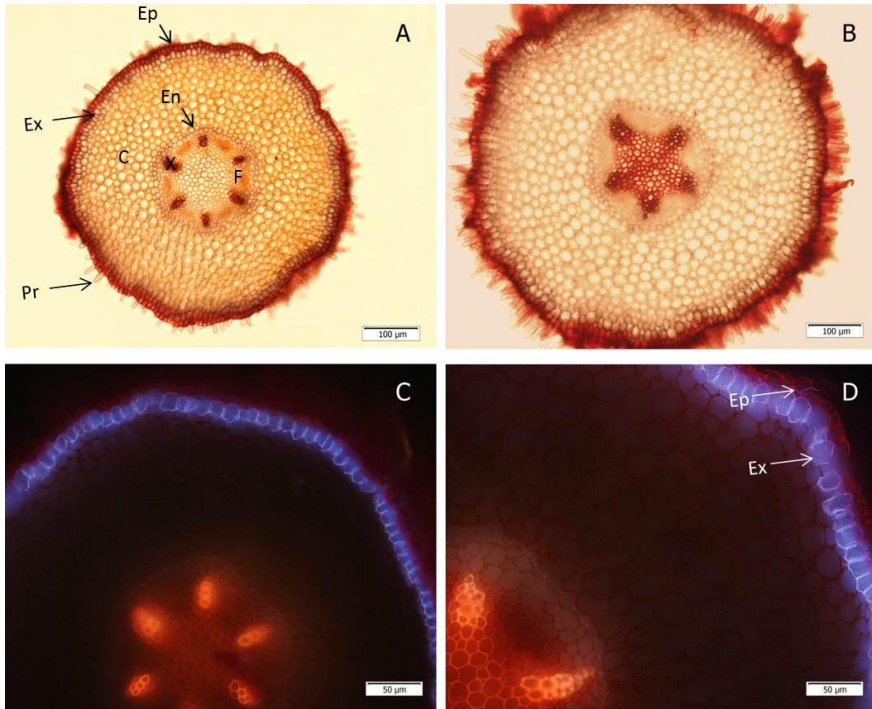
El estudio histológico confirmó las diferencias entre ploidías en las dimensiones de la raíz, cuya sección transversal fue mayor en plantas 4x que en las 2x (**Fig. 3.3A y 3.3B**). También se observó también que a 20 mm del ápice, la exodermis es más gruesa en las plantas 4x que en las 2x (**Fig. 3.3C y 3.3D**) y que las deposiciones de suberina en las paredes celulares son más gruesas también en las plantas 4x.

**Tabla 3.2** Dimensiones de las raíces fibrosas de plantas de citrange Carrizo diploides (2x) y tetraploides (4x), cultivadas durante 10 semanas en condiciones de invernadero con riego normal (Ct).

	2x	4x
<sup>x</sup> Diámetro de la sección trasversal ( $\mu\text{m}$ )	684.5 b	942.1 a
<sup>x</sup> Área de la sección transversal ( $\text{mm}^{-2}$ )	0.37 b	0.71 a
<sup>y</sup> SLR ( $\text{m}\cdot\text{g}^{-1}$ )	5.23 a	3.04 b
Número de ápices radiculares por planta	2808 a	974 b

Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ). Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.01$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan. <sup>x</sup>Medida tomada a 20 mm del ápice. <sup>y</sup>Longitud específica de las raíces en relación a su masa.





**Figura 3.3** Cortes de raíz tomados a 20 mm del ápice, realizados a mano en tejido fresco de raíces de plantas **(A, C)** diploides (2x) y **(B, D)** tetraploides (4x) de citrange Carrizo transparentadas en hidrato de cloral, teñidas con hemisulfato de berberina y Safranina O y visualizadas mediante microscopía óptica **(A, B)** y microscopía de fluorescencia con luz UV **(C, D)**. Ep: epidermis, En: endodermis, Ex: exodermis, Pr: pelo radicular, C: córtex, X: xilema, F: floema.

### 3.5. Tasa de asimilación neta ( $A_{CO_2}$ ), concentración intercelular de $CO_2$ ( $C_i$ ), rendimiento cuántico del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) y concentración foliar de clorofila.

La  $A_{CO_2}$  no fue distinta entre las plantas Ct, pero descendió un 20% en las plantas 4x y un 39% en las plantas 2x sometidas al tratamiento (**Tabla 3.3**). Por tanto, al final del experimento la  $A_{CO_2}$  de plantas 4x+S era 1.5 veces más alta que la de plantas 2x+S. No se encontraron diferencias en la  $C_i$  entre las plantas control. La salinidad incrementó este parámetro en plantas 2x, mientras que no se modificó en las 4x (**Tabla 3.3**).

La concentración de clorofilas, medida en las hojas de las plantas sometidas al tratamiento control fue similar entre ploidías. El tratamiento salino causó un descenso de éste parámetro de un 14% en las hojas 2x, mientras que no se observó ningún efecto del tratamiento salino en la concentración de clorofilas de las hojas 4x. De acuerdo con lo anterior, el rendimiento cuántico del fotosistema II se redujo en las plantas 2x sometidas al tratamiento salino, mientras que no hubo diferencias respecto al tratamiento control en las plantas 4x (**Tabla 3.3**).

**Tabla 3.3** Asimilación neta de CO<sub>2</sub> ( $A_{CO_2}$ ), concentración total de clorofila [Chl], concentración intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) y rendimiento cuántico del fotosistema II (Fv/Fm) en hojas de citrange Carrizo diploide (2x) y tetraploide (4x) cultivadas en un medio salino (+S) con NaCl 40 mM o control (Ct) durante 20 días.

	Ct		+S	
	2x	4x	2x	4x
$A_{CO_2}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	6.23 a <sup>Z</sup>	7.23 a	3.82 c	5.81 b
[Chl] ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	142.2 a	146.9 a	122.5 b	143.2 a
$C_i$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	198 a	206 a	245 b	210 a
Fv/Fm	0.81 a	0.83 a	0.64 b	0.78 a

Z: Los valores son la media de seis plantas (n = 6). Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas en el test de Duncan para  $P \leq 0.05$

### 3.6. Daño foliar

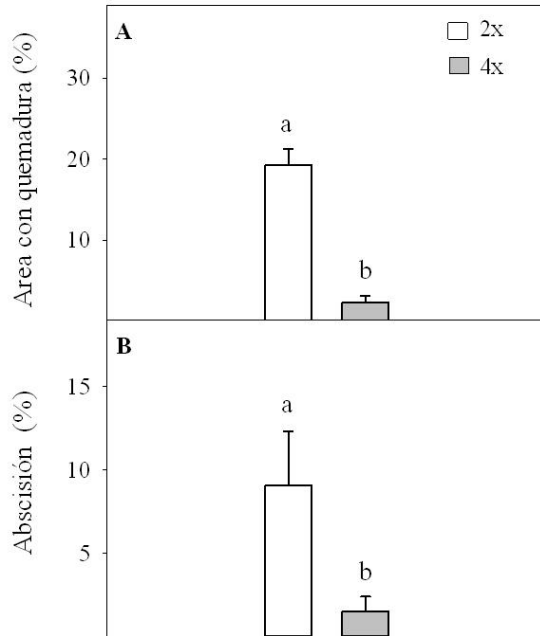
Los síntomas derivados de la toxicidad se manifestaron en las hojas (**Fig. 3.4**). La concentración de clorofilas totales descendió un 13% en las plantas 2x+S, mientras que en las plantas 4x+S no fue distinta de las plantas Ct (**Tabla. 3.3**). Además, las plantas 2x+S mostraron síntomas foliares derivados de la toxicidad más intensos que las plantas 4x+S. Estos síntomas fueron claramente apreciables a simple vista y se cuantificaron como el % de área dañada. En las plantas 2x+S el área foliar afectada por quemaduras fue 8.3 veces mayor que en las plantas 4x+S (**Fig. 3.5A**). El tratamiento +S también afectó a las plantas induciendo su defoliación en ambos genotipos. Sin embargo éste efecto fue más intenso en las plantas 2x+S, que en las 4x+S, ya que el % de abscisión fue 5.9 veces mayor en las primeras respecto a éstas últimas (**Fig. 3.5B**).

### 3.7.Crecimiento

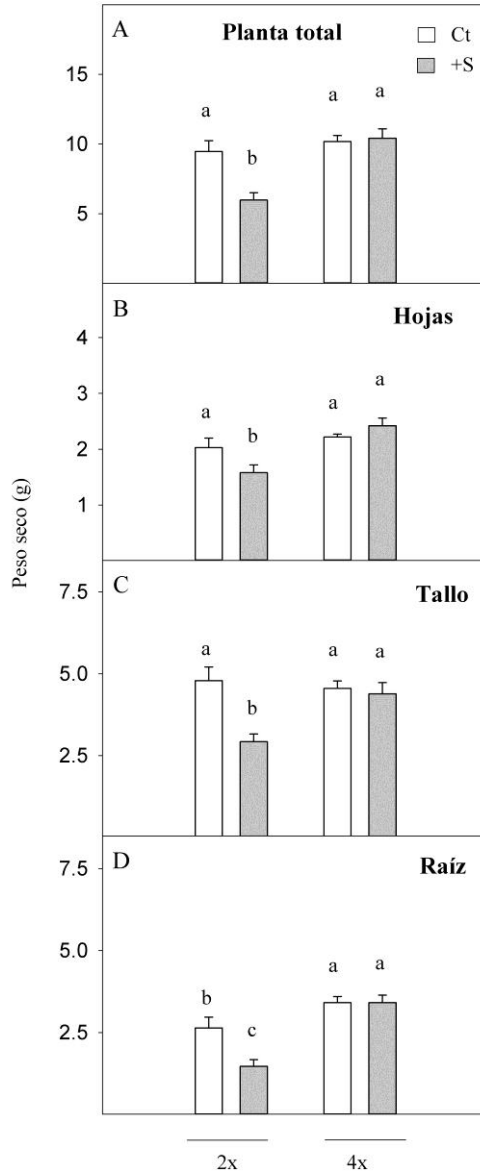
No se encontraron diferencias significativas en el peso seco (PS) total entre las plantas control (Ct) de ambos genotipos (2xCt y 4xCt) (**Fig. 3.6A**), ni tampoco entre los PS de plantas Ct en las hojas (**Fig. 3.6B**), y el tallo (**Fig. 3.6C**). Sin embargo, el PS de las raíces 4xCt fue mayor que el de las 2xCt (**Fig. 3.6D**). El tratamiento salino (+S) no modificó el PS de las plantas 4x respecto al Ct, aunque sí que afectó al PS de las plantas 2x, reduciéndolo un 36.9% en las 2x+S respecto a las 2xCt (**Fig. 3.6A**) y contribuyendo todos los órganos a ésta reducción (**Fig. 3.6B, 3.6C y 3.6D**).



**Figura 3.4** Síntomas en plantas de citrange Carrizo diploides (2x) y tetraploides (4x) sometidas al tratamiento con NaCl 40 mM NaCl (+S) durante 20 días.



**Figura 3.5.** Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl (+S) durante 20 días en **A)** el daño foliar (%) y **B)** la abscisión (%), medidas en plantas de citrange Carrizo diploides (2x) y tetraploides (4x). Ct: plantas control. Los valores son la media de seis plantas (n=6). Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.



**Figura 3.6** Efecto del tratamiento salino con 40 mM NaCl (+S) durante 30 días en el peso seco (g) de **A)** la planta completa, **B)** hojas, **C)** tallos y **D)** raíces de plantas citrange Carrizo diploides (2x) y tetraploides (4x). Ct: plantas control. Los valores son la media de seis plantas (n=6). Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.



#### 4. Discusión

Las plantas de CC4x son más tolerantes al estrés salino que las 2x, rasgo que se pone de manifiesto a través de varios indicadores en éste estudio. Sin embargo, existe controversia en lo referente al comportamiento de los cítricos 4x frente a la salinidad, debido a la reciente publicación de varios estudios, cuyas conclusiones difieren (Syvertsen y García-Sánchez, 2014). En algunos portainjertos de cítricos (*P. trifoliata*, citrange Carrizo y mandarino Cleopatra) las versiones 4x son más tolerantes a la salinidad que sus correspondientes 2x (Saleh et al., 2008). Sin embargo, en condiciones de salinidad elevada y abundante disponibilidad hídrica, los genotipos 4x (*P. trifoliata* y mandarino ‘Willowleaf’) fueron menos tolerantes que los 2x, acumulando más  $\text{Cl}^-$  y resultando más afectados (Mouhaya et al., 2010). En otro estudio, que comparó híbridos somáticos alotetraploides con su parental 2x naranjo amargo (*C. aurantium* L.), las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  alcanzadas por éste último fueron más reducidas que en los híbridos (García-Sánchez et al., 2002b). Sin embargo, en la evaluación de híbridos alotetraploides cigóticos, procedentes de la hibridación sexual de alotetraploides somáticos, se encontró que estos genotipos injertados con naranjo ‘Valencia’ eran capaces de mantener las concentraciones iónicas foliares reducidas, evitar la aparición de síntomas y mantener su tasa de crecimiento más eficientemente que la mayoría de portainjertos 2x comparados (Grosser et al., 2012a).

La mayor tolerancia a la salinidad que observamos en las plantas de CC4x se debe fundamentalmente a su capacidad para mantener el  $\text{Cl}^-$  de las hojas a concentraciones más bajas que las plantas de CC2x (**Tabla 3.1**). Este efecto se aprecia también en las tasas más reducidas de absorción y transporte a la parte aérea de  $\text{Cl}^-$  que se observaron en las plantas 4x+S (**Fig. 3.1A**). Es probable que estas diferencias estén relacionadas con las características anatómicas de la raíz que diferencian a los cítricos 4x, ya que varios estudios realizados en cítricos respaldan ésta hipótesis. La absorción de  $\text{Cl}^-$  por las raíces y su acumulación en la parte aérea parecen estar relacionadas con la absorción de agua y con la tasa de transpiración, respectivamente (Syvertsen y García-Sánchez, 2014; Moya et al., 2003; Syvertsen et al., 2010). La acumulación de iones salinos en las hojas contribuye a la reducción de su potencial osmótico, que desencadena el cierre estomático, permitiendo a las plantas limitar el transporte (Syvertsen y García-Sánchez, 2014).

En el trabajo de Allario et al. (2013) se propone que exista una regulación del cierre estomático más eficiente en los cítricos 4x, gracias a una producción constitutiva de ácido abscísico (ABA) más elevada, promovida por la sobreexpresión en las raíces de genes involucrados en la respuesta al estrés hídrico, tales como *CsNCDEI*, regulador de la síntesis de ABA. Este comportamiento se observó en plantas de naranjo ‘Valencia’ injertadas sobre lima Rangpur (*C. limonia* Osb.) 4x, respecto a las injertadas sobre el correspondiente portainjerto 2x.

En nuestro experimento, las medidas de la transpiración, realizadas considerando la planta completa, revelaron que ésta es más reducida en las plantas 4x, tanto en condiciones Ct como en +S (**Fig. 3.2.**). Este comportamiento se atribuye a las características anatómicas de la raíz (Syvertsen et al., 2000) y se correlaciona con la menor absorción de  $\text{Cl}^-$  observada en éste estudio. Por otro lado, en las raíces de cítricos, se ha asociado un menor diámetro y mayor longitud específica (SRL,  $\text{m}\cdot\text{g}^{-1}$ ) con conductancias hidráulicas más elevadas. Esta propiedad se atribuye al menor trayecto que realizan el agua y nutrientes desde la superficie de la raíz hasta alcanzar el xilema en raíces finas respecto a aquellas de mayor grosor. Eissenstat y Achor (1999) documentaron que los cítricos cuyas raíces tienen diámetros menores y altas SRL, de promedio, tienden a presentar paredes celulares exodérmicas más delgadas. Posteriormente, Huang y Eissenstat (2000) demostraron que la conductancia hidráulica de la raíz en portainjertos de cítricos depende de diferencias anatómicas en la raíz: es inversa al grosor cortical y al grado de suberización de la exodermis. La deposición de lignina y suberina en las paredes celulares exodérmicas bloquea los plasmodesmos, restringiendo la vía simplástica para el movimiento de agua e iones (Walker et al., 1984; Storey y Walker, 1987). Estos autores sugieren que el estado de las paredes celulares exodérmicas desempeña un papel fundamental en la delimitación de las vías de absorción y en el caudal de agua e iones en raíces salinizadas de cítricos. Además proponen que la suberización de la hipodermis aumenta en condiciones salinas, lo que podría ser un mecanismo adaptativo de tolerancia para restringir la absorción de iones (Walker et al., 1984).

Cuando la humedad del suelo no es limitante, la conductancia de las raíces es el principal factor regulador de la absorción de agua y solutos; las diferencias entre portainjertos en éste parámetro determinan el transporte a la parte aérea, son clave en el estado hídrico y, por tanto, en el crecimiento y la fisiología del árbol (Syvertsen y Graham, 1985; Rodríguez-Gamir et al., 2010).



Nuestros resultados indican que las raíces de CC4x, con menor SRL y mayor diámetro (**Tabla 3.2**), tienen mayor resistencia hidráulica, lo que determina que tengan una transpiración más reducida que las 2x (**Fig. 3.2A y 3.2B**), de acuerdo con el trabajo de Syvertsen et al. (2000). El estudio histológico muestra que la exodermis es más gruesa en las raíces 4x que en las 2x (**Fig. 3.3**), por lo que las raíces 4x impondrían una resistencia mayor al paso del agua y solutos que las 2x, lo que explicaría la menor absorción de  $\text{Cl}^-$ . En mandarina Cleopatra, la acumulación de  $\text{Cl}^-$  reducida se ha asociado también a la conductancia de las raíces y a la transpiración, dado el pequeño diámetro de sus vasos xilemáticos (Moya et al., 2003; Rodríguez-Gamir et al., 2010; Rodríguez-Gamir et al., 2012).

Otro mecanismo relacionado que apreciamos se debe a que la mayor parte de la absorción de agua y nutrientes en las plantas sucede a través de los ápices de las raíces que se encuentran en crecimiento activo (Gambetta et al., 2013). En especies leñosas, las porciones suberificadas y/o lignificadas constituyen la gran mayoría de la superficie. La banda de Caspary, que se forma en las paredes celulares transversales y radiales de la endodermis mediante la deposición de lignina y suberina, está presente a lo largo de toda la raíz, excepto en los primeros milímetros apicales. Por encima de éste ápice, la banda se desarrolla coincidiendo aproximadamente con la maduración del protoxilema (Peterson y Lefcourt, 1990). Además a una distancia variable del ápice, se depositan capas de suberina en la cara interna de la pared celular endodérmica, creando una estructura lamelar que restringe el acceso del flujo apoplástico a la estela. Se considera que el  $\text{Cl}^-$  transcurre por la vía apoplástica atravesando el córtex de la raíz hasta alcanzar la banda de Caspary y la sortea a través del citoplasma de las células endodérmicas. Sin embargo, la capacidad de transporte en ambas direcciones a través del plasmalema de éstas células es insuficiente para lograr un flujo de  $\text{Cl}^-$  al xilema que justifique la acumulación observada en las hojas de plantas sometidas a concentraciones elevadas de NaCl en el medio. Por ello se asume que una alta proporción del flujo apoplástico accede a través del ápice de la raíz, donde la banda de Caspary aún no se encuentra desarrollada (Enstone y Peterson, 1992) y es directamente liberado al xilema.

Otra vía alternativa de acceso libre al xilema son los puntos de emergencia de ramificaciones laterales de la raíz, donde se produce división celular a nivel de la endodermis y las nuevas células aún carecen de banda de Caspary. Este acceso es temporal, ya que la banda aparece rápidamente en la nueva ramificación, creando continuidad en el tejido de manera semejante a la raíz originaria (Peterson y Lefcourt, 1990).

Por tanto sería esperable que el transporte de  $\text{Cl}^-$  se incrementara debido al flujo apoplástico libre en éstos puntos de ramificación de la raíz. En nuestro estudio encontramos que la estructura de las raíces de CC2x se diferencia de las de CC4x por tener mayor ramificación, que da lugar a un número de ápices 2.9 veces mayor. Por tanto, las raíces 2x tienen más puntos de absorción libre de  $\text{Cl}^-$  (**Tabla 3.1**) y esta característica podría contribuir significativamente a la absorción de  $\text{Cl}^-$  más elevada que se observó.

En cuanto al  $\text{Na}^+$ , su concentración fue similar entre los genotipos 2x y 4x de plantas salinizadas, tanto en hojas como en tallos y raíces (**Tabla 3.1**). Por tanto, las diferencias en la tolerancia a la salinidad entre ellos no pueden atribuirse a los efectos de éste ión, al menos en las condiciones experimentales planteadas en éste trabajo. Como sería esperable, tampoco se encontraron diferencias entre los genotipos en la capacidad de absorción y transporte de  $\text{Na}^+$  (**Fig. 3.1B**). El mecanismo de exclusión de este ión, que implica la capacidad de las células del parénquima xilemático para extruir  $\text{Na}^+$  del flujo xilemático, secuestrándolo en los tejidos de la raíz y la base del tallo (Walker, 1986), no se modifica al variar la ploidía en CC.

La concentración de  $\text{K}^+$  fue más alta en las hojas de plantas 4x que en las 2x, mientras que se observó lo contrario en los tallos y raíz, con independencia del tratamiento (**Tabla 3.1**). La salinidad redujo la concentración de  $\text{K}^+$  en todos los órganos de las plantas 2x+S, mientras que éste descenso no se observó en las plantas 4x+S. Existen numerosos estudios que señalan que la concentración de  $\text{K}^+$  en la planta se reduce al incrementarse la de  $\text{Na}^+$  (Grattan y Grieve, 1992). Esta reducción de la absorción de  $\text{K}^+$  a favor del  $\text{Na}^+$  es un proceso competitivo que sucede cuando el ión  $\text{Na}^+$  predomina sobre el  $\text{K}^+$  en la solución externa. De acuerdo con ello, en las plantas 2x+S se redujo la tasa de absorción de  $\text{K}^+$  debido al tratamiento salino (**Fig. 3.1C**). Sin embargo, la ausencia de respuesta en éste sentido en las plantas 4x+S indica que podrían tener la capacidad de discriminar entre  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  más eficientemente, evidencia que coincide con los resultados publicados recientemente en Arabidopsis tetraploide (Chao et al., 2013).

La mayor capacidad de las plantas de CC4x para excluir el  $\text{Cl}^-$  de las hojas, aumenta su tolerancia al estrés salino y disminuye el daño por clorosis foliar, quemaduras y abscisión respecto al CC2x. La clorosis es un síntoma temprano de toxicidad salina, que ha sido observado en cítricos por varios autores y se ha asociado a reducciones en la concentración de clorofila foliar (Lloyd et al., 1987a; García-Legaz et al., 1993; Romero-Aranda et al., 1998; García-Sánchez et al., 2002a).

En éste sentido, el descenso en la concentración foliar de clorofilas se observó únicamente en las plantas 2x salinizadas (**Tabla 3.3**). El daño foliar y la defoliación también fueron mayores en las plantas 2x que en las 4x al aplicarse el tratamiento salino (**Fig. 3.5A y 3.5B**). Estos síntomas deben estar relacionados con la mayor acumulación de  $\text{Cl}^-$  que se observó en las plantas 2x+S respecto a las 4x+S. Trabajos previos establecen que la defoliación en cítricos es proporcional a su concentración foliar de  $\text{Cl}^-$  (Bañuls y Primo-Millo, 1992) y que la abscisión es un proceso mediado por etileno e inducido por la acumulación de este ión (Gómez-Cadenas et al., 1998). El  $\text{Cl}^-$  se acumula preferentemente en las hojas maduras y su concentración es creciente hacia los márgenes foliares. Aunque estas hojas acaban dañándose, pueden mantener la función fotosintética en el área sana.

Dado que la transpiración y la conductancia hidráulica de las raíces son menores en las plantas 4x que en las 2x, tanto en condiciones control como salinas (**Fig. 3.2**), el transporte de agua es menor en las plantas 4x que en las 2x. De acuerdo con lo anterior, la tasa fotosintética debería ser también menor en las plantas 4x, sin embargo, los resultados muestran que las plantas 4x tienen tasas de asimilación ( $A_{\text{CO}_2}$ ) más elevadas que las 2x en condiciones salinas. Esta aparente contradicción se explica cuando la capacidad de intercambio gaseoso de la planta no es el principal factor limitante para la asimilación neta de  $\text{CO}_2$ , sino que intervienen factores no estomáticos que afectan al funcionamiento del aparato fotosintético y por tanto disminuyen la capacidad de la planta para la asimilación de  $\text{CO}_2$ . Los datos de la **Tabla 3.3** señalan que el descenso en la asimilación de las plantas 2x salinizadas se debe a la baja concentración foliar de clorofilas, indicando mayor sensibilidad a la salinidad que las 4x. Por otro lado, el aumento de la  $C_i$  en las hojas de las plantas 2x salinizadas, que no se observó en las correspondientes 4x, se ha asociado con daños en la anatomía foliar (Romero-Aranda et al., 1998) así como con cambios en la fluorescencia, indicativos de la disfunción de la cadena de transporte de electrones en las hojas de cítricos sometidos a estrés salino (López-Climent et al., 2008). En nuestro estudio, este efecto es indicativo de la toxicidad que ocasiona la mayor acumulación de  $\text{Cl}^-$  en las plantas 2x respecto a las 4x. El daño fotoquímico constituye uno de los factores no estomáticos que contribuyen a la disminución de la asimilación en las plantas 2x salinizadas, ya que el rendimiento cuántico del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) se encontró afectado únicamente en éste grupo. El descenso en este parámetro puede ser indicativo de daño en las membranas tilacoidales o en la cadena de transporte de electrones (Havaux y Lannoye, 1983).

Por último, de acuerdo con los datos de  $A_{CO_2}$ , el tratamiento salino redujo el peso seco de las plantas 2x pero no afectó el de las 4x (**Fig. 3.6**). Estos datos coinciden con estudios previos que indican que la reducción del crecimiento ocasionada en los cítricos sometidos a estrés salino depende del genotipo considerado y se asocia a la inducción de relaciones hídricas adversas, causadas por la acumulación en las hojas de iones salinos que afectan a la tasa de asimilación (Bañuls y Primo-Millo, 1995)

Los datos presentados nos permiten concluir que las plantas de CC4x son más tolerantes a la salinidad que las de CC2x por presentar una capacidad de absorción y transporte de cloruro disminuida que reduce la acumulación del ión en las hojas, retrasando el daño foliar. Este efecto permite mantener la función fotosintética menos afectada y en consecuencia mantener el crecimiento activo de las plantas 4x. La reducida absorción de cloruro parece ser principalmente debida a los cambios en la anatomía de las raíces ocasionados por la tetraploidía, que reducen la conductancia hidráulica y la transpiración de las plantas 4x.

# **La tetraploidía mejora la tolerancia al estrés por exceso de boro en citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)<sup>3</sup>**

## **1. Introducción**

El boro (B) es un micronutriente esencial, necesario para el funcionamiento fisiológico normal de las plantas (Brown et al., 2002). Este elemento participa en la formación de la pared celular, desempeñando una función estructural: la unión de dos moléculas de ramnogalacturonato II mediante enlaces borato-diol (O'Neill et al., 1996). También participa en la elongación de la raíz, el metabolismo de carbohidratos, la acumulación de fenoles, el crecimiento del tubo polínico y la integridad de las membranas celulares (Brown et al., 2002; Herrera-Rodríguez et al., 2010).

En la solución del suelo, el B se encuentra principalmente en forma de ácido bórico o borato, aunque las raíces de la planta lo absorben preferentemente en forma de ácido bórico, siendo el único elemento conocido que se absorbe en forma no cargada (Brown et al., 2002).

---

<sup>3</sup>El contenido de éste capítulo se ha publicado en el siguiente artículo:

Ruiz M, Quiñones A, Martínez-Alcántara B, Aleza P, Morillon R, Navarro L, Primo-Millo E and Martínez-Cuenca M-R (2016) **Tetraploidy Enhances Boron-Excess Tolerance in Carrizo Citrange (*Citrus sinensis* L. Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.)**. *Frontiers in Plant Science* 7:701.

Los cítricos son sensibles al exceso de B y su toxicidad altera la funcionalidad normal de la planta, ocasionando una reducción del crecimiento y del rendimiento productivo. Los síntomas de toxicidad por B aparecen generalmente en las hojas de mayor edad. Éstos síntomas consisten inicialmente en el amarilleamiento de los ápices más distales y los márgenes foliares o en un moteado distribuido irregularmente. En estados de toxicidad avanzada se producen quemaduras de color marrón y la abscisión prematura de las hojas. Ocasionalmente se ha observado la aparición de gotas resinosas en el envés foliar, el acortamiento de entrenudos y el necrosado de las yemas y brotes apicales (Chapman, 1968; Papadakis et al., 2004; Grattan et al., 2015; Martínez-Cuenca et al., 2015).

Generalmente, la toxicidad por B se produce debida al riego con aguas que contienen B en concentraciones excesivas, o bien a su acumulación en las capas superficiales del suelo como consecuencia de la elevada evapotranspiración en climas áridos o semiáridos (Nable et al., 1997). En España, este caso se da en la vega baja del río Segura, región de clima semi-árido, donde la sequía estacional prolongada, así como la escasez y mala calidad del agua disponible para el riego son factores que limitan habitualmente la producción agrícola. En ésta zona, la demanda creciente de recursos hídricos debida al crecimiento urbano y a la intensa actividad agrícola, plantea la necesidad de recurrir al uso de aguas residuales depuradas para el riego, que habitualmente contienen B en concentraciones suficientes para ocasionar daños al cultivo de cítricos (Grattan et al., 2015).

El rango de concentración de B en el suelo que resulta óptimo para las plantas es muy estrecho, de modo que la regulación eficiente de su absorción y transporte es esencial para el mantenimiento de la homeostasis. Las concentraciones altas de B en el suelo imponen su absorción en exceso por las raíces y su acumulación en las hojas más antiguas de la planta, ocasionando toxicidad. El B en exceso se inmoviliza en las paredes celulares, constituyendo la fracción insoluble, o se acumula en el fluido apoplástico, constituyendo la mayor parte de la fracción soluble, mientras que solamente una pequeña porción del B soluble se localiza en el interior celular (Liu et al., 2013; Martínez-Cuenca et al., 2015). En éste último caso, uno de los mecanismos principales que determina la tolerancia es la compartimentalización vacuolar (Martínez-Cuenca et al., 2015).

Las plantas absorben el agua y los solutos a través de la superficie de las raíces y su flujo deberá atravesar radialmente los tejidos radicales hasta alcanzar el cilindro vascular central, para ser transportado a la parte aérea a través de los vasos xilemáticos.

Este transporte radial, puede realizarse a través del apoplasto, formado por el conjunto de espacios intercelulares, o a través del simplasto, integrado por la red de citoplasmas conectados por plasmodesmos (Brown et al., 2002; Takano et al., 2008). La selectividad de la vía de transporte apoplástica es inespecífica y está regulada por dos barreras de suberina, localizadas en las capas celulares de la exodermis y la endodermis (Peterson et al., 1993; Baxter et al., 2009). La primera limita el paso de agua y solutos a través de la superficie de la raíz (Hose et al., 2001) y su suberificación progresiva desde el ápice hacia porciones distales determina el descenso de la permeabilidad al paso de agua y solutos (Gambetta et al., 2013). La segunda restringe el flujo apoplástico al xilema, regulando el acceso a la planta de agua y minerales (Chen et al., 2011).

La mayoría de solutos, como el B, ven limitado su acceso al xilema por la banda de Caspary. Para rebasarla se introducen en el simplasto de las células endodérmicas y son exportados a la estela por canales transportadores de membrana (Takano et al., 2008; Miwa y Fujiwara, 2010). Cuando el B se encuentra en el medio a concentraciones bajas, su absorción y transporte requieren de dos tipos de proteínas transportadoras de membrana, las BOR y las NIP (proteínas intrínsecas tipo nodulina). La regulación sinérgica de la expresión génica involucrada en éste proceso se considera fundamental para lograr la homeostasis. El primer transportador de B identificado en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh fue AtBOR1, cuya función es el transporte de entrada al xilema cuando existe déficit (Takano et al., 2002). Este canal se localiza en la membrana plasmática de las células del periciclo de la raíz y su sobreexpresión, en condiciones deficitarias de B, activa la translocación de B desde las raíces hacia la parte aérea de la planta, probablemente en forma de borato (Miwa et al., 2006). Sin embargo algunos estudios señalan que cuando existe exceso de B, la proteína BOR1 es eliminada de la membrana mediante endocitosis y degradada en las vacuolas (Takano et al., 2005b; Takano et al., 2010), lo que sugiere que su regulación puede ser uno de los mecanismos para evitar la toxicidad por B. Éste transportador ha sido recientemente caracterizado en cítricos al localizarse el gen ortólogo *CmBOR1* en *Citrus macrophylla* Wester y verificarse su función (Cañon et al., 2013).

Otra proteína de membrana que facilita la entrada de B a las células de la raíz es NIP5;1 (Takano et al., 2006), un canal de ácido bórico, miembro de la familia de las proteínas intrínsecas principales (MIPs), mediadoras del flujo pasivo de agua y moléculas pequeñas no cargadas.

Éste transportador se localiza en la membrana plasmática de la cara externa de la epidermis de la raíz (Takano et al., 2006 Takano et al., 2010) y su expresión se induce en respuesta al déficit de B en la planta (Takano et al., 2006). En *A. thaliana*, la sobreexpresión de *AtNIP5;1* aumenta la absorción de B en condiciones de deficiencia y promueve la elongación de la raíz (Kato et al., 2009). Del mismo modo que ha sido descrito en *BORI*, Tanaka et al. (2011) sugieren que la degradación del RNAm de *NIP5;1* dependiente de B interviene en la aclimatación de plantas a las concentraciones excesivas. El transportador de membrana CiNIP5 ha sido caracterizado recientemente en citrange Carrizo (*C. sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) (An et al., 2012).

En cuanto a las plantas autotetraploides (4x), se ha descrito que difieren de sus ancestros 2x únicamente en contener un número duplicado de cromosomas, aunque pueden considerarse clones por ser su composición génica idéntica (véase apartado I-3.2.2.1.1). En cítricos, los genotipos 2x apomícticos suelen generar de manera espontánea plantas autotetraploides procedentes de la duplicación cromosómica de células maternas nucleares, que a continuación dan lugar a embriones somáticos (Barrett y Hutchison, 1978; Aleza et al., 2011). En cítricos se han identificado diferencias fenotípicas entre plantas 2x y sus correspondientes autotetraploides (Cameron y Frost, 1968; Barrett y Hutchison, 1978; Romero-Aranda et al., 1997; Allario et al., 2011). Estas últimas tienen las hojas más gruesas y con un verdor más intenso y las raíces son más cortas y engrosadas. Las raíces de los cítricos que tienen menor diámetro y longitudes específicas (SRL) mayores, tienen mayor conductancia hidráulica radial (Eissenstat y Achor, 1999; Huang y Eissenstat, 2000). Esta propiedad se atribuye al menor trayecto radial del agua y solutos desde la superficie de la raíz hasta alcanzar el xilema, cuando se comparan con raíces de un diámetro mayor. Además la conductancia hidráulica también depende de características anatómicas como el grosor de la exodermis y su grado de suberificación y en un suelo húmedo constituye la mayor limitación para la absorción de agua y solutos. Las diferencias en éste parámetro entre portainjertos determinan su capacidad de transporte a la parte aérea y modulan las relaciones hídricas y sus respuestas fisiológicas que afectan al crecimiento (Syvertsen y Graham, 1985).

Los portainjertos 4x tienen una menor SRL y por tanto menor conductancia hidráulica que sus correspondientes 2x, lo que explica su tasa de crecimiento más reducida y su arquitectura más compacta (Barrett y Hutchison, 1978).



Por el mismo motivo, tienen una tasa de transpiración generalmente menor que sus correspondientes 2x (Syvertsen et al., 2000), una conductancia estomática más reducida (Allario et al., 2011) y una regulación más efectiva del intercambio de gases (Allario et al., 2013). El mesófilo foliar más grueso que caracteriza a los genotipos 4x de cítricos, aumentaría la resistencia a la difusión de CO<sub>2</sub>, disminuyendo su tasa de asimilación neta (Romero-Aranda et al., 1997). Todos estos factores parecen condicionar el tamaño menor, característico de los cítricos 4x.

Se ha propuesto que algunos clones autotetraploides de cítricos podrían utilizarse como portainjertos, ya que la fisiología de los árboles se encuentra muy influenciada por las propiedades del sistema radicular, que juega un papel clave en la capacidad de absorción y transporte de elementos minerales. En este sentido, la capacidad para restringir el transporte de solutos, que pueden resultar tóxicos por acumulación en la parte aérea, difiere entre los portainjertos habitualmente utilizados en citricultura y la elección del portainjerto adecuado constituye el mecanismo más eficiente para solucionar los problemas de toxicidad en el cultivo (Walker et al., 1984).

Este trabajo pretende estudiar el comportamiento de los genotipos 2x y 4x de citrange Carrizo, injertado y sin injertar frente a concentraciones altas de B en el medio. El objetivo último fue identificar caracteres morfológicos, anatómicos o moleculares asociados a la tetraploidía que determinan diferencias en la tolerancia a la toxicidad por B. El híbrido elegido para el estudio es el portainjerto más ampliamente utilizado en España, que actualmente se encuentra en el 75% de las plantaciones y se utiliza en otras áreas cítricas del mundo. Además, los citranges se consideran moderadamente sensibles a la toxicidad por B (Grattan et al., 2015).

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Material vegetal**

Se utilizaron plantas 2x y 4x de citrange Carrizo (CC) obtenidas a partir de semilla de árboles del banco de germoplasma de plantas libres de patógenos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (Navarro et al., 2002; Navarro, 2015).

## 2.2. Condiciones experimentales

### 2.2.1. Experimento 1: ensayo *in vitro*

Las semillas de CC 2x y 4x se esterilizaron durante 5 min en lejía comercial al 2% (v/v) (0.5 M NaClO), se eliminaron las cubiertas, se enjuagaron tres veces en agua desionizada estéril y se sembraron en un medio con Agar (Difco Bacto) al 4% en agua destilada (pH 6.0). El medio se esterilizó previamente a 120° C durante 20 min y se dispensó un volumen de 40 mL en tubos de 150 x 25 mm. Se cultivó una semilla por tubo en una cámara de cultivo (Sanyo MCR-350H, Sanyo Electric Biochemical Co.) a temperaturas que oscilaron entre 20° y 22° C en oscuridad y entre 26° y 28 °C durante el periodo luminoso, una humedad relativa del 80% e iluminación fotosintéticamente activa (PAR, 400-700 nm) con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPDF) de 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 16 h diarias. Transcurridos 20 días se seleccionaron plántulas homogéneas y se transfirieron, tras eliminar los cotiledones, a tubos de plástico de dimensiones similares que contenían 50 mL de medio nutritivo estéril, compuesto por 5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1.5 mM  $\text{KNO}_3$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.2 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 20  $\mu\text{M}$  Fe-EDDHA, 7.65  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 54.4  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , agar al 0.25% y pH ajustado a 6.0. El medio control (Ct) contenía 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  y el medio con exceso de B (+B), 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

Las plántulas se mantuvieron en éstas condiciones durante 45 días. Al inicio y al final de éste periodo, se extrajeron plantas del medio, se enjuagaron con agua destilada y se separaron hojas, tallo y raíces. Los órganos se pesaron en fresco y se midió la longitud de tallos y raíces. Se tomaron muestras para los análisis moleculares, que fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80 °C y para los análisis elementales que fueron secadas en un horno a 70 °C durante 48 h. Las muestras secas se pesaron para obtener la relación entre el peso fresco y el seco.

### 2.2.2. Experimento 2: ensayo en invernadero

Se germinaron semillas de CC 2x y 4x en el invernadero, utilizando un sustrato previamente esterilizado, compuesto de turba, fibra de coco, arena y perlita (50:25:20:5), con 1.38 g  $\text{kg}^{-1}$  de superfosfato de cal. Las plántulas se regaron dos veces por semana con una solución nutritiva compuesta de 5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1.4 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.6 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 20  $\mu\text{M}$  Fe-EDDHA, 7.6  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.50  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_3$  y 54  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , ajustada a pH 6.0 con 1 M KOH.

La solución de riego se aplicó diluida 1:1 con agua desionizada durante las primeras 8 semanas. Tras este periodo, las plantas seleccionadas por su uniformidad, se trasplantaron a macetas de plástico de 0.5 L con sustrato compuesto por turba, fibra de coco, arena y perlita (40:25:25:10). Las plantas de cada ploidía (2x y 4x) se separaron en 4 grupos y se regaron con la solución nutritiva descrita, modificada en cada grupo hasta alcanzar un contenido de 50, 200, 400 u 800  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  respectivamente.

Las plantas se podaron de manera homogénea para forzar el desarrollo de un brote vegetativo durante el tratamiento establecido. Inmediatamente tras la poda, seis plantas de cada ploidía se extrajeron de las macetas, se lavaron las raíces hasta eliminar todo el sustrato y se registró el peso al inicio del tratamiento. Otras 12 plantas de cada ploidía y tratamiento se distribuyeron al azar en el área destinada al experimento y se rodearon por una fila de plantas similares pero excluidas del experimento. Las plantas se cultivaron en un invernadero equipado con luz suplementaria PAR de PPDF 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  suministrada para alargar el fotoperiodo hasta 16 h de luz. El rango de temperaturas osciló entre 16° y 18° C durante la noche y entre 26° y 28° C durante el día y la humedad relativa se mantuvo aproximadamente al 80%. Cada maceta se regó dos veces por semana con 300 mL de la solución para favorecer el drenaje y evitar la acumulación de B y sales en el sustrato.

Durante cinco semanas, se muestrearon semanalmente dos hojas de la parte media del tallo de seis plantas de cada genotipo y tratamiento para determinar la concentración de B. Transcurrido éste periodo, las plantas se extrajeron de las macetas y se lavaron las raíces para eliminar el sustrato. Se separaron hojas, tallos y raíces, se lavaron con agua desionizada y se pesaron los órganos por separado. Las raíces se diseccionaron separando la raíz principal de las secundarias y se contó el número total de ápices por planta. El crecimiento y el daño foliar se evaluaron en otras seis plantas 2x y 4x que habían sido sometidas a los tratamientos con 50 y 800  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  en las condiciones indicadas durante 10 semanas. Para ello se midió el área foliar total utilizando un aparato LI-300 area-meter (LI-COR). El área afectada por quemaduras se recortó para separarla del área sana y se midió de la misma manera. El área dañada se expresó en forma de porcentaje sobre el total de área foliar. Se contó el número de hojas sanas y caídas de cada planta y se expresó la abscisión en % respecto al total de hojas de cada planta. Los órganos se secaron en un horno a 70° C durante 48 h, para determinar el peso seco final y estimar el crecimiento.

### 2.2.3. Experimento 3: ensayo en campo

Este experimento se llevó a cabo en una parcela localizada en Elche (Alicante) (38°14'53.57"N; 0°41'46.9"W), una región de clima semi-árido en la vega baja del río Segura. En ésta localización, la temperatura media anual ronda los 17.9° C, las precipitaciones medias son de 290.2 mm y la humedad relativa del aire se sitúa en torno al 65% de media. La textura del suelo en los primeros 50 cm de profundidad es de tipo franco arcilloso y el pH del suelo es de 8.5, con un contenido de carbonato cálcico del 32.7% y un contenido en materia orgánica del 1.63%. Las plantas de CC 2x y 4x proceden de semillas de los árboles banco de germoplasma de plantas libres de patógenos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).

Las semillas se germinaron en las mismas condiciones indicadas en el Experimento 2. A la edad de 6 meses, se injertaron con naranjo 'Valencia' late (*C. sinensis*) (VL) de la misma procedencia. Transcurrido un periodo de 6 meses, en el año 2009, los plantones se establecieron en la parcela. El marco de plantación fue de 5 × 5 m y los árboles se distribuyeron en tres bloques al azar, conteniendo cada bloque dos unidades experimentales con 4 árboles representantes de cada ploidía, situados en los vértices de un cuadrilátero. Cada bloque experimental se encontraba separado de los adyacentes por una fila de árboles que no formaron parte del experimento. Las plantas se cultivaron siguiendo los estándares locales de fertirrigación y control de plagas.

Se determinó la concentración de B en hojas de primavera tomadas de ramas sin fructificación en el mes de noviembre de los años 2012, 2013 y 2014. Cada muestra consistió en un *pool* de seis hojas tomadas al azar de alrededor de la copa de cada uno de los 4 árboles. La altura de los árboles y el diámetro de los troncos se midieron el 5º año tras el establecimiento de la parcela. A partir de éstas medidas se calculó el volumen de la copa (V), según la ecuación de Turrell y Vanselow (1946):

$$V \text{ (m}^3\text{)} = 0.5236 \times H \times D^2$$

Donde H es la altura del árbol y D el diámetro máximo de la copa.

Los frutos se cosecharon en su punto de madurez fisiológica y se midió el rendimiento de cada árbol. La eficiencia productiva (kg m<sup>-3</sup>) se calculó como el peso de la cosecha (kg·árbol<sup>-1</sup>) / volumen de copa (m<sup>3</sup>·árbol<sup>-1</sup>).

### 2.3.Métodos de análisis

#### 2.3.1. Comprobación del nivel de ploidía

Las plantas de CC utilizadas en los experimentos se obtuvieron de semillas de los árboles 2x y 4x del banco de germoplasma. La ploidía de las plantas se comprobó mediante citometría de flujo, utilizando una muestra de tejido foliar de 0.5 mm<sup>2</sup> aproximadamente junto con una muestra similar de plantas control 2x o 4x (Aleza et al., 2009). En una placa Petri, se depositó la muestra y una gota de la solución de aislamiento de núcleos (High Resolution DNA Kit Type P, solution A; Partec). Con ayuda de una cuchilla, se troceó la muestra finamente y se filtró para separar los núcleos a través de una malla de nylon de 30 µm. El tampón de aislamiento filtrado se recogió en un tubo nuevo y se añadió la solución de DAPI (4',6-diamine-2-phenylindol) (High-Resolution DNA Kit Type P, solution B; Partec) para teñir los núcleos. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras se introdujeron en el citómetro de flujo Ploidy Analyzer (PA; Partec), equipado con una bombilla de mercurio de alta presión HBO 100-W y los filtros KG1 y BG38. Los histogramas se analizaron con el software dpac, v2.0 (Partec), que a partir de los picos obtenidos y su coeficiente de variación, determina el nivel de ploidía de las muestras.

#### 2.3.2. Extracción de ARN y análisis qRT-PCR

La expresión relativa de los genes *NIP5* y *BORI* se analizó, mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-PCR), en las raíces de las plantas cultivadas *in vitro* (Experimento 1). Para ello se molieron 100 mg de raíz fresca utilizando nitrógeno líquido, se extrajo el RNA total utilizando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) y se trató con DNAsa I (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc.) según las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración del extracto obtenido se evaluó utilizando un espectrofotómetro ND-1000 full spectrum UV-Vis (Nanodrop Technologies, Thermo Fisher Scientific). Se retrotranscribieron 2 µg del ARN obtenido, utilizando oligo (dT)<sub>23</sub> como cebador en una reacción de 20 µl de volumen, realizada por la transcriptasa reversa M-MuLV (*RevertAid*, Thermo Fisher Scientific Inc.). El ADN copia (ADNc) obtenido se diluyó 1:3 y se utilizó como molde de la qPCR, llevada a cabo en un volumen de 20 µL, utilizando Perfecta SYBR Green FastMix (Quanta Bioscience) en un termociclador LightCycler 480 system (*Roche Applied Science*) con el programa: 3 min a 95° C y 40 ciclos de 15 s a 95° C y 1 min a 60 °C.

Los cebadores utilizados son los descritos en publicaciones previas (An et al., 2012; Cañon et al., 2013) y se muestran en la **Tabla 4.1**. Se realizaron tres réplicas técnicas simultáneas de cada reacción y tres réplicas biológicas sucesivas. La expresión se normalizó utilizando los niveles de expresión del gen putativo de Actina, utilizando para el diseño de cebadores la secuencia en mandarino Clementino (*C. clementina* Hort. ex Tan.) que se muestra en la **Tabla 4.1**.

**Tabla 4.1** Lista de cebadores utilizados para la RT-PCR cuantitativa

Gen	Código	Cebadores directo/reverso	Referencia
<i>NIP5</i>	JQ277272 <sup>1</sup>	5'-AGCTTCCCGGATATTCCAGT-3' 5'-ACTATGGGTCTCTGCTGTTGC-3'	An et al. (2012)
<i>BORI</i>	EF581174 <sup>1</sup>	5'-GGGCATATAGTCCCCGTGTT-3' 5'-CCGGGACTGGGAACCTTC-3'	Cañon et al. (2013)
<i>ACT</i>	clementine0.9_013110m <sup>2</sup>	5'-CAGTGTTTGGATTGGAGGATCA-3' 5'-TCGCCCTTTGAGATCCACAT-3'	Agüero et al. (2014)

<sup>1</sup>Número de entrada en la base de datos de secuencias de referencia del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). <sup>2</sup>Código de referencia del transcrito, disponible en la base de datos del International Citrus Genome Consortium (<http://www.phytozome.net/search.php>).

### 2.3.3. Concentración total de B

Las muestras de hoja y raíz procedentes de los experimentos se pesaron en fresco, se lavaron en una solución 0.01% (v/v) de Tween-20 (*Sigma-Aldrich Corp.*), se enjuagaron con agua destilada y se secaron en un horno a 70 °C durante 48 h hasta alcanzar un peso seco constante (PS). Para medir la concentración total de B ( $B_T$ ) se utilizaron 0.5 g de PS de los órganos, que se calcinaron en un horno mufla a 550 °C durante 12 h. Las cenizas se disolvieron en 1 N HCl (Hiperpur, Panreac), obteniendo un volumen final de extracto de 5 mL. El  $B_T$  se determinó mediante espectroscopía de emisión con plasma de acoplamiento inductivo, utilizando el aparato ICP-AES iCAP 6000 (Thermo Scientific).

### 2.3.4. Fraccionamiento de B

La concentración de B en la fracción soluble e insoluble se midió en las hojas y en las raíces de las plantas cultivadas *in vitro* (Experimento 1).

Las muestras se congelaron y se molieron utilizando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se homogeneizaron 0.5 g de éste polvo con 10 volúmenes de agua a 0 °C y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. El precipitado se lavó con 10 volúmenes de agua a 0 °C, se centrifugó de nuevo y se lavó tres veces con 10 volúmenes de etanol al 80%, una vez con 10 volúmenes de metanol:cloroformo (1:1, v/v) y una vez con 10 volúmenes de acetona. El conjunto de sobrenadantes recogidos constituye la fracción soluble y el precipitado la fracción insoluble, constituida por paredes celulares. Ambas fracciones se secaron y se sometieron al proceso de cuantificación de B descrito en el apartado anterior.

### 2.3.5. Tasas de absorción y transporte de B

La tasa de absorción neta ( $An$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS raíz}\cdot\text{día}^{-1}$ ) se calculó a partir del  $B_T$  acumulado en las plantas, utilizando la ecuación de Pitman (1976):

$$An = \left[ \frac{\ln R_{45} - \ln R_0}{R_{45} - R_0} \right] \times \left[ \frac{C_{T45} \cdot C_{T0}}{t_{45} - t_0} \right]$$

Donde R es el PS de la raíz y  $C_T$  es el contenido total de B en la planta completa, al inicio del tratamiento ( $t_0$ ) y al final ( $t_{45}$ ).

La tasa de transporte neto ( $Tn$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS raíz}\cdot\text{día}^{-1}$ ), que cuantifica la translocación del elemento, se calculó según la ecuación siguiente:

$$Tn = \left[ \frac{\ln R_{45} - \ln R_0}{R_{45} - R_0} \right] \times \left[ \frac{C_{A45} \cdot C_{A0}}{t_{45} - t_0} \right]$$

Donde R es el PS de la raíz y  $C_T$  es el contenido total de B en la parte aérea, al inicio del tratamiento ( $t_0$ ) y al final ( $t_{45}$ ).

### 2.3.6. Histología

Se utilizaron plantas 2x y 4x de CC cultivadas *in vitro* (Experimento 1) durante 10 días. Se seleccionaron plantas cuya raíz fuera única, sin ramificaciones y con un crecimiento de trayectoria recta, y se lavaron con agua destilada.

### *2.3.6.1. Corte*

Manteniendo la planta sobre una superficie húmeda, se separó la raíz de la parte aérea realizando un corte con bisturí. Sobre una superficie humedecida, se realizaron manualmente cortes transversales de la raíz, lo más finos posibles, a diferentes distancias del ápice con ayuda de una lupa Leica MZ8. Los cortes se colocaron inmediatamente en un portaobjetos y se cubrieron con una gota de agua hasta el momento de realizar el transparentado.

### *2.3.6.2. Preparación de soluciones*

Para el transparentado se utilizó una disolución saturada de hidrato de cloral (cristalizado >98%, Sigma) en ácido láctico al 85% (Sigma). La tinción fluorescente se realizó con una disolución 0.1% (p/v) de hemisulfato de berberina (Sigma) en ácido láctico (85%). La tinción de contraste se realizó con una disolución de azul de anilina (Merck) al 0.5% (p/v) en agua destilada.

### *2.3.6.3. Transparentado y tinción*

El método utilizado está basado en el descrito por Lux et al. (2005) y consiste en aplicar una tinción fluorescente específica para suberina y lignina y una tinción de contraste que facilita la visibilidad de las bandas de Caspary localizadas en la exodermis y endodermis de la raíz.

Los cortes realizados se cubrieron con la solución de transparentado y los portaobjetos se introdujeron en una placa Petri cerrada y se incubaron durante 1 h en un baño de agua a 70 °C. Tras retirar la solución de transparentado con un papel (Kimwipes, Kimberly-Clark, US), las muestras se lavaron con agua destilada y se secaron con papel. Se aplicó la tinción fluorescente y se incubaron las muestras durante 1 h a 70 °C. Tras lavarlas y secarlas se aplicó la tinción de contraste y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Las muestras se enjuagaron y se montaron en agua para su observación.

### *2.3.6.4. Microscopía y fotografía*

Las muestras se examinaron utilizando un microscopio de fluorescencia Eclipse e600 (Nikon), con iluminación ultravioleta (UV-2A: ex 330-380 filter). Se tomaron fotografías utilizando una cámara DS-Ri1 (Nikon) y el software suministrado por el fabricante.

## **2.4. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de la varianza (ANOVA) y las medias se clasificaron utilizando el test de rango múltiple de Duncan para  $P \leq 0.05$ , con el software Statgraphics Plus, version 5.1 (Statistical Graphics, Englewood Cliffs).



Las interacciones entre efectos principales fueron únicamente consideradas en el caso de que los efectos principales fueran significativos de manera independiente, en caso contrario no fueron incluidos en el modelo (ni).

### 3. Resultados

#### 3.1. Experimento 1: ensayo *in vitro*

##### 3.1.1. Crecimiento de las plantas

El PS de los órganos de plantas cultivadas *in vitro* en condiciones normales (Ct) de B fue mayor en hojas, raíces y tallos (2.0, 2.1 y 1.3 veces, respectivamente) de plantas 4x que en los órganos correspondientes de las plantas 2x cultivadas en las mismas condiciones. En consecuencia, el PS de las plantas completas 4x fue, 1.8 veces mayor que en las 2x (**Tabla 4.2**).

**Tabla 4.2** Peso seco (mg) de los órganos y de las plantas completas, longitud de tallos y raíces (cm) y longitud específica de raíces relativa al peso seco ( $\text{m}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (SRL), de plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de citrange Carrizo cultivadas *in vitro* (Experimento 1) durante 45 días, en el medio nutritivo suplementado con 50  $\mu\text{M}$  (Ct) o 400  $\mu\text{M}$  (+B)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

	2x		4x		ANOVA					
	Ct	+B	Ct	+B	P	T				
Peso seco (mg)										
Hoja	15.9	b	12.6	b	32.9	a	36.5	a	***	ns
Tallo	6.1	b	5.5	b	12.8	a	15.7	a	***	ns
Raíz	13.7	b	11.2	b	17.8	a	21.5	a	**	ns
Planta completa	35.7	b	29.3	b	63.4	a	73.7	a	***	ns
Longitud (cm)										
Tallo	2.8	b	2.6	b	4.7	a	5.3	a	***	ns
Raíz	18.4		14.9		15.5		15.3		ns	ns
SRL ( $\text{m}\cdot\text{g}^{-1}$ )	13.5	a	13.5	a	8.8	b	7.4	b	***	ns

Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ). Los efectos de la ploidía (P) y el tratamiento (T), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican: \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; ns, no significativo. Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

Este efecto está probablemente relacionado con el tamaño más grande de las semillas y particularmente de los cotiledones de las plantas 4x respecto a las 2x, que incrementaría la cantidad de reservas disponibles para la germinación. El tratamiento con exceso de B (+B) no redujo el PS de los órganos de las plantas 2x ni de las 4x respecto al tratamiento Ct. Los tallos de las plantas 2xCt fueron un 40.5% más cortos que los de las plantas 4xCt y el tratamiento B+ no afectó a su longitud. Sin embargo, las raíces de las plantas de ambas ploidías tuvieron una longitud similar y el tratamiento +B no ejerció ningún efecto. Por tanto, la SRL ( $\text{m}\cdot\text{g}^{-1}$ ) fue más de un 50% mayor en plantas 2x que en plantas 4x con independencia del tratamiento de B aplicado (**Tabla 4.2**). Este dato indica que las raíces 4x fueron más gruesas que las 2x, como muestra la **Tabla 4.3**, donde se detallan varias medidas de la raíz realizadas al inicio del experimento 1. El diámetro del corte transversal de la raíz y su área a 2 cm del ápice, así como el área de córtex y el diámetro de la estela fueron, respectivamente, un 44.1%, 107.1%, 104.0%, 50.5% y 126.7% mayores en las raíces 4x que en las 2x.

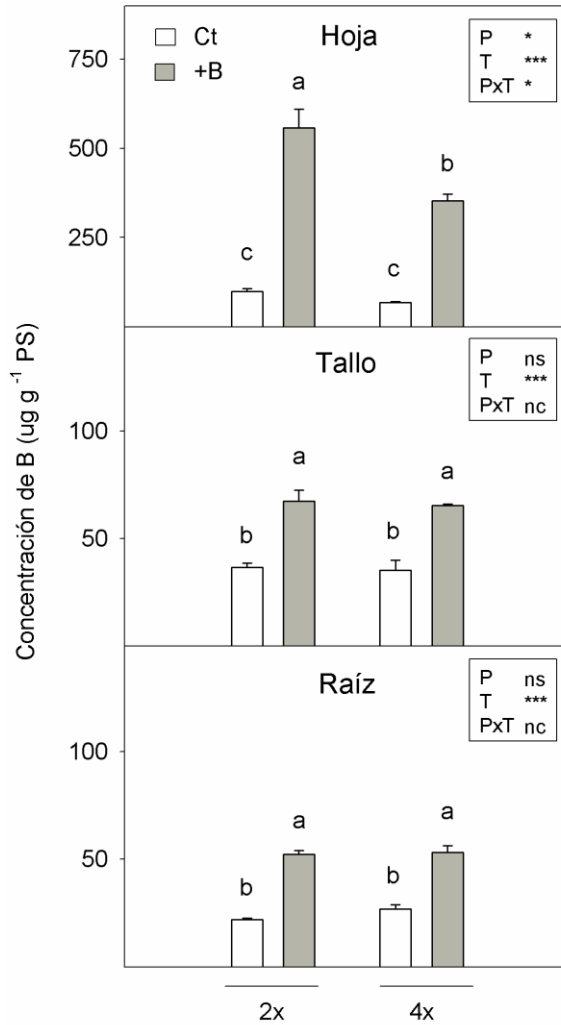
**Tabla 4.3** Medidas de la sección transversal a 20 mm del ápice de la raíz de plantas de citrange Carrizo diploides (2x) y tetraploides (4x) cultivadas *in vitro* (Experimento 1) durante 20 días.

	2x		4x		ANOVA
Diámetro total ( $\mu\text{m}$ )	593.5	b	855.3	a	***
Área total ( $\text{mm}^2$ )	0.28	b	0.58	a	**
Área del córtex ( $\text{mm}^2$ )	0.25	b	0.51	a	***
Diámetro de la estela ( $\mu\text{m}$ )	195.2	b	293.8	a	***
Área de la estela ( $\text{mm}^2$ )	0.03	b	0.07	a	***

Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ). Los efectos de la ploidía (P), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican: \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; ns, no significativo. Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

### 3.1.2. Concentración de B

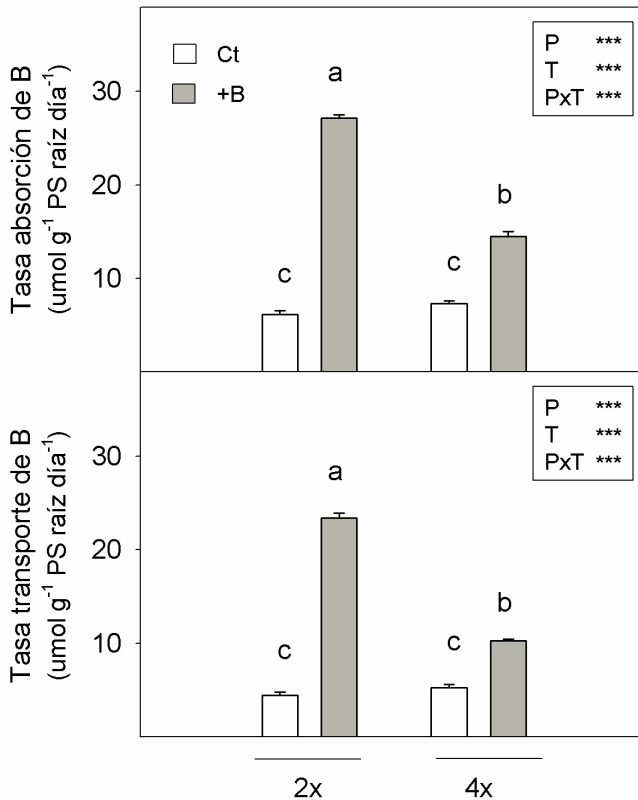
Las plantas cultivadas *in vitro* durante 45 días con el tratamiento +B (400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) tuvieron concentraciones de B en hojas, tallos y raíces más altas que las cultivadas con el tratamiento Ct (50  $\mu\text{M}$ ) (**Fig. 4.1**). Las hojas de plantas 2x+B acumularon concentraciones de B un 58% más altas que las 4x+B, mientras que los tallos y raíces de las plantas de ambas ploidías alcanzaron concentraciones similares de B (**Fig. 4.1**).



**Figura 4.1** Concentración de boro ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ), medida en plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de citrange Carrizo cultivadas *in vitro* (Experimento 1) durante 45 días, en el medio nutritivo suplementado con 50  $\mu\text{M}$  (Ct) o 400  $\mu\text{M}$  (+B)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ) y su error estándar. Los efectos de la ploidía (P) y el tratamiento (T), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; ns, no significativo; nc, no incluido en el modelo. Las letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

### 3.1.3. Tasas de absorción y transporte de B

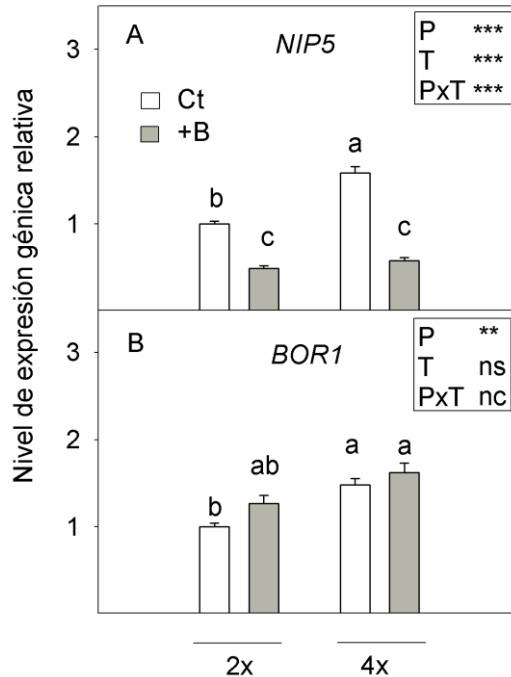
Las tasas estimadas de absorción y transporte neto de B a la parte aérea en las plantas 2xCt y 4xCt fueron similares (**Fig. 4.2**). En condiciones de exceso de B, ambas tasas aumentaron. Sin embargo, en plantas 2x+B la tasa de absorción aumentó 4.4 veces respecto al Ct y la de transporte 5.3 veces, mientras que en plantas 4x+B el aumento solo fue de 2.0 veces respecto al 4xCt en ambos parámetros (**Fig. 4.2**).



**Figura 4.2** Tasa de absorción de boro ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  PS raíz·día) y tasa de transporte de boro ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  PS raíz·día) medida en plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de citrange Carrizo cultivadas *in vitro* (Experimento 1) durante 45 días en el medio nutritivo suplementado con 50  $\mu\text{M}$  (Ct) o 400  $\mu\text{M}$  (+S)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ) y su error estándar. Los efectos de la ploidía (P) y el tratamiento (T), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican: \*\*\* $P \leq 0.001$ . Las letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

### 3.1.4. Análisis de la expresión génica

La **Fig. 4.3** muestra la expresión de genes involucrados en la homeostasis de B entre raíces de plantas 2x y 4x cultivadas durante 45 días en el medio control (Ct) o con exceso de B (+B). En condiciones Ct, las plantas 4x mostraron una cantidad relativa de transcrito del gen *NIP5* mayor que las 2x y la expresión se redujo en ambas ploidías bajo el tratamiento +B. Sin embargo el mayor descenso en la expresión en condiciones +B respecto a condiciones Ct se registró en las plantas 4x (63.3%), aunque la abundancia relativa de transcrito en raíces 4x+B fue similar a la de 2x+B (**Fig 4.3A**). La expresión de *BOR1* en las raíces cultivadas con el tratamiento Ct fue ligeramente más alta en raíces 4x que en las 2x. Sin embargo, su expresión no varió entre el tratamiento Ct y el +B (**Fig. 4.3B**).



**Figura 4.3** Expresión relativa de los genes **A) *NIP5*** y **B) *BOR1*** estimada mediante qRT-PCR en raíces de plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de citrange Carrizo cultivadas *in vitro* durante 45 días, en el medio suplementado con 50  $\mu\text{M}$  (Ct) o 400  $\mu\text{M}$  (+B)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Los valores son la media de 9 réplicas biológicas ( $n=9$ ) y su error estándar. Los efectos de la ploidía (P) y el tratamiento (T), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; ns, no significativo; nc, no incluido en el modelo. Las letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

### 3.1.5. Fracciones de B soluble e insoluble

En condiciones Ct, las hojas y raíces de plantas 2x y 4x presentaron concentraciones similares de B en la fracción soluble (**Tabla 4.4**). El tratamiento +B indujo el aumento pronunciado de la concentración de B en la fracción soluble de las hojas, que fue de 6.6 veces en plantas 2x y solo de 3.5 veces en plantas 4x. En las raíces también se observó un aumento de la concentración de boro, pero menos acusada; el incremento entre el tratamiento Ct y el +B fue de 2.1 veces en raíces 2x y de 2.8 en 4x. En la fracción insoluble de hojas, la concentración de B aumentó ligeramente con el tratamiento +B, de manera similar en ambas ploidías, mientras que en raíces no varió en función de la ploidía ni del tratamiento (**Tabla 4.4**).

**Tabla 4.4** Concentración de boro ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ) en las fracciones soluble e fibrosa de hojas y raíces, medida en plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de citrange Carrizo cultivadas *in vitro* (Experimento 1) durante 45 días, en el medio nutritivo suplementado con 50  $\mu\text{M}$  (Ct) o 400  $\mu\text{M}$  (+S)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

	2x		4x		ANOVA			
	Ct	+B	Ct	+B	P	T	PxT	
Hoja								
Soluble	72.3	c 475.6	a 77.8	c 273.0	b	*	***	*
Fibrosa	36.4	b 42.1	a 35.7	b 43.8	a	ns	*	ni
Raíz								
Soluble	17.4	b 36.7	a 13.4	b 37.8	a	ns	***	ni
Fibrosa	13.9	18.3	17.2	19.1		ns	ns	ni

Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ) y su error estándar. Los efectos de la ploidía (P) y el tratamiento (T), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican:  $*P \leq 0.05$ ;  $***P \leq 0.001$ ; ns, no significativo; ni, no incluido en el modelo. Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

### 3.1.6. Histología de las raíces

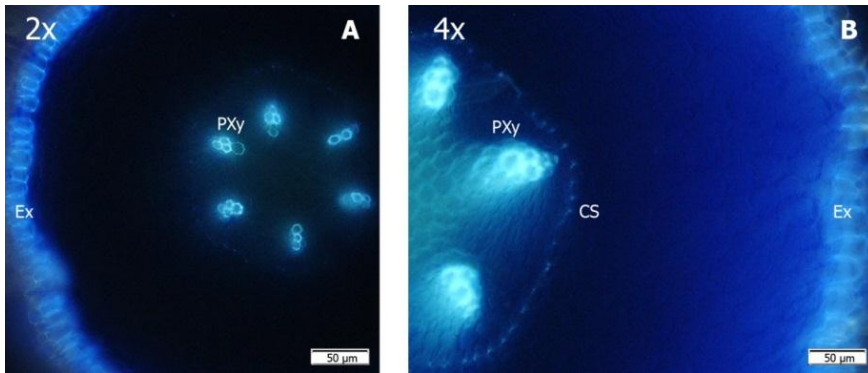
El patrón de desarrollo de la raíz en CC es similar al descrito en otras especies leñosas, en las que suelen distinguirse tres zonas. El ápice, de color blanco, contiene la zona meristemática y de elongación, donde el tejido aún permanece indiferenciado y las paredes celulares carecen de depósitos hidrofóbicos de suberina o lignina.

A continuación se observa la zona de maduración, en la que las paredes celulares completan su desarrollo y aparecen los depósitos de suberina o lignina. El tercer segmento es la zona de crecimiento secundario, que se distingue porque el cilindro vascular ya ha alcanzado un desarrollo completo.

Las raíces de CC desarrolladas *in vitro* en el experimento 1, mostraron claramente éstas tres zonas, pero se identificaron diferencias entre las raíces 2x y las 4x. Los ápices de las raíces 4x son visiblemente más gruesos y de menor longitud que los de raíces 2x. La transición de la zona apical blanca al segmento maduro lignificado tiene lugar en una distancia más corta y cercana al ápice en las raíces 4x que en las 2x, observándose diferencias estructurales y en el desarrollo del tejido. Para evaluar con más detalle éstas diferencias, se examinó la anatomía mediante microscopía, comparando segmentos de raíz, tomados a sucesivas distancias del ápice. Las secciones tomadas a distancias más cercanas al ápice (< 3 mm), ya fueran de raíces 2x o 4x, no mostraron fluorescencia, indicando que en ambas ploidías el tejido meristemático, carente de depósitos hidrofóbicos en las paredes celulares, abarca un segmento de, al menos, ésta longitud.

Las primeras estructuras identificables fueron la epidermis y los primeros vasos protoxilemáticos, que aparecieron en secciones de ambos genotipos tomadas a una distancia del ápice de entre 3 y 6 mm. En los segmentos de 6 a 9 mm, la epidermis, exodermis y protoxilema aparecen ya en raíces de ambas ploidías, pero el estadio de desarrollo observado fue más avanzado en las secciones 4x que en las 2x. Entre 9 y 12 mm de distancia al ápice, la banda de Caspary, localizada en la capa de células de la endodermis, era claramente identificable en las raíces 4x, tomando forma de puntos en torno al cilindro vascular (**Fig. 4.4B**), mientras que en las raíces 2x apenas se detectaba (**Fig. 4.4A**).

En las secciones tomadas entre 12 y 15 mm, el contorno delimitado por la banda de Caspary en la endodermis y el cilindro vascular ya aparecen diferenciados en ambos genotipos y entre 15 y 18 mm se observó en ellos un estado de desarrollo avanzado. Estas observaciones indican que la diferenciación de tejidos completa su proceso a una distancia más corta del ápice en raíces 4x que en las 2x. Se observó además, que la exodermis de las raíces 4x es más gruesa que la de las raíces 2x y contiene una deposición de suberina más gruesa.



**Figura 4.4.** Cortes de raíz tomados a 9-12 mm del ápice, realizados a mano en tejido fresco de raíces de plantas **A)** diploides (2x) y **B)** tetraploides (4x) de citrange Carrizo cultivadas *in vitro*, transparentadas en hidrato de cloral, teñidas con hemisulfato de berberina y azul de anilina y visualizadas mediante microscopía de fluorescencia con luz UV. PXY: Protoxilema, CS, Banda de Caspary, Ex, Exodermis.

## Experimento 2: ensayo en invernadero

### 3.1.7. Morfología de las plantas

Las plantas de CC 2x y 4x, de 6 meses de edad, cultivadas en invernadero con suministro de B normal (Ct), tuvieron un PS similar al inicio del experimento (**Tabla 4.5**). La arquitectura de la parte aérea tampoco fue distinta entre plantas 2x y 4x, que alcanzaron una altura y número de hojas similar (datos no presentados). Sin embargo, se encontraron diferencias en la morfología de las raíces debido a la ploidía. Las raíces 4x presentaron un grosor mayor, pero su longitud fue menor y presentaron ramificaciones menos abundantes que las 2x (**Fig. 4.5A** y **4.5B**). En consecuencia, el número total de ápices radiculares en las raíces 2x fue 2.9 veces mayor que en las 4x (**Fig. 4.5C**).

### 3.1.8. Acumulación de B en las hojas

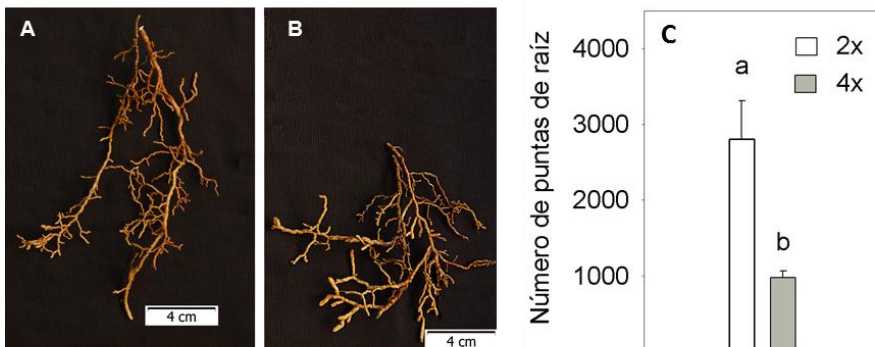
La **Fig 4.6** muestra la concentración de  $B_T$  medida en las hojas de plantas de CC 2x y 4x, de 6 meses de edad, cultivadas durante 5 semanas con diferente suministro de B añadido a la solución nutritiva de riego. Como era previsible, la concentración de B en las hojas aumentó con el incremento de la concentración de  $H_3BO_3$  suministrado (**Fig. 4.6A**), pero se observó que las plantas 2x acumularon en sus hojas más B que las 4x al suministrarse concentraciones de  $H_3BO_3$  entre 200  $\mu M$  y 800  $\mu M$ .



**Tabla 4.5** Peso seco (g) de los órganos y de las plantas completas de citrange Carrizo diploides (2x) y tetraploides (4x), cultivadas en invernadero (Experimento 2) durante 10 semanas, irrigadas con solución nutritiva suplementada con 50  $\mu\text{M}$  (Ct) u 800  $\mu\text{M}$  (+B) de  $\text{H}_3\text{BO}_3$

	2x		4x		ANOVA						
	Ct	+B	Ct	+B	P	T	PxT				
Peso seco											
Hoja	9.9	a <sup>x</sup> 8.5	a	11.8	b	12.0	b	*	ns	ni	
Tallo	28.2	a	19.0	b	35.9	a	34.3	a	*	*	ns
Raíz	17.1		15.2		20.2		15.0		ns	ns	ni
PSPF (1)	55.2	a	42.7	b	67.9	a	61.3	a	*	*	ns
PSPI (2)	20.3		20.3		18.1		18.1		ns	ns	ni
(1) - (2)	34.9	b	22.4	c	49.7	a	43.2	a	*	*	ns

<sup>x</sup>El peso seco de las hojas caídas se incluyó en cada grupo de plantas. PSPF: peso seco de las plantas completas al final del tratamiento; PSPI: peso seco de las plantas completas al inicio del tratamiento; (1)-(2): diferencia entre PSPF y PSPI. Los valores son la media de seis plantas (n=6). Los efectos de la ploidía (P) y el tratamiento (T), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican: \*  $P \leq 0.05$ ; ns, no significativo; ni, no incluido en el modelo. Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.



**Figura 4.5** Arquitectura de la raíz de **A)** citrange Carrizo 2x y **B)** citrange Carrizo 4x. **C)** Número de puntas de raíz en plantas de 6 meses cultivadas en invernadero. Los valores son la media de 3 plantas y su error estándar. Las letras indican diferencias significativas en el ANOVA para  $P \leq 0.05$ .

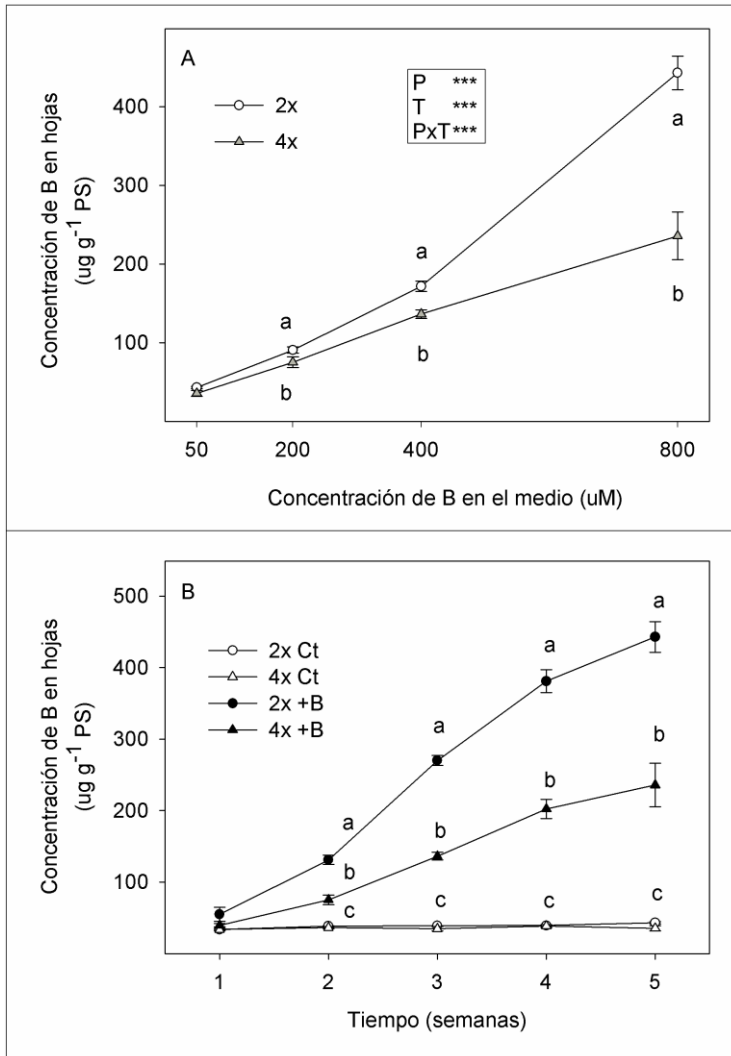
Transcurridas cinco semanas, la concentración de B en las hojas de plantas 2x regadas con 800  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  (+B) fue 10.3 veces más alta que en las 2x regadas con 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Ct), mientras que las plantas 4x incrementaron su concentración 6.6 veces entre éstos tratamientos (**Fig. 4.6B**). Entre plantas de ploidía distinta sometidas al tratamiento +B, la concentración de B en hojas fue un 46.8% más baja en plantas 4x+B que en las 2x+B.

### 3.1.9. Efecto en el crecimiento, daño foliar y abscisión

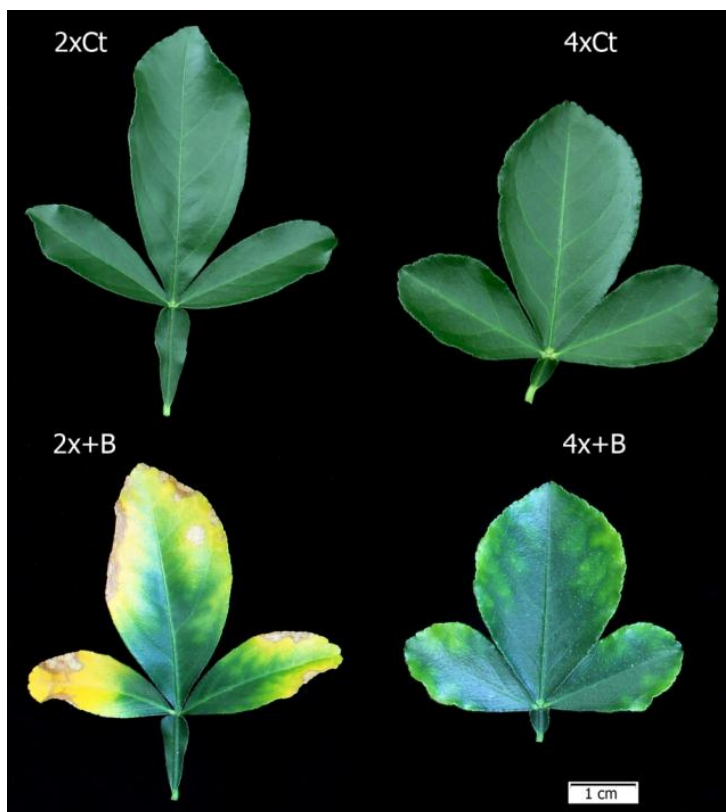
Las plantas tratadas con 800  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  (+B y Ct, respectivamente), se mantuvieron hasta 10 semanas para poder observar el desarrollo de los síntomas ocasionados por la toxicidad del tratamiento +B. La biomasa de las plantas 4x no resultó afectada, ya que el PS no varió entre plantas 4xCt y 4x+B, mientras que las plantas 2x+B sí que sufrieron una disminución de su PS respecto a las 2xCt (**Tabla 4.5**).

El crecimiento de las plantas, estimado como el incremento en PS durante el periodo experimental, fue similar entre plantas 4x+B y 4xCt, mientras que el incremento en plantas 2x+B fue un 36% menor que en las 2xCt. Por tanto, el tratamiento con exceso de B, afectó al crecimiento de las plantas 2x en mayor medida que al de las 4x. Las plantas 2x+B mostraron síntomas en las hojas, como consecuencia de la toxicidad por B, mucho más intensos que las plantas 4x+B (**Fig. 4.7**).

Estas diferencias en los síntomas fueron apreciables a simple vista (**Fig. 4.7**), especialmente por presentar las plantas 2x+B un área foliar dañada que se extendía 3.1 veces más que en las plantas 4x+B (**Fig. 4.8A**). Además, el exceso de B provocó la abscisión prematura de hojas en ambos genotipos, aunque la intensidad fue también mayor en plantas 2x, que alcanzaron porcentajes de abscisión 2.2 veces mayores que las plantas 4x (**Fig. 4.8B**).



**Figura 4.6 A)** Concentración de boro ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ) en hojas desarrolladas de plantas de seis meses de edad de citrange Carrizo diploide (2x) y tetraploide (4x), cultivadas en invernadero (Experimento 2) durante 5 semanas, irrigadas con solución nutritiva suplementada con 50, 200, 400 u 800  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . **B)** concentración de boro ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ) en hojas desarrolladas de plantas de seis meses de edad de citrange Carrizo 2x y 4x, cultivadas en invernadero (Experimento 2) durante 5 semanas irrigadas con solución nutritiva suplementada con 50  $\mu\text{M}$  (Ct) u 800  $\mu\text{M}$  (+B)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ) y su error estándar. Los efectos de la ploidía (P) y el tratamiento (T), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican: \*\*\*  $P \leq 0.001$ . Las letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

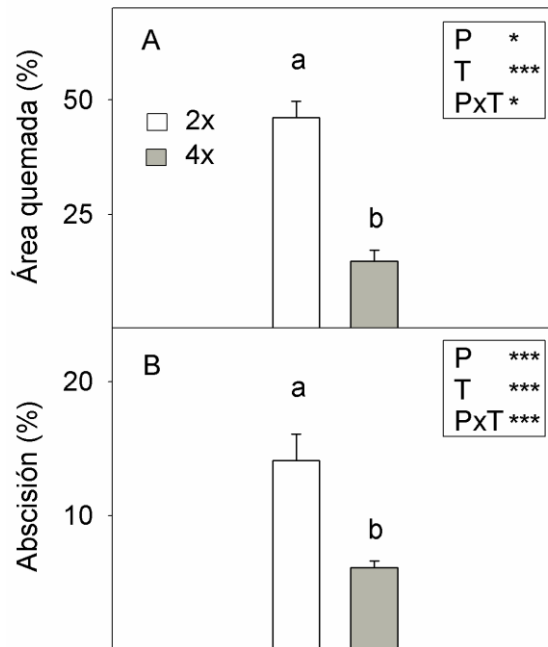


**Figura 4.7** Síntomas visibles de toxicidad por exceso de boro en hojas de plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de citrange Carrizo de seis meses de edad, cultivadas en invernadero (Experimento 2) durante 10 semanas, irrigadas con solución nutritiva suplementada con 50  $\mu\text{M}$  (Ct) u 800  $\mu\text{M}$  (+B)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

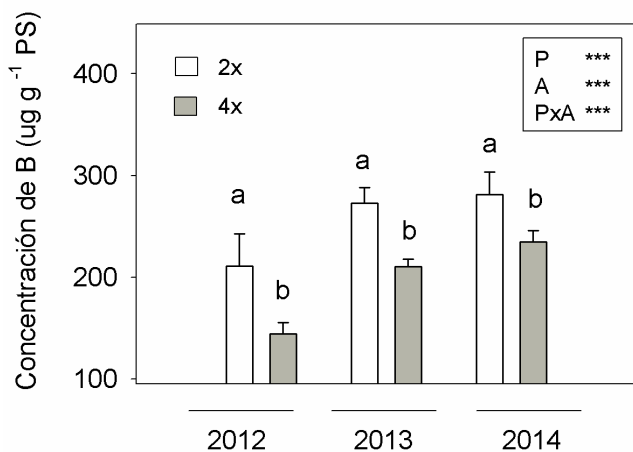
### 1.1. Experimento 3: ensayo en campo

En los árboles de naranjo ‘Valencia’ late (VL) cultivados en condiciones de campo la concentración de B, medida en hojas desarrolladas en primavera nueve meses después de la brotación, varió en función de la ploidía del portainjerto (**Fig. 4.9**). En el año 2012, las hojas de VL injertado sobre CC2x (VL/2xCC) tuvieron concentraciones de B 1.5 veces más altas que las hojas de VL injertado sobre CC4x (VL/4xCC).

Esta concentración más alta se mantuvo en los años siguientes, siendo 1.3 veces más alta en CC/2xVL en 2013 y 1.2 veces en 2014, respecto a CC/4xVL, aun cuando la concentración absoluta de B en los árboles fue en aumento con el transcurso de los años. Sin embargo no se observaron síntomas de toxicidad por B en ninguno de los 2 tipos de árbol. En el 6° año (2015) tras el establecimiento de la parcela, la altura de los árboles VL/4xCC fue un 10.8% menor que la de los árboles VL/2xCC y el volumen de copa un 42.2% más pequeño. La producción total por árbol en VL/4xCC fue un 53.3% inferior que en VL/2xCC, sin embargo la eficiencia productiva ( $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) no fue significativamente distinta entre árboles con ploidía del portainjerto diferente (**Tabla 4.6**).



**Figura 4.8 A)** Daño foliar (%) y **B)** abscisión foliar (%) en plantas diploides (2x) y tetraploides (4x) de citrange Carrizo de seis meses de edad, cultivadas en invernadero (Experimento 2) durante 10 semanas, irrigadas con solución nutritiva suplementada con 50  $\mu\text{M}$  (Ct) u 800  $\mu\text{M}$  (+B)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ) y su error estándar. Los efectos de la ploidía (P) y el tratamiento (T), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican:  $*P \leq 0.05$ ;  $***P \leq 0.001$ . Las letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.



**Figura 4.9** Concentración de boro ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ ) en hojas de la brotación de primavera de nueve meses de edad, tomadas durante los años 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> tras el establecimiento de la parcela de árboles de naranjo ‘Valencia’ late, injertados sobre citrange Carrizo diploide (2x) y tetraploide (4x) cultivados en condiciones de campo (Experimento 3). Los valores son la media de 12 plantas ( $n=12$ ) y su error estándar. Los efectos de la ploidía (P) y el año (A), determinados mediante ANOVA de doble vía se indican: \*\*\*  $P \leq 0.001$ . Las letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

**Tabla 4.6** Características de los árboles de seis años de edad de naranjo ‘Valencia’ injertados sobre citrange Carrizo 2x y 4x y cultivados en condiciones de campo (Experimento 3).

	2x		4x		ANOVA
Altura (m)	1.8	a	1.6	b	*
Volumen de copa ( $\text{m}^3$ )	3.1	a	1.8	b	**
Producción (kg)	15.4	a	7.2	b	***
Eficiencia ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ )	5.0		4.1		ns

Los valores son la media de 12 plantas ( $n=12$ ). El efecto de la ploidía determinado mediante ANOVA de doble vía se indica: \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; ns, no significativo. Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas.

#### 4. Discusión

En el primer experimento, las plantas 2x y 4x cultivadas *in vitro* mostraron un incremento en las concentraciones de B en todos sus órganos al suministrárseles un exceso de B en el medio de cultivo. Sin embargo, el B se acumuló preferentemente en las hojas, mientras que las concentraciones encontradas en raíces y tallos fueron relativamente bajas (**Fig. 4.1**). Estos datos coinciden con los aportados previamente por Papadakis et al. (2004), indicando que una gran parte del B absorbido por las raíces es transportado a las hojas por el flujo transpiratorio. Sin embargo, la retranslocación de éste elemento desde las hojas a otros órganos vía floema es muy limitada, por lo que su redistribución en la planta es escasa (Brown y Shelp, 1997). La inmovilización de B en las hojas se considera un mecanismo de tolerancia de las plantas frente a la toxicidad por exceso, ya que el crecimiento en las partes jóvenes de la planta no se altera, mientras que el B se acumula preferentemente en las hojas viejas (Nable et al., 1997). Dado que el floema no es una vía de transporte de B en condiciones de exceso, éste elemento queda retenido en los márgenes de las hojas maduras, produciendo quemaduras al acumularse. A pesar de ello, las hojas mantienen un área sana suficiente para realizar la función fotosintética (Nable et al., 1997). Curiosamente, la concentración de B en las hojas de plantas cultivadas en condiciones de exceso fue más alta en las plantas 2x que en las 4x, pero no hubo diferencias entre ploidías en la concentración de B en tallos y raíces (**Fig. 4.1**). El crecimiento no se vio afectado por el exceso de B (**Tabla 4.2**), coincidiendo con las observaciones previas realizadas por Papadakis et al. (2004). En consecuencia, se vio que las plantas 2x sometidas a un exceso de B tuvieron tasas de absorción y transporte a la parte aérea más activas que las 4x (**Fig. 4.2**). Hay tres posibles explicaciones para éstos resultados:

La existencia de diferencias entre ploidías en la regulación del transporte mediado por proteínas de membrana que facilitan la absorción y translocación de B a la parte aérea. La adquisición de B por las células de la raíz se asocia con la actividad de algunas acuaporinas, especialmente CiNIP5, que ha sido caracterizada en CC (An et al., 2012). El gen *CiNIP5* codifica para un canal de ácido bórico que facilita la absorción de B, aumentando su expresión en condiciones deficientes y reprimiéndose en condiciones de exceso.

Estas observaciones coinciden con el comportamiento descrito en *C. macrophylla* por Martínez-Cuenca et al. (2015), que sugieren que en condiciones de exceso de B disminuye la eficiencia de las raíces para absorberlo (**Fig. 4.3A**). De igual manera, se analizó la expresión del gen *BORI*, que modula el transporte de B en plantas a nivel de la entrada al xilema, regulando la translocación de las raíces a la parte aérea (Takano et al., 2002). En cítricos, se ha realizado recientemente la caracterización funcional del gen *CmBORI* en *C. macrophylla* (Cañon et al., 2013). La cantidad de transcrito de éste gen en las raíces no varía al aplicarse una concentración alta de B en el medio y la actividad del transportador permite acumular eficientemente el B en las hojas, aun cuando la cantidad en el medio externo sea excesiva (Cañon et al., 2013; Martínez-Cuenca et al., 2015).

Algunos estudios sugieren que existen genes homólogos a los mencionados que sí que se encuentran involucrados en la tolerancia a la toxicidad por B en otras especies. Schnurbusch et al. (2010) proponen que existe una relación entre la expresión de *HvNIP2:1* y la tolerancia a la toxicidad por B en cebada. Tanaka et al. (2011) sugieren que la degradación de *AtNIP5:1* desempeña un papel importante para la aclimatación de plantas de *A. thaliana* a condiciones de B elevado. Sutton et al. (2007) identifican *Bot1* como un ortólogo de *BORI* responsable de la tolerancia a la toxicidad por B en el cultivar de cebada Sahara, al detectar que el aumento de su expresión facilita el eflujo de B de las raíces al medio externo para limitar la acumulación en la parte aérea. Reid (2007) documenta que los cultivares de cebada y trigo que manifiestan tolerancia al exceso de B, son capaces de restringir la acumulación de B, tanto en la raíz como en la parte aérea, mediante la expulsión activa mediada por el aumento en la expresión de *HvBOR2* y *TaBOR2*, respectivamente.

Nuestros datos indican que ante un exceso de B en el medio externo, la expresión de los genes *CiNIP5* y *BORI* fue similar entre las raíces de plantas 2x y 4x, y por consiguiente, la ploidía no determina diferencias en el sistema de transporte activo de B desde las raíces a la parte aérea. Es, por tanto, improbable que la concentración de B más reducida que mostraron las plantas 4x+B sea debida a diferencias en los sistemas de absorción y transporte descritos.

Alternativamente, podría considerarse que existieran diferencias en la distribución celular del B que justificaran la tolerancia observada en plantas 4x.



Dadas las diferencias anatómicas entre algunos órganos de cítricos 2x y 4x (Allario et al., 2011), se contempló la posibilidad de que la tolerancia al exceso de B estuviera relacionada con una mayor proporción de B unido a las paredes celulares, que disminuyera la porción de B móvil disponible en los tejidos foliares. Estas dos formas de acumulación corresponden a las fracciones insoluble y soluble respectivamente. La mayor parte de la fracción soluble está constituida por B extraíble en agua, que se localiza en el apoplasto, mientras que el remanente soluble, que se extrae mediante disolventes orgánicos, corresponde al B localizado en el interior del protoplasto y que se encuentra unido a moléculas orgánicas (Liu et al., 2013). El B soluble es la fracción más abundante en plantas +B de ambas ploidías y es proporcional al B total absorbido por la planta. La fracción insoluble de B, unida a las pectinas de la pared celular (Liu et al., 2013), fue similar tanto en hojas como en raíces de ambas ploidías con independencia del tratamiento. Esto sugiere que existe una concentración crítica de B insoluble, a partir de la cual los sitios de unión quedan saturados. El remanente no unido quedaría en la fracción soluble y sería translocado a la parte aérea, formando parte del acúmulo de B causante de los daños por toxicidad. La capacidad de las paredes celulares para retener B permite a las plantas bloquear gran parte del elemento en forma insoluble, evitando su acceso al citoplasma y por tanto protegiendo las células del efecto tóxico.

Aunque recientemente se ha descrito que la insolubilización de B en el apoplasto es un mecanismo de tolerancia al exceso de B en cítricos (Martínez-Cuenca et al., 2015), la cantidad de B unido, en éste caso, a las paredes celulares en relación a su peso fue similar entre plantas 2x y 4x, tanto en las raíces como en las hojas (**Tabla 4.4**). Por tanto, la insolubilización no parece ser el mecanismo determinante de las diferencias encontradas entre los genotipos en el contenido soluble de B en las hojas.

Por último, en cuanto a la morfología y anatomía de las raíces, se estudió si las diferencias en éstos caracteres entre raíces 2x y 4x podrían afectar la absorción de B y su transporte. Las raíces 4x, que tienen menor SRL y mayor diámetro, mostraron una exodermis más gruesa que las 2x (**Fig. 4.4**). La maduración de la exodermis se completa con la deposición de capas de suberina, que aparece más acentuada en las raíces 4x que en las 2x. Este dato coincide con un trabajo previo, que indica que aquellos portainjertos de cítricos con raíces de diámetro fino y alta SRL tienden a tener menos engrosada la exodermis (Eissenstat y Achor, 1999).

El desarrollo secundario de la pared celular exodérmica aumenta la resistencia al flujo de agua e iones, al bloquear los plasmodesmos y por tanto la vía simplástica que conecta entre sí las membranas plasmáticas de las células de ésta capa (Walker et al., 1984). En éstas condiciones, los accesos principales para el paso de agua e iones hacia el simplasto son las células pasaje de la exodermis, cuyas paredes no han sufrido desarrollo secundario (Walker et al., 1984). También se ha descrito que la conductancia hidráulica radial es inversamente proporcional al grosor del cortex de la raíz (Huang y Eissenstat, 2000).

Dadas las características de la exodermis y el córtex de las raíces 4x, éstas pueden imponer mayor resistencia al movimiento radial de agua y solutos que las 2x, lo que en parte explica las diferencias observadas entre plantas 2x y 4x en la absorción de ácido bórico. Sin embargo, la mayor parte del agua y solutos se absorben a través del ápice de la raíz en crecimiento, ya que el resto de la superficie de la raíz en especies leñosas se encuentra lignificada y/o suberificada. Por tanto, las diferencias morfológicas y anatómicas en los ápices radiculares entre los genotipos estudiados podrían determinar cambios en la absorción y transporte de ácido bórico. Habitualmente se considera que la mayoría del ácido bórico absorbido viaja por vía apoplástica a través del córtex hasta alcanzar la banda de Caspary y ésta estructura es rebasada a través del citoplasma de las células endodérmicas. Sin embargo, la capacidad de transporte, tanto de influjo como de eflujo, de ácido bórico a través del plasmalema de estas células, probablemente no es suficiente para realizar la carga al xilema de ácido bórico que las plantas necesitan.

La banda de Caspary formada en la estructura de las paredes celulares radiales y transversales de las células endodérmicas al depositarse suberina y lignina, se encuentra presente a lo largo de la raíz, exceptuando los primeros mm de la zona apical en crecimiento. En la porción inmediatamente distal, se desarrolla la banda coincidiendo con la maduración del protoxilema (Peterson y Lefcourt, 1990). Por tanto, a una distancia variable del ápice, las raíces desarrollan una capa de suberina en la cara interna de la endodermis, que crea una estructura lamelar que aísla los protoplastos del apoplasto. Se cree que la presencia de suberina lamelar evita la entrada de solutos apoplásticos en la endodermis. En consecuencia, una alta proporción de flujo apoplástico de agua y solutos debe entrar por el ápice de la raíz, que carece de banda de Caspary (Enstone y Peterson, 1992).

Este acceso de solutos al xilema se ha descrito para el  $\text{Ca}^{2+}$  y es el modo por el cual las raíces pueden satisfacer la demanda de la planta sin alterar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (White, 2001).

Es muy probable que el ácido bórico tenga el mismo acceso que éste ión, ya que en otros aspectos el comportamiento en la planta del  $\text{Ca}^{2+}$  y del ácido bórico son muy parecidos. En las raíces 4x, la formación de la banda de Caspary endodérmica parece comenzar más tempranamente que en las 2x (**Fig. 4**) y por tanto la deposición de lignina y suberina en raíces 4x aparece a menor distancia del ápice que en las 2x. Esta característica, junto con la reducida conductancia hidráulica de agua y solutos que ha sido atribuida a las raíces 4x, podría determinar su baja capacidad de absorción y transporte de agua de las raíces a las hojas.

El experimento 2 confirma la mayor tolerancia de las plantas 4x respecto de las 2x, ya que estas acumularon 1.9 veces más B en las hojas que las 4x. En las condiciones de éste experimento, el PS de las plantas 2x se redujo con el tratamiento de 800  $\mu\text{M}$  de ácido bórico, mientras que esto no sucedió en las plantas 4x sometidas al mismo tratamiento (**Tabla 4.5**). Por tanto, las plantas 2x sometidas al experimento en invernadero mostraron un comportamiento diferente, en lo referente al crecimiento, que las plantas 2x sometidas al experimento *in vitro* (Experimento 1), en el cual, el PS de las plantas no se vio afectado por el tratamiento. Esta aparente contradicción tiene explicación al considerar la diferencia entre los dos experimentos en el tiempo de exposición de las plantas al tratamiento, que fue de 10 semanas en el experimento 2 y de 45 días en el 1. Además, la concentración de ácido bórico utilizada en la solución nutritiva del tratamiento +B en invernadero fue más alta (800  $\mu\text{M}$ ) que la utilizada en el tratamiento *in vitro* (400  $\mu\text{M}$ ).

La susceptibilidad al exceso de B también se manifestó en el daño foliar y la abscisión, que fueron mucho más intensos en las plantas 2x que en las 4x sometidas al tratamiento +B (**Fig. 4.8**). Las diferencias descritas en la concentración foliar de B, el daño foliar y la abscisión que se encontraron entre los genotipos 2x y 4x en respuesta al exceso de B, pueden deberse, en parte, a las diferencias encontradas en el sistema radicular. Las plantas 2x tienen 2.9 veces más ápices que las plantas 4x y tienen por tanto mayor número de puntos de entrada libre para la absorción de ácido bórico (**Fig. 4.5**). Se ha propuesto también que algunos iones alcanzan el xilema por vía apoplástica cuando las raíces laterales emergen, ya que durante su formación, la endodermis ha de dividirse y las nuevas paredes celulares también carecen de banda de Caspary (Peterson y Lefcourt, 1990; White, 2001).

Sin embargo ésta vía es solamente temporal, hasta que se depositan las bandas de Caspary en las raíces incipientes que quedan rápidamente recubiertas de igual manera que las raíces de las que proceden (White, 2001). En consecuencia, tal y como sucede con los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , el transporte de ácido bórico mediado por el flujo apoplástico en éstos puntos podría ser significativamente mayor mientras las raíces secundarias se encuentran penetrando la endodermis para emerger.

Por último, se llevó a cabo un experimento en condiciones de campo, en el que árboles de naranjo ‘Valencia’ late (VL) injertados sobre portainjertos 2x o 4x de citrange Carrizo (CC) se regaron con aguas que contenían un exceso de B (Experimento 3). Se realizó un seguimiento de la concentración de B en las hojas durante 3 años para confirmar en campo, la capacidad de las raíces 4x de excluir el B de las hojas. Como era de esperar, los resultados muestran que los árboles VL/4xCC tuvieron concentraciones de B más bajas en las hojas que los VL/2xCC durante todos los años del muestreo (**Fig. 4.9**). Los árboles VL/4xCC tuvieron un tamaño de copa inferior y producciones más bajas, aunque similar eficiencia productiva que los VL/2xCC (**Tabla 4.6**). Estas características no se relacionan con la concentración foliar de B, sino que son también consecuencia de las diferencias entre las raíces 2x y 4x de CC, ya que la conductancia hidráulica afecta en éste sentido el crecimiento y rendimiento productivo de los árboles (Syvertsen y Graham, 1985). En otro trabajo, realizado con lima Rangpur (*C. limonia* Osb.) 2x y 4x injertada con naranjo 2x, se propuso que la tetraploidía del portainjerto confería mayor tolerancia a la sequía, mediada por la expresión génica diferencial. La sobreexpresión de gen *CsNCEDI* proporciona un mayor aporte de ABA desde las raíces a la parte aérea (Allario et al., 2013). Por tanto, no debe descartarse que la mayor biosíntesis de ABA en las raíces 4x pueda ser también la causa de una regulación más activa del intercambio de gases en los árboles con portainjerto 4x.

En conclusión, las plantas 4x presentan una capacidad reducida de absorción y transporte de B respecto a las 2x, que da lugar a una concentración de B en las hojas más baja. Este efecto parece ser consecuencia de las diferencias morfológicas e histológicas identificadas en las raíces.

# La tolerancia a la clorosis férrica no se modifica en portainjertos de cítricos autotetraploides

## 1. Introducción

El hierro es un micronutriente esencial para las plantas e interviene en algunas funciones vitales como la respiración y la fotosíntesis, participando en el transporte de electrones mediante reacciones redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ . Pese a ser un elemento relativamente abundante en muchos suelos de cultivo, su absorción por parte de la planta se ve frecuentemente dificultada por algunas propiedades del suelo. Para vencer las condiciones adversas, las plantas han desarrollado mecanismos adaptativos que aumentan su absorción con objetivo de evitar la deficiencia. Las especies dicotiledóneas y las monocotiledóneas no herbáceas activan la estrategia I para la movilización y absorción de hierro (Marschner y Römheld, 1995; Schmidt, 1999; Kim y Guerinot, 2007), que consiste en las siguientes etapas: (1) excreción de protones ( $\text{H}^+$ ) a la rizosfera mediante la activación de  $\text{H}^+$ -ATPasas, localizadas en la membrana de las células epidérmicas de la raíz (Rabotti y Zocchi, 1994; Rabotti et al., 1995; Dell'Orto et al., 2000) para reducir el pH de la solución del suelo e incrementar la solubilización de  $\text{Fe}^{3+}$  (Rabotti et al., 1995); (2) incremento de la actividad de la reductasa de quelato férrico (FC-R) localizada en la membrana plasmática que reduce  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  en la superficie de la raíz (Guerinot y Yi, 1994; Susín et al., 1996; Cohen et al., 1997; Robinson et al., 1999); (3) estimulación del transporte de  $\text{Fe}^{2+}$  en la raíz a través de las membranas celulares mediante la activación de los transportadores regulados por hierro (IRT) (Eide et al., 1996).

El desarrollo de herramientas genómicas ha contribuido también a la comprensión de los procesos metabólicos y moleculares que intervienen en la absorción de hierro en las plantas.

En relación a la liberación de protones, se han caracterizado algunos genes que codifican para  $H^+$ -ATPasas reguladas por hierro (Santi and Schmidt, 2009). Las enzimas FC-R, se encuentran codificadas en genes de la familia *FRO* (Jeong y Connolly, 2009), que ya han sido identificados en *Arabidopsis* (Robinson et al., 1999), guisante (Waters et al., 2002), tomate (Li et al., 2004), pepino (Waters et al., 2007) y *Medicago truncatula* (Andaluz et al., 2009). El gen *FRO2* se considera el principal responsable de la actividad FC-R inducida por deficiencia de hierro (Robinson et al., 1999) y su sobreexpresión confiere tolerancia a ésta condición (Connolly et al., 2003). Los genes *IRT* codifican proteínas pertenecientes a la familia ZIP de transportadores de zinc en *Arabidopsis* (Eide et al., 1996). Entre ellos, el *IRT1* codifica para una proteína de la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz, cuya expresión, inducible por la deficiencia de hierro, promueve la actividad del principal transportador para la absorción de hierro del suelo (Connolly et al., 2002; Vert et al., 2002). El gen *IRT2*, que codifica para una proteína cuya localización e inducción son similares al anterior, parece desempeñar un papel diferente (Vert et al., 2001; Vert et al., 2009). Se han encontrado ortólogos a éstos genes en muchas otras especies como tomate (Eckhardt et al., 2001), guisante (Cohen et al., 2004), pepino (Waters et al., 2007), arroz (Bugchio et al., 2002), cacahuete (Ding et al., 2010) y tabaco (Enomoto et al., 2007).

Otro aspecto a considerar es la localización del hierro absorbido en las plantas. Se ha propuesto que el apoplasto de la raíz podría actuar como almacén (Bienfait et al., 1985) y que la capacidad de retranslocación del hierro almacenado podría ser un factor determinante de las diferencias en la tolerancia a la deficiencia de hierro en algunas especies como la soja (Longnecker y Welch, 1990).

La deficiencia en hierro afecta a la mayoría de los cítricos cultivados en la cuenca mediterránea, que frecuentemente desarrollan clorosis férrica, cuyos síntomas principales son el amarilleamiento intervenal de las hojas, el decaimiento del crecimiento vegetativo y del rendimiento productivo y la baja calidad de la fruta. El contenido alto en carbonatos, característico de los suelos mediterráneos, genera condiciones alcalinas que reducen la disponibilidad de hierro (Hell y Stephan, 2003). El sistema más empleado para prevenir la clorosis férrica en frutales es la utilización de portainjertos tolerantes (Molassiotis et al., 2006; Ksouri et al., 2006; Ksouri et al., 2007; Jiménez et al., 2008; Jiménez et al., 2011).

Los cítricos injertados en muchos de sus portainjertos comerciales no se comportan adecuadamente para su cultivo en suelos con contenidos altos en carbonatos (Castle et al., 2009). En las áreas cítricas propensas a inducir clorosis férrica, la elección de un portainjerto tolerante a suelos calizos es fundamental para lograr un aprovechamiento óptimo, pero en la citricultura española, las opciones son muy limitadas (véase apartado I-2.3.1). Por ello, numerosos estudios se han centrado en evaluar la tolerancia de los portainjertos de cítricos a ésta deficiencia (Chouliaras et al., 2004; Pestana et al., 2005; Castle et al., 2009; Pestana et al., 2011; Martínez-Cuenca et al., 2013d; Martínez-Cuenca et al., 2013b). El portainjerto más utilizado en España, el citrange Carrizo (*Citrus sinensis* L. Osb. × *P. trifoliata* L. Raf.), es sensible a ésta condición, mientras que los portainjertos tolerantes *C. macrophylla* W., limonero Volkameriana (*C. volkameriana* Pasq.) y mandarino Cleopatra (*C. reshni* Hort ex. Tan) presentan limitaciones en otros aspectos (véase apartados I-2.3.1.2, I-2.3.1.4 e I-2.3.1.5, respectivamente). La búsqueda de portainjertos tolerantes al cultivo en suelo calcáreo, que además reúnan las cualidades requeridas es, actualmente, un objetivo de mejora prioritario en portainjertos de cítricos (Dambier et al., 2011).

La contribución de cada uno de los mecanismos que componen la estrategia I de absorción de hierro parece diferir considerablemente entre especies y genotipos. En cítricos, se han realizado algunos estudios para tratar de identificar los mecanismos predominantes en cada especie (Treeby y Uren, 1993; Manthey et al., 1994; Chouliaras et al., 2004). En trabajos recientes, se evaluó la actividad de las enzimas y transportadores clave involucrados en el proceso y de los genes que los codifican en portainjertos de cítricos (Martínez-Cuenca et al., 2013d; Martínez-Cuenca et al., 2013a; Martínez-Cuenca et al., 2013c). La deficiencia en hierro aumentó la expresión del gen *HAI* pero no se observaron diferencias entre mandarino Cleopatra (MC) y citrange Carrizo (CC). La expresión de *FRO2* fue más alta en MC que en CC en condiciones deficientes, mientras que *IRT1* se expresó más activamente en CC que en MC y el *IRT2* no se modificó en condiciones de deficiencia. En consecuencia, la actividad H<sup>+</sup>-ATPasa fue más alta en plantas deficientes, pero no se encontraron diferencias entre genotipos. La actividad FC-R en condiciones deficientes fue más alta en MC que en CC y su acumulación en el apoplasto también fue mayor. Por tanto, la tolerancia a la clorosis férrica en estos portainjertos se debe principalmente al nivel de actividad de la FC-R, que es promovido por la expresión de *FRO2* (Martínez-Cuenca et al., 2013a).

Los cítricos autotetraploides (4x) difieren de sus ancestros 2x únicamente en contener un número duplicado de cromosomas somáticos, aunque pueden considerarse clones por ser su composición génica idéntica. En cítricos, los genotipos 2x apomícticos suelen generar de manera espontánea plantas autotetraploides procedentes de la duplicación cromosómica de células maternas nucelares, que a continuación dan lugar a embriones somáticos (Barrett y Hutchison, 1978; Aleza et al., 2011).

De entre las diferencias fenotípicas que se han identificado entre las plantas 2x y sus correspondientes autotetraploides (véase apartado I-3.2.2.2), destaca que las 4x tienen las hojas más gruesas y con un verdor más intenso, mientras que las raíces son más cortas y engrosadas y los árboles tienen una arquitectura más compacta (Barrett y Hutchison, 1978). Se ha propuesto que las diferencias en las raíces 4x respecto a sus correspondientes 2x podrían afectar a la absorción y transporte de elementos minerales. Estas diferencias hacen pensar en la evaluación de genotipos 4x para determinar su utilidad como portainjertos, ya que la fisiología de los árboles se encuentra profundamente influenciada por las características de la raíz. Concretamente, determinados genotipos 4x de algunas especies de portainjertos han mostrado, en estudios previos, que por sus características anatómicas y fisiológicas, podrían conferir a los árboles una mayor tolerancia a condiciones estresantes tales como la salinidad y la sequía (Saleh et al., 2008; Allario et al., 2011; Allario et al., 2013; Podda et al., 2013). Por ello, se ha propuesto que algunos clones autotetraploides de cítricos podrían utilizarse como portainjertos que aportaran nuevas características de interés, sin modificar aquellas propias de su versión 2x (Lee, 1988; Lee, 1990).

El objetivo de ésta investigación fue determinar si existen diferencias entre los portainjertos de cítricos 2x y sus versiones 4x que favorezcan una mejor tolerancia de las últimas a la deficiencia de hierro. Los portainjertos evaluados en éste trabajo fueron los más utilizados en la citricultura española, citrange Carrizo y *C. macrophylla*.

## **2. Material y métodos**

### **2.1. Material vegetal**

Las semillas se obtuvieron de frutos maduros, tomados del Banco de Germoplasma de cítricos del IVIA (Navarro et al., 2002; Navarro, 2015).



Se utilizaron los portainjertos citrange Carrizo diploide y tetraploide (CC2x, CC4x) y *Citrus macrophylla* 2x y 4x (CM2x, CM4x), que se corresponden con las entradas IVIA-387, IVIA-503, IVIA-288 e IVIA-518, respectivamente.

## 2.2. Cultivo en invernadero

Tras la extracción, las semillas se esterilizaron durante 15 min en una solución compuesta de NaClO al 0.12% y Tween-20 (Sigma-Aldrich Corp., EE.UU) al 0.01% (v/v), se enjuagaron en agua desionizada y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 20 h. Se trataron con Captan 50 (Bayer Cropscience, Alemania), se envasaron en bolsas de plástico y se conservaron a 4 °C. En el mes de diciembre se llevó a cabo la siembra, retirando previamente la testa de las semillas para facilitar la germinación. Se germinaron en el invernadero, utilizando un substrato previamente esterilizado con vapor a 100° C durante 1 hora, compuesto de turba, fibra de coco, arena y perlita (50:25:20:5) y con 1.38 g kg<sup>-1</sup> de superfosfato de cal.

Las plántulas se regaron dos veces por semana con una solución nutritiva compuesta de 5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.4 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.6 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 20 μM Fe-EDDHA, 7.6 μM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.50 μM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 50 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.50 μM MoO<sub>3</sub> y 54 μM MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, ajustada a pH 6.0 con 1 M KOH. La solución de riego se aplicó diluida 1:1 con agua desionizada durante las primeras 8 semanas. Las plantas se cultivaron en un invernadero equipado con luz suplementaria PAR de PPDF 250 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> suministrada para alargar el fotoperiodo hasta 16 h de luz. El intervalo de temperaturas se mantuvo entre 16° y 18° C durante la noche y entre 26° y 28° C durante el día y la humedad relativa se mantuvo aproximadamente al 80%.

## 2.3. Comprobación del nivel de ploidía

Las plantas de CC utilizadas en los experimentos se obtuvieron de semillas de los árboles 2x y 4x del banco de germoplasma. Se comprobó la ploidía de las plantas mediante citometría de flujo, utilizando una muestra de tejido foliar de 0.5 mm<sup>2</sup> aproximadamente junto con una muestra similar de plantas control 2x o 4x (Aleza et al., 2009). En una placa Petri, se depositó la muestra y una gota de la solución de aislamiento de núcleos (High Resolution DNA Kit Type P, solution A; Partec). Con ayuda de una cuchilla, se troceó la muestra finamente y se filtró para separar los núcleos a través de una malla de nylon de 30 μm. El tampón de aislamiento filtrado se recogió en un tubo nuevo y se añadió la solución de DAPI (4',6-diamine-2-phenylindol) (High-Resolution DNA Kit Type P, solution B; Partec) para teñir los núcleos.

Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras se introdujeron en el citómetro de flujo Ploidy Analyzer (PA; Partec), equipado con una bombilla de mercurio de alta presión HBO 100-W y los filtros KG1 y BG38. Los histogramas se analizaron con el software dpac, v2.0 (Partec), que a partir de los picos obtenidos y su coeficiente de variación, determina el nivel de ploidía de las muestras.

#### **2.4. Condiciones experimentales del ensayo en invernadero**

Se seleccionaron plantas uniformes, diploides y tetraploides de CC y CM, que se trasplantaron a macetas de 0.5 L, distribuyéndolas en 2 grupos con diferente sustrato. El sustrato normal consistió en una mezcla de turba y arena de sílice (2:3) con  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  al 0.4% (p/v) y el sustrato con carbonatos contenía además  $\text{CaCO}_3$  al 10% (v/v). Las plantas se aclimataron durante 4 semanas, manteniendo las condiciones de climatización y riego descritas en el apartado 2.2. A partir de entonces, el ápice de la planta se marcó para diferenciar el brote nuevo y se iniciaron los tratamientos de riego. Las plantas con sustrato normal se regaron con la solución nutritiva sin modificar (Fe-EDDHA 20  $\mu\text{M}$ ) y fueron el tratamiento control (Ct). El tratamiento clorosante (Clo) consistió en el cultivo de las plantas en sustrato calcáreo y su riego con una solución deficiente en hierro (Fe-EDDHA 2  $\mu\text{M}$ ) y con bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$  10 mM). Los tratamientos se aplicaron durante 10 semanas a las plantas 2x y 4x de CC y CM.

En total, 12 plantas de cada ploidía y tratamiento se distribuyeron al azar en el área destinada al experimento y se rodearon por una fila de plantas similares que no fueron incluidas en el mismo. De cada grupo, seis plantas se destinaron a la medida del crecimiento, el verdor y para llevar a cabo el análisis mineral. Con otro grupo de seis plantas de cada genotipo y ploidía se midió la actividad reductasa de las raíces. Estas plantas fueron cultivadas en sustrato normal y regadas durante 2 semanas con solución nutritiva normal, conteniendo Fe-EDDHA 20  $\mu\text{M}$  o con solución nutritiva sin hierro (Fe-EDDHA 0  $\mu\text{M}$ ) para inducir la actividad FC-R.

#### **2.5. Medida del crecimiento de las plantas**

Al finalizar el experimento se tomaron los nuevos brotes de las plantas, señalados al inicio del experimento con una anilla, se enjuagaron con agua destilada y se separaron las hojas del tallo. Los órganos se pesaron en fresco y fueron secados en un horno a 70 °C durante 48 h. Las muestras secas se pesaron para obtener la relación entre el peso fresco y el seco. El peso seco del brote completo (tallo y hojas) se utilizó como medida del crecimiento.

Las hojas secas de éstas muestras se destinaron al análisis del contenido en hierro descrito en el apartado 2.2.5.

### 2.6. Medida del verdor foliar

Los cambios en el verdor foliar se determinaron utilizando un aparato SPAD-502 (Konica, Minolta). Se midió el verdor al inicio (i) y al final (f) del tratamiento en las dos hojas más jóvenes pero completamente desarrolladas de la nueva brotación, realizando cinco lecturas consecutivas en diferentes zonas de la hoja, evitando el nervio central. El valor medio de las lecturas obtenidas en las dos hojas se consideró representativo de cada planta. Los datos se expresaron en forma de cociente entre las medidas final e inicial (f/i), de modo que los valores inferiores a 1 indican un descenso del verdor foliar durante el periodo experimental. Los valores de verdor registrados con éste método son proporcionales a la concentración foliar de clorofilas totales (Castle et al., 2009).

### 2.7. Actividad reductasa de quelato férrico en las raíces

La actividad FC-R se determinó midiendo la formación del complejo Fe(II)-BPDS a partir de Fe(III)-EDTA (Chaney et al., 1972). Se utilizaron seis plantas de cada genotipo cultivadas en las condiciones indicadas. De ellas se tomaron segmentos apicales de raíz (de unos 5-8 mm de longitud) con un peso fresco total de 20 mg, que se lavaron con una solución 0.2 mM de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  durante 5 min y después se incubaron en 10 mL de la solución nutritiva control suplementada con 0.3 mM de BPDS (Acros Organics, New Jersey, USA) y 100  $\mu\text{M}$  de Fe(III)-EDTA (Sigma). El pH de esta solución fue previamente ajustado a pH 5.5 con 5mM de MES-NaOH (Panreac, Barcelona, España). El recipiente utilizado se cubrió con papel de aluminio para no dejar penetrar la luz. Durante un periodo de incubación entre 1 y 6 h a 23 °C se tomaron alícuotas cada hora y se midió la absorbancia a 535 nm con un espectrofotómetro (Mikrowin 2000, Asys, Eugendorf, Austria). El BPDS forma un complejo rojo soluble en agua con el  $\text{Fe}^{2+}$  y solo un débil complejo con el  $\text{Fe}^{3+}$ . La cantidad de hierro reducido se calculó a partir de la concentración del complejo  $\text{Fe}^{2+}$  (BPDS) utilizando un coeficiente de extinción de  $22.14 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$  y se expresó en  $\text{nmol Fe}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PF raíz} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 2.8. Muestreo foliar en campo

La parcela experimental se localizada en Elche (Alicante) ( $38^\circ 14' 53.57''\text{N}$ ;  $0^\circ 41' 46.9''\text{W}$ ), región de clima semi-árido en la vega baja del río Segura (véase capítulo I).

En ella, se plantaron en el año 2009, árboles de naranjo ‘Valencia’ late (VL) (*C. sinensis* (L.) Osb.), injertados sobre CC y CM 2x y 4x. El suelo de la parcela, en sus primeros 50 cm de profundidad, posee una textura franco arcillosa (USDA) y un pH extremadamente básico (> 8.0) debido al alto porcentaje de caliza activa (6.4%) procedente de materiales carbonatados de origen sedimentario, que constituyen un 32.7% de la composición mineral del suelo. El marco de plantación establecido fue de 5 × 5 m y los árboles se distribuyeron en tres bloques al azar, conteniendo cada bloque dos unidades experimentales con 4 árboles representantes de cada ploidía situados en los vértices de un cuadrilátero. Cada bloque experimental se encontraba separado de los adyacentes por una fila de árboles que no formaron parte del experimento.

Las plantas se cultivaron siguiendo los estándares locales de fertirrigación y control de plagas. Se tomaron muestras de hojas de primavera de ramas sin fructificación en el mes de noviembre de los años 2012 y 2013. Cada muestra consistió en un *pool* de seis hojas tomadas al azar de alrededor de la copa de cada uno de los 4 árboles de naranjo ‘Valencia’ late (VL) injertado sobre CC o CM en sus variantes 2x y 4x (VL/2xCC, VL/4xCC, VL/CM2x y VL/CM4x respectivamente). Las muestras se sometieron a análisis elemental para determinar la concentración de hierro total.

### **2.9. Determinación del contenido en hierro total**

Las muestras foliares procedentes del ensayo en invernadero y de la parcela experimental (véase apartados 2.5 y 2.8 respectivamente) se sometieron a un análisis de la concentración de hierro total. Para ello se lavaron en una solución de agua destilada y detergente no iónico TWEEN 20 (Sigma-Aldrich Co.) al 10% (p/v), se desecaron en un horno de aire caliente (Mettler co., Germany) a 65 °C durante 48 h y se molieron. A continuación las muestras se calcinaron en un horno mufla a 550 °C durante 12 h. El hierro se extrajo con ácido nítrico al 2% (Hiperpur Panreac, Fe < 1 ppb) en un baño ultrasónico (Fungilab, España) durante 30 min de incubación a 40 °C. Las concentraciones totales de hierro se midieron mediante espectrometría de absorción atómica en un ASS Analyst200 (Perkin Elmer, USA).

### **2.10. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de la varianza (ANOVA) y las medias se clasificaron utilizando el test de rango múltiple de Duncan para  $P \leq 0.05$ , con el software Statgraphics Plus, version 5.1 (Statistical Graphics, Englewood Cliffs).

### 3. Resultados

#### 3.1. Crecimiento, verdor foliar y concentración de hierro

En condiciones de suficiencia de hierro (Ct), el crecimiento del brote desarrollado durante el experimento, fue en torno a un 20% mayor en CM respecto a CC. En condiciones clorosantes (Clo), el crecimiento del brote se redujo en todos los genotipos en proporciones semejantes (en torno a un 70% respecto al tratamiento Ct). No se encontraron diferencias en el crecimiento del brote entre plantas del mismo genotipo pero distinta ploidía, con independencia del tratamiento considerado (**Tabla 5.1**).

**Tabla 5.1** Crecimiento (PS, g) en plantas de citrange Carrizo (CC) y *C. macrophylla* (CM) diploides (2x) y tetraploides (4x) cultivadas en condiciones de invernadero durante 7 semanas en condiciones de hierro suficiente (Ct: Fe-EDDHA 20  $\mu$ M) y en condiciones clorosantes (Clo: solución Fe-EDDHA 2  $\mu$ M y NaHCO<sub>3</sub> 10 mM; sustrato 10% CaCO<sub>3</sub>).

	CC2x	CC4x	CM2x	CM4x
Ct	1.36 a	1.37 a	1.76 b	1.88 b
Clo	0.42 a	0.39 a	0.56 b	0.61 b

Valores medios (n=6). Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  obtenidas en el test de rango múltiple de Duncan.

El verdor foliar relativo al inicio (SPAD f:i) fue, en condiciones control, más alto en CM que en CC, con independencia de la ploidía (**Tabla 5.2**). El descenso del verdor en las plantas Clo fue mayor en CC2x que en CC4x, mientras que fue menos acusado en CM2x que en CC y no hubo descenso del verdor en CM4x. La concentración de hierro foliar en los brotes desarrollados durante el experimento, fue similar entre CC y CM en condiciones de hierro suficientes (Ct) (**Tabla 5.3**). En las plantas sometidas a condiciones deficientes (Clo), la concentración de hierro foliar descendió drásticamente en todos los genotipos, poniéndose de manifiesto el poder clorosante del tratamiento aplicado.

Los plantas de CM (2x y 4x) sometidas al tratamiento Clo, mantuvieron niveles de hierro foliar en el brote más altos que las de CC, lo que indica una mayor tolerancia a la clorosis férrica. No hubo diferencias significativas en el hierro foliar entre las plantas 2x y 4x de ambas especies.

**Tabla 5.2** Verdor foliar (SPAD f:i) en plantas de citrange Carrizo (CC) y *C. macrophylla* (CM) diploides (2x) y tetraploides (4x) cultivadas en condiciones de invernadero durante 7 semanas en condiciones de hierro suficiente (Ct: Fe-EDDHA 20  $\mu\text{M}$ ) y en condiciones clorosantes (Clo: solución Fe-EDDHA 2  $\mu\text{M}$  y  $\text{NaHCO}_3$  10 mM; sustrato 10%  $\text{CaCO}_3$ ).

	CC2x	CC4x	CM2x	CM4x
Ct	0.84 a	0.92 a	1.11 b	1.21 b
Clo	0.30 a	0.46 b	0.70 c	1.10 d

Valores medios (n=6), las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  obtenidas en el test de rango múltiple de Duncan.

**Tabla 5.3** Concentración de hierro foliar (ppm PS) en plantas de citrange Carrizo (CC) y *C. macrophylla* (CM) diploides (2x) y tetraploides (4x) cultivadas en condiciones de invernadero durante 7 semanas en condiciones de hierro suficiente (Ct: Fe-EDDHA 20  $\mu\text{M}$ ) y en condiciones clorosantes (Clo: solución Fe-EDDHA 2  $\mu\text{M}$  y  $\text{NaHCO}_3$  10 mM; sustrato 10%  $\text{CaCO}_3$ ).

	CC2x	CC4x	CM2x	CM4x
+Fe	48.6 a	53.8 a	46.7 a	49.6 a
Clo	15.2 a	20.6 a	33.1 b	39.5 b

Valores medios (n=6), las letras diferentes indican en cada fila indican diferencias significativas en para  $P \leq 0.05$  obtenidas en el test de rango múltiple de Duncan.

### 3.2. Actividad reductasa de quelato férrico (FC-R)

Transcurridos 30 días tras el inicio del experimento en invernadero, se analizó la actividad FC-R de la raíz. Las plantas cultivadas en condiciones de hierro suficientes (Ct) tuvieron una actividad reductasa menor que las plantas sometidas al tratamiento sin hierro (-Fe) en todos los casos (**Tabla 5.4**), indicando que las condiciones experimentales aplicadas fueron inductoras de la actividad. El CC2x presentó un nivel constitutivo (Ct) de actividad FC-R más bajo que los demás genotipos. La eliminación de hierro del medio incrementó alrededor de unas 2.5 veces la FC-R en CC2x y unas 1.9 veces en CC4x. Los niveles constitutivos de FCR en CM fueron semejantes entre plantas 2x y 4x y sus incrementos en el tratamiento -Fe también fueron semejantes, oscilando en torno al 40%. En condiciones deficientes, se observó una actividad FC-R un 37% mayor en el CC4x respecto al CC2x, mientras que no hubo diferencias entre CM2x y CM4x.

**Tabla 5.4** Actividad del enzima reductasa de quelato férrico (FC-R, nmol Fe<sup>2+</sup>·g<sup>-1</sup>PS·h<sup>-1</sup>) en puntas de raíz fibrosa de plantas de citrange Carrizo (CC) y *C. macrophylla* (CM) diploides (2x) y tetraploides (4x) cultivadas en condiciones de invernadero durante 2 semanas en condiciones de hierro suficiente (Ct, Fe-EDDHA 20 µM) o ausente (-Fe, Fe-EDDHA 0 µM).

	CC2x	CC4x	CM2x	CM4x
Ct	384.2 a	675.4 b	627.8 b	521.6 b
-Fe	950.0 a	1299.0 b	932.4 b	956.0 b

Valores medios (n=6), las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  obtenidas en el test de rango múltiple de Duncan.

### 3.3. Concentración de hierro en naranjos ‘Valencia’ late

En la parcela experimental de naranjos ‘Valencia’ late (VL) injertados sobre CC o CM 2x y 4x, se observó una oscilación de la concentración foliar de hierro entre los años de muestreo (**Tabla 5.5**). Los árboles injertados sobre CM tuvieron concentraciones foliares de Fe más elevadas que los injertados sobre CC. No se observó una tendencia clara en cuanto a la concentración foliar de hierro en función de la ploidía, ya que las diferencias identificadas afectaron solamente a CC en uno de los años de estudio.

**Tabla 5.5** Concentración de hierro (ppm PS) en hojas de la brotación de primavera de nueve meses de edad, tomadas de árboles de naranjo ‘Valencia’ late (VL) de injertados sobre citrange Carrizo (CC) y *C. macrophylla* (CM) diploides (2x) y tetraploides (4x) en los años 3° (2012) y 4° (2013) tras el establecimiento de la parcela.

	VL/CC2x	VL/CC4x	VL/CM2x	VL/CM4x
2012	45.5 a	54.1 b	72.6 c	74.6 c
2013	44.5 a	48.9 a	57.9 b	55.8 b

Valores medios (n=12), las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  obtenidas en el test de rango múltiple de Duncan.





## 4. Discusión

En este experimento se ha estudiado el comportamiento ante un medio con fuerte poder clorosante de los portainjertos CC2x y CM2x y de sus variantes 4x. El estudio, que incluyó ensayos en invernadero y en condiciones de campo, evaluó el crecimiento de los brotes, la clorosis en las hojas, la concentración foliar de hierro y la actividad enzimática de la reductasa de quelato férrico (FC-R) de las raíces. Este tipo de estudio que combina varios ensayos se ha propuesto en trabajos recientes como el método más adecuado para determinar el nivel de tolerancia al déficit de hierro en portainjertos de cítricos (Castle et al., 2009; Pestana et al., 2011; Martínez-Cuenca et al., 2013c).

El portainjerto CM se considera muy tolerante a la clorosis férrica (Castle et al., 2009). En cuanto a la diferencia entre ploidías, las plantas CM4x tuvieron menor clorosis que las CM2x y mantuvieron su crecimiento más activo en condiciones clorosantes en el ensayo de invernadero. Sin embargo, no se observaron diferencias entre ellas en la concentración de hierro foliar en éstas condiciones ni en el ensayo de campo y la actividad FC-R tampoco fue distinta. El color más verde de los genotipos 4x de cítricos ha sido documentado en trabajos previos (Barrett y Hutchison, 1978) y se atribuye al mayor espesor del tejido foliar que determina un peso seco mayor por unidad de superficie (Syvertsen et al., 2000). Concretamente, el mesófilo foliar más grueso que caracteriza a los genotipos 4x de cítricos (Romero-Aranda et al., 1997), la mayor abundancia de cloroplastos por célula y la concentración de clorofila más elevada (Jellings y Leech, 1984; Warner et al., 1987; Romero-Aranda et al., 1997; Mathura et al., 2006), explicaría que las plantas 4x sean más verdes.

El portainjerto CC tiene una capacidad de tolerar la clorosis férrica intermedia comparado con otros portainjertos de cítricos e inferior a la de CM (Castle et al., 2009). Nuestros resultados muestran que CM mantuvo el verdor foliar más elevado que CC en el medio clorosante. Las plantas de CC2x y CC4x sometidas al tratamiento sufrieron un descenso del verdor mayor que CM. La concentración foliar de hierro en los brotes fue menor en CC2x y CC4x que en CM2x y CM4x, indicando que CM, con independencia del nivel de ploidía, es más tolerante a la clorosis férrica que CC. Entre CC2x y CC4x únicamente se encontraron diferencias en el verdor foliar, que se mantiene más intenso en CC4x, mientras que el crecimiento y la concentración foliar de hierro en condiciones deficientes no fueron diferentes entre ploidías.

La actividad FC-R de CC4x fue más alta tanto en condiciones de suficiencia de hierro como en deficiencia. Sin embargo, la mayor actividad enzimática no se correlaciona con los niveles de hierro en el medio clorosante y ha sido también documentada en tetraploides de otras especies (Tan et al., 2015). En nuestro experimento serían indicadores de tolerancia a la clorosis férrica tanto el verdor foliar más intenso de las plantas 4x como la actividad FC-R más alta registrada en plantas CC4x. Sin embargo, al no contar con el respaldo del indicador principal, que es la concentración foliar de hierro, no podemos afirmar que la tetraploidía tenga un efecto en la tolerancia a la clorosis férrica.

En la parcela experimental de naranjos VL injertados sobre CC o CM 2x y 4x, la concentración foliar de hierro fue variable con los años, fenómeno atribuible al desarrollo de los árboles y a su entrada en producción. En general, la concentración de hierro fue más alta en VL/CM que en VL/CC, debido a la mayor tolerancia de CM respecto a CC a la clorosis férrica inducida por la presencia de carbonatos, con independencia de la ploidía. Los árboles con portainjerto CM no fueron distintos en función de la ploidía, mientras que en CC hubo diferencias ligeras entre ploidías en algunos años.

A pesar de los esfuerzos realizados en las últimas décadas, la distribución y el papel que desempeña el hierro en cada órgano vegetal no se conoce en profundidad, especialmente en especies leñosas. El indicador más comúnmente utilizado de manera concluyente para determinar el grado de tolerancia a la deficiencia en hierro es el análisis de la concentración foliar total en las hojas (Marschner y Römheld, 1995). Sin embargo, en muchos casos existe una concentración foliar de hierro adecuada que no se correlaciona con concentraciones de clorofila óptimas, fenómeno acuñado como ‘paradoja del hierro’ (Morales et al., 1998; Römheld, 2000) que sugiere que parte del hierro adquirido por las plantas deficientes, posiblemente sea inmovilizado y acumulado en formas no activas.

En conjunto, los resultados reflejan la mayor tolerancia al déficit de hierro de CM frente a CC, tal y como describe la bibliografía. Sin embargo, la tetraploidía no parece modificar la capacidad de las plantas de mantener elevada la concentración de hierro foliar en condiciones deficientes, aunque sí que modifica el verdor foliar y el crecimiento en CM y la actividad FC-R en CC.

Con estos datos, no podemos descartar que exista un efecto de la tetraploidía en la tolerancia. De manera que en los próximos años se continuará la evaluación de los árboles de la parcela para determinar a más largo plazo posibles diferencias.

# **Evaluación morfológica, fisiológica y genética de los portainjertos alotetraploides SMC-58 y SMC-73 obtenidos mediante la hibridación somática de citrange Carrizo (*Citrus sinensis* L. Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) y *C. macrophylla* Wester.<sup>4</sup>**

### **1. Introducción**

La cuenca mediterránea es una de las principales áreas productoras de cítricos para consumo en fresco y España es el primer país exportador (FAO, 2013). Sin embargo, esta región reúne algunas de las condiciones abióticas y bióticas más adversas para el cultivo de los cítricos. Entre los factores abióticos, destacan la salinidad de los suelos (véase apartado I-4.2) y la alcalinidad, debido a la naturaleza calcárea de la mayor parte de las zonas costeras (véase apartado I-4.1). Entre los factores limitantes de tipo biótico, la enfermedad transmisible por injerto de mayor importancia, tanto por los daños económicos como por los cambios que ha obligado a introducir en los sistemas de cultivo de las zonas afectadas, es la enfermedad de la tristeza (Cambra et al., 2000; Moreno et al., 2008), causada por el virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus Tristeza Virus*, CTV) (véase apartado I-2.2).

---

<sup>4</sup>El contenido de éste capítulo está en preparación para optar a su publicación en Plant Cell Reports:

Ruiz, M., Pensabene-Bellavia, G., Quiñones, A., Morillon, R., Primo-Millo, E., Navarro, L., Aleza, P. **Characterization of new allotetraploid Carrizo citrange + *Citrus macrophylla* somatic hybrids.**

Uno de los principales recursos que ha permitido establecer la citricultura superando éstas y otras limitaciones es la utilización de portainjertos tolerantes (véase apartados I-2 e I-5). Para afrontar la alcalinidad de los suelos, tradicionalmente se utilizaba el naranjo amargo (NA) (*Citrus aurantium* L.), tolerante a ésta condición, pero fue sustituido por otros portainjertos por su sensibilidad a la tristeza.

El mandarino Cleopatra (*C. reshni* Hort ex Tan.) y el *C. macrophylla* W. (CM) son tolerantes a los suelos calizos, mientras que el portainjerto más utilizado actualmente, el citrange Carrizo (*C. sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) (CC) es propenso a desarrollar clorosis férrica en éstos suelos (Castle et al., 2009). Su sensibilidad obliga a utilizar quelatos de hierro, que constituyen el 50% del gasto anual en fertilizantes en España, tanto en cítricos como en otros cultivos frutales y hortícolas (Sanz et al., 1992).

La salinidad del suelo puede remediarse realizando drenajes abundantes, pero ésta solución es inviable en zonas áridas donde la disponibilidad hídrica es limitada. Los cítricos son el cultivo perenne más sensible a esta condición (Maas, 1993), manifestando una reducción drástica del crecimiento, quemaduras y abscisión foliar como consecuencia de la acumulación de Cl<sup>-</sup> en las hojas (Levy y Syvertsen, 2004). La tolerancia de los árboles a la salinidad del suelo depende principalmente del portainjerto (Maas, 1993), cuya capacidad de restringir el transporte de iones a la parte aérea es heredable (Walker, 1986). El mandarino Cleopatra y CM están adaptados al suelo salino y manifiestan un transporte restringido de sales a la parte aérea, mientras que el CC es sensible a ésta condición y acumula niveles tóxicos más rápidamente que los anteriores (Gómez-Cadenas et al., 2003), de modo que el desarrollo de portainjertos capaces de tolerar la salinidad en el entorno de las raíces y de realizar un transporte reducido de las sales a la parte aérea es fundamental para la citricultura.

Los daños ocasionados por la tristeza dependen en parte de la variedad cultivada, del portainjerto sobre el que esté injertada, del aislado de CTV y de las condiciones ambientales (Ballester-Olmos et al., 1993). El CC es tolerante a la tristeza, mientras que CM tiene cierta sensibilidad a las razas de CTV presentes en España (Camba et al., 2000).

Disponer de portainjertos que reúnan las características requeridas es fundamental para promover una citricultura próspera y sostenible. Sin embargo, actualmente en España las opciones son muy limitadas y ninguno de los portainjertos disponibles en el mercado reúne todas las condiciones idealmente necesarias (véase apartado I-2.3).

Los más utilizados son CC y CM. El primero es muy valorado por favorecer la productividad de las variedades injertadas y la producción de frutos de tamaño y calidad organoléptica óptima. Además, confiere tolerancia a un espectro amplio de estreses abióticos y enfermedades incidentes en la citricultura española, entre los que destaca la tolerancia al CTV. El portainjerto CM induce a la variedad injertada características que contribuyen a rentabilizar las plantaciones como son el crecimiento vigoroso de los árboles, la entrada temprana en producción, la alta productividad y la excelente adaptación a suelos con alto contenido en caliza y salinidad. No obstante, es sensible al frío, moderadamente sensible a CTV y disminuye la calidad organoléptica del fruto. Estos portainjertos tienen, por tanto, características de interés complementarias.

Los programas de mejora tratan de reunir en un solo genotipo las resistencias a enfermedades y estreses abióticos necesarias. Es imprescindible procurar un buen comportamiento agronómico, adaptado a los requerimientos del área de cultivo, alto rendimiento productivo y buena calidad del fruto, requisito imprescindible para la producción destinada al consumo en fresco. El método empleado tradicionalmente para la mejora de portainjertos es la hibridación sexual, cuyas limitaciones inherentes a la biología reproductiva de los cítricos hacen muy complicado y largo el proceso (véase apartado I-3.2.2.4.2).

Alternativamente, la hibridación somática mediante fusión de protoplastos es una técnica biotecnológica que permite superar algunos de los inconvenientes de la hibridación sexual, como por ejemplo la obtención de híbridos somáticos (HS) de especies sexualmente incompatibles o de aquellos genotipos apomícticos cuya elevada poliembrionía dificulta el desarrollo y selección del embrión sexual (Louzada et al., 1993; Grosser et al., 1996b; Guo y Deng, 1999). Esta técnica se basa en el aislamiento y posterior unión de dos células no sexuales (somáticas) privadas de pared celular (protoplastos) para formar una única célula híbrida, denominada heterocarión, a partir de la cual se puede regenerar una planta completa debido a la totipotencia de las células embriogénicas utilizadas y al empleo de técnicas de cultivo *in vitro*. En cítricos se pueden regenerar plantas completas a partir de células procedentes de callos nucelares embriogénicos obtenidos a partir del cultivo de óvulos *in vitro* (Vardi et al., 1982; Kobayashi et al., 1983). En cítricos la obtención de callo embriogénico es posible únicamente a partir de genotipos apomícticos (Pérez et al., 1998).

Por tanto, en las hibridaciones somáticas mediante fusión de protoplastos se utilizan dos tipos de protoplastos: los que provienen de mesófilo foliar (para los cuales no se dispone de protocolos de regeneración de plantas mediante técnicas de cultivo *in vitro*) (Grosser et al., 2000) y los que se obtienen a partir de callo embriogénico, mantenido en forma de suspensión celular o en cultivo sobre medio sólido en placas de Petri. La totipotencia, aportada por éstos últimos a las células híbridas obtenidas tras la fusión, permite regenerar plantas enteras a partir de ellas. Por lo tanto, para establecer un programa de mejora mediante hibridación somática, es un requisito inicial disponer de un protocolo eficaz para la obtención de callos embriogénicos (Pérez et al., 1998). La inducción de callos embriogénicos es relativamente fácil en mandarino y en naranjo dulce (*C. sinensis* (L.) Osb.), mientras que es difícil de obtener en otros genotipos como el naranjo amargo, *P. trifoliata* y sus híbridos interespecíficos citrange y citrumelo (*C. paradisi* Macf. ‘Duncan’ × *P. trifoliata*). La obtención de callo embriogénico de estos híbridos interespecíficos, como se ha detallado anteriormente para el CC, es de gran interés para la mejora de portainjertos mediante hibridación somática (Dambier et al., 2011).

La hibridación somática mediante fusión de protoplastos permite obtener híbridos alotetraploides (HS), aunque es frecuente también la obtención de cíbridos (Grosser et al., 1996a). Los híbridos alotetraploides reúnen los genomas de los parentales utilizados, permitiendo la adición de caracteres dominantes complementarios con independencia de la heterozigosidad de los parentales (Ollitrault et al., 2000). Estos HS pueden resultar útiles directamente como portainjertos o como parentales para la obtención de híbridos tetraploides (4x) mediante hibridación sexual en programas de mejora de portainjertos de cítricos a nivel 4x (Grosser et al., 2000; Ollitrault et al., 2000; Dambier et al., 2011; Grosser y Gmitter, 2011).

En los trabajos de hibridación somática de cítricos no se utilizan agentes de selección que permitan identificar o regenerar únicamente las plantas que combinan los genomas parentales, por lo que es necesario analizar el origen genético de las plantas regeneradas a nivel nuclear y citoplasmático con marcadores moleculares. Generalmente, el análisis genético de las plantas regeneradas se realiza con un número reducido de marcadores nucleares (Guo et al., 2007; Dambier et al., 2011; Grosser y Gmitter, 2011;), sin procurar su distribución homogénea entre los diferentes grupos de ligamiento (GL) y por tanto éste análisis no permiten estudiar la estabilidad cromosómica de los HS.

Durante los últimos años, ha aumentado considerablemente el número de marcadores SSR (Simple Sequence Repeat), también llamados microsátélites (Ahmad et al., 2003; Chen et al., 2006; Barkley et al., 2006; Luro et al., 2008; Chen et al., 2008a; Ollitrault et al., 2010; Gulsen et al., 2010; Ollitrault et al., 2012a; Ollitrault et al., 2012b; Liu et al., 2013; García-Lor et al., 2013b; Biswas et al., 2014; Curk et al., 2015) y también el de los basados en polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP) (Jiang et al., 2010; Distefano et al., 2012; Ollitrault et al., 2012b; Bernardi et al., 2013; Cuenca et al., 2013a; García-Lor et al., 2013a; Curk et al., 2015; Guo et al., 2015). Éstos marcadores ofrecen un conjunto de características (alto polimorfismo, distribución aleatoria en el genoma, codominancia, reproducibilidad y especificidad) que los hacen adecuados para la caracterización de HS. Los marcadores SSR y SNP han demostrado su utilidad en numerosos estudios en cítricos para desarrollar el mapa genético de referencia (Ollitrault et al., 2012a), evaluar la diversidad genética (García-Lor et al., 2015), establecer las relaciones filogenéticas del germoplasma (Curk et al., 2016), determinar el mecanismo implicado en la formación de gametos no reducidos (Aleza et al., 2015; Cuenca et al., 2015) o para estudiar la estructura genética de poblaciones de híbridos triploides y optimizar los programas de mejora a nivel poliploide (Aleza et al., 2016). Los SNP, cuyo desarrollo se ha potenciado con la secuenciación masiva de genomas, pueden ser analizados con mayor agilidad que los SSR, mediante la tecnología KASPar (Kompetitive Allele Specific Polymerase chain reaction; LGC Genomics) (Cuenca et al., 2013a; Semagn et al., 2014). La reciente publicación del mapa genético de referencia de clementino (Ollitrault et al., 2012a), que contiene una alta densidad de marcadores SSR y SNP distribuidos homogéneamente en los nueve GL, posibilita la caracterización precisa y detallada de los HS.

Además del análisis molecular, es imprescindible la realización de evaluaciones fisiológicas y agronómicas exhaustivas que verifiquen las características de los HS, tanto para determinar su utilidad como parentales en programas de mejora como para evaluar su aptitud como nuevo portainjerto (Dambier et al., 2011). Para ésta evaluación, se requiere un elevado número de plantas. Sin embargo, los HS presentan inicialmente caracteres juveniles y la floración, fructificación y producción de semillas se alcanzan tras un periodo de ‘envejecimiento’, cuya duración mínima es de entre 5 y 8 años. Este largo periodo juvenil es el principal limitante temporal que retarda los programas de mejora de cítricos (Krajewski y Rabe, 1995) y que afecta especialmente a la evaluación de los HS como posibles portainjertos.

Para solventar este problema se utilizó un método de micropropagación vegetativa de HS de cítricos, descrito recientemente, que permite obtener eficientemente plántulas para su evaluación (Bordas et al., 2015).

En éste capítulo se analizó, mediante marcadores SSR y SNP, la constitución genética de dos HS obtenidos mediante fusión de protoplastos de CM y CC (Pensabene-Bellavia, 2009), se realizó un estudio morfológico de los híbridos, se evaluó su comportamiento fisiológico frente al estrés salino y la deficiencia de hierro y se determinó la respuesta de los HS a la inoculación con la raza agresiva de CTV T388. El objetivo fue realizar una caracterización precoz de estos HS para determinar su posible utilidad como portainjertos.

## **2. Material y métodos**

### **2.1 Material vegetal y cultivo de las plantas en invernadero**

Se utilizaron plantas 2x de CC y CM, obtenidas a partir de semilla procedente de árboles del Banco de Germoplasma (BG) de plantas libres de patógenos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (Navarro et al., 2002; Navarro, 2015) y plantas micropropagadas de los HS alotetraploides SMC-58 y SMC-73, obtenidos en el IVIA mediante fusión de protoplastos de callo embriogénico de CM y mesófilo de hoja de CC (Pensabene-Bellavia et al., 2015). Los HS se micropropagaron por Agromillora Research S.L. siguiendo la metodología descrita por Bordas et al. (2015).

Las semillas de CC y CM se germinaron en el invernadero, utilizando un sustrato previamente esterilizado, compuesto de turba, fibra de coco, arena y perlita (50:25:20:5) y con  $1.38 \text{ g kg}^{-1}$  de superfosfato de cal. Los semilleros se regaron dos veces por semana con una solución nutritiva compuesta de 5 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1.4 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.6 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 20  $\mu\text{M}$  Fe-EDDHA, 7.6  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.50  $\mu\text{M}$   $\text{MMoO}_3$  y 54  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y ajustada a pH 6.0 con 1 M KOH. La solución de riego se aplicó diluida 1:1 con agua destilada durante las primeras 8 semanas. Tras este periodo, plantas uniformes procedentes de micropropagación y obtenidas de semillas, se trasplantaron a macetas de plástico de 0.5 L con sustrato compuesto por turba, fibra de coco, arena y perlita (40:25:25:10).



Las plantas se distribuyeron al azar en el área destinada a cada experimento y se rodearon por una fila de plantas similares, las cuales quedaron excluidas del experimento. Las plantas se cultivaron en un invernadero equipado con luz suplementaria para alargar el fotoperiodo a 16 h de luz, cuya densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPDF) fue de  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El rango de temperaturas osciló entre 16° y 18° C durante la noche y entre 26° y 28° C durante el día y la humedad relativa se mantuvo aproximadamente al 80%.

## 2.2 Caracterización genética

El análisis del genoma nuclear de los dos HS, sus parentales CM y CC y del callo embriogénico de CM utilizado en el proceso de fusión de protoplastos se realizó con 24 marcadores SSR y 60 marcadores SNP distribuidos en los nueve GL del mapa genético de clementino (Ollitrault et al., 2012a) (**Tablas 6.1a, 6.1b, 6.1c y 6.1d**). El genoma citoplasmático de los híbridos regenerados se caracterizó con tres marcadores mitocondriales InDel: *5/rrn18-1* (Duminil et al., 2002), *nad2/4-3* y *nad7/1-2* (Froelicher et al., 2011) y con cinco marcadores SSR cloroplásticos: NTCP7, NTCP9 CCMP2, CCMP5 (Cheng et al., 2005) y CCMP6 (Bryan et al., 1999; Weising y Gardner, 1999) (**Tabla 6.1d**). La extracción del ADN se realizó según el protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983) con pequeñas modificaciones.

### 2.2.1 Marcadores SSR

Las amplificaciones mediante PCR se llevaron a cabo en termocicladores Thermocycler ep gradient S (Eppendorf®, Germany) en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , con 0.8 U de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas®, USA), 10 ng de ADN molde, cebadores reversos wellRED (Sigma®, Germany) a una concentración de 0.2 mM, cebadores directos a la misma concentración y sin marcar, dNTPs a una concentración final de 0.2 mM cada uno y tampón de reacción cuyo stock 10x se compone de 750 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 0.0001% BSA. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de 30s a 94 °C, 1 min a la temperatura de anillamiento óptima para cada pareja de cebadores, 45 s a 72 °C y una elongación final de 4 min a 72 °C.

La resolución de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter Inc., USA). Los productos de PCR se desnaturalizaron inicialmente durante 2 min a 90 °C y posteriormente se inyectaron durante 30 s a 2 kV.

Finalmente, se llevó a cabo la separación de los fragmentos durante 35 min a 6 kV junto con un marcador de tamaño de 400 pb. Los electroferogramas se analizaron con el software GenomeLab™ GeXP v.10.0. Las dosis alélicas se calcularon siguiendo la metodología MAC-PR (microsatellite DNA allele counting peak ratio) descrita por Esselink et al. (2004) y validada en cítricos por Cuenca et al. (2011).

### 2.2.2 Marcadores SNP

El análisis genético de los marcadores SNP se llevó a cabo utilizando la tecnología KASPar adaptada al genotipado de SNP (LGCgenomics). Los cebadores utilizados fueron diseñados por LGCgenomics y son complementarios a las secuencias flanqueantes de cada locus SNP. El sistema KASPar está basado en la técnica FRET (Förster Resonance Energy Transfer), ya que utiliza dos cassettes que combinan un cebador específico de alelo marcado con un fluoróforo distintivo y un desactivador de la fluorescencia (quencher) que actúa mediante transferencia de energía de resonancia. En los cassettes, el fluoróforo y el quencher quedan separados al hibridar el cebador con el ADN del alelo a amplificar (Cuppen, 2007), emitiéndose una señal específica que es indicativa del alelo presente en la muestra. La señal normalizada de cada muestra se analizó en KBioscience y sus representaciones se visualizaron mediante SNPViewer software (KBioscience Ltd., UK). La dosis alélica de los HS heterocigóticos se determinó a partir de las señales relativas de los alelos siguiendo la metodología descrita por Cuenca et al. (2013a).

### 2.2.3 Genotipado de los híbridos somáticos

La identificación de las configuraciones alélicas de los HS SMC-58 y SMC-73 se realizó a partir de los datos de genotipado obtenidos con los marcadores SSR y SNP utilizados. Para un marcador con configuraciones alélicas completamente diferentes ( $A_1A_2 + A_3A_4$ ,  $A_1A_2 + A_3A_3$ ), el genotipo del HS se anotó directamente a partir de los alelos observados. Cuando los parentales de los HS para un determinado marcador comparten uno de los alelos ( $A_1A_2 + A_2A_2$  o  $A_1A_2 + A_2A_3$ ), la configuración alélica de los HS se infirió a partir de las dosis alélicas estimadas para cada HS.

## 2.3 Caracterización morfológica

Se evaluaron 12 plantas de CC y CM, de 9 meses de edad cultivadas en invernadero en las condiciones citadas y 12 plantas de edad similar de los HS SMC-58 y SMC-73 cultivadas en las mismas condiciones.

Se midió la altura de las plantas, la longitud de los entrenudos y el número de hojas. En 3 hojas maduras de cada planta se midió el verdor foliar con un aparato SPAD (Minolta, Japan), tomando el valor medio de 5 disparos en cada hoja. De éstas mismas hojas se midieron sus dimensiones longitud (l) y anchura (a) del limbo del foliolo principal. Se calculó el índice foliar con la relación  $l/a$ , que es indicador de la forma de la hoja. Por último se realizó una descripción basada en los criterios del IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute).

#### **2.4 Evaluación de la tolerancia a la clorosis férrica**

Se seleccionaron 12 plantas uniformes de cada genotipo, evitando aquellas con ramificaciones laterales y se trasplantaron a macetas de 0.5 L, distribuyéndolas en 2 grupos con diferente sustrato. El sustrato normal consistió en una mezcla de turba y arena de sílice (2:3) con  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  al 0.4% (p/v) mientras que el sustrato clorosante contenía adicionalmente  $\text{CaCO}_3$  al 10% (v/v). Antes de comenzar el experimento, las plantas se aclimataron durante 4 semanas en el invernadero en el que se realizó el experimento, manteniendo las condiciones de climatización y riego descritas en el apartado 2.1. Las plantas se revisaron cada 3 días, retirando las brotaciones laterales para mantener su crecimiento estructurado en un único brote. A partir de entonces, el ápice de la planta se marcó con una anilla para diferenciar la biomasa desarrollada durante el experimento y se iniciaron los tratamientos de riego, que fueron aplicados cada 3 días. Las plantas con sustrato normal se regaron con la solución nutritiva control descrita en el apartado 2.1, que contiene 20  $\mu\text{M}$  Fe-EDDHA, constituyendo éstas condiciones el tratamiento control (Ct). Las plantas con sustrato clorosante se regaron con una solución similar a la anterior pero deficiente en hierro, conteniendo 2  $\mu\text{M}$  Fe-EDDHA y 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , constituyendo éstas condiciones el tratamiento clorosante (Clo). Estos tratamientos se aplicaron durante 10 semanas. Las plantas de cada genotipo y tratamiento se distribuyeron al azar en el área destinada al experimento y se rodearon por una fila de plantas similares que no fueron incluidas en el mismo.

Al finalizar el experimento se tomaron los brotes de las plantas desarrollados durante los tratamientos, se lavaron con agua destilada y se separaron las hojas del tallo. Los órganos se pesaron en fresco y se secaron en un horno a 70 °C durante 48 h. Las muestras secas se pesaron para obtener la relación entre el peso fresco y seco. El peso seco del brote completo (tallo y hojas) se utilizó como medida del crecimiento. Las hojas secas de éstas muestras se destinaron al análisis del contenido en hierro.

Los cambios en el verdor foliar se determinaron utilizando un aparato SPAD-502 (Konica, Minolta, Japan). Se midió el verdor al inicio (i) y al final (f) del tratamiento en las dos hojas más jóvenes completamente desarrolladas de la nueva brotación, realizando cinco lecturas consecutivas en diferentes zonas de la hoja, evitando el nervio central. El valor medio de las lecturas obtenidas en las dos hojas se consideró representativo de cada planta. Los datos se expresaron en forma de cociente entre las medidas f/i, de modo que los valores inferiores a 1 indican un descenso del verdor foliar durante el periodo experimental. Los valores de verdor registrados con éste método son proporcionales a la concentración foliar de clorofilas totales (Castle et al., 2009). Las muestras foliares se sometieron a un análisis elemental. Para ello se lavaron en una solución de agua destilada y detergente no iónico TWEEN 20 (Sigma-Aldrich Co., Germany) al 10% (p/v), se desecaron en un horno de aire caliente (Mettmertco., Germany) a 65 °C durante 48 h y se molieron. A continuación, las muestras se calcinaron en un horno mufla a 550 °C durante 12 h. El hierro se extrajo con ácido nítrico al 2% (Hiperpur Panreac, Fe < 1 ppb) en un baño ultrasónico (Fungilab S.A., España) durante 30 min a 40 °C. Las concentraciones totales de hierro se midieron mediante espectrometría de absorción atómica en un ASS Analyst200 (Perkin Elmer, USA).

## 2.5 Evaluación de la tolerancia a la salinidad

Se seleccionaron 40 plantas homogéneas y sin ramificaciones secundarias de cada genotipo. La mitad de las plantas de cada tipo se trató como control (Ct), sin modificar la solución nutritiva descrita en el apartado 2.1 y a la otra mitad se le aplicó estrés salino, incorporando a ésta solución 40 mM de NaCl (+S). A partir de entonces, el ápice de la planta se marcó con una anilla para diferenciar el brote nuevo y se iniciaron los tratamientos de riego, que fueron aplicados cada 3 días. Se controló, en ambos tratamientos, que el volumen de solución aplicado fuera homogéneo y permitiera el drenaje; aproximadamente 400 mL fueron suficientes, evitando así la acumulación de sales en el sustrato.

Se registró semanalmente el intercambio de gases de la superficie foliar utilizando un analizador de gases por infrarrojos LCpro+ (ADC Bioscientific Ltd., UK) para monitorizar las tasas de transpiración ( $E$ ) y asimilación neta de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{CO}_2}$ ). Las medidas se realizaron entre las 10 y las 14 a.m. en las condiciones controladas de humedad y temperatura descritas y presión ambiental de  $\text{CO}_2$ , fijando una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

De cada planta se realizaron 3 registros en 2 hojas de la porción media del tallo de 9 plantas de cada grupo. Transcurridos 20 días de tratamiento salino, se registró el % de abscisión foliar, el % de área foliar quemada en las plantas y el peso seco de las hojas desarrolladas durante el tratamiento. Se tomaron muestras homogéneas de 5 hojas de la porción media de cada planta, de la raíz y del tallo. Las hojas se lavaron en una solución de agua destilada y detergente no iónico Tween 20 (Sigma-Aldrich Co., Germany) al 10% (p/v), se desecaron en estufa (Memmertco., Germany) a 65 °C durante 48 h y se molieron.

Se tomaron alícuotas para el análisis de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ), que fueron calcinadas en un horno mufla a 500 °C durante 12 h. Las cenizas se disolvieron en  $\text{HNO}_3$  al 2% y Triton-X 100 (Sigma-Aldrich Co.) al 0.1% (p/v). Se determinó el contenido de los macronutrientes mediante espectroscopía de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) utilizando un equipo iCAP 6000 (Thermoscientific, USA). Para el análisis de cloruros totales ( $\text{Cl}^-$ ) se tomaron alícuotas de las muestras secadas en estufa, se incubaron en una solución compuesta de  $\text{HNO}_3$  0.1N y  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  al 10% y se filtraron en papel Whatman n° 1. Se determinó la concentración de  $\text{Cl}^-$  mediante valoración con iones plata utilizando un cloridómetro Corning 926 (Sherwood Scientific Ltd. UK).

## **2.6 Evaluación de la tolerancia a CTV**

Se inocularon mediante injerto en T invertida seis plantas de CC, CM, SMC-58 y SMC-73 con la raza de CTV T388 (+CTV), que es muy agresiva para CM (Moreno et al., 1990 Ballester-Olmos et al., 1993). El inóculo se obtuvo de la colección de aislados de CTV del IVIA. Transcurridos 25 días, se podaron las plantas a 5 cm del inóculo para promover una nueva brotación. Como control (Ct) se utilizaron tres plantas de cada genotipo sin inocular. Las plantas se cultivaron según las condiciones de invernadero descritas en el apartado 2.1 durante 12 meses. Transcurrido éste periodo, se evaluaron los síntomas en las hojas y madera del tallo y se midió la altura y biomasa de la parte aérea y de las raíces.

## **2.7 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de la varianza (ANOVA) y las medias se clasificaron utilizando el test de rango múltiple de Duncan para  $P \leq 0.05$ , con el software Statgraphics Plus, version 5.1 (Statistical Graphics, Englewood Cliffs).

### 3. Resultados

#### 3.1 Caracterización genética

El análisis genético del callo de CM, utilizado en los procesos de fusión de protoplastos, no mostró ninguna diferencia respecto al árbol original del BG del IVIA para todos los marcadores SSR y SNP analizados.

Los HS SMC-58 y SMC-73, junto con los parentales, se analizaron con un total de 92 marcadores, de los cuales 84 están localizados en el genoma nuclear y 8 en el genoma citoplasmático. En el genoma nuclear, se analizaron 60 marcadores SNP y 24 SSR, distribuidos en los 9 GL del mapa genético de referencia (Ollitrault et al., 2012a), utilizando entre 5 y 16 marcadores por GL. De los 60 marcadores SNP analizados, 40 fueron polimórficos; mientras que de los 24 SSR analizados, se encontró polimorfismo en 21 marcadores (**Tablas 6.1a-6.1d**).

El GL 1 se analizó con un total de 7 marcadores polimórficos, 5 SNP y 2 SSR (**Tabla 6.2a**). Los HS SMC-58 y SMC-73 presentaron las configuraciones alélicas correspondientes a la adición de los alelos de los marcadores analizados. El GL 2 se analizó con 5 marcadores SNP y 2 SSR que presentaron polimorfismo entre los parentales. En todos los marcadores analizados se observó en los HS la adición de los alelos correspondientes a cada marcador, excepto en el marcador JK-TAA41, en el que se observó la pérdida del alelo de 142 nt procedente de CC en los dos HS. El GL 3 se analizó con 6 marcadores SNP y un marcador SSR polimórficos entre los parentales. Los HS reunieron los alelos procedentes de cada parental, excepto en el caso del marcador Ci08A10, en el que se detectó la pérdida del alelo de 154 nt, procedente de CM, en ambos HS. El GL 4 se analizó con 3 marcadores SNP y 2 marcadores SSR (**Tabla 6.2b**.) y los HS reunieron en ambos casos los alelos de los parentales. En la **Fig. 6.1** se muestran como ejemplo los resultados obtenidos con el marcador SSR Ci07D06.

**Tabla 6.1a** Marcadores analizados localizados en los grupos de ligamiento (GL) 1 y 2. Se indica el nombre del locus, referencia bibliográfica, entrada en GeneBank y posición genética.

Tipo	Locus	Posición		Referencias	
		GL	cM	Bibliografía	GeneBank
SNP	*CiC4827-01	1	20.5	Ollitrault et al., 2012b	ET072918
SNP	CiC2110-01	1	28.8	Ollitrault et al., 2012b	ET099643
SSR	CiBE5720	1	58.5	Ollitrault et al., 2010	ET082224
SNP	*CiC4581-01	1	63.7	Ollitrault et al., 2012b	ET109034
SNP	*ACO-P353	1	80.4	Ollitrault et al., 2012a	JX630066
SNP	ACO-C601	1	83.4	Ollitrault et al., 2012a	JX630065
SNP	CiC0599-01	1	102.4	Ollitrault et al., 2012b	ET093125
SNP	TSC-C80	1	111.6	García-Lor et al., 2013a	JX630084
SSR	JK-taa15	1	119.7	Kijas et al., 1997	none
SNP	*F3H-M309	2	19.6	García-Lor et al., 2013a	JX630066
SNP	*F3H-C341	2	20.0	García-Lor et al., 2013a	JX630067
SNP	*F3H-P30	2	20.0	García-Lor et al., 2013a	JX630066
SNP	*PEPC-M316	2	32.6	García-Lor et al., 2013a	JX630067
SNP	PEPC-C328	2	32.6	García-Lor et al., 2013a	JX630067
SSR	mCrCIR07D05	2	75.6	Cuenca et al., 2011	FR677574
SNP	SOS1-M50	2	78.5	García-Lor et al., 2013a	JX630068
SNP	*CiC3712-01	2	93.9	Ollitrault et al., 2012b	ET079481
SNP	CCC1-P727	2	110.9	García-Lor et al., 2013a	JX630069
SNP	*CCC1-M85	2	110.9	García-Lor et al., 2013a	JX630069
SSR	JK-TAA41	2	131.8	Kijas et al., 1997	none
SNP	*PKF-C64	2	131.2	García-Lor et al., 2013a	JX630076
SNP	TRPA-M593	2	132.3	García-Lor et al., 2013a	JX630070
SNP	PKF-M186	2	133.5	García-Lor et al., 2013a	JX630076

\*Marcadores no polimórficos

**Tabla 6.1b** Marcadores analizados localizados en los grupos de ligamiento (GL) 3, 4 y 5. Se indica el nombre del locus, referencia bibliográfica, entrada en GeneBank y posición genética.

Tipo	Locus	Posición		Referencias	
		GL	cM	Bibliografía	GeneBank
SNP	INVA-M437	3	30.2	García-Lor et al., 2013a	JX630071
SNP	MDH-M519	3	34.8	García-Lor et al., 2013a	JX630072
SNP	*MDH-MP69	3	34.8	García-Lor et al., 2013a	JX630072
SNP	*CiC4681-02	3	92.8	Ollitrault et al., 2012b	ET109640
SNP	NCED3-M535	3	101.3	García-Lor et al., 2013a	JX630086
SNP	CiC5796-12	3	109.9	Ollitrault et al., 2012b	ET0822752
SNP	ATMR-M728	3	141.9	García-Lor et al., 2013a	JX630073
SNP	ATMR-C372	3	141.9	García-Lor et al., 2013a	JX630073
SSR	Ci08A10	3	144.9	Froelicher et al., 2011	AJ567414
SNP	CHS-M183	3	167.3	García-Lor et al., 2013a	JX630074
SNP	*CHS-P57	3	167.3	García-Lor et al., 2013a	JX630074
SNP	*CiC4240-04	4	7.1	Ollitrault et al., 2012b	ET106812
SNP	CHI-M598	4	11.0	García-Lor et al., 2013a	JX630075
SSR	mCrCIR07D06	4	16.3	Cuenca et al., 2011	FR677581
SNP	CiC2840-01	4	17.0	Ollitrault et al., 2012b	ET103429
SNP	CiC3740-02	4	43.9	Ollitrault et al., 2012b	ET079647
SSR	mCrCIR03G05	4	75.1	Cuenca et al., 2011	FR677578.1
SNP	*CiC6213-07	4	85.5	Ollitrault et al., 2012b	ET085253
SNP	CiC1380-05	5	17.2	Ollitrault et al., 2012b	ET072553
SNP	CiC5788-16	5	41.5	Ollitrault et al., 2012b	ET082679
SNP	*CiC5842-02	5	77.3	Ollitrault et al., 2012b	ET083106
SNP	*NADK2-M285	5	86.0	García-Lor et al., 2013	JX630077
SSR	mCrCIR06A12	5	98.7	Froelicher et al., 2011	AM489742
SNP	DFR-M240	5	105.7	García-Lor et al., 2013a	JX630074

\*Marcadores no polimórficos



**Tabla 6.1c** Marcadores analizados localizados en los grupos de ligamiento (GL) 6 y 7. Se indica el nombre del locus, referencia bibliográfica, entrada en GeneBank y posición genética.

Tipo	Locus	Posición		Referencias	
		GL	cM	Bibliografía	GeneBank
SSR	*mCrCIR04H09	6	0.0	Ollitrault et al., 2012a	FR692370
SNP	CiC4356-06	6	6.2	Ollitrault et al., 2012b	ET107540
SSR	MEST132	6	26.9	Aleza et al., 2011	DY276930
SSR	CiBE4818	6	28.3	Ollitrault et al., 2010	ET110604
SSR	CiBE0733	6	42.2	Ollitrault et al., 2010	ET094202
SNP	*CiC2128-01	6	61.2	Ollitrault et al., 2012b	ET111354
SSR	mCrCIR02B11	6	69.2	Ollitrault et al., 2012a	FR692358
SNP	PSY-M30	6	69.7	García-Lor et al., 2013	JX630080
SNP	PSY-C461	6	69.7	García-Lor et al., 2013a	JX630080
SNP	CiC3056-02	6	70.5	Ollitrault et al., 2012b	ET075329
SSR	*CiBE6256	6	84.6	Ollitrault et al., 2010	ET085615
SNP	*AocM290	6	85.9	Ollitrault et al., 2012b	JX630079
SNP	AocC593	6	85.9	Ollitrault et al., 2012b	DY293375
SSR	mCrCIR01C06	6	88.9	Cuenca et al., 2011	AJ567393
SSR	MEST123	6	93.0	Aleza et al., 2011	DY276100
SSR	CiBE5866	6	99.8	Ollitrault et al., 2010	ET083232
SSR	mCrCIR07E05	7	13.1	Froelicher et al., 2011	AM489749
SNP	*CiC1444-03	7	13.6	Ollitrault et al., 2012b	ET073216
SNP	DXS-M618	7	40.7	García-Lor et al., 2013	JX630082
SNP	DXS-C545	7	40.7	García-Lor et al., 2013a	JX630082
SNP	FLS-P129	7	46.0	García-Lor et al., 2013a	JX630083
SSR	*mCrCIR03E06	7	75.1	Ollitrault et al., 2012a	FR692363
SSR	Ci07C07	7	98.0	Froelicher et al., 2011	AJ567409

\*Marcadores no polimórficos

**Tabla 6.1d** Marcadores nucleares analizados localizados en los grupos de ligamiento (GL) 8 y 9 y marcadores citoplasmáticos. Se indica el nombre del locus, referencia bibliográfica, entrada en GeneBank y posición genética.

Tipo	Locus	Posición		Referencias	
		GL	cM	Bibliografía	GeneBank
SSR	mCrCIR07B05	8	31.7	Froelicher et al., 2011	AM489747
SSR	CiBE0214	8	40.4	Ollitrault et al., 2010	ET088913
SNP	CiC5164-02	8	45.6	Ollitrault et al., 2012b	ET111943
SNP	LCY2-M379	8	58.1	García-Lor et al., 2013a	JX566716
SNP	CiC1749-05	8	103	Ollitrault et al., 2012b	ET097636
SNP	*CiC4876-07	9	2.7	Ollitrault et al., 2012b	ET080580
SNP	*CiC5087-01	9	15.9	Ollitrault et al., 2012b	ET111514
SSR	mCrCIR07F11	9	49.6	Kamiri et al., 2011	FR677567
SNP	CiC2518-02	9	53.5	Ollitrault et al., 2012b	ET101955
SSR	Ci08C05	9	55.1	Froelicher et al., 2011	AJ567415
SNP	LCYB-P736	9	78.9	García-Lor et al., 2013a	JX630084
SNP	LCYB-M480	9	78.9	García-Lor et al., 2013a	JX630084
SNP	HYB-M62	9	102.3	García-Lor et al., 2013a	AF315289
SNP	HYB-C433	9	102.3	García-Lor et al., 2013a	JX630087
Indel	<i>nad2/4-3</i>	Mitocondrial		Froelicher et al., 2011	
Indel	* <i>nad7/1-2</i>	Mitocondrial		Froelicher et al., 2011	
Indel	* <i>5/rrn18-1</i>	Mitocondrial		Duminil et al., 2002	
cpSSR	CCMP2	Cloroplástico		Cheng et al., 2003	
cpSSR	CCMP5	Cloroplástico		Cheng et al., 2003	
cpSSR	CCMP6	Cloroplástico		Cheng et al., 2003	
cpSSR	NTCP7	Cloroplástico		Cheng et al., 2003	
cpSSR	* NTCP9	Cloroplástico		Cheng et al., 2003	

\*Marcadores no polimórficos

**Tabla 6.2a** Análisis genético con marcadores nucleares SNP y SSR ubicados en los GL 1, 2 y 3 (GL) de los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 obtenidos de la fusión de protoplastos de *C. macrophylla* (CM) y citrange Carrizo (CC).

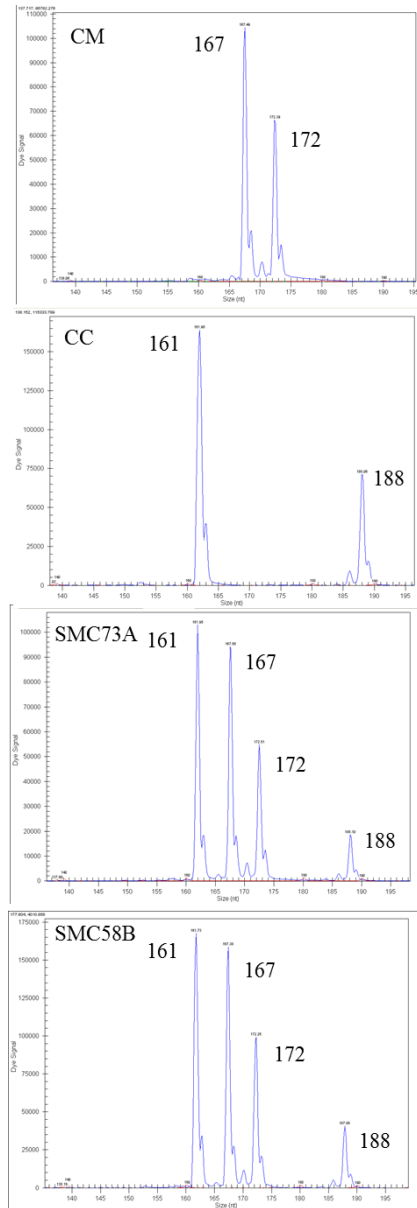
Locus	GL	CC		CM		SMC-58				SMC-73			
CiC2110-01		<sup>3</sup> C	A	A	A	C	A	A	A	C	A	A	A
CiBE5720		<sup>3</sup> 08	329	308	320	308	329	308	320	308	329	308	320
ACO-C601		G	G	A	G	G	G	A	G	G	G	A	G
CiC0599-01	1	G	A	G	G	G	A	G	G	G	A	G	G
TSC-C80		G	G	G	T	G	G	G	T	G	G	G	T
JK-taa15			143	165	168	143	165	168		143	165	168	
PEPC-C328		A	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A	G
mCrCIR07D05			189		195	189		195		189		195	
SOS1-M50		A	G	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A
CCC1-P727		C	T	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C
JK-TAA41	2	142	154	132	154	142	154	132	154	142	154	132	154
TRPA-M593		C	G	C	C	C	G	C	C	C	G	C	C
PKF-M186		T	T	C	T	T	T	C	T	T	T	C	T
INVA-M437		C	T	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C
MDH-M519		C	T	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C
NCED3-M535		G	T	T	T	G	T	T	T	G	T	T	T
CiC5796-12		A	A	C	C	A	A	C	C	A	A	C	C
ATMR-M728	3	T	T	G	G	T	T	G	G	T	T	G	G
ATMR-C372		A	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A	G
Ci08A10			156		154	156		154		156		154	
CHS-M183		C	C	G	G	C	C	G	G	C	C	G	G

<sup>3</sup>Alelos correspondientes a los marcadores SNP: A, adenina; C, citosina; T, timina; G, guanina. <sup>2</sup>Alelos correspondientes a los marcadores SSR. Cada número corresponde con el tamaño en nucleótidos del alelo amplificado. Se indican en gris los alelos perdidos.

**Tabla 6.2b** Análisis genético con marcadores nucleares SSR y SNP ubicados en los grupos de ligamiento (GL) 4, 5 y 6 de los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 obtenidos de la fusión de protoplastos de *C. macrophylla* (CM) y citrango Carrizo (CC).

Locus	GL	CC		CM		SMC-58				SMC-73			
CHI-M598		<sup>y</sup> C	C	G	C	C	C	G	C	C	C	G	C
mCrCIR07D06		<sup>z</sup> 162	188	167	170	162	188	167	170	162	188	167	170
CiC2840-01	4	T	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C
CiC3740-02		G	C	G	G	G	C	G	G	G	C	G	G
mCrCIR03G05		213	219	199		213	219	199		213	219	199	
CiC1380-05		T	T	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C
CiC5788-16		G	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A
mCrCIR06A12	5	92	103	86		92	103	86		92	103	86	
DFR-M240		C	G	C	C	C	G	C	C	C	G	C	C
CiC4356-06		C	C	C	T	C	C	C	T	C	C	C	T
MEST132		231	244	244		231	244	244		231	244	244	
CiBE4818		151	162	154		151	162	154		151	162	154	
CiBE0733		240	245	235		240	245	235		240	245	235	
mCrCIR02B11			232	232	248	232	232	248		232	232	248	
PSY-M30		C	G	G	G	C	G	G	G	C	G	G	G
PSY-C461	6	A	A	A	T	A	A	A	T	A	A	A	T
CiC3056-02		G	A	A	A	G	A	A	A	G	A	A	A
AocC593		C	C	C	T	C	C	C	T	C	C	C	T
mCrCIR01C06		147	159	147	133	147	159	147	133	147	159	147	133
MEST123		239	246	250		239	246	250		239	246	250	
CiBE5866		214		222		214		222		214		222	

<sup>y</sup>Alelos correspondientes a los marcadores SNP: A, adenina; C, citosina; T, timina; G, guanina. <sup>z</sup>Alelos correspondientes a los marcadores SSR. Cada número corresponde con el tamaño en nucleótidos del alelo amplificado. Se indican en gris los alelos perdidos y SNP modificados.



**Figura 6.1.** Electroferogramas del marcador SSR Ci07D06 analizado en *C. macrophylla* (CM), citrange Carrizo (CC) y los híbridos somáticos SMC-73 y SMC-58. Se indica el tamaño en nucleótidos del alelo amplificado.

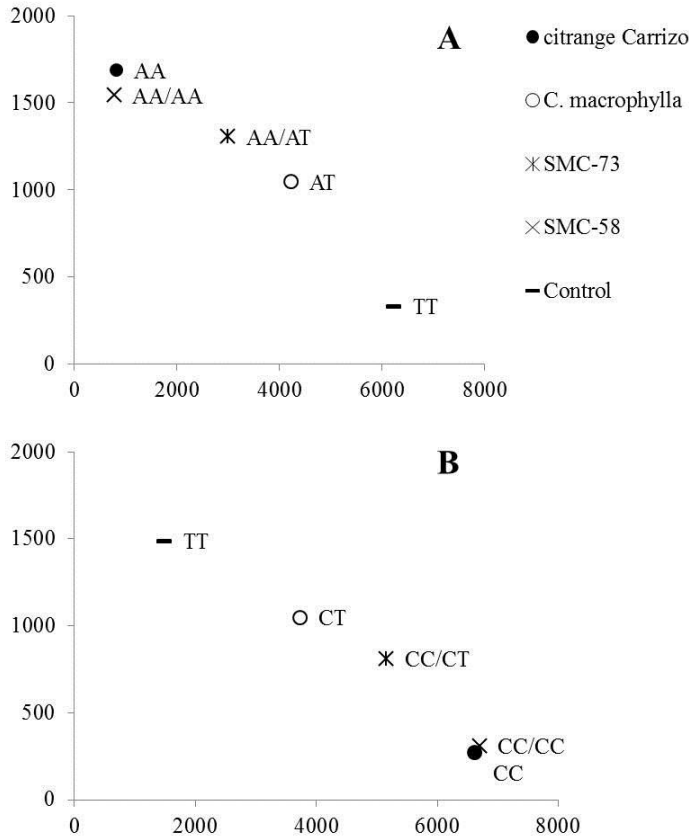
El GL 5 se analizó con 3 marcadores SNP y 1 marcador SSR y no se identificaron pérdidas alélicas en ningún caso. El GL 6 se analizó con 5 marcadores SNP y 7 marcadores SSR. Se identificaron pérdidas alélicas en los HS en 6 de los 7 marcadores SSR analizados (CiBE4818, CiBE0733, mCrCIR02B11, mCrCIR01C06, MEST123 y CiBE5866), una procedente de CC (CiBE0733) y el resto de CM. Cuatro de las pérdidas fueron comunes entre ambos híbridos, mientras que 2 de ellas afectaron únicamente al híbrido SMC-73. Además en 3 de los 5 marcadores SNP analizados (CiC4356-06, PSY-C461, AocC593) no se observó en el HS SMC-58 un alelo respecto a los parentales, mientras que el híbrido SMC-73 no mostró tales diferencias respecto a sus parentales (**Tabla 6.2b**). En la **Fig. 6.2** se muestra a título de ejemplo el análisis de los marcadores SNP PSY-C461 y AocC593 de los dos HS junto a los parentales. En el GL 7 se analizaron 3 marcadores SNP y 2 marcadores SSR. Se identificó la pérdida del alelo 239 nt procedente de CM en un marcador SSR (Ci07C07) en ambos HS. En el GL 8 se analizaron 3 marcadores SNP y 2 marcadores SSR, identificándose variación en el marcador LCY2-M379 en los dos HS respecto a los parentales. En el GL 9 se analizaron 5 marcadores SNP y 2 marcadores SSR y no se identificó ninguna pérdida en los HS respecto a los parentales (**Tabla 6.2c**).

En resumen, en 48 de los 61 marcadores nucleares analizados, se observó que los HS SMC-58 y SMC-73 reúnen los alelos procedentes de CC y de CM; sin embargo, en 13 de estos loci se observaron pérdidas alélicas. Estas pérdidas fueron de alelos procedentes de CM en 8 loci y procedentes de CC en 5 loci. La mayoría de las pérdidas, se localizaron en el GL 6 (**Tabla 6.2b**), donde se detectaron 9 alelos perdidos, de los cuales 2 proceden de CC y 7 de CM. Las demás pérdidas fueron aisladas y se localizaron en los GL 2, 3 (**Tabla 6.2a**), 7 y 8 (**Tabla 6.2c**), siendo las del GL 2 y 8 de alelos procedentes de CC y las de los GL 3 y 7 de CM. También se identificaron diferencias en los alelos perdidos entre los dos HS y todos ellos localizados en el GL 6. Concretamente, en SMC-58 se observó la no presencia de 3 alelos SNP, procedentes de CM (**Fig. 6.2**) que sí se observaron en SMC-73, presentando una configuración alélica correspondiente a la adición de los alelos de los parentales para estos loci, mientras que en éste último se identificaron 2 alelos SSR perdidos procedentes de CC y CM, que sí que se encontraron presentes en SMC-58.

**Tabla 6.2c** Análisis genético con marcadores nucleares SNP y SSR ubicados en los grupos de ligamiento (GL) 7, 8 y 9 y marcadores mitocondrial (mt) y cloroplásticos (cp) de los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 obtenidos de la fusión de protoplastos de *C. macrophylla* (CM) y citrange Carrizo (CC).

Locus	GL	CC	CM	SMC-58			SMC-73		
mCrCIR07E05		<sup>z</sup> 119 128	116	119	128	116	119	128	116
DXS-M618		<sup>y</sup> G G	A A	G	G	A A	G	G	A A
DXS-C545	7	G G	C G	G	G	C G	G	G	C G
FLS-P129		C T	T T	C	T	T T	C	T	T T
Ci07C07		212	239	212		239	212		239
mCrCIR07B05		196	203 210	196	203	210	196	203	210
CiBE0214		312	309	312		309	312		309
CiC5164-02	8	C C	T T	C	C	T T	C	C	T T
LCY2-M379		A G	G G	A	G	G G	A	G	G G
CiC1749-05		G T	T T	G	T	T T	G	T	T T
mCrCIR07F11		160	162 164	160	162	164	160	162	164
CiC2518-02		T A	T T	T	A	T T	T	A	T T
Ci08C05		153	153 156	153	153	156	153	153	156
LCYB-M480	9	T C	T T	T	C	T T	T	C	T T
HYB-M62		A A	C C	A	A	C C	A	A	C C
HYB-C433		G G	A G	G	G	A G	G	G	A G
<i>nad2/4-3</i>	mt	261	251	251			251		
CCMP2	cp	197	203	197	203		197		
CCMP5	cp	93	95	93	95		93		
CCMP6	cp	133	135	133	135		133		
NTCP7	cp	182	188	182	188		182		

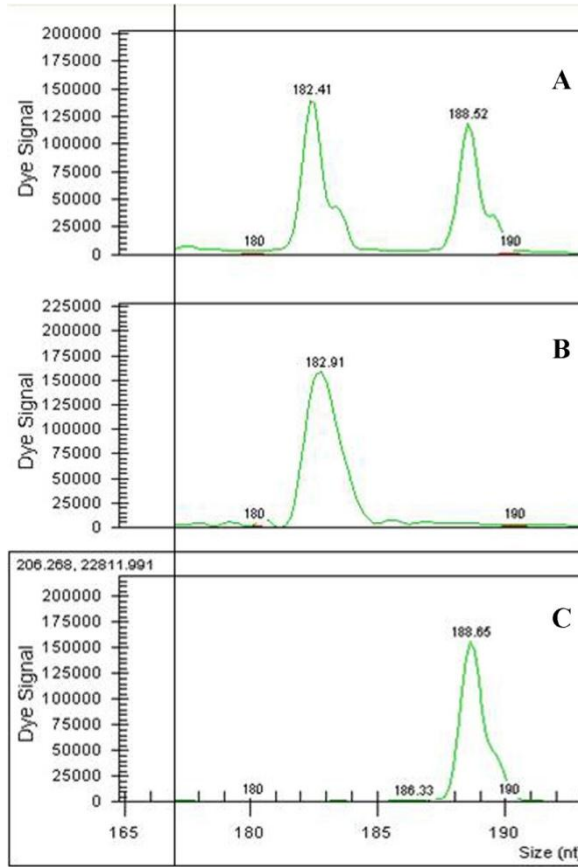
<sup>y</sup>Alelos correspondientes a los marcadores SNP: A, adenina; C, citosina; T, timina; G, guanina. <sup>z</sup>Alelos correspondientes a los marcadores SSR. Cada número corresponde con el tamaño en nucleótidos del alelo amplificado. Se indican en gris los alelos perdidos y SNP modificados.



**Figura 6.2** Análisis gráfico de los marcadores SNP PSY-C461 **A)** y AOC-C593 **B)** analizados en *C. macrophylla*, citrange Carrizo y los híbridos somáticos SMC-73 y SMC-58. Se indica la configuración alélica en nucleótidos: A, adenina; C, citosina; T, timina; G, guanina de cada genotipo.

El genoma citoplasmático se analizó con un marcador mitocondrial (*nad2/4-3*) y 4 marcadores cloroplásticos (CCMP2, CCMP5, CCMP6, NTCP7) (**Tabla 6.1d**), que presentaron polimorfismo entre CC y CM. En los HS se identificó el alelo de 251 nt del marcador mitocondrial *nad2/4-3*, que procede del parental embriogénico CM. Sin embargo en el análisis del genoma cloroplástico se identificaron en SMC-73 los alelos procedentes de CC para los 4 marcadores analizados, mientras que en el híbrido SMC-58 se detectaron tanto los alelos de CC como los de CM en los 4 marcadores analizados (**Tabla 6.2c**). En la **Fig. 6.3** se muestra a modo de ejemplo el análisis con el SSR cloroplástico NTCP7 del HS SMC-58 junto a los parentales.



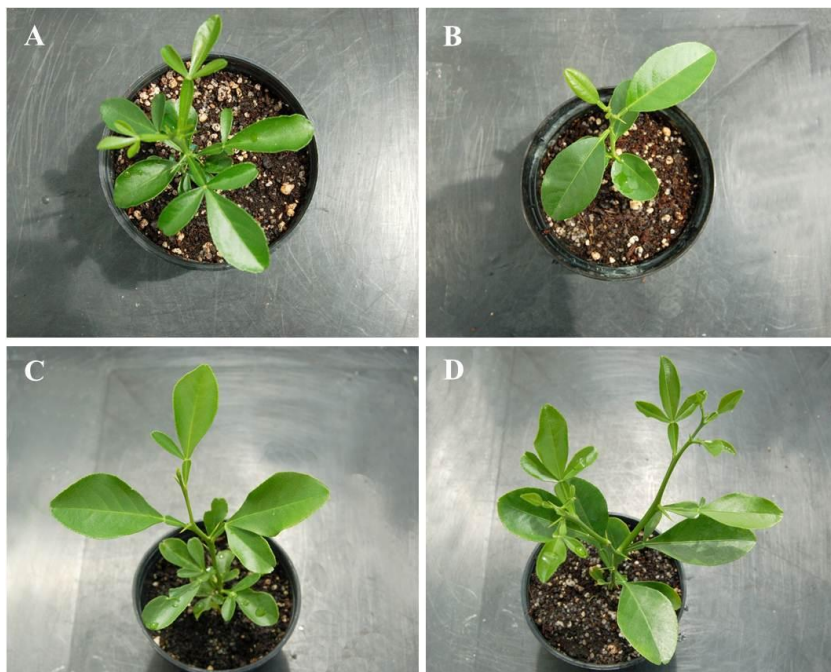


**Figura 6.3** Electroferogramas del marcador cloroplástico SSR NTCP7 analizado en el híbrido SMC-58 **A**) y sus parentales citrange Carrizo **B**) y *C. macrophylla* **C**). Se indica el tamaño en nucleótidos del alelo amplificado.

### 3.2 Caracterización morfológica

Se realizó una caracterización morfológica de plantas de 9 meses de edad de los parentales CC (**Fig. 6.4A**) y CM (**Fig. 6.4B**) de los híbridos somáticos SMC-58 (**Fig. 6.4C**) y SMC-73 (**Fig. 6.4D**). Se observó que los HS tuvieron un crecimiento más lento que ambos parentales y tienen tendencia a la aparición de ramificaciones laterales (**Fig. 6.3D**). La altura de los HS fue menor que la de CC o CM (**Tabla 6.3**). Entre ellos, SMC-58 tuvo un crecimiento en torno a un 20% menor que SMC-73. La longitud promedio de los entrenudos es mayor en CC que en CM. El SMC-58 tiene entrenudos similares a CM, mientras que los de SMC-73 tienen una longitud intermedia entre CC y CM.

El índice morfológico foliar, indicativo de la relación altura/anchura del limbo del foliolo principal, es inferior en los HS al de ambos parentales y similar entre ellos, indicando que sus hojas tienen una forma más redondeada, característica de los cítricos 4x (Barrett y Hutchison, 1978).



**Figura 6.4** Plantas de A) citrange Carrizo (CC), B) *C. macrophylla* (CM) y los híbridos somáticos C) SMC-58 y D) SMC-73, cultivadas durante 5 meses en condiciones de invernadero.

**Tabla 6.3** Caracterización morfológica, realizada en plantas de 9 meses de edad, de los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 obtenidos mediante fusión de protoplastos de citrange Carrizo (CC) y *C. macrophylla* (CM).

Genotipo	Altura (cm)	Nº de hojas	Longitud de los entrenudos (cm)	Verdor foliar (SPAD)	Índice morfológico foliar (l/a)
CC	143.6 a	41.9 a	3.43 a	73.82 a	2.51 a
CM	111.9 b	36.8 b	3.05 b	60.93 b	2.14 b
SMC-58	59.1 d	19.2 d	3.08 bc	72.78 a	1.74 c
SMC-73	81.5 c	26.6 c	3.14 c	75.99 a	1.79 c

Los valores son la media de 12 plantas (n=12). Las letras diferentes en cada sección en columnas indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

El verdor foliar de las hojas adultas de los HS es similar entre ellos y comparable al de CC, mientras que CM tiene un índice de verdor foliar en torno a un 12% menor que los anteriores. Las plantas de los HS SMC-58 y SMC-73 presentan hojas dispuestas en espiral alrededor del tallo con espinas rectas axilares de longitud media (16-40 mm), similares a las de ambos parentales. Las hojas, de inserción brevipetiolada, son compuestas e imparipinnadas y el número de folíolos alterna entre uno, como en CM y tres, como en CC, en la misma planta (**Fig. 6.1C y 6.1D**). En el HS SMC-58, se ha observado que el número de folíolos más frecuente es uno o dos, aunque también presenta hojas con tres folíolos. El híbrido SMC-73 presenta con mayor frecuencia hojas con tres folíolos, aunque los otros tipos también aparecen. El tamaño foliar de ambos es pequeño (10-20 cm<sup>2</sup>) y heterogéneo. El peciolo es más corto que el limbo en ambos HS y contiene alas obdeltadas y angostas, cuya unión a la lámina es articulada. La forma del folíolo principal en los HS mantiene una relación longitud/anchura de entre 1.5 y 1.8, su forma oscila entre elíptica, como el folíolo principal de CC y oboval, como la hoja de CM. Los márgenes foliares son crenados y el ápice obtuso en ambos HS. Al no disponer de árboles adultos de los HS, no puede describirse su tamaño final y porte, ni se han podido caracterizar aún flores o frutos.

### 3.3 Evaluación de la tolerancia a la clorosis férrica

En condiciones clorosantes (Clo) se redujo el verdor foliar en todos los genotipos. Citrange Carrizo sufrió un descenso mayor que CM y los HS mostraron un descenso del verdor intermedio entre ambos parentales (**Tabla 6.4**). El crecimiento de la biomasa foliar del brote de los HS desarrollado durante el tratamiento Clo fue similar al de CM y mayor que el de CC, aunque en condiciones control (Ct) los híbridos crecieron de manera semejante a CC (SMC-73) o menos que ambos parentales (SMC-58). La concentración de hierro foliar en las hojas desarrolladas en el tratamiento clorosante fue más alta en CM que en CC y los híbridos tuvieron concentraciones iguales entre ellos e intermedias entre los parentales (**Tabla 6.4**).

**Tabla 6.4** Verdor foliar (f/i), crecimiento en biomasa del brote (g PS) y concentración foliar de hierro en el brote (ppm PS) de plantas de citrange Carrizo (CC), *C. macrophylla* (CM) y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73, cultivadas durante 10 semanas en invernadero en condiciones control (20  $\mu$ M Fe-EDDHA) y en condiciones clorosantes (CaCO<sub>3</sub> al 10% (v/v), 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2  $\mu$ M Fe-EDDHA).

Tratamiento	Genotipo	Verdor (f/i) <sup>x</sup>	Crecimiento (g PS)	Hierro (ppm)
Control	CC	0.84 a	1.36 b	48.3 a
	CM	1.11 b	1.76 c	46.7 a
	SMC-58	1.02 b	0.89 a	38.7 a
	SMC-73	0.89 ab	1.21 b	43.5 a
Clorosante	CC	0.30 a	0.42 a	16.5 a
	CM	0.70 c	0.56 b	33.1 b
	SMC-58	0.56 b	0.52 b	23.9 ab
	SMC-73	0.52 b	0.61 b	21.7 ab

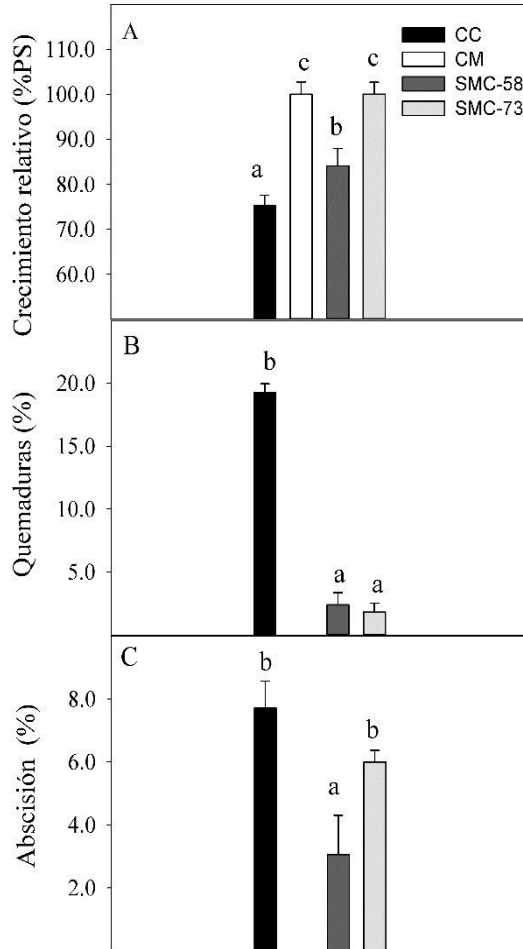
<sup>x</sup>SPAD final/inicial, valores inferiores a 1 indican pérdida de verdor. Los valores son la media de seis plantas (n=6). Las letras diferentes en cada sección en columnas indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

### 3.4 Evaluación de la tolerancia a la salinidad

Las diferencias en la respuesta al cultivo en un medio salino (+S) durante 20 días entre los HS y sus parentales se identificaron mediante la medida de las tasas de reducción del crecimiento, los síntomas foliares, los iones acumulados y el intercambio de gases. El tratamiento +S redujo el crecimiento de las plantas de CC, parental sensible a la salinidad, que alcanzaron un PS al final del experimento en torno a un 25% menor que las plantas Ct (**Fig. 6.5A**). Sin embargo, las plantas de CM, tolerantes a la salinidad, tuvieron un crecimiento similar en ambos tratamientos. El híbrido SMC-73 tuvo un comportamiento similar a CM en cuanto al desarrollo de biomasa, ya que el tratamiento +S no afectó a su crecimiento, mientras que el SMC-58 tuvo un PS en condiciones +S un 16% menor que el alcanzado por las plantas Ct, presentando una reducción del crecimiento menos acusada que CC.

Los síntomas foliares derivados de la toxicidad fueron acusados en las plantas de CC, cuya área foliar afectada por quemaduras fue en torno al 20% (**Fig. 6.5B**), mientras que las plantas de CM no mostraron quemaduras foliares.

Los HS presentaron un porcentaje de área foliar dañada muy inferior a CC, que en ambos casos fue de en torno al 2%. El tratamiento +S también afectó a las plantas induciendo su defoliación (**Fig. 6.5C**).



**Figura 6.5.** **A)** Crecimiento (g PS), **B)** daños por quemaduras foliares (%) y **C)** abscisión en plantas de citrange Carrizo (CC), *C. macrophylla* (CM) y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73, cultivadas durante 20 días en invernadero en condiciones salinas (NaCl 40 mM). Los valores son la media de seis plantas y su error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

Este síntoma se observó en el 7% de las hojas de CC y en el 6% de SMC-73, sin encontrarse diferencias significativas entre éstos genotipos. La abscisión fue más reducida en SMC-58 que en los genotipos anteriores, afectando a un 3% de sus hojas, mientras que no se observó abscisión foliar en CM.

En medio salino (+S), las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , expresadas en términos molares y en referencia al agua del tejido, aumentaron en las hojas de todos los genotipos respecto al tratamiento Ct (**Tabla 6.5**). El parental CM, tolerante a la salinidad, fue el que tuvo concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  más reducidas en el tratamiento +S, que fueron 2.2 y 1.4 veces respectivamente, más altas que en las plantas Ct. Por su parte, CC aumentó la concentración de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en el tratamiento +S 4.1 y 2.6 veces respectivamente, respecto al tratamiento Ct. El HS SMC-58, en condiciones +S tuvo concentraciones de  $\text{Cl}^-$  más reducidas que el parental sensible CC y concentraciones de  $\text{Na}^+$  similares a CC, que fueron, respectivamente, 4.2 y 1.8 veces más elevadas que en las plantas Ct. El HS SMC-73, tuvo concentraciones de  $\text{Cl}^-$  en las plantas sometidas al tratamiento +S similares a las de CC, mientras que la concentración de  $\text{Na}^+$  fue superior a la alcanzada por CC. Respecto a las plantas Ct, el aumento de la concentración de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en las plantas de SMT-73 sometidas al tratamiento +S fue de 3.9 y 2.3 veces, respectivamente.

**Tabla 6.5** Concentración foliar de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (mM en el agua del tejido) en plantas de citrange Carrizo (CC), *C. macrophylla* (CM) y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73, cultivadas durante 20 días en invernadero en condiciones control o en condiciones salinas (NaCl 40 mM).

Tratamiento	Ión	CC	CM	SMC-58	SMC-73
Control	$\text{Cl}^-$	56.3 a	36.5 a	43.5 a	53.4 a
	$\text{Na}^+$	140.0 b	85.7 a	217.9 c	202.0 c
	$\text{K}^+$	571.1 a	607.0 b	556.2 a	609.0 b
Salino	$\text{Cl}^-$	233.2 c	80.9 a	183.0 b	205.4 c
	$\text{Na}^+$	367.8 b	117.5 a	393.7 b	466.0 c
	$\text{K}^+$	462.0 a	621.2 b	446.0 a	468.4 a

Los valores son la media de tres plantas (n=3). Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

Estos datos indican que ambos HS manifestaron una capacidad para la exclusión de  $\text{Cl}^-$  menor que la del parental tolerante CM, sin embargo el HS SMC-58 tuvo mayor capacidad de exclusión de  $\text{Cl}^-$  que el parental sensible CC, mientras que SMC-73 manifestó ser similar a CC en éste carácter.

En cuanto al  $\text{Na}^+$ , la capacidad de exclusión observada en los HS fue similar a CC en el caso de SMC-58 y superior en el caso de SMC-73. La concentración de  $\text{K}^+$  en las plantas sometidas al tratamiento +S no se modificó en CM, mientras que las plantas de CC, SMC-58 y SMC-73 sufrieron un descenso del 21%, 20% y 33%, respectivamente.

**Tabla 6.6** Tasas de transpiración ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y asimilación neta ( $A_{\text{CO}_2}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en plantas de citrange Carrizo (CC), *C. macrophylla* (CM) y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73, cultivadas durante 20 días en invernadero en condiciones control o en condiciones salinas (NaCl 40 mM).

Tratamiento	Parámetro	CC	CM	SMC-58	SMC-73
Control	$E$	0.76 c	1.37 a	1.32 a	1.16 b
	$A_{\text{CO}_2}$	6.23 b	9.99 a	9.21 a	8.74 a
Salino	$E$	0.62 c	1.32 a	0.89 b	0.66 c
	$A_{\text{CO}_2}$	3.82 c	10.1 a	6.23 b	4.14 c

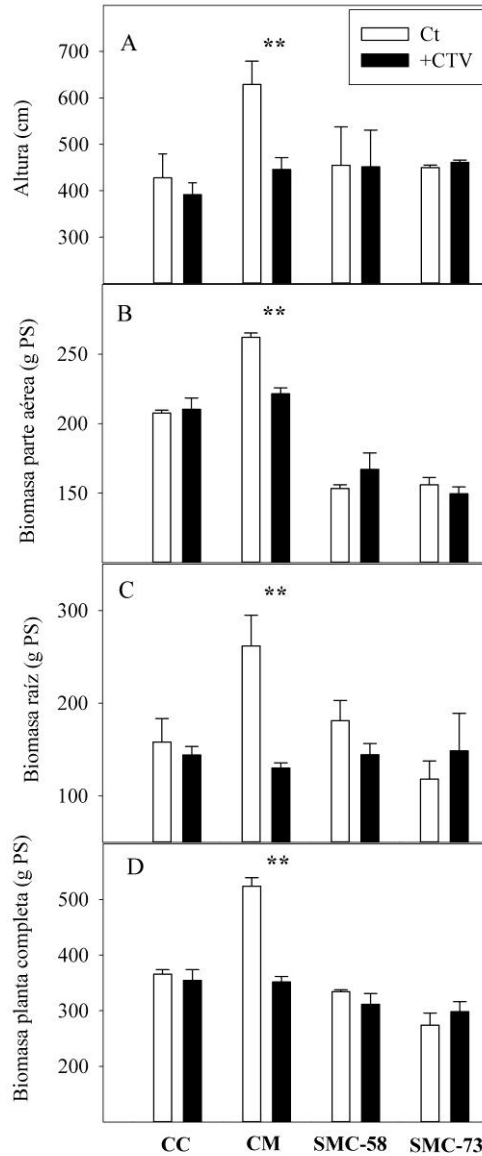
Los valores son la media de seis plantas ( $n=6$ ). Las letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas para  $P \leq 0.05$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.

Las plantas de CM sometidas al tratamiento +S no modificaron sus tasas de  $A_{\text{CO}_2}$  y  $E$  respecto a las plantas Ct (**Tabla 6.6**). Sin embargo, el parental sensible CC redujo su  $A_{\text{CO}_2}$  en un 39% y su  $E$  en un 18% respecto a las plantas Ct. En los HS SMC-58 y SMC-73 sometidos al tratamiento +S, el descenso en la  $E$  respecto al tratamiento Ct fue de un 33% y un 43% respectivamente, mientras que la  $A_{\text{CO}_2}$  se redujo en un 32% y un 53% respectivamente. Estos datos indican que el SMC-73 fue el genotipo cuyo intercambio gaseoso se encontró más afectado por el tratamiento +S, con tasas similares a CC, mientras que el SMC-58, redujo su intercambio en menor medida que los anteriores, pero a tasas inferiores a CM. Los resultados obtenidos indican que, a grandes rasgos, los HS presentan un comportamiento en medio salino intermedio respecto a los parentales tolerante (CM) y sensible (CC). No obstante, existen diferencias entre SMC-58 y SMC-73 que apuntan a una mejor adaptación al medio salino de SMC-58 frente a SMC-73, ya que su respuesta fue, globalmente, más aproximada a la del parental tolerante CM.

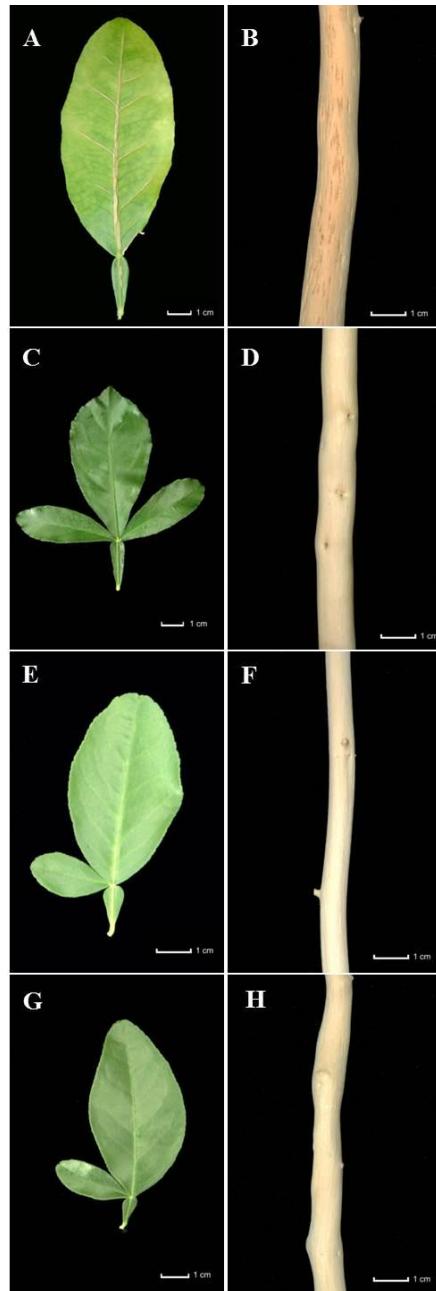
### 3.5 Evaluación de la tolerancia a CTV

Se evaluó el crecimiento y la aparición de síntomas en las plantas inoculadas con la raza agresiva T388 de CTV. En CM, se observó una reducción del crecimiento, tanto en altura (**Fig. 6.6A**), como en biomasa de la parte aérea (**Fig. 6.6B**) y de la raíz (**Fig. 6.6C**), que afectaron la biomasa de la planta completa reduciéndola en torno a un 35% (**Fig. 6.7D**). En éstas plantas, se observó además amarilleamiento de las hojas, acorchamiento de la nervadura (vein corking) (**Fig. 6.7A**) y la aparición de acanaladuras en la madera del tallo (stem pitting) (**Fig. 6.7B**). En CC, así como en los híbridos SMC-58 y SMC-73, no se observó disminución en el crecimiento (**Fig. 6.6D**) ni la aparición de ninguno de los síntomas de la enfermedad (**Fig. 6.7C a 6.7H**).





**Figura 6.6.** **A)** Crecimiento en altura (cm), **B)** biomasa (g PS) de la parte aérea, **C)** biomasa de la raíz y **D)** biomasa de la planta completa, de plantas de citrange Carrizo (CC), *C. macrophylla* (CM) y los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 inoculadas con la raza T388 del virus de la tristeza de los cítricos (+CTV) y de las plantas control (Ct) no inoculadas, cultivadas durante 12 meses en condiciones de invernadero. Los valores son la media de entre tres y seis plantas y su error estándar. \*\*diferencias significativas para  $P \leq 0.01$  al aplicar el test de rango múltiple de Duncan.



**Figura 6.7** Síntomas en las plantas inoculadas con la raza T388 de CTV: **A)** Amarilleamiento foliar y acorchamiento de nervaduras en la hoja de *C. macrophylla* (CM); **B)** acanaladuras en la madera del tallo de CM; **C)** y **D)** hoja y tallo de citrange Carrizo (CC) no afectados; **E)** y **F)** hojas y tallo de SMC-58 no afectados; **G)** y **H)** hojas y tallo de SMC-73 no afectados.

## 4. Discusión

Los portainjertos más utilizados en la citricultura española, CC y CM, reúnen un conjunto de características de interés, algunas de las cuales son complementarias. El CC destaca por ser tolerante a un espectro amplio de estreses y enfermedades, entre los que cabe resaltar la tolerancia a CTV. De CM destaca su alta tolerancia al cultivo en suelos alcalinos y salinos. Sin embargo es moderadamente sensible a CTV.

Actualmente, CM es el portainjerto más utilizado en las regiones citrícolas áridas del sureste español, cuyos suelos son de naturaleza calcárea y frecuentemente se encuentran afectados por la acumulación de sales. Sin embargo, en las regiones que no presentan caliza ni salinidad en el suelo, el portainjerto más utilizado es CC, que reúne las cualidades idóneas para el cultivo de variedades de naranjo y mandarino con producción de frutos de mayor calidad. El desarrollo de nuevos portainjertos de cítricos, se centra en reunir el mayor número de características de interés en un solo cultivar. Los inconvenientes que plantea la mejora tradicional de portainjertos mediante hibridación sexual se atribuyen principalmente a la compleja biología reproductiva de los cítricos y a su alta heterocigosis que hace muy complicado y largo el proceso de obtención y selección de individuos que reúnan los caracteres deseados de ambos parentales (Herrero et al., 1996; Ollitrault et al., 2003; Barkley et al., 2006; Ollitrault y Navarro, 2012).

Los programas de mejora de portainjertos mediante hibridación somática permiten reunir en los híbridos alotetraploides los genomas completos de los parentales y por tanto la adición de sus caracteres dominantes complementarios (Ollitrault et al., 2000). Por otro lado, la propagación *in vitro* permite la evaluación precoz de los HS, adelantando la disponibilidad de plantas a la pérdida de caracteres juveniles e inicio de la producción de semilla, lo que supone un considerable avance para los programas de mejora (Bordas et al., 2015).

### 4.1 Caracterización genética de los híbridos somáticos obtenidos mediante fusión de protoplastos

En trabajos previos del grupo se obtuvieron dos HS alotetraploides de los portainjertos más utilizados en la citricultura española, CC y CM (Pensabene-Bellavia, 2009). Estos HS se han analizado con 61 marcadores moleculares nucleares y 5 marcadores citoplasmáticos que presentaron polimorfismo entre los parentales para determinar su origen y su estructura genética.

Este análisis genético ha permitido confirmar que los HS se han originado a partir de la adición de los genomas de los parentales así como identificar alelos parentales que no están presentes en los HS. Estos alelos perdidos se han identificado en 13 marcadores ubicados en diferentes GL (2, 3, 6, 7 y 8), aunque la mayoría de los alelos no observados corresponden a los marcadores localizados en el GL 6 (9 alelos de 13 totales detectados). También se han identificado diferencias entre los dos HS en 5 marcadores. Los alelos no observados en los HS pertenecen fundamentalmente al parental embriogénico CM (9 del total alelos perdidos), aunque también se ha observado la pérdida de 4 alelos correspondientes al parental de hoja CC. En el genoma citoplasmático también se han observado diferencias entre los híbridos SMC-58 y SMC-73. Ambos han incorporado el genoma mitocondrial de CM; sin embargo, el SMC-73 presenta el genoma cloroplástico de CC, mientras que en el SMC-58 se ha observado la recombinación de los genomas cloroplásticos de ambos parentales.

Los HS de cítricos incorporan predominantemente el genoma mitocondrial procedente del parental embriogénico (Kobayashi et al., 1991; Saito et al., 1993; Yamamoto y Kobayashi, 1995; Moriguchi et al., 1997; Moreira et al., 2000; Cabasson et al., 2001; Ollitrault et al., 2001; Guo et al., 2002; Xiao et al., 2014), aunque en algunos estudios se ha observado recombinación a nivel mitocondrial (Vardi et al., 1987; Moriguchi et al., 1997; Cheng et al., 2003; Dambier et al., 2011). Sin embargo, el genoma cloroplástico habitualmente se hereda indistintamente de cualquiera de los dos parentales o presenta recombinación entre ellos. (Grosser et al., 2000; Dambier et al., 2011; Aleza et al., 2016). En este sentido, se ha comprobado en cítricos que los genomas mitocondriales y cloroplásticos están relacionados con cambios en el aroma y propiedades organolépticas de los frutos (Fanciullino et al., 2005; Satpute et al., 2015), resistencia a enfermedades (Tusa et al., 2000), alteraciones en el desarrollo de la biología floral y androesterilidad (Guo et al., 2004; Zheng et al., 2012). No obstante, en la actualidad no se dispone de información sobre cómo estas nuevas combinaciones y reorganizaciones de los genomas cloroplásticos y mitocondriales afectan al comportamiento agronómico de los portainjertos de cítricos.

El análisis genético del callo de CM, utilizado en los procesos de fusión, no mostró ninguna diferencia alélica con respecto al genotipo del árbol original.

Por ello, la hipótesis más lógica que permite explicar las diferencias observadas en las estructuras genéticas de los HS analizados es que se produzca una exclusión y/o reorganización del material genético durante el proceso de fusión y regeneración de los HS. Las diferencias observadas entre los híbridos parecen quedar limitadas a nivel sub-cromosómico, ya que el análisis por citometría de flujo no ha mostrado diferencias en el número de cromosomas ( $2n=4x=36$ ) entre los dos HS ni respecto al control tetraploide. Sin embargo, la hipótesis de que preexistan variaciones en el contenido alélico de la población celular del callo embriogénico no se puede excluir totalmente. Si este fuera el caso, dichas variaciones no podrían detectarse mediante el análisis con marcadores SSR, ya que podrían encontrarse afectando solamente a una pequeña parte de la población de células que constituyen el callo embriogénico. Sin embargo sí que podrían ser detectadas con marcadores SNP. Por otro lado, el análisis genético se ha realizado con diferentes extracciones de ADN y se han observado las mismas diferencias entre los dos HS y entre los parentales, pero no se han observado diferencias en los resultados obtenidos entre las diferentes extracciones.

Los marcadores moleculares utilizados en este trabajo están distribuidos en los diferentes GL del mapa genético de clementino, lo que nos ha permitido observar configuraciones alélicas diferentes entre los dos HS. La mayoría de los alelos ausentes que se han detectado están localizados en el mismo GL y las pérdidas se reducen a fragmentos pequeños. El origen de estas variaciones puede estar relacionado tanto con fenómenos de delección (ausencia de alelos de marcadores SSR), como con variaciones puntuales de un número reducido de nucleótidos (alelos SNP no observados).

En cítricos se han detectado variaciones a nivel sub-cromosómico en diferentes HS (Olivares-Fuster, 1998; Froelicher, 1999; Guo et al., 2007; Xu et al., 2014), aunque los estudios que las describen son muy escasos. Generalmente los análisis genéticos de HS se han realizado con un número muy reducido de marcadores moleculares, suficientes para constatar que los HS adicionan los genomas de los dos parentales, pero que resultan insuficientes para identificar este tipo de cambios (Oberwalder et al., 1998; Guo y Deng, 1999). Estas alteraciones sub-cromosómicas observadas en los HS de cítricos también se han descrito recientemente en HS de patata (*Solanum* spp) mediante marcadores DArT (Diversity Array Technology) (Smyda-Dajmund et al., 2016). Se identificaron más de 5000 marcadores distribuidos a lo largo del genoma de los HS de patata, de los cuales 2000 resultaron polimórficos entre los parentales y permitieron detectar la pérdida de entre un 13.9% y un 29.6% de los alelos parentales en los HS.

La detección de alteraciones en el genoma de HS justifica la necesidad de realizar un análisis genético detallado en las plantas obtenidas mediante hibridación somática, que permita obtener información lo más detallada posible de su estructura genética. Esta información es clave para interpretar y optimizar las evaluaciones posteriores del comportamiento fisiológico de los HS para su utilización como portainjertos.

#### **4.2 Morfología y respuesta fisiológica de los híbridos somáticos al estrés biótico y abiótico**

Morfológicamente, los HS SMC-58 y SMC-73 reúnen características intermedias entre los parentales y son muy similares entre sí, aunque se ha observado que el número de folíolos es variable entre 1 y 3 e inestable en las plantas, apareciendo hojas unifoliadas que se asemejan a CM, trifoliadas como las de CC y también bifoliadas. Además se apreció claramente el efecto de la tetraploidía en la forma más redondeada del limbo foliar principal. Estas características foliares también se han observado en HS obtenidos a partir de *Citrus* y géneros afines, como *Citropsis*, *Severinia* y *Microcitrus* (Smith et al., 2013), o a partir de hibridaciones interespecíficas del género *Citrus* (Olivares-Fuster, 1998), que produjeron hojas con características morfológicas intermedias entre los parentales.

Algunas de las plantas de los HS cultivadas en los invernaderos del IVIA han empezado a producir frutos, aunque escasos y de forma esporádica. Se observó que éstos contenían un número elevado de semillas apomícticas por fruto, característica muy importante para portainjertos de cítricos, por facilitar su multiplicación vegetativa y cultivo en vivero.

También se observó en este estudio el menor crecimiento de los HS respecto a los parentales, que mostraron reducción de un 59% (SMC-58) y un 43% (SMC-73) respecto a CC y de un 47% (SMC-58) y un 19% (SMC-73) respecto a CM. Además, el SMC-73 tuvo un crecimiento notablemente superior al SMC-58. En éste aspecto, los HS no presentan características intermedias entre los parentales. La reducción del crecimiento se ha descrito en otros HS alotetraploides de cítricos (Grosser et al., 1998; Grosser et al., 2012a) y se ha asociado con el aumento del nivel de ploidía (Lee, 1988; Lee, 1990; Lee, 1994).

En los portainjertos, esta característica tiene la utilidad de permitir el establecimiento de plantaciones de alta densidad que permitan un manejo más eficiente y resulten más rentables, ya que la reducción del tamaño no afecta al rendimiento productivo (Grosser et al., 1995; Grosser y Chandler, 2003; Grosser et al., 2015).

En cuanto a la resistencia a patógenos como CTV o *Phytophthora*, se ha postulado que debe heredarse mayoritariamente de manera dominante (Grosser et al., 2000). El CTV produce dos enfermedades claramente diferenciadas, las acanaladuras en la madera de las especies sensibles, independientemente de su uso como variedad o como portainjerto y el decaimiento de árboles injertados sobre NA. En nuestro trabajo se ha evaluado, por primera vez, la herencia de la tolerancia a las acanaladuras en la madera causadas por CTV y se ha determinado que los HS obtenidos entre la especie sensible CM y la tolerante CC mantienen la tolerancia aportada por CC. En otros trabajos se ha evaluado la herencia de la tolerancia al decaimiento en HS entre la especie sensible NA y diversas especies tolerantes (Grosser et al., 1996c). Los resultados no fueron globalmente concluyentes, ya que mientras que los HS entre NA y lima Rangpur (*C. limonia* Osb.) o limonero Rugoso (*C. jambhiri* Lush) se mostraron tolerantes, otros entre NA y *P. trifoliata*, o mandarina Cleopatra (*C. reshni* Hort ex. Tan.) y naranja dulce se mostraron susceptibles. Estos resultados también evidencian que en las hibridaciones somáticas no siempre se obtiene la adición de los fenotipos parentales como sería esperable (Gmitter et al., 2012).

No existen trabajos previos sobre evaluación precoz de la adaptación de HS a condiciones adversas del suelo. En nuestro trabajo se ha demostrado que los dos HS evaluados tienen a grandes rasgos un comportamiento intermedio entre ambos parentales. En lo referente a la adaptación a las condiciones clorosantes, los híbridos mostraron una tolerancia mayor que la observada en el parental sensible CC y similar a la del parental tolerante CM. Estos resultados indican que los híbridos probablemente manifiesten una buena adaptación al cultivo en suelo alcalino. En la tolerancia a la salinidad, el SMC-58 manifestó ser más tolerante que CC, debido a su menor acumulación de  $Cl^-$  en las hojas, aunque su acumulación fue mayor que la del parental tolerante CM. El HS SMC-73 mostró una acumulación de  $Cl^-$  similar a CC y mayor que los anteriores, por lo que es previsible que su capacidad de tolerar la salinidad sea más restringida.

Actualmente se están llevando a cabo, a nivel mundial, varios programas de obtención de HS alotetraploides para su utilización como portainjertos de cítricos. En Florida se ha obtenido un número elevado de HS que destacan por su buena adaptación al suelo local, por inducir buena calidad de fruto y favorecer el rendimiento productivo y por tener aparentemente en ensayos preliminares una tasa reducida de afección por la enfermedad Huang long bing (Grosser et al., 2015). También se están evaluando HS para la citricultura mediterránea, (Dambier et al., 2011), china (Guo et al., 2002; Guo et al., 2007), brasileña (Mendes-da-Gloria et al., 2000; Mourao et al., 2008) y mexicana (Medina-Urrutia et al., 2004). Estos datos evidencian que la mejora de portainjertos a nivel tetraploide mediante hibridación somática es una aproximación que permite eficientemente obtener nuevo germoplasma de gran utilidad potencial para su utilización como portainjerto en la citricultura.

#### **4.3 Importancia de la caracterización molecular y fisiológica de los híbridos somáticos**

La estrategia de mejora basada en la hibridación somática mediante fusión de protoplastos pretende reunir en un híbrido la herencia aditiva de los parentales. No obstante, los estudios que analizan el proceso de generación de variabilidad mediante hibridación somática realizados en las últimas décadas, gran parte de los cuales han sido llevados a cabo en cítricos, revelan que la expresión de los caracteres de los híbridos puede no ser aditiva. En éstos casos, el fenotipo del híbrido no es necesariamente la suma del efecto de los alelos parentales reunidos, ya que se ha observado que la alopoliploidización genera modificaciones en la expresión génica, cambios epigenéticos y fenotípicos (Bassene et al., 2009; Bassene et al., 2010; Dambier et al., 2011; Xu et al., 2014;) y se ha discutido en qué medida se deben a la interespecificidad de los genomas parentales reunidos, cuya interacción *de novo* afecta profundamente a la expresión génica (Hegarty et al., 2009), o a la ganancia de ploidía (Dambier et al., 2011).

Cuando se genera un alopoliploide, sea mediante hibridación sexual o somática, la coexistencia en un único núcleo de los genomas de ambos parentales y los cambios en los genomas citoplasmáticos, se asocian habitualmente con una amplia variedad de reorganizaciones y modificaciones que afectan a la estructura y regulación del genoma del nuevo HS (Comai et al., 2000; Ozkan et al., 2001; Wang et al., 2006b; Soltis et al., 2009; Flagel y Wendel, 2010).



Este fenómeno, que ha sido englobado bajo el término de *shock* genómico (Song et al., 1995), es de naturaleza dinámica y estocástica y se compone de procesos variados como son la eliminación de fragmentos del genoma a nivel sub-cromosómico o cromosómico y su intercambio, modificaciones en la metilación, regulaciones en la represión/expresión de genes o activación de elementos transponibles, entre otros (Chen, 2007; Xu et al., 2014). Estos cambios afectan a la expresión génica, bien mediante la alteración de la secuencia o bien debido a cambios en la regulación epigenética (Comai, 2005), proporcionando al genoma plasticidad y mejorando así la capacidad de los híbridos para su adaptación al ambiente (Chen, 2007).

Esta neoregulación de los genomas parentales en las plantas aloploidoides explicaría en gran medida la obtención de genotipos y fenotipos no observados en el *pool* diploide (Osborn et al., 2003) y los fenómenos de herencia no aditiva (He et al., 2003; Albertin et al., 2006; Hegarty et al., 2006; Wang et al., 2006a; Wang et al., 2006b; Chen, 2007; Flagel et al., 2008; Flagel y Wendel, 2010; Chen, 2010). El estudio de la expresión génica en neopoliploides ha ganado importancia en los últimos años, ya que ha sido propuesto como una aproximación de gran utilidad para entender cómo funcionan y evolucionan los genomas (Gmitter et al., 2012; Gianinetti, 2013). En los HS SMC-58 y SMC-73, las pérdidas sub-cromosómicas puntuales detectadas, algunas de las cuales son distintas entre éstos HS, indican que éste tipo de alteraciones ocurren y afectan de manera individual a cada HS, con independencia de que los parentales sean los mismos. Estas variaciones genéticas identificadas, junto con los posibles fenómenos de neoregulación, así como las nuevas combinaciones citoplásmáticas encontradas y la ganancia de ploidía, podrían ser los determinantes de las diferencias fenotípicas encontradas entre los híbridos y de las desviaciones respecto a la adición de los fenotipos parentales.

La obtención mediante fusión de protoplastos de dos HS procedentes de los mismos parentales, pero cuya composición genética, morfología y comportamiento fisiológico son diferentes pone de manifiesto la necesidad de realizar caracterizaciones moleculares exhaustivas de los HS obtenidos para poder verificar su composición genética, así como la necesidad y el interés de estudiar sus características y comportamiento agronómico para valorar correctamente su utilidad en los programas de mejora.

Este tipo de estudios, además de aportar un gran valor a los programas de mejora genética de cítricos, pueden revelar información clave para el conocimiento y comprensión de los principios que operan en la regulación para el funcionamiento y la evolución de los genomas

#### **4.4 Posible utilización de los híbridos somáticos SMC-78 y SMC-73 como portainjertos de cítricos**

Los HS SMC-58 y SMC-73, que reúnen los genomas de los dos portainjertos más utilizados en la citricultura española, presentan sin duda alguna un gran interés para su posible utilización directa como portainjertos de cítricos mejor adaptados a las características de la citricultura mediterránea. Ambos se han mostrado tolerantes a razas severas del virus de la tristeza (CTV), mientras que CM es muy sensible a las mismas. Las razas predominantes de CTV en España son relativamente suaves y causan pocos daños en CM, sin embargo, esta especie es muy sensible a razas severas del virus que provoca fuertes acanaladuras en el tronco del portainjerto y deterioro de los árboles infectados. En España, también se han detectado razas severas, aunque la incidencia es baja (Moreno et al., 2008). Las razas severas se transmiten de forma poco eficiente por las especies de pulgones presentes en las zonas citrícolas comerciales españolas, pero muy eficientemente por la especie de pulgón *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), que ya está presente en el norte de Portugal, Galicia y parte de la cornisa Cantábrica. La probable introducción de esta especie a las zonas citrícolas, previsiblemente provocaría una dispersión de razas severas de CTV que causaría daños en CM. Por ello es muy importante disponer de alternativas a este portainjerto que se puedan utilizar en suelos alcalinos, donde no es posible utilizar el CC.

Los dos híbridos somáticos estudiados presentan además un comportamiento frente a la clorosis férrica provocada por los suelos calizos, que son mayoría en la citricultura española, cercano al de CM y muy superior al de CC. Además, tienen una tolerancia a la salinidad algo mejor que CC. Por todo ello, los datos obtenidos en esta tesis confirman el interés teórico potencial por el que se abordó la obtención de los HS.

Antes de su posible utilización es necesario realizar largos y costosos ensayos en condiciones de campo para confirmar los datos obtenidos en los experimentos de invernadero y averiguar datos adicionales como su tiempo de entrada en producción y la calidad de la fruta inducida a la variedad injertada.

También será conveniente evaluar otros aspectos, como la tolerancia a la sequía o a la toxicidad por boro, que mejoran en las variantes 4x de algunos portainjertos de cítricos (Allario et al., 2013; Ruiz et al., 2016b), así como la tolerancia a la salinidad (Grosser et al., 2012a; Saleh et al., 2008; Ruiz et al., 2016a). Estos experimentos ya se han iniciado en colaboración con Agromillora Research S.L. y permitirán en el plazo de unos pocos años determinar si alguno de los HS estudiados se puede utilizar comercialmente, lo que sería un gran avance para la citricultura.



## DISCUSIÓN GENERAL

---

La poliploidía, característica heredable de poseer más de dos juegos completos de cromosomas, es un fenómeno muy común en plantas superiores (Wood et al., 2009) y uno de los principales motores evolutivos (Hollister et al., 2012) por favorecer la adaptación a las condiciones ambientales cambiantes o adversas (Ramsey, 2011). Se han descrito numerosos cambios anatómicos y fisiológicos asociados a la poliploidía (Warner y Edwards, 1989; Warner y Edwards, 1993; Li et al., 1996), que se relacionan con ésta capacidad de adaptación (Buggs y Pannell, 2007; Maherali et al., 2009; Ramsey, 2011; Manzaneda et al., 2012), cuyo determinante genético consiste en un conjunto de cambios estructurales y de la regulación de la expresión como consecuencia del aumento en la ploidía (Comai, 2005). Esta alteración del genoma puede aparecer de manera espontánea (Frost, 1925; Frost y Soost, 1968), pero también se puede inducir de manera artificial (Dermen, 1940; Aleza et al., 2009). En agricultura, ha sido habitualmente aprovechada para la mejora de cultivos (Batra, 1952; Beakbane, 1967; Chadha y Mukherjee, 1975; Walker, 1980; Grosser y Gmitter, 2011). En el caso de los cítricos es destacable el estudio, la obtención y la utilización de variedades triploides (3x) sin semillas y de portainjertos tetraploides (4x), ya que ha supuesto en los últimos años una importante aportación a la mejora del cultivo (Grosser y Gmitter, 2011; Ollitrault et al., 2008; Ollitrault y Navarro, 2012; Navarro et al., 2015).

El desarrollo de nuevos portainjertos de cítricos, se centra en reunir el mayor número de características de interés en un solo cultivar, siendo esenciales las tolerancias a estreses bióticos y abióticos requeridas en cada zona de cultivo y la inducción de buen rendimiento y de buena calidad al fruto de la variedad injertada (Castle, 2010). En España, la presencia del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y *Phytophthora* spp, así como el alto contenido en caliza de la mayoría de los suelos citrícolas y el creciente problema de la salinidad, limitan el número de portainjertos adecuados para el cultivo. La mejora tradicional de portainjertos, mediante hibridación sexual, plantea inconvenientes debido fundamentalmente a la compleja biología reproductiva de los cítricos y a su alta heterocigosidad (Herrero et al., 1996; Ollitrault et al., 2003; Barkley et al., 2006).

Por este motivo se han iniciado algunos programas de mejora de portainjertos de cítricos a nivel 4x, con el objetivo de agilizar y facilitar el su desarrollo (Dambier et al., 2011; Grosser y Gmitter, 2011; Grosser et al., 2015). La alotetraploidía obtenida mediante fusión de protoplastos ofrece ventajas en éste sentido, al permitir la obtención de híbridos de especies sexualmente incompatibles (Louzada et al., 1993; Grosser et al., 1996b; Guo y Deng, 1999) o reunir en un solo cruce los genomas de los parentales, permitiendo la adición de caracteres dominantes complementarios con independencia de la heterocigosidad (Ollitrault et al., 2000; Ollitrault y Navarro, 2012). La obtención de portainjertos alotetraploides mediante hibridación somática, ya ha demostrado ser de gran utilidad para la mejora de cítricos (Grosser et al., 2015).

Por su parte, la autotetraploidía o característica de contener un número duplicado de cromosomas somáticos manteniendo una composición genética idéntica a los correspondientes genotipos 2x, ofrece la posibilidad de evaluar y seleccionar las variantes espontáneas autotetraploides de los portainjertos utilizados en cada área citrícola, constituyendo un método de mejora relativamente sencillo (Lee, 1988; Lee, 1990). Las variantes autotetraploides de los portainjertos que se utilizan actualmente podrían ser una alternativa para obtener árboles más pequeños y más tolerantes a ciertos estreses sobre patrones ya conocidos (Mukherjee y Cameron, 1958; Barrett y Hutchison, 1978; Lee, 1990; Ollitrault y Michaux-Ferriere, 1992; Saleh et al., 2008; Allario et al., 2013). Sin embargo, el efecto de la tetraploidía parece variar en las diferentes especies de cítricos que se utilizan como portainjerto y los determinantes anatómicos, fisiológicos y moleculares de las diferencias asociadas a la tetraploidía apenas han sido descritos. Conocerlos y caracterizar su efecto sobre la tolerancia a estreses o el vigor del árbol permitiría identificar eficientemente la utilidad potencial de las versiones 4x de cada portainjerto.

El propósito de ésta tesis ha sido evaluar las características de potencial interés agronómico de las variantes 4x de los portainjertos más utilizados en la citricultura española, el citrange Carrizo (CC) y el *C. macrophylla* (CM), con el fin de valorar su utilidad, así como describir los determinantes anatómicos, fisiológicos y moleculares de las diferencias encontradas. Además se ha pretendido la caracterización molecular y fisiológica de híbridos alotetraploides obtenidos mediante fusión de protoplastos de CM y CC (Pensabene-Bellavia, 2009), como paso previo para su posible utilización como portainjertos en la citricultura mediterránea.

En todos los estudios realizados se han obtenido nuevos conocimientos sobre el efecto de la tetraploidía en los portainjertos de cítricos y su utilidad potencial.

En una parcela experimental, localizada en la región citrícola del sureste español, que presenta condiciones edafo-climáticas adversas, observamos que la reducción del tamaño de copa de árboles de naranjo ‘Valencia’ late (VL) asociada a la tetraploidía del portainjerto, puede darse o no, en función del portainjerto considerado, de acuerdo con Lee (1990). En nuestro estudio, el volumen de copa de VL/4xCC fue un 42% inferior al de VL/CC2x, mientras que entre VL/CM4x y VL/CM2x no varió.

Sin embargo no se observaron diferencias en la eficiencia productiva ni en la calidad del fruto en función de la ploidía del portainjerto como señalan otros estudios (Schwartz, 2001a; Hussain et al., 2012a). Estos datos sugieren que podría mejorarse el rendimiento y facilitarse el manejo de las plantaciones citrícolas utilizando CC4x en lugar de CC2x para obtener árboles más pequeños y reduciendo el marco de plantación, como propone el estudio de Grosser y Gmitter (2011) para otros portainjertos. No obstante, puesto que el presente estudio se llevó a cabo en una plantación que aún se encuentra en desarrollo, habrá que continuar el ensayo durante varios años para disponer de datos definitivos.

Por otro lado, en las regiones citrícolas localizadas en clima semiárido, el cultivo de cítricos se realiza frecuentemente en suelos alcalinos, que dificultan la absorción de algunos nutrientes. En este estudio se comprobó que la autotetraploidía aumentó la concentración foliar de potasio (K) en torno a un 27% en naranjos ‘Valencia’ late injertados sobre CC4x y CM4x, respecto a aquellos injertados sobre las correspondientes versiones 2x. En la línea de éstos resultados, se ha propuesto en Arabidopsis que la tetraploidía de la raíz proporciona concentraciones foliares más elevadas de K a la parte aérea, condición que se relaciona con el incremento de la tolerancia de las plantas a la salinidad (Chao et al., 2013).

En cuanto al calcio (Ca) y el magnesio (Mg), la tetraploidía redujo sus concentraciones foliares en naranjos ‘Valencia’ late injertados sobre CC4x y CM4x, respecto a aquellos injertados sobre las correspondientes versiones 2x. Estas modificaciones en la composición mineral foliar, observadas en la parcela experimental establecida en suelo alcalino, proporcionaron a los árboles con portainjerto 4x una relación K/Ca+Mg más elevada, dato indicativo de una mayor capacidad para mantener un balance favorable de nutrientes en condiciones alcalinas (Shear et al., 1948) y promover una adecuada nutrición al árbol.

Por ello, nuestro estudio sugiere que la tetraploidía en CC y CM podría proporcionar mayor capacidad de adaptación para el cultivo de cítricos en suelos calcáreos.

En estas regiones, el cultivo de cítricos también se encuentra afectado por la salinización del suelo o sufre un gran riesgo de quedar afectado por esta condición. Los suelos salinos contienen concentraciones altas de solutos potencialmente tóxicos, como es el caso del cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), el sodio ( $\text{Na}^+$ ) o el boro (B), cuya acumulación en la parte aérea ocasiona desequilibrios nutricionales, daños y reducción severa del crecimiento y de la producción. El impacto de la salinidad es especialmente grave en los cultivos arbóreos de hoja perenne, dada la acumulación preferente de las sales en la parte aérea, que suele conducir a la inutilización de las plantaciones. No obstante, la absorción de solutos en exceso por las raíces y su transporte a la parte aérea son procesos controlados por el portainjerto (Levy y Lifshitz, 2000; García-Sánchez et al., 2002a; García-Sánchez et al., 2006; Gimeno et al., 2012), que determina, en gran medida, el grado de acumulación en las hojas.

La tetraploidía en CC redujo la absorción de B, presente en exceso en el suelo, en torno a un 20% en los árboles VL/ CC4x, efecto que se confirmó en los experimentos realizados con plantas de CC sin injertar. Este estudio sostiene la utilidad de CC4x como portainjerto de cítricos tolerante a la toxicidad específica por B. Sin embargo, éste comportamiento no se observó en VL/CM4x.

La salinidad del suelo ocasiona en las plantas dos alteraciones fundamentales: la toxicidad, debida a la acumulación de los iones salinos y la inhibición del crecimiento, resultante del efecto osmótico de las sales y de la reducción de la asimilación impuesta por el daño foliar. Entre las adaptaciones de los cítricos para hacer frente a éste estrés, destaca la exclusión de  $\text{Cl}^-$  (Munns y Tester, 2008), cuya absorción y transporte restringidos se consideran el principal mecanismo de tolerancia (Storey y Walker, 1999). Nuestro estudio indica que la tetraploidía, tanto en CC como en CM mejora la tolerancia a la salinidad respecto a las correspondientes versiones 2x, debido a la menor absorción de  $\text{Cl}^-$  que retrasa su acumulación en la parte aérea y por tanto disminuye el daño por toxicidad.

Sin embargo se observaron diferencias entre estas especies de portainjerto en la respuesta de las plantas salinizadas 4x respecto a las 2x. En CM4x las concentraciones foliares de  $\text{Na}^+$  fueron 1.4 veces menores que en plantas 2x en condiciones de salinidad moderada, pero no hubo diferencias entre ploidías en la concentración foliar de éste ión en plantas sometidas a salinidad elevada.



Mientras, en CC, las concentraciones foliares de  $\text{Na}^+$  en condiciones de salinidad moderada no fueron distintas entre plantas 2x y 4x. Estos resultados sugieren que pueda existir un efecto asociado a la tetraploidía de la raíz que reduzca la absorción de  $\text{Na}^+$ , tal y como sucede con el  $\text{Cl}^-$ . Pero, al menos en CC, la mayor tolerancia a la salinidad del genotipo 4x no se asocia a diferencias en la absorción y acumulación de éste ión.

Otra diferencia de comportamiento observada entre CC4x y CM4x sometidos a salinidad es el descenso en la tasa de asimilación neta. En CM4x el cierre estomático inducido por la salinidad es más pronunciado que en CM2x, limitando la tasa fotosintética y afectando al crecimiento. Esto indica que, aunque las plantas CM4x son capaces de limitar la acumulación foliar de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en mayor medida que las 2x, son más sensibles al cierre estomático causado por la salinidad. Sin embargo en condiciones salinas CC4x mantiene su tasa de asimilación más elevada que CC2x y por tanto, a diferencia de éste último, mantiene su tasa de crecimiento inalterada.

La respuesta común asociada a la tetraploidía en ambos portainjertos fue la menor absorción y transporte de  $\text{Cl}^-$  a la parte aérea y en ambos casos se observó éste comportamiento acompañado de una tasa de transpiración más reducida. La absorción de  $\text{Cl}^-$  por las raíces y su acumulación en la parte aérea parecen estar relacionadas en cítricos con la absorción de agua y con la tasa de transpiración, respectivamente (Moya et al., 2003; Syvertsen et al., 2010; Syvertsen y García-Sánchez, 2014). La acumulación de iones salinos en las hojas contribuye a la inducción del cierre estomático, permitiendo a las plantas limitar el transporte (Syvertsen y García-Sánchez, 2014). En el trabajo de Allario et al. (2013) se propone que existe una regulación del cierre estomático más eficiente en los cítricos 4x, gracias su producción constitutiva de ácido abscísico más elevada, mientras que Syvertsen et al. (2000) proponen que la tetraploidía induce modificaciones morfológicas en la raíz que imponen una transpiración más reducida.

En CC se determinó que la conductancia hidráulica de las raíces 4x es en torno a un 58% menor que en las 2x. La salinidad redujo la conductancia en un 35%, pero las diferencias entre ploidías se mantuvieron. La conductancia hidráulica reducida se ha relacionado también en cítricos con la capacidad de exclusión de  $\text{Cl}^-$  (Rodríguez-Gamir et al., 2012) y con la reducción del tamaño de la copa (Martínez-Alcantara et al., 2013).

Por tanto, en líneas generales, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Saleh et al. (2008), que plantean que la tetraploidía en cítricos se asocia a una menor acumulación de  $Cl^-$  y por Syvertsen et al. (2000), que indican que las variantes 4x pueden tener menores tasas de transpiración asociadas a la anatomía de la raíz. Sin embargo, existe controversia en lo referente al comportamiento de los cítricos 4x frente a la salinidad, debido a la reciente publicación de varios estudios, cuyas conclusiones difieren (Syvertsen y García-Sánchez, 2014) y se ha propuesto que la disponibilidad hídrica asociada al estrés salino pueda alterar ésta respuesta (Mouhaya et al., 2010).

También se planteó la posibilidad de que la absorción de nutrientes modificada por la tetraploidía pudiera afectar al hierro y alterar la tolerancia a la clorosis férrica. Sin embargo no se encontraron diferencias entre ploidías, en CC ni en CM, en las concentraciones foliares de hierro de plantas cultivadas en condiciones deficientes y clorosantes. Estos resultados apuntan que la capacidad de hacer frente a la clorosis férrica no difiere entre ploidías en éstos portainjertos.

Considerando los resultados obtenidos, este trabajo propone que la tetraploidía altera la absorción y el transporte a la parte aérea de agua y de algunos solutos, pudiendo contribuir a la reducción del daño causado por la absorción en exceso de solutos potencialmente tóxicos. No obstante éste efecto es variable en función de la especie considerada y podría modificarse dependiendo de las condiciones ambientales, por lo que habría de verificarse para cada caso.

En cuanto a los determinantes de éstas diferencias, se consideró la hipótesis planteada por Syvertsen et al. (2000), acerca de la influencia de la morfología de la raíz sobre la tasa reducida de transpiración en portainjertos de cítricos 4x. Coincidiendo con dicho estudio, se encontró que las raíces de CC4x son más cortas y engrosadas que las de CC2x, de manera que su longitud específica (SRL) es un 42% menor. Estudiando este órgano con mayor detalle, se encontró que la estructura de la raíz de CC4x tiene un número de ramificaciones un 65% menor que en CC2x. Adicionalmente, el estudio histológico desveló que las paredes celulares de la raíz 4x son más gruesas y suberificadas que las 2x y que la formación de las capas impermeabilizantes comienza a menor distancia del ápice radicular que en las plantas 2x.

Estas características se han asociado a una conductancia hidráulica reducida en cítricos (Eissenstat y Achor, 1999; Huang y Eissenstat, 2000), efecto que ha sido recientemente descrito en vid (Barrios-Masías et al., 2015) y a la limitación de la absorción de agua y nutrientes, que impone una transpiración más reducida (Moya et al., 2003). En CC4x, esta anatomía explicaría la mayor tolerancia a la salinidad y al exceso de B descrita.

La ausencia de un estudio similar en CM no nos permite atribuir la mayor capacidad del genotipo 4x para excluir  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  a las características de la raíz. No obstante CM4x muestra una tasa de transpiración menor que CM2x, del mismo modo que sucede en CC4x y sería razonable que el mecanismo fisiológico subyacente tuviera características comunes.

Probablemente las modificaciones que la tetraploidía induce en la raíz estén relacionadas también con la menor tasa de crecimiento que se ha descrito respecto a los 2x. En el trabajo de Romero-Aranda et al. (1997) se determinó que la asimilación neta es entre un 25% y un 35% más alta en las hojas 2x que en las 4x, debido al mayor grosor del tejido 4x. Sin embargo en otro trabajo (Syvertsen et al., 2000) la asimilación neta de  $\text{CO}_2$  no fue diferente entre ploidías, pero se asocia el tamaño más reducido de los cítricos 4x con su menor tasa de transpiración y menor SRL. Sin embargo, ambos trabajos destacan que la falta de control sobre el tamaño y porte de las plantas complica la tarea de tomar medidas puntuales del intercambio de gases que resulten representativas y que permitan realizar comparaciones concluyentes sobre sus implicaciones fisiológicas. En este sentido, nuestro trabajo aporta información concluyente, ya que el crecimiento más reducido y las diferencias en la concentración mineral foliar y en la absorción de solutos en exceso deben atribuirse, al menos en parte, a características de la raíz tetraploide, por haberse mantenido tales efectos en las plantas injertadas.

Por otra parte, los híbridos SMC-58 y SMC-73, obtenidos mediante hibridación somática a partir de la adición de los genomas nucleares de CC y CM y cuya micropropagación *in vitro* ha permitido su evaluación precoz, presentan en su genoma nuclear pérdidas alélicas sub-cromosómicas de los parentales y difieren entre ellos en la composición de su genoma citoplasmático. Estas diferencias genéticas identificadas han permitido determinar que los híbridos somáticos (HS) no incorporan los genomas nucleares completos de los parentales, como era generalmente aceptado y además presentan diferencias entre sí.

De acuerdo con otros autores que describen los efectos de la hibridación somática en el genoma de los cítricos (Olivares-Fuster, 1998; Froelicher, 1999; Guo et al., 2007; Xu et al., 2014) y de otras especies (Maliga et al., 1978; Sakata y Monma, 1993; Smyda-Dajmund et al., 2016), las diferencias genéticas en los híbridos respecto a los parentales y entre sí son indicativas de que se han producido exclusiones y reorganizaciones del material genético durante el proceso de fusión y regeneración de las plantas, que afectan de manera independiente a cada HS obtenido.

Morfológicamente, los HS SMC-58 y SMC-73 reúnen características intermedias entre los parentales, son muy similares entre sí y muestran algunos caracteres propios de la tetraploidía (Barrett y Hutchison, 1978), como la forma redondeada del limbo foliar o la reducción del crecimiento (Syvertsen et al., 2000). Ambos han heredado de CC la tolerancia a las acanaladuras en la madera causadas por CTV, presentan tolerancia frente a la clorosis férrica similar a la de CM y tolerancia a la salinidad superior a la de CC. Este estudio pone de manifiesto la necesidad de realizar caracterizaciones moleculares exhaustivas de los HS obtenidos para poder verificar su composición genética, así como la necesidad de estudiar sus características y comportamiento agronómico para valorar correctamente su utilidad en los programas de mejora. En este sentido, se han encontrado otros estudios que también evidencian que en las hibridaciones somáticas no siempre se obtiene la adición de los fenotipos parentales como sería esperable (Gmitter et al., 2012). En éstos casos, el fenotipo del híbrido no es la suma del efecto de los alelos parentales reunidos, debido a las modificaciones en la expresión génica, cambios epigenéticos y fenotípicos inducidos por la aloploidización (Bassene et al., 2009; Bassene et al., 2010; Dambier et al., 2011; Xu et al., 2014). En cuanto a estas alteraciones, actualmente se discute cuál es la contribución de la interacción *de novo* de los genomas parentales reunidos (Hegarty et al., 2009) y de la ganancia de ploidía (Dambier et al., 2011). Los HS evaluados SMC-58 y SMC-73 han manifestado un conjunto de características que presentan sin duda alguna un gran interés potencial para la citricultura mediterránea. Se habrá de estudiar su comportamiento en campo y su efecto sobre las variedades injertadas antes de su posible utilización comercial.

## CONCLUSIONES GENERALES

---

Este trabajo constituye un ejemplo de la utilidad potencial de la tetraploidía para la mejora de portainjertos de cítricos, explorando tanto la selección de variantes autotetraploides, como la obtención de híbridos somáticos alotetraploides.

La evaluación y selección de las variantes autotetraploides de los portainjertos utilizados en cada área citrícola puede constituir un método de mejora sencillo. Estas variantes pueden proporcionar la capacidad de reducción del tamaño de copa sin afectar la eficiencia productiva ni la calidad del fruto y una mejor adaptación a ciertas condiciones adversas como la alcalinidad del suelo, la salinidad o la acumulación excesiva de solutos potencialmente tóxicos, mientras que otras características de interés se mantienen inalteradas. Su evaluación en cada caso es necesaria para verificar los efectos de la tetraploidía, puesto éstos varían entre diferentes portainjertos y podrían ser dependientes de ciertas condiciones ambientales.

La obtención de híbridos somáticos alotetraploides es una opción que permite reunir muy eficientemente las características de dos portainjertos de interés en un solo genotipo. Sin embargo es fundamental llevar a cabo caracterizaciones moleculares y fisiológicas exhaustivas de los híbridos somáticos obtenidos, ya que la alopoliploidización induce alteraciones genéticas que pueden generar desviaciones del fenotipo respecto a la adición parental.

Este trabajo presenta los primeros datos relativos al comportamiento de las versiones autotetraploides de los portainjertos Carrizo y *C. macrophylla*, que son los más utilizados en España y presenta los primeros datos a cerca de la constitución genética y comportamiento fisiológico de dos híbridos somáticos alotetraploides obtenidos mediante la fusión de protoplastos de los portainjertos anteriores.

Las conclusiones generales obtenidas son las siguientes:

1. La tetraploidía en los portainjertos citrange Carrizo y *C. macrophylla* altera la composición mineral de las hojas de la variedad injertada 'Valencia' late, aumentando la concentración de potasio y disminuyendo la de calcio y magnesio. Esta composición mineral aumenta el balance de cationes  $K^+/Ca^{2+}+Mg^{2+}$  resultando más favorable para el mantenimiento de una nutrición adecuada en suelos alcalinos.

2. En condiciones de exceso de boro en el medio, la tetraploidía del portainjerto citrange Carrizo determina una acumulación de B menor en las hojas de la variedad injertada ‘Valencia’ late, por lo que éste portainjerto (CC4x) podría utilizarse en sustitución del diploide (CC2x) en aquellas plantaciones citrícolas establecidas en zonas cuyo suelo este afectado o corra un alto riesgo de afectarse por exceso de boro.
3. La tetraploidía de los portainjertos citrange Carrizo y *C. macrophylla* determina, en naranjos ‘Valencia’ late, una altura menor de los árboles respecto a las correspondientes versiones diploides, pero no modifica la eficiencia productiva ni la calidad del fruto.
4. La tetraploidía en citrange Carrizo reduce en torno a un 40% el volumen de copa en naranjos ‘Valencia’ late injertados sobre este portainjerto, mientras que este carácter no se modifica en en naranjos ‘Valencia’ late injertados sobre *C. macrophylla* tetraploide. La utilización de citrange Carrizo tetraploide como portainjerto, reduciendo el marco de plantación, podría contribuir al aumento del rendimiento productivo y facilitaría el cultivo de las plantaciones citrícolas.
5. Las plantas de *C. macrophylla* tetraploides son más tolerantes a la toxicidad causada por la salinidad que las diploides de esta especie por presentar una mayor capacidad para excluir la absorción de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y mantener su concentración reducida en las hojas retrasando el daño del tejido foliar. Este efecto podría asociarse a su menor tasa de transpiración, que actuaría limitando la absorción y transporte del ión. El cierre estomático que limita la transpiración reduce además la asimilación neta de  $\text{CO}_2$ , disminuyendo el crecimiento de las plantas tetraploides.
6. Las plantas tetraploides de citrange Carrizo son también más tolerantes a la salinidad que las diploides por presentar una menor capacidad de absorción y transporte de  $\text{Cl}^-$ , que reduce la acumulación del ión en las hojas, retrasando el daño foliar. Este efecto permite mantener la función fotosintética menos afectada y en consecuencia mantener activo el crecimiento de las plantas 4x. La reducida absorción de  $\text{Cl}^-$  parece ser principalmente debida a los cambios en la morfología y anatomía de las raíces ocasionados por la tetraploidía, que confieren menor conductancia hidráulica a las raíces y reducen la capacidad de absorción de agua y  $\text{Cl}^-$ .

## CONCLUSIONES GENERALES

7. El citrange Carrizo tetraploide podría utilizarse en sustitución del diploide como portainjerto en plantaciones cítricas establecidas en suelos salinos o que corran un alto riesgo de salinización.
8. Las plantas tetraploides de citrange Carrizo presentan una capacidad reducida de absorción y transporte de boro respecto a las diploides, que da lugar a una concentración menor de boro en las hojas, reduciendo el daño por toxicidad. Este efecto parece ser consecuencia de las diferencias morfológicas e histológicas identificadas en las raíces.
9. Las raíces de citrange Carrizo tetraploide tienen un número de ramificaciones en torno a un 65% menor que las raíces decitrango Carrizo diploides, son más cortas y gruesas, de manera que su longitud específica (SRL) es alrededor de un 42% menor. Además, la región fibrosa cuenta con paredes celulares exodérmicas más gruesas que contienen láminas suberificadas de mayor grosor que las diploides y la deposición de compuestos impermeabilizantes (suberina y/o lignina) en la endodermis comienza a una distancia más cercana al ápice que en las raíces diploides.
10. La tetraploidía en citrange Carrizo y *C. macrophylla* no modifica la tolerancia de las plantas a la clorosis férrica, al menos en las condiciones experimentales expuestas.
11. Los híbridos somáticos SMC-58 y SMC-73 reúnen los genomas nucleares de citrange Carrizo y *C. macrophylla*, aunque se han identificado pérdidas alélicas sub-cromosómicas puntuales distribuidas a lo largo de los 9 grupos de ligamiento y que son diferentes entre ellos. En su citoplasma, SMC-58 incorpora el genoma mitocondrial de *C. macrophylla* y el genoma cloroplástico es recombinante de citrange Carrizo y *C. macrophylla*, mientras que SMC-73 tiene también el genoma mitocondrial de *C. macrophylla* y el cloroplástico procede de citrange Carrizo.
12. Morfológicamente, los HS SMC-58 y SMC-73 reúnen características intermedias entre los parentales, son muy similares entre sí y muestran algunos caracteres propios de la tetraploidía. Ambos han heredado de citrange Carrizo la tolerancia a las acanaladuras en la madera causadas por CTV, presentan tolerancia frente a la clorosis férrica similar a la de *C. macrophylla* y tolerancia a la salinidad superior a la de citrange Carrizo, por lo que resultan de gran interés para su posible utilización directa como portainjertos de cítricos mejor adaptados a las necesidades de la citricultura mediterránea.





## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abadía, J., 1992. Leaf responses to Fe deficiency: a review. *Journal of Plant Nutrition* 15, 1699-1713.
- Adnan, A., 2004. Influence of salinity on citrus: a review paper. *Journal of Central European Agriculture* 5, 263-272.
- Agüero, J., Vives, M.C., Velázquez, K., Pina, J.A., Navarro, L., Moreno, P., Guerri, J., 2014. Effectiveness of gene silencing induced by viral vectors based on Citrus leaf blotch virus is different in *Nicotiana benthamiana* and citrus plants. *Virology* 460-461, 154-164.
- Ahmad, R., Struss, D., Southwick, S., 2003. Development and characterization of microsatellite markers in Citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128, 584-590.
- Ahmed, H.S., Al-Shurafa, M.Y., 1984. Effect of rootstocks on the leaf mineral content of citrus. *Scientia Horticulturae* 23, 163-168.
- Albertin, W., Balliau, T., Brabant, P., Chevre, A.M., Eber, F., Malosse, C., Thiellement, H., 2006. Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Genetics* 173, 1101-1113.
- Albertin, W., Brabant, P., Catrice, O., Eber, F., Jenczewski, E., Chevre, A.M., Thiellement, H., 2005. Autopolyploidy in cabbage (*Brassica oleracea* L.) does not alter significantly the proteomes of green tissues. *Proteomics* 5, 2131-2139.
- Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Bourgeois, A., Bely, M., Dillmann, C., De Vienne, D., Sicard, D., 2009. Evidence for autotetraploidy associated with reproductive isolation in *Saccharomyces cerevisiae*: towards a new domesticated species. *Journal of Evolutionary Biology* 22, 2157-2170.
- Albrigo, L.G., 1977. Comparison of some Antitranspirants on Orange Trees and Fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 102, 270-273.
- Aleza, P., García-Lor, A., Juárez, J., Navarro, L., 2016. Recovery of citrus cybrid plants with diverse mitochondrial and chloroplastic genome combinations by protoplast fusion followed by in vitro shoot, root or embryo micrografting. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, pp 1-13.
- Aleza, P., Juárez, J., Cuenca, J., Ollitrault, P., Navarro, L., 2010. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x x 2x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. *Plant Cell Reports* 29, 1023-1034.

- Aleza, P., Juarez, J., Ollitrault, P., Navarro, L., 2009. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant Cell Reports* 28, 1837-1846.
- Aleza, P., Cuenca, J., Hernandez, M., Juarez, J., Navarro, L., Ollitrault, P., 2015. Genetic mapping of centromeres in the nine Citrus clementina chromosomes using half-tetrad analysis and recombination patterns in unreduced and haploid gametes. *BMC Plant Biology* 15, 80.
- Aleza, P., Juarez, J., Cuenca, J., Ollitrault, P., Navarro, L., 2012a. Extensive citrus triploid hybrid production by 2x x 4x sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Reports* 31, 1723-1735.
- Aleza, P., Juarez, J., Hernandez, M., Ollitrault, P., Navarro, L., 2012b. Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on 4x x 2x sexual hybridisations. *Tree Genetics and Genomes* 8, 1293-1306.
- Aleza, P., Froelicher, Y., Schwarz, S., Agusti, M., Hernandez, M., Juarez, J., Luro, F., Morillon, R., Navarro, L., Ollitrault, P., 2011. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Annals of Botany* 108, 37-50.
- Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, J.M., Iglesias, D.J., Pina, J.A., Navarro, L., Talon, M., Ollitrault, P., Morillon, R., 2013. Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant Cell and Environment* 36, 856-868.
- Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, J.M., Tadeo, F., Froelicher, Y., Talón, M., Navarro, L., Ollitrault, P., Morillon, R., 2011. Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur Lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany* 62, 2507-2519.
- Altman, A., Mendel, K., 1973. Characteristics of Uptake Mechanism of Chloride-Ions in Excised Roots of a Woody Plant (Citrus). *Physiologia Plantarum* 29, 157-162.
- Álvarez-Fernández, A., Abadía, J., Abadía, A., 2005. Iron deficiency, fruit yield and fruit quality. in: Barton, L.L., Abadía, J. (Eds.), *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in plants and microbes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland, pp. 85-101.
- Álvarez-Fernández, A., Paniagua, P., Abadía, J., 2003. Effect of Fe deficiency chlorosis on fruit quality in peach (*Prunus persica* L. Batsch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5738-5744.

- Álvarez-Fernández, A., Sierra, M.A., Lucena, J.J., 2002. Reactivity of synthetic Fe chelates with soils and soil components. *Plant Soil* 241, 129-137.
- Andaluz, S., Rodríguez-Celma, J., Abadía, A., Abadía, J., López-Millán, A.F., 2009. Time course induction of several key enzymes in *Medicago truncatula* roots in response to Fe-deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 1082-1088.
- AOAC, 1984. *Official Methods of Analysis*, 14<sup>a</sup> ed, Washington, D.C., USA.
- An, J.C., Liu, Y.Z., Yang, C.Q., Zhou, G.F., Wei, Q.J., Peng, S.A., 2012. Isolation and expression analysis of *CiNIP5*, a citrus boron transport gene involved in tolerance to boron deficiency. *Scientia Horticulturae* 142, 149-154.
- Arumuganathan, K., Earle, E.D., 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9, 229-241.
- Asíns, M.J., Breto, M.P., Carbonell, E.A., 1993. Salt Tolerance in *Lycopersicon* Species 2. Genetic-Effects and a Search for Associated Traits. *Theoretical Applied Genetics* 86, 769-774.
- Aversano, R., Ercolano, M.R., Caruso, I., Fasano, C., Rosellini, D., Carputo, D., 2012. Molecular Tools for Exploring Polyploid Genomes in Plants. *International Journal of Molecular Science* 13, 10316-10335.
- Ayers, R.S., Westcot, D.W., 1985. *Water quality for agriculture*. FAO Irrigation and drainage paper 29.
- Baldwin, J.T., 1942. Polyploidy in *Sedum ternatum* Michx. II. Cytogeography. *American Journal of Botany* 29, 283-286.
- Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Carbonell, E.A., Moreno, P., Hemoso de Mendoza, A., Cambra, M., Navarro, L., 1993. Biological Diversity of Citrus Tristeza Virus (Ctv) Isolates in Spain. *Plant Pathology* 42, 219-229.
- Bañuls, J., Serna, M.D., Legaz, F., Talon, M., Primo.Millo, E., 1997. Growth and gas exchange parameters of citrus plants stressed with different salts. *Journal of Plant Physiology* 150, 194-199.
- Bañuls, J., Primo-Millo, E., 1992. Effects of Chloride and Sodium on Gas-Exchange Parameters and Water Relations of Citrus Plants. *Physiologia Plantarum* 86, 115-123.
- Bañuls, J., Legaz, F., Primo.Millo, E., 1990. Effect of salinity on uptake and distribution of chloride and sodium in some citrus scion-rootstock combinations. *Journal of Horticultural Science* 65, 715-724.
- Bañuls, J., Primo-Millo, E., 1995. Effects of Salinity on some Citrus Scion-Rootstock Combinations. *Annals of Botany* 76, 97-102.

- Bar-Akiva, A., Gotfried, A., 1971. Effect of nitrogen and potassium nutrition on fruit yield and quality and leaf mineral composition of 'Valencia' orange trees. *Agrochimica* 15, 127-135.
- Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R., Federici, C.T., 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical Applied Genetics* 112, 1519-1531.
- Barrett, H.C., Rhodes, A.M., 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Systematic Botany* 1, 105-136.
- Barrett, H.C., 1974. Colchicine-induced poliploidy. *Botanical Gazette* 135, 29-41.
- Barrett, H.C., Hutchison, D.J., 1978. Spontaneous Tetraploidy in Apomictic Seedlings of Citrus. *Economic Botany* 32, 27-45
- Barrios-Masías, F.H., Knipfer, T., McElrone, A.J., 2015. Differential responses of grapevine rootstocks to water stress are associated with adjustments in fine root hydraulic physiology and suberization. *Journal of Experimental Botany* 66, 6069-6078.
- Barry, G.H., Castle, W.S., Davies, F.S., 2004. Rootstocks and plant water relations affect sugar accumulation of citrus fruit via osmotic adjustment. *Journal of American Society for Horticultural Science* 129, 881-889.
- Basil, E., Blumwald, E., 2014. The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/H<sup>+</sup> transporters. *Current opinion in plant biology* 22, 1-6.
- Bassene, J.B., Froelicher, Y., Dhuique-Mayer, C., Mouhaya, W., Ferrer, R.M., Ancillo, G., Morillon, R., Navarro, L., Ollitrault, P., 2009. Non-additive phenotypic and transcriptomic inheritance in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon*: the case of pulp carotenoid biosynthesis pathway. *Plant Cell Reports*. 28, 1689-1697.
- Bassene, J.B., Froelicher Y., Dubois, C., Ferrer, M.R., Navarro, L., Ollitrault, P., Ancillo, G., 2010. Non-additive gene regulation in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* Blanco and *C. limon* (L.) Burm. *Heredity* 105, 299-308.
- Batra, S., 1952. Induced Tetraploidy in Muskmelons. *Journal of Heredity* 43, 141-148.
- Baxter, I., Hosmani, P.S., Rus, A., Lahner, B., Borevitz, J.O., Muthukumar, B., Mickelbart, M.V., Schreiber, L., Franke, R.B., Salt, D.E., 2009. Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in Arabidopsis. *PLOS Genetics* 5, 1-12.
- Bayer, R.J., Mabblerley, D.J., Morton, C., Miller, C.H., Sharma, I.K., Pfeil, B.E., Rich, S., Hitchcock, R., Sykes, S., 2009. A Molecular Phylogeny of the Orange Subfamily (Rutaceae: Aurantioideae)

- using Nine Cpdna Sequences. *American Journal of Botany* 96, 668-685.
- Beakbane, A.B., 1967. A Relationship between Leaf Structure and Growth Potential in Apple. *Annals of Applied Biology* 60, 67-72.
- Behboudian, M.H., Torokfalvy, E., Walker, R.R., 1986. Effects of Salinity on Ionic Content, Water Relations and Gas-Exchange Parameters in some Citrus Scion Rootstock Combinations. *Scientia Horticulturae* 28, 105-116.
- Belkhodja, R., Morales, F., Quilez, R., López-Millán, A.F., Abadía, A., Abadía, J., 1998. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynthesis Research* 56, 265-276.
- Benavides, A., 2000. Absorción y asimilación del hierro en las plantas. *Ciencia UANL* 3, 50-52.
- Bennetzen, J.L., Wang, H., 2014. The Contributions of Transposable Elements to the Structure, Function, and Evolution of Plant Genomes. *Annual Reviews of Plant Biology* 65, 505-530.
- Berhow, M.A., Hasegawa, S., Kwan, K., Bennett, R.D., 2000. Limonoids and the chemotaxonomy of Citrus and the Rutaceae family, in: Berhow, M.A., Hasegawa, S., and Manners, G.D. (Eds.), *Citrus Limonoids: Functional Chemicals in Agriculture and Food*. American Chemical Society, Washington, D.C., US., pp. 212-228.
- Bernardi, J., Mazza, R., Caruso, P., Recupero, G.R., M., A., Licciardello, C., 2013. Use of an expressed sequence tag-based method for single nucleotide polymorphism identification and discrimination of Citrus species and cultivars. *Molecular Breeding*. 31, 705-718.
- Bertoni, G.M., Pissaloux, A., Morard, P., Sayag, D.R., 1992. Bicarbonate-pH relationship in white lupins. *Journal of Plant Nutrition* 15, 1509.
- Bienfait, H.F., Van den Briel, W., Mesland-Mul, N.T., 1985. Free space iron pools in roots. *Plant Physiology* 78, 596-600.
- Biswas, M.K., Xu, Q., Mayer, C., Deng, X., 2014. Genome Wide Characterization of Short Tandem Repeat Markers in Sweet Orange (*Citrus sinensis*). *PLoS One* 9, e104182.
- Bitters, W.P., Parker, E.R., 1953. Quick decline of citrus as influenced by top-root relationships. *California Agricultural Experimental Station Bulletin* 733, 1-35.
- Bitters, W.P., 1986. Citrus rootstocks: their characteristics and reactions.
- Bolaños, L., K. Lukaszewski, Bonilla, I., Blevins, D., 2004. Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 907-912.
- Bordas, M., Torrents, J., Navarro, L., 2015. Micropropagation for evaluation of new citrus somatic hybrid rootstocks. *Acta Horticulturae* 1065, 329-334.
- Bowman, K.D., Rouse, R.E., 2006. US-812 citrus rootstock. *HortScience* 41, 832-836.

- Bradstreet, R.B., 1954. Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. *Analytical Chemistry* 26, 185-187.
- Brady, N.C., Weil, R.R., 1999. *The Nature and Properties of Soils*. 12th ed. Prentice Hall.
- Bretagnolle, F., Thompson, J.D., 1995. Gametes with the Somatic Chromosome-Number - Mechanisms of their Formation and Role in the Evolution of Autopolyploid Plants. *New Phytologist* 129, 1-22.
- Brochmann, C., Brysting, A., Alsos, I., Borgen, L., Grundt, H., Scheen, A., Elven, R., 2004. Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 82, 521-536.
- Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F., Römheld, V., 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology* 4, 205-223.
- Brown, P.H., Shelp, B.J., 1997. Boron mobility in plants. *Plant Soil* 193, 85-100.
- Bryan, G.J., McNicoll, J., Ramsay, G., Meyer, R.C., De Jong, W.S., 1999. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics* 99, 859-867.
- Buggs, R.J.A., Pannell, J.R., 2007. Ecological differentiation and diploid superiority across a moving ploidy contact zone. *Evolution* 61, 125-140.
- Buggs, R.J.A., Chamala, S., Wu, W., Tate, J.A., Schnable, P.S., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Barbazuk, W.B., 2012. Rapid, Repeated, and Clustered Loss of Duplicate Genes in Allopolyploid Plant Populations of Independent Origin. *Current Biology* 22, 248-252.
- Bughio, N., Yamaguchi, H., Nishizawa, N.K., Nakanishi, H., Mori, S., 2002. Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *Journal of Experimental Botany* 53, 1677-1682.
- Cabasson, C.M., Luro, F., Ollitrault, P., Grosser, J.W., 2001. Non-random inheritance of mitochondrial genomes in Citrus hybrids produced by protoplast fusion. *Plant Cell Reports* 20, 604-609.
- Cakmak, I., Römheld, V., 1997. Boron deficiency induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil* 193, 71-83.
- Calabrese, F., 1998. *La Favolosa Storia Degli Agrumi*, Palermo, Italia.
- Calabrese, F., 1992. The history of citrus in the Mediterranean countries and Europe. *International Society of Citriculture* 1, 35-38.
- Calatayud A., Ramirez J.W., Iglesias D.J., Barreno E. 2002. Effects of ozone on photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange, chlorophyll a fluorescence and antioxidant systems in lettuce leaves. *Physiologia Plantarum*, 116: 308-316.
- Callister, A.N., Arndt, S.K., Adams, M.A., 2006. Comparison of four methods for measuring osmotic potential of tree leaves. *Physiologia Plantarum* 127, 383-392.

- Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquin, C., Roman, M.P., Olmos, A., Martinez, P.C., de Mendoza, A.H., López, A., Navarro, L., 2000. Incidence and epidemiology of Citrus tristeza virus in the Valencian Community of Spain. *Virus Research* 71, 85-95.
- Cameron, J.W., Soost, R.K., 1986. C35 and C32: Citrange rootstocks for citrus. *HortScience* 21, 157-158.
- Cameron, J.W., Frost, H.B., 1968. Genetic, breeding and nucellar embryony, in: Reuther, W., Batchelor, L.D., Webber, H.J. (Eds.), *The citrus industry*, vol. 1. University of California Press, Riverside, CA, pp. 325-370.
- Cameron, J.W., Burnett, R.H., 1978. Use of Sexual Tetraploid Seed Parents for Production of Triploid Citrus Hybrids. *HortScience* 13, 167-169.
- Campbell, C.R., Plank, C.O., 1998. Preparation of plant tissue for laboratory analysis, in: Kalra, Y.P. (Ed.), *Handbook of reference methods for plant analysis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 37-49.
- Cañon, P., Aquea, F., Rodríguez-Hoces de la Guardia, A., Arce-Johnson, P., 2013. Functional characterization of Citrus macrophylla BOR1 as a boron transporter. *Physiologia Plantarum* 149, 329-339.
- Cassidy, N.G., 1966. A Rational Method for Recording and Comparing Concentrations of Plant Constituents that are Water Soluble with Particular Reference to Chloride and Potassium. *Plant Soil* 25, 372-&.
- Castle, W.S., 2010. A Career Perspective, on Citrus Rootstocks, Their Development, and Commercialization. *HortScience* 45, 11-15.
- Castle, W.S., 1995. Rootstock as a fruit quality factor in citrus and deciduous tree crops. *N. Z. J. Crop Horticultural Science* 23, 383-394.
- Castle, W.S., Nunnallee, J., Manthey, J.A., 2009. Screening Citrus Rootstocks and Related Selections in Soil and Solution Culture for Tolerance to Low-iron Stress. *HortScience* 44, 638-645.
- Cerdá, A., Fernandez, F.G., Caro, M., Guillen, M.G., 1979. Growth and Mineral-Composition of 2 Lemon Varieties Irrigated with Saline Waters *Agrochimica* 23, 387-396.
- Chadha, T.R., Mukherjee, S., 1975. Growth and brittleness in shoots of some induced tetraploids in grapes as related to anatomical characteristics. *Indian Agriculture* 19, 333-340.
- Chandra, A., Dubey, A., 2010. Effect of ploidy levels on the activities of Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase, superoxide dismutase and peroxidase in Cenchrus species grown under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 27-34.
- Chaney, R.L., 1984. Diagnostic practices to identify iron-deficiency in higher plants. *Journal of Plant Nutrition*, 47-67.

- Chaney, R.L., Brown, J.C., Tiffin, L.O., 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiology*, 208-213.
- Chao, D.Y., Dilkes, B., Luo, H., Douglas, A., Yakubova, E., Lahner, B., Salt, D.E., 2013. Polyploids Exhibit Higher Potassium Uptake and Salinity Tolerance in Arabidopsis. *Science* 341, 658-659.
- Chapman, H.D., 1968. The mineral nutrition of Citrus. In: W Reuther, LD Batchelor, HJ Webber, eds. *The citrus industry*. University of California Press: Riverside, CA 1, 127-289.
- Chapot, H., 1975. Citrus, Technical Monograph No. 4. Ciba-Geigy Agrochem: Basle, Switzerland.
- Chen, Y., Barak, P., 1984. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy* 35, 217-240.
- Chen, T., Cai, X., Wu, X., Karahara, I., Schreiber, L., Lin, J., 2011. Casparian strip development and its potential function in salt tolerance. *Plant Signalling and Behaviour* 6, 1499-1502.
- Chen, Z.J., 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review in Plant Biology* 58, 377-406.
- Chen, C., Bowman, K.D., Choi, Y.A., Dang, P.M., Rao, M.N., Huang, S., Soneji, J.R., McCollum, T.G., Gmitter, F.G., Jr., 2008a. EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics and Genomes* 4, 1-10.
- Chen, C., Lyon, M.T., O'Malley, D., Federici, C.T., Gmitter, J., Grosser, J.W., Chaparro, J.X., Roose, M.L., Gmitter, F.G., Jr., 2008b. Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. *Plant Science* 174, 1-8.
- Chen, C.X., Zhou, P., Choi, Y., Huang, S., Gmitter, F., 2006. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 112, 1248-1257.
- Chen, Z.J., 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science* 15, 57-71.
- Cheng, Y., de Vicente, M.C., Meng, H., Guo, W., Tao, N., Deng, X., 2005. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in Citrus and related genera. *Tree physiology* 25, 661-672.
- Cheng, Y., Guo, W., Deng, X., 2003. Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) plus Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. *Plant Cell Reports* 21, 445-451.
- Chouliaras, V., Dimassi, K., Therios, I., Molassiotis, A., Diamantidis, G., 2004. Root reducing capacity, rhizosphere acidification, peroxidase and catalase activities and nutrient levels of Citrus taiwanica and Citrus volkameriana seedlings, under Fe deprivation conditions. *Agronomie* 24, 1-6.



- Cinelli, F., 1995. Physiological responses of clonal quince rootstocks to iron deficiency induced by addition of bicarbonate to nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition* 1, 77-89.
- Cohen, C.K., Garvin, D.F., Kochian, L.V., 2004. Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicates a primary function in Fe uptake from the soil. *Planta* 218, 784-792.
- Cohen, C.K., Norvell, W.A., Kochian, L.V., 1997. Induction of the root cell plasma membrane ferric reductase. *Plant Physiology* 114, 1061-1069.
- Comai, L., Tyagi, A.P., Winter, K., Holmes-Davis, R., Reynolds, S.H., Stevens, Y., Byers, B., 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed arabidopsis allotetraploids. *Plant Cell* 12, 1551-1567.
- Comai, L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6, 836-846.
- Connolly, E.L., Campbell, N.H., Grotz, N., Prichard, C.L., Guerinot, M.L., 2003. Overexpression of the *FRO2* ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiology* 133, 1102-1110.
- Connolly, E.L., Fett, J.P., Guerinot, M.L., 2002. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14, 1347-1357.
- Cooper, W.C., Reece, P.C., Furr, J.R., 1962. Citrus breeding in Florida—past, present and future. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 5, 13.
- Cooper, W.C., 1961. Toxicity and accumulation of salts in Citrus trees on various rootstocks in Texas. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 95-104.
- Coulombe, B.A., Chaney, R.L., Wiebold, W.J., 1984. Use of bicarbonate in screening soybeans for resistance to iron chlorosis. *Journal of plant nutrition* 7, 411-425.
- Cuenca, J., Aleza, P., Navarro, L., Ollitrault, P., 2013a. Assignment of SNP allelic configuration in polyploids using competitive allele-specific PCR: application to citrus triploid progeny. *Annals of Botany* 111, 731-742.
- Cuenca, J., Aleza, P., Vicent, A., Brunel, D., Ollitrault, P., 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.
- Cuenca, J., Aleza, P., Juarez, J., Garcia-Lor, A., Froelicher, Y., Navarro, L., Ollitrault, P., 2015. Maximum-likelihood method identifies meiotic restitution mechanism from heterozygosity transmission of centromeric loci: application in citrus. *Scientific Reports* 5, 9897.

- Cuenca, J., Froelicher, Y., Aleza, P., Juarez, J., Navarro, L., 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, 462-470.
- Cui, L., Wall, P.K., Leebens-Mack, J.H., Lindsay, B.G., Soltis, D.E., Doyle, J.J., Soltis, P.S., Carlson, J.E., Arumuganathan, K., Barakat, A., Albert, V.A., Ma, H., DePamphilis, C.W., 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* 16, 738-749.
- Cuppen, E., 2007. Genotyping by allele-specific amplification (KASPar). *CSH Protocols* pdb.prot4841.
- Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., Ollitrault, P., 2016. Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Annals of botany* 117, 565-583.
- Curk, F., Ancillo, G., Ollitrault, F., Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J., Garcia-Lor, A., Navarro, L., Ollitrault, P., 2015. Nuclear Species-Diagnostic SNP Markers Mined from 454 Amplicon Sequencing Reveal Admixture Genomic Structure of Modern Citrus Varieties. *PLoS One* 10, e0125628.
- Curk, F., Ancillo, G., Garcia-Lor, A., Luro, F., Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P., Navarro, L., Ollitrault, P., 2014. Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in Citrus species: analysis of chromosome 2. *BMC Genetics* 15, 152.
- Dambier, D., Benyahia, H., Pensabene-Bellavia, G., Kacar, Y.A., Froelicher, Y., Belfalah, Z., Lhou, B., Handaji, N., Printz, B., Morillon, R., Yesiloglu, T., Navarro, L., Ollitrault, P., 2011. Somatic hybridization for citrus rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant Cell Reports* 30, 883-900.
- Davies, F.S., Albrigo, L.G., 1994. Citrus. *Crops production Science in Horticulture*. CAB Int. UK .
- De Storme, N., Geelen, D., 2013. Sexual polyploidization in plants cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytologist* 198, 670-684..
- Del Pozo, J.C., Ramirez-Parra, E., 2014. Deciphering the molecular bases for drought tolerance in Arabidopsis autotetraploids. *Plant Cell and Environment* 37, 2722-2737.
- Dell'Orto, M., Santi, S., De Nisi, P., Cesco, S., Varanini, Z., Zocchi, G., Pinton, R., 2000. Development of Fe-deficiency responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots: involvement of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Journal of Experimental Botany* 51, 695-701.

- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 19-21.
- Deng, B., Du, W., Liu, C., Sun, W., Tian, S., Dong, H., 2012. Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids? *Plant Growth Regulation* 66, 37-47.
- Dermen, H., 1940. Colchicine polyploidy and technique. *The Botanical Review* 6, 599-635.
- Ding, H., Duan, L.H., Li, J., Yan, H.F., Zhao, M., Zhang, F.S., Li, W.X., Ding, H.A.F., Duan, L., Li, J., Yan, H., Zhao, M., Zhang, F., Li, W.X., 2010. Cloning and functional analysis of the peanut iron transporter AhIRT1 during iron deficiency stress and intercropping with maize. *Journal of Plant Physiology* 167, 996-1002.
- Distefano, G., La Malfa, S., Gentile, A., Wu, S.B., 2013. EST-SNP genotyping of citrus species using high-resolution melting curve analysis. *Tree Genetics and Genomes* 9, 1271-1281.
- Distefano, G., Caruso, M., La Malfa, S., Gentile, A., Wu, S.B., 2012. High Resolution Melting Analysis Is a More Sensitive and Effective Alternative to Gel-Based Platforms in Analysis of SSR - An Example in Citrus. *PLoS One* 7, e44202.
- Dong, S., Adams, K.L., 2011. Differential contributions to the transcriptome of duplicated genes in response to abiotic stresses in natural and synthetic polyploids. *New Phytologist* 190, 1045-1057.
- Doyle, J.J., Flagel, L.E., Paterson, A.H., Rapp, R.A., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Wendel, J.F., 2008. Evolutionary Genetics of Genome Merger and Doubling in Plants. *Annual Reviews in Genetics* 42, 443-461.
- Duminil, J., M.-H. Pemonge, M.H., Petit, R.J., 2002. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Molecular ecology resources* 2, 428-430.
- Eckhardt, U., Marques, A.M., Buckout, T.J., 2001. Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Molecular Biology* 45, 437-448.
- Eide, D.J., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 5624-5628.
- Eissenstat, D., Achor, D., 1999. Anatomical characteristics of roots of citrus rootstocks that vary in specific root length. *New Phytologist*. 141, 309-321.
- Embleton, T.W., Jones, W.W., 1964. Avocado nutrition in California. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 77, 401-405.
- Embleton, T.W., Reitz, H.J., Jones, W.W., 1973. Citrus fertilization, in: W. Reuther (Ed.), *The Citrus Industry*, Revised edition ed. University of California Press, Berkeley, CA, USA., pp. 122-182.

- Enomoto, Y., Hodoshima, H., Shimada, H., Shoji, K., Yoshihara, T., Goto, F., 2007. Long-distance signals positively regulate the expression of iron uptake genes in tobacco roots. *Planta* 227, 81-89.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A., 1992. The apoplastic permeability of root apices. *Canadian Journal of Botany* 70, 1502-1512.
- Epstein, E., Norlyn, J.D., Rush, D.W., Kinsbury, R.W., Kelley, D.B., Cunningham, G.A., Wrona, A.F., 1980. Saline Culture of Crops - a Genetic Approach. *Science* 210, 399-404.
- Epstein, E., Bloom, A.J., 2005. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA.
- Esen, A., Soost, R., Geraci, G., 1979. Genetic-Evidence for the Origin of Diploid Megagametophytes in Citrus. *Journal of Heredity* 70, 5-8.
- Esen, A., Soost, R., Geraci, G., 1978. Seed Set, Size, and Development After 4x x 2x and 4x x 4x Crosses in Citrus. *Euphytica* 27, 283-294.
- Esen, A., Soost, R.K., 1971. Unexpected Triploids in Citrus - their Origin, Identification, and Possible use. *Journal of Heredity* 62, 329-&.
- Esselink, G.D., Nybom, H., Vosman, B., 2004. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting-peak ratios) method. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 402-408.
- Fallahi, E., Rodney, D., 1992. Tree Size, Yield, Fruit-Quality, and Leaf Mineral Nutrient Concentration of Fairchild Mandarin on 6 Rootstocks. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 117, 28-31.
- Fallahi, E., Mousavi, Z., Rodney, D., 1991. Performance of Orlando Tangelo Trees on 10 Rootstocks in Arizona. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116, 2-5.
- Fanciullino, A.L., Gancel, A.L., Froelicher, Y., Luro, F., Ollitrault, P., Brillouet, J.M., 2005. Effects of nucleo-cytoplasmic interactions on leaf volatile compounds from citrus somatic diploid hybrids. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4517-4523.
- Fang, D.Q., 1993. Intra- and intergeneric relationships of Poncirus polyandar: Investigation by leaf isozymes. *Journal of Wuhan botanical research* 11, 34-40.
- FAO, 2016. [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org).
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D., 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 33, 317-345.
- Fawcett, H.S., 1936. *Citrus Diseases and their Control*, 2nd ed. McGraw-Hill Book Co, New York (US), London (UK).

- Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W., Roose, M.L., 1998. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical Applied Genetics* 96, 812-822.
- Feldman, M., Levy, A.A., 2012. Genome Evolution Due to Allopolyploidization in Wheat. *Genetics* 192, 763-774.
- Ferguson, L., Grattan, S.R., 2005. How salinity damages citrus: Osmotic effects and specific ion toxicities. *HortTechnology* 15, 95-99.
- Fernandez-Ballester, G., García-Sánchez, F., Cerda, A., Martínez, V., 2003. Tolerance of citrus rootstock seedlings to saline stress based on their ability to regulate ion uptake and transport. *Tree Physiology* 23, 265-271.
- Flagel, L., Udall, J., Nettleton, D., Wendel, J., 2008. Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biology* 6, 16.
- Flagel, L.E., Wendel, J.F., 2010. Evolutionary rate variation, genomic dominance and duplicate gene expression evolution during allotetraploid cotton speciation. *New Phytologist* 186, 184-193.
- Flowers, T.J., 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55, 307-319.
- Forner, J., Forner-Giner, M., Alcaide, A., 2003. Forner-alcaide 5 and forner-alcaide 13: Two new citrus rootstocks released in Spain. *HortScience* 38, 629-630.
- Forner-Giner, M.A., Primo-Millo, E., Forner, J.B., 2009. Performance of Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13, hybrids of *Cleopatra* mandarin x *Poncirus trifoliata*, as salinity-tolerant citrus rootstocks. *Journal of the American Pomological Society* 63, 72-80.
- Frommer, W.B., von Wiren, N., 2002. Plant biology: ping-pong with boron. *Nature* 420, 282-283.
- Froelicher, Y., Mouhaya, W., Bassene, J.B., Costantino, G., Kamiri, M., Luro, F., Morillon, R., Ollitrault, P., 2011. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics and Genomes* 7, 49-61.
- Froelicher, Y., 1999. Organisation de la diversité dans le genre *Clausena* Burm.f. (RUTACEAE) et modalité de son exploitation en création variétal. Tesis doctoral. Université de Paris-sud.
- Frost, H.B., Soost, R.K., 1968. Seed reproduction, development of gametes and embryos, in: Batchelor, L.D., Webber, H.B. (Eds.), *The Citrus Industry*. Vol.2. University of California Press, Berkeley, USA, pp. 290-324.
- Frost, H.B., 1943. Genetics and breeding, in: Anonymous, *The Citrus Industry* Vol. 1. University of California Press, Berkeley, pp. 817-913.

- Frost, H., 1925. Tetraploidy in citrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 11, 535-537.
- Funkhouser, E.A., Price, C.A., 1974. Chloroplast RNA: possible site of an early lesion in iron deficiency. *Plant Cell Physiology*, 883-889.
- Furusato, K., 1953. Studies on the polyembryony in Citrus. *Japanese journal of genetics* 28, 165-166.
- Gambetta, G.A., Fei, J., Rost, T.L., Knipfer, T., Matthews, M.A., Shackel, K.A., Walker, M.A., McElrone, A.J., 2013. Water Uptake along the Length of Grapevine Fine Roots: Developmental Anatomy, Tissue-Specific Aquaporin Expression, and Pathways of Water Transport. *Plant Physiology* 163, 1254-1265.
- García-Legaz, M.F., Ortiz, J.M., García-Lidon, A., Cerdá, A., 1993. Effect of Salinity on Growth, Ion Content and Co<sub>2</sub> Assimilation Rate in Lemon Varieties on Different Rootstocks. *Physiologia Plantarum* 89, 427-432.
- García-Lor, A., Curk, F., Snoussi-Trifa, H., Morillon, R., Ancillo, G., Luro, F., Navarro, L., Ollitrault, P., 2015. Genetic Structure and Phylogeny of the 'True Citrus Fruit Trees' Group (Citrinae, Rutaceae). *Acta Horticulturae* 1065, 85-95.
- García-Lor, A., Ancillo, G., Navarro, L., Ollitrault, P., 2013a. Citrus (Rutaceae) SNP Markers Based on Competitive Allele-Specific PCR; Transferability Across the Aurantioideae Subfamily. *Applied Plant Science* 1, 1200406.
- García-Lor, A., Curk, F., Snoussi-Trifa, H., Morillon, R., Ancillo, G., Luro, F., Navarro, L., Ollitrault, P., 2013b. 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. *Annals of Botany* 111, 1-19.
- García-Lor, A., 2013c. Organización de la diversidad genética de los cítricos. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- García-Lor, A., Luro, F., N., L., Ollitrault, P., 2012. Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: a perspective for genetic association studies. *Molecular Genetics and Genomics* 287, 77-94.
- García-Sánchez, F., Perez-Perez, J.G., Botia, P., Martinez, V., 2006. The response of young mandarin trees grown under saline conditions depends on the rootstock. *European Journal of Agronomy* 24, 129-139.
- García-Sánchez, F., Syvertsen, J.P., 2006. Salinity tolerance of Cleopatra mandarin and Carrizo citrange rootstock seedlings is affected by CO<sub>2</sub> enrichment during growth. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131, 24-31.
- García-Sánchez, F., Jifon, J.L., Carvajal, M., Syvertsen, J.P., 2002a. Gas exchange, chlorophyll and nutrient contents in relation to Na<sup>+</sup> and

- Cl<sup>-</sup> accumulation in 'Sunburst' mandarin grafted on different rootstocks. *Plant Science* 162, 705-712.
- García-Sánchez, F., Martínez, V., Jifon, J., Syvertsen, J.P., Grosser, J.W., 2002b. Salinity reduces growth, gas exchange, chlorophyll and nutrient concentrations in diploid sour orange and related allotetraploid somatic hybrids. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77, 379-386.
- García-Sánchez, F., Botia, P., Fernandez-Ballester, G., Cerda, A., López, V., 2005. Uptake, transport, and concentration of chloride and sodium in three citrus rootstock seedlings. *Journal of Plant Nutrition* 28, 1933-1945.
- Garsmeur, O., Schnable, J.C., Almeida, A., Jourda, C., D'Hont, A., Freeling, M., 2014. Two Evolutionarily Distinct Classes of Paleopolyploidy. *Molecular Biology and Evolution* 31, 448-454.
- Geraci, G., Esen, A., Soost, R.K., 1975. Triploid Progenies from 2x x 2x Crosses of Citrus Cultivars. *Journal of Heredity* 66, 177-178.
- Gianinetti, A., 2013. A criticism of the value of midparent in polyploidization. *Journal of Experimental Botany* 64, 4119-4129.
- Gilliam, J.W., 1971. Rapid measurement of chlorine in plant materials. *Proceedings of the Soil Science Society of America Journal* 35, 512-513.
- Gilliam, M., Tester, M., 2005. The regulation of anion loading to the maize root xylem. *Plant Physiology* 137, 819-828.
- Gimeno, V., Simon, I., Nieves, M., Martínez, V., Camara-Zapata, J.M., Garcia, A.L., Garcia-Sánchez, F., 2012. The physiological and nutritional responses to an excess of boron by Verna lemon trees that were grafted on four contrasting rootstocks. *Trees Structure and Function* 26, 1513-1526.
- Gimeno, V., Syvertsen, J.P., Nieves, M., Simon, I., Martínez, V., Garcia-Sánchez, F., 2009. Additional nitrogen fertilization affects salt tolerance of lemon trees on different rootstocks. *Scientia Horticulturae* 121, 298-305.
- Gmitter, F.G., Jr., Chen, C., Machado, M.A., de Souza, A.A., Ollitrault, P., Froehlicher, Y., Shimizu, T., 2012. Citrus genomics. *Tree Genetics and Genomes* 8, 611-626.
- Gmitter, F.G., Jr., Grosser, J.W., Moore G. A., 1992. Citrus, in: Hammerschlag, F., Litz, R.L. (Eds.), *Biotechnology of perennial crops*. CAB Intl.: Wallingford, Oxon, U. K., pp. 335-369.
- Gmitter, F.G., Jr., Ling, X.B., 1991. Embryogenesis *in vitro* and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped Citrus ovules treated with colchicine. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116, 317-321.
- Gmitter, F.G., Jr., Ling, X.B., Deng, X.X., 1991. Colchicine-induced polyploidy in Citrus embryogenic cultures, somatic embryos and regenerated plantlets. *Plant science* 1, 135-141.

- Goldbach, H., Yu, Q., Wingender, R., Schulz, M., Wimmer, M., Findekle, P., Baluska, F., 2001. Rapid response reactions of roots to boron deprivation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164, 173-181.
- Goldbach, H.E., Wimmer M. A., 2007. Boron in plants and animals: is there a role beyond cell-wall structure? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170, 39-48.
- Goldberg, S., Suarez, D.L., Lesch, S.M., 2000. Predicting boron adsorption by soils using soil chemical parameters in the constant capacitance model. *Soil Science society of American Journal* 64, 1356-1363.
- Gómez-Cadenas, A., Arbona, V., Jacas, J., Primo-Millo, E., Talon, M., 2002. Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants. *Journal of Plant Growth and Regulation* 21, 234-240.
- Gómez-Cadenas, A., Iglesias, D.J., Arbona, V., Colmenero-Flores, J.M., Primo.Millo, E., Talon, M., 2003. Physiological and molecular responses of Citrus to salinity. *Recent research developments in Plant molecular biology*, 281-298.
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Primo.Millo, E., Talon, M., 1998. Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus seedlings to salt shock. *Physiologia Plantarum* 103, 475-484.
- Graciano-Ribeiro, D., Nassar, N.M.A., 2012. A comparative anatomical study in cassava diploid and tetraploid hybrids. *Plant Systematics and Evolution* 298, 1711-1721.
- Graham, J.H., Syvertsen, J.P., 1989. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizas Increase Chloride Concentration in Citrus Seedlings. *New Phytologist* 113, 29-36.
- Grant, V., 1981. *Plant Speciation*. Columbia University Press, New York, USA.
- Grattan, S.R., Grieve, C.M., 1992. Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 38, 275-300.
- Grattan, S.R., Diaz, F.J., Pedrero, F., Vivaldi, G.A., 2015. Assessing the suitability of saline wastewaters for irrigation of Citrus spp.: Emphasis on boron and specific-ion interactions. *Agricultural Water Management* 157, 48-58.
- Grieve, A.M., Walker, R.R., 1983. Uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in salt-treated citrus plants. *Australian Journal of Agricultural Research* 34, 133-143.
- Grosser, J.W., Omar, A.A., Gmitter, J.A., Syvertsen, J.P., 2012a. Salinity tolerance of valencia orange trees on allotetraploid rootstocks. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 125, 50-55.
- Grosser, J.W., Calovic, M., Gmitter, F.G., Jr., 2012b. In Vitro Breeding Facilitates Conventional Breeding for Scion and Rootstock



- Improvement in Citrus. Vii International Symposium on in Vitro Culture and Horticultural Breeding 961, 27-34.
- Grosser, J.W., Chandler, J.L., 2003. New Citrus rootstocks via protoplast fusion. *Acta Horticulturae* 622, 491-497.
- Grosser, J.W., Ollitrault, P., Olivares-Fuster, O., 2000. Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36, 434-449.
- Grosser, J.W., Jiang, J., Louzada, E.S., Chandler, J.L., Gmitter, F.G., Jr., 1998. Somatic hybridization, an integral component of citrus cultivar improvement: II. Rootstock improvement. *HortScience* 33, 1060-1061.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G., Jr., Castle, W.S., Chandler, J.L., 1995. Production and evaluation of citrus somatic hybrid rootstocks: progress report. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 108, 140-143.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G., Jr., 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104, 343-357.
- Grosser, J.W., Barthe, G.A., Castle, B., Gmitter, F.G., Jr., Lee, O., 2015. The Development of Improved Tetraploid Citrus Rootstocks to Facilitate Advanced Production Systems and Sustainable Citriculture in Florida. Xii International Citrus Congress - International Society of Citriculture 1065, 319-327.
- Grosser, J.W., Ananthakrishnan, G., Calovic, M., Serrano, P., Chandler, J.L., Gmitter, F.G., Jr., Guo, W.W., 2007. Applications of somatic hybridization and cybridization in scion and rootstock improvement, with focus on citrus. *Proceedings of the International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species*, 73-81.
- Grosser, J., Gmitter, F., Tusa, N., Recupero, G., Cucinotta, P., 1996a. Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. *Plant Cell Reports* 15, 672-676.
- Grosser, J., Mourao, F., Gmitter, F., Louzada, E., Jiang, J., Baergen, K., Quiros, A., Cabasson, C., Schell, J., Chandler, J., 1996b. Allotetraploid hybrids between citrus and seven related genera produced by somatic hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 92, 577-582.
- Grosser, J.W., Garnsey, S.M., Halliday, C., 1996c. Assay of sour orange somatic hybrid rootstocks for quick-decline disease caused by citrus tristeza virus. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 1, 353-356.

- Guerinot, M.L., Yi, Y., 1994. Iron nutritious, noxious and not readily available. *Plant Physiology* 3, 815-820.
- Guerra, D., Schifino, W.M.T., Schwarz, S.F., Dutra de Souza, P. V., Gonzatto, M.P., Weiler, R.L., 2014. Comparison between diploid and tetraploid citrus rootstocks: morphological characterization and growth evaluation. *Bragantia* 73, 1-7.
- Gulsen, O., Roose, M.L., 2001a. Lemons: Diversity and relationships with selected citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126, 309-317.
- Gulsen, O., Roose, M.L., 2001b. Chloroplast and nuclear genome analysis of the parentage of lemons. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126, 210-215.
- Gulsen, O., Uzun, A., Canan, I., Seday, U., Canihos, E., 2010. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. *Euphytica* 173, 265-277.
- Guo, F., Yu, H., Tang, Z., Jiang, X., Wang, L., Wang, X., Xu, Q., Deng, X., 2015. Construction of a SNP-based high-density genetic map for pummelo using RAD sequencing. *Tree Genetics and Genomes* 11, 2.
- Guo, W.W., Wu, R.C., Cheng, Y.J., Deng, X.X., 2007. Production and molecular characterization of Citrus intergeneric somatic hybrids between red tangerine and citrange. *Plant Breeding* 126, 72-76.
- Guo, W.W., Cheng, Y.J., Deng, X.X., 2002. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between Citrus reticulata and Poncirus trifoliata. *Plant Cell Reports* 20, 829-834.
- Guo, W., Prasad, D., Cheng, Y., Serrano, P., Deng, X., Grosser, J., 2004. Targeted cybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Reports* 22, 752-758.
- Guo, W., Deng, X., 1999. Intertribal hexaploid somatic hybrid plants regeneration from electrofusion between diploids of Citrus sinensis and its sexually incompatible relative, Clausena lansium. *Theoretical and Applied Genetics* 98, 581-585.
- GVA, 2014. Normativa para la producción integrada de cítricos en la Comunidad Valenciana, 4227.  
[http://www.docv.gva.es/datos/2014/05/16/pdf/2014\\_4227.pdf](http://www.docv.gva.es/datos/2014/05/16/pdf/2014_4227.pdf)
- GVA, 2013. Superficies y producciones de la Comunidad Valenciana.  
<http://www.agricultura.gva.es/la-conselleria/estadisticas>
- Ha, M., Lu, J., Tian, L., Ramachandran, V., Kasschau, K.D., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Chen, X., Wang, X.J., Chen, Z.J., 2009. Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in Arabidopsis interspecific hybrids and allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106, 17835-17840.

- Hajiboland, R., Bahrami-Rad, S., Bastani, S., Tolrà, R., Poschenrieder, C., 2013. Boron re-translocation in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 35, 2373-2381.
- Harlan, J.R., DeWet, J.M.J., 1975. On Ö Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *The Botanical Review* 41, 361-390.
- Havaux M., Lannoye R. 1983. Chlorophyll fluorescence induction – a sensitive indicator of water stress in maize plants. *Irrigation Sci.* 4: 147-151.
- He, P., Friebe, B.R., Gill, B.S., Zhou, J.M., 2003. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat *Plant Molecular Biology* 52, 401-414.
- Hegarty, M.J., Barker, G.L., Wilson, I.D., Abbott, R.J., Edwards, K.J., Hiscock, S.J., 2006. Transcriptome shock after interspecific hybridization in *Senecio* is ameliorated by genome duplication. *Current Biology* 16, 1652-1659.
- Hegarty, M.J., Barker, G.L., Brennan, A.C., Edwards, K.J., Abbott, R.J., Hiscock, S.J., 2009. Extreme changes to gene expression associated with homoploid hybrid speciation. *Molecular Ecology* 18, 877-889.
- Hell, R., Stephan, U.W., 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216, 541-551.
- Herrero, R., Asíns, M., Pina, J., Carbonell, E., Navarro, L., 1996. Genetic diversity in the orange subfamily aurantioideae, 2. Genetic relationships among genera and species. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 1327-1334.
- Herrera-Rodríguez, M.B., González-Fontes, A., Rexach, J., Camacho-Cristobal, J.J., Maldonado, J.M., Navarro-Gochicoa, M.T., 2010. Role of boron in vascular plants and response mechanisms to boron stresses. *Plant Stress* 4, 115-122.
- Hodgson, R.W., 1967. Horticultural varieties of citrus, in: Reuther, W., Webber, H.J. and Batchelor, L.D. (Ed.), *The Citrus Industry*, Vol. I. California University Press, California, US.
- Hollister, J.D., Arnold, B.J., Svedin, E., Xue, K.S., Dilkes, B.P., Bomblies, K., 2012. Genetic Adaptation Associated with Genome-Doubling in Autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *Plos Genetics* 8, e1003093.
- Hopping, M.E., 1993. Preparation and Preservation of Nuclei from Plant-Tissues for Quantitative DNA Analysis by Flow-Cytometry. *New Zealand Journal of Botany* 31, 391-401.
- Hose, E., Clarkson, D.T., Steudle, E., Schreiber, L., Hartung, W., 2001. The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* 52, 2245-2264.
- Huang, B.R., Eissenstat, D.M., 2000. Linking hydraulic conductivity to anatomy in plants that vary in specific root length. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125, 260-264.

- Husband, B.C., Ozimec, B., Martin, S.L., Pollock, L., 2008. Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: Current trends and insights from synthetic polyploids. *International Journal of Plant Science* 169, 195-206.
- Hussain, S., Curk, F., Dhuique-Mayer, C., Urban, L., Ollitrault, P., Luro, F., Morillon, R., 2012a. Autotetraploid trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) rootstocks do not impact clementine quality but reduce fruit yields and highly modify rootstock/scion physiology. *Scientia Horticulturae* 134, 100-107.
- Hussain, S., Luro, F., Costantino, G., Ollitrault, P., Morillon, R., 2012b. Physiological analysis of salt stress behaviour of citrus species and genera: Low chloride accumulation as an indicator of salt tolerance. *South African Journal of Botany* 81, 103-112.
- Hutchinson, D.J., 1974. Swingle citrumelo. A promising rootstock hybrid. *Acta Horticulturae* 87, 89-90.
- Iwasaki, T., 1943. On the big leaf and small leaf starin of trifoliolate orange. *Journal of Horticultural Society of Japan* 14, 302-305.
- Jackson, L.K., Sherman, W.B., 1975. Chromosome counts in 'Tahiti' lime. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 88, 458-459.
- Jaegger, B., Goldbach, H., Sommer, K., 2000. Release from lime induced iron chlorosis by CULTAN in fruit trees and its characterisation by analysis. *Acta Horticulturae* 531, 107-113.
- Jaskani, M.J., Saghir-ul-Hasnain, M.A., Bashir, M.A., Khan, I.A., 1996. Morphological description of citrus colchiploids. *International Society of Citriculture Proceedings* 1, 130-132.
- Jellings, A.J., Leech, R.M., 1984. Anatomical Variation in 1st Leaves of 9 Triticum Genotypes, and its Relationship to Photosynthetic Capacity. *New Phytologist* 96, 371-382.
- Jeong, J., Connolly, E.L., 2009. Iron uptake mechanisms in plants: functions of the FRO family of ferric reductases. *Plant science* 176, 709-714.
- Jiang D., Ye Q. L., Wang F.S., Cao L., 2010. The Mining of Citrus EST-SNP and Its Application in Cultivar Discrimination. *Agricultural Sciences in China* 9, 179-190.
- Jifon, J., Syvertsen, J., 2003. Moderate shade can increase net gas exchange and reduce photoinhibition in citrus leaves. *Tree Physiology* 23, 119-127.
- Jiménez, S., Ollat, N., Deborde, C., Maucourt, M., Rellán-Álvarez, R., Moreno, M.A., Gogorcena, Y., 2011. Metabolic response in roots of Prunus rootstocks submitted to iron chlorosis. *Journal of Plant Physiology* 168, 415-423.
- Jiménez, S., Pinochet, J., Abadía, A., Moreno, M.A., Gogorcena, Y., 2008. Tolerance response to iron chlorosis of Prunus selections as rootstocks. *HortScience* 43, 304-309.

- Jiménez-Cuesta, M., Cuquerella, J., MartínezJávega, J.M., 1981. Determination of a color index for citrus fruit degreening. Proceedings of the International Society of Citriculture 2, 750-753.
- Jones, R.J., Loch, D.S., LeFeuvre, R.P., 1995. Differences in mineral concentration among diploid and tetraploid cultivars rhodesgrass (*Chloris gayana*). Australian Journal of Experimental Agriculture 35, 1123-1129.
- Kaur, S., Nicolas, M.E., Ford, R., Norton, R., Taylor, P.W.J., 2006. Physiological mechanisms of tolerance to high boron concentration in *Brassica rapa*. Functional Plant Biology 33, 973-980.
- Kato, Y., Miwa, K., Takano, J., Wada, M., Fujiwara, T., 2009. Highly boron deficiency-tolerant plants generated by enhanced expression of NIP5:1, a boric acid channel. Plant and Cell Physiology 50, 58-66.
- Kim, S.A., Guerinot, M.L., 2007. Mining iron: iron uptake and transport in plants. 581, 2273–2280. FEBS Letters, 2273-2280.
- Kisaka, H., Kisaka, M., Kanno, A., Kameya, T., 1997. Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare* L) and carrot (*Daucus carota* L). Theoretical and Applied Genetics 94, 221-226.
- Kobayashi, S., Uchimiya, H., Ikeda, I., 1983. Plant-Regeneration from Trovita Orange Protoplasts. Japanese Journal of Breeding 33, 119-122.
- Kobayashi, S., Ohgawara, T., Fujiwara, K., Oiyama, I., 1991. Analysis of Cytoplasmic Genomes in Somatic Hybrids between Navel Orange (*Citrus sinensis* Osb) and Murcott Tangor. Theoretical and Applied Genetics 82, 6-10.
- Koltunow, A.M., 1993. Apomixis - Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis Or Fertilization in Ovules. Plant Cell 5, 1425-1437.
- Krajewski, A., Rabe, E., 1995. Bud age affects sprouting and flowering in clementine mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). HortScience 30, 1366-1368.
- Krueger, R.R., Navarro, L., 2007. Citrus germplasm resources, in: Kahn, I.A. (Ed.), Citrus genetics, breeding and biotechnology. CAB International, Wallingford, UK, pp. 45-140.
- Krug, C.A., 1943. Chromosome numbers in the subfamily aurantioideae with special reference to the genus citrus. Botanical Gazette 104, 602-611.
- Ksouri, R., Debez, A., Mahmoudi, H., Ouerghi, Z., Gharsalli, M., Lachaâl, M., 2007. Genotypic variability within Tunisian grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) facing bicarbonate-induced iron deficiency. Plant Physiology and Biochemistry 45, 315-322.

- Ksouri, R., Mrah-Gharsalli, M., Lachaâl, M., 2006. Biochemical responses to true and bicarbonate-induced iron deficiency in grapevine (*Vitis*) genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 26, 305-315.
- Lai, Z., Gross, B., Zou, Y., Andrews, J., Rieseberg, L., 2006. Microarray analysis reveals differential gene expression in hybrid sunflower species. *Molecular Ecology* 15, 1213-1227.
- Lapin, W.K., 1937. Investigations on polyploidy in Citrus. USSR all-Union Science Research Institute Humid Subtropics Works 1, 1-68.
- Lauchli, A., Grattan, S.R., 2007. Plant growth and development under salinity stress, in: Jenks, M.A., Hasegawa, P.A., Jain, S.M. (Eds.), *Advances in molecular-breeding toward drought and salt tolerant crops*. Springer, Holland, pp. 1-32.
- Lee, L.S., 1994. The relationship between ploidy, gene expression and vigour in citrus. Doctor of Philosophy thesis, Department of biological science.
- Lee, L.S., 1990. Prospects for using citrus tetraploids for rootstocks. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 108, 140-143.
- Lee, L.S., 1988. Citrus Polyploidy: Origins and Potential for Cultivar Improvement. *Australian Journal of Agricultural Research* 39, 735-747.
- Legaz, F., Quiñones, A., Martínez-Alcántara, B., Primo-Millo, E., 2008. Fertilización de los cítricos en riego a goteo II: Mg y microelementos. *Levante Agrícola* 400, 8-12.
- Leitch, A.R., Leitch, I.J., 2008. Perspective - Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320, 481-483.
- Levy, J., Syvertsen, J.P., 2004. Irrigation water quality and salinity effects in citrus trees. *Horticultural reviews* 30.
- Levy, Y., Lifshitz, J., 2000. The response of orchard citrus trees on different rootstocks to irrigation with saline water, evaluated by trickle linear gradient. *Proceedings of the Third International Symposium on Irrigation of Horticultural Crops*, Vols 1 and 2, 629-640.
- Li, L.H., Cheng, X.D., Ling, H.Q., 2004. Isolation and characterization of Fe<sup>3+</sup> chelate reductase gene *LeFROI* in tomato. *Plant Molecular Biology*, 125-136.
- Li, W.L., Berlyn, G.P., Ashton, P.M.S., 1996. Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera* (Betulaceae). *American Journal of Botany* 83, 15-20.
- Li, X., Xie, R., Lu, Z., Zhou, Z., 2010. The Origin of Cultivated Citrus as Inferred from Internal Transcribed Spacer and Chloroplast DNA Sequence and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprints. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135, 341-350.

- Li, A., Liu, D., Wu, J., Zhao, X., Hao, M., Geng, S., Yan, J., Jiang, X., Zhang, L., Wu, J., Yin, L., Zhang, R., Wu, L., Zheng, Y., Mao, L., 2014. mRNA and Small RNA Transcriptomes Reveal Insights into Dynamic Homoeolog Regulation of Allopolyploid Heterosis in Nascent Hexaploid Wheat. *Plant Cell* 26, 1878-1900.
- Li, W., Biswas, D.K., Xu, H., Xu, C., Wang, X., Liu, J., Jiang, G., 2009. Photosynthetic responses to chromosome doubling in relation to leaf anatomy in *Lonicera japonica* subjected to water stress. *Functional Plant Biology* 36, 783-792.
- Lindsay, W.L., 1995. Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants a QUANTITATIVE APPROACH, in: Abadía, J. (Ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Holland, pp. 7-14.
- Lindsay, W.L., 1979. Chemical Equilibria in Soils, New York, USA.
- Liu, G.D., Wang, R.D., Liu, L.C., Wu, L.S., Jiang, C.C., 2013. Cellular boron allocation and pectin composition in two citrus rootstock seedlings differing in boron deficiency response. *Plant Soil* 370, 555-565.
- Liu, B., Brubaker, C., Mergeai, G., Cronn, R., Wendel, J., 2001. Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* 44, 321-330.
- Liu, S.R., Li, W.Y., Long, D., Hu, C.G., Zhang, J.Z., 2013. Development and Characterization of Genomic and Expressed SSRs in Citrus by Genome-Wide Analysis. *PLoS One* 8, e75149.
- Liu, X., Li, J., Huang, M., Chen, J., 2015. Mechanisms for the Influence of Citrus Rootstocks on Fruit Size. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 63, 2618-2627.
- Lloyd, J., Kriedemann, P.E., Aspinall, D., 1990. Contrasts between Citrus Species in Response to Salinization an Analysis of Photosynthesis and Water Relations for Different Rootstock-Scion Combinations. *Physiologia Plantarum* 78, 236-246.
- Lloyd, J., Howie, H., 1989. Salinity, Stomatal Responses and Whole-Tree Hydraulic Conductivity of Orchard Washington Navel Orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck. *Australian Journal of Plant Physiology* 16, 169-179.
- Lloyd, J., Kriedemann, P.E., Syvertsen, J.P., 1987a. Gas-Exchange, Water Relations and Ion Concentrations of Leaves on Salt Stressed Valencia Orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck. *Australian Journal of Plant Physiology* 14, 387-396.
- Lloyd, J., Syvertsen, J.P., Kriedemann, P.E., 1987b. Salinity Effects on Leaf Water Relations and Gas-Exchange of Valencia Orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck, on Rootstocks with Different Salt Exclusion Characteristics. *Australian Journal of Plant Physiology* 14, 605-617.

- Longley, A.E., 1925. Polycary, polyspory and polyploidy in Citrus and Citrus relatives. *Journal of the Washington Academy of Science* 15, 347-351.
- Longnecker, N., Welch, R.M., 1990. Accumulation of apoplastic iron in plant roots. *Plant Physiology* 92, 17-22.
- López-Climent, M.F., Arbona, V., Perez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A., 2008. Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Environmental and Experimental Botany* 62, 176-184.
- Louzada, E.S., Grosser, J.W., Gmitter, F.G.J., 1993. Intergeneric somatic hybridization of sexually incompatible parents: *Citrus sinensis* and *Atalantia ceylanica*. *Plant Cell Reports* 12, 687-690.
- Lu, J., Zhang, C., Baulcombe, D.C., C., Z.J., 2012. Maternal siRNAs as regulators of parental genome imbalance and gene expression in endosperm of Arabidopsis seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109, 5529-5534.
- Luro, F.L., Costantino, G., Terol, J., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., Talon, M., Ollitrault, P., Morillon, R., 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.
- Luro, F., Maddy, F., Jacquemond, C., Froelicher, Y., Morillon, R., Rist, D., Ollitrault, P., 2004. Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. *Proceedings of the XIth Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, Vols 1 and 2*, 841-847.
- Lux, A., Morita, S., Abe, J., Ito, K., 2005. An improved method for clearing and staining free-hand sections and whole-mount samples. *Annals of Botany* 96, 989-996.
- Maas, E.V., 1993. Salinity and Citriculture. *Tree Physiology* 12, 195-216.
- Maathuis, F., Amtmann, A., 1999. K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: The basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. *Annals of Botany* 84, 123-133.
- Mabberley, D.J., 1997. A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea* 7, 167-172.
- Mackey, J., 1970. Significance of Mating Systems for Chromosomes and Gametes in Polyploids. *Hereditas-Genetiskt Arkiv* 66, 165-&.
- MAGRAMA, 2014. Superficies y producciones anuales de cultivos.
- Maherali, H., Walden, A.E., Husband, B.C., 2009. Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. *New Phytologist* 184, 721-731.
- Maliga, P., Kiss, Z.R., Nagy, A.H., Lázár, G., 1978. Genetic instability in somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca*. *Molecular and General Genetics* 163, 145-151.
- Manthey, J.A., McCoy, D.L., Crowley, D.E., 1994. Stimulation of rhizosphere iron reduction and uptake in response to iron



- deficiency in citrus rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry* 32, 211-215.
- Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Bastida, J.M., Weiss-Lehman, C., Raskin, E., Mitchell-Olds, T., 2012. Environmental aridity is associated with cytotype segregation and polyploidy occurrence in *Brachypodium distachyon* (Poaceae). *New Phytologist* 193, 797-805.
- Markwell, J., Osterman, J.C., Mitchell, J.L., 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Research* 46, 467-472.
- Marschner, H., 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants.*, 2<sup>a</sup> ed. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Marschner, H., Römheld, V., 1995. Strategies of plants for acquisition of iron, in: Abadía, J. (Ed.). *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, Holland, pp. 375-378.
- Martínez-Alcántara, B., Rodríguez-Gamir, J., Martínez-Cuenca, M.R., Iglesias, D.J., Primo-Millo, E., Forner-Giner, M.A., 2013. Relationship between hydraulic conductance and citrus dwarfing by the Flying Dragon rootstock (*Poncirus trifoliata* L. Raft var. monstrosa). *Trees Structure and Function* 27, 629-638.
- Martínez-Alcántara, B., Martínez-Cuenca, M.R., Quiñones, A., Iglesias, D.J., Primo-Millo, E., Forner-Giner, M.A., 2015. Comparative expression of candidate genes involved in sodium transport and compartmentation in citrus. *Environmental and experimental botany* 111, 52-62.
- Martínez-Cuenca, M.R., Forner-Giner, M.A., Iglesias, D.J., Primo-Millo, E., Legaz, F., 2013a. Strategy I responses to Fe-deficiency of two Citrus rootstocks differing in their tolerance to iron chlorosis. *Scientia Horticulturae* 153, 56-63.
- Martínez-Cuenca, M.R., Iglesias, D.J., Forner-Giner, M.A., Primo-Millo, E., Legaz, F., 2013b. The effect of sodium bicarbonate on plant performance and iron acquisition system of FA-5 (Forner-Alcaide 5) citrus seedlings. *Acta Physiologia Plantarum* 35, 2833-2845.
- Martínez-Cuenca, M.R., Iglesias, D.J., Talon, M., Abadía, J., López-Millan, A.F., Primo-Millo, E., Legaz, F., 2013c. Metabolic responses to iron deficiency in roots of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. *Tree Physiology* 33, 320-329.
- Martínez-Cuenca, M.R., Quinones, A., Iglesias, D.J., Forner-Giner, M.A., Primo-Millo, E., Legaz, F., 2013d. Effects of high levels of zinc and manganese ions on Strategy I responses to iron deficiency in citrus. *Plant Soil* 373, 943-953.
- Martínez-Cuenca, M.R., Martínez-Alcántara, B., Quinones, A., Ruiz, M., Iglesias, D.J., Primo-Millo, E., Forner-Giner, M.A., 2015. Physiological and Molecular Responses to Excess Boron in *Citrus macrophylla* W. *PLoS One* 10, e0134372.

- Masterson, J., 1994. Stomatal Size in Fossil Plants - Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms. *Science* 264, 421-424.
- Matheron, M., Wright, G., Porchas, M., 1998. Resistance to *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* and nursery characteristics of several citrus rootstocks. *Plant Dis.* 82, 1217-1225.
- Mathura, S., Fossey, A., Beck, S.L., 2006. Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*). *Forestry* 79, 381-388.
- Matoh, T., 1997. Boron in plant cell walls. *Plant Soil* 193, 59-70.
- Maxwell K. and Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- McClintock, B., 1984. The Significance of Responses of the Genome to Challenge. *Science* 226, 792-801.
- Medina-Urrutia, V., Madera, K.F.L., Serrano, P., Ananthkrishnan, G., Grosser, J.W., Guo, W.W., 2004. New intergeneric somatic hybrids combining amblycarpa mandarin with six trifoliolate/trifoliolate hybrid selections for lime rootstock improvement. *HortScience* 39, 355-360.
- Mendes-da-Gloria, F.J., Mourao, F.D., Camargo, L.E.A., Mendes, B.M.J., 2000. Caipira sweet orange plus Rangpur lime: a somatic hybrid with potential for use as rootstock in the Brazilian citrus industry. *Genetics and Molecular Biology* 23, 661-665.
- Mendiburu, A.O., Peloquin, S.J., 1979. Gene-Centromere Mapping by 4x-2x Matings in Potatoes. *Theoretical and Applied Genetics* 54, 177-180.
- Meng, H.B., Jiang, S.S., Hua, S.J., Lin, X.Y., Li, Y.L., Guo, W.L., Jiang, L.X., 2011. Comparison Between a Tetraploid Turnip and Its Diploid Progenitor (*Brassica rapa* L.): The Adaptation to Salinity Stress. *Agricultural Science of China* 10, 363-375.
- Micó, C., Recatalá, L., Peris, M., Sánchez, J., 2005. Evaluación de la contaminación por metales pesados en cultivos vegetales de la comarca del Bajo Vinalopó (Alicante). *Edafología* 12, 185-197.
- Miller, G.W., Pushnik, J.C., Welkie, G.W., 1984. Iron chlorosis, a worldwide problem. The relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *Journal of Plant Nutrition* 1-5, 1-22.
- Miranda, M., Ikeda, F., Endo, T., Moriguchi, T., Omura, M., 1997. Chromosome markers and alterations in mitotic cells from interspecific Citrus somatic hybrids analysed by fluorochrome staining. *Plant Cell Reports* 16, 807-812.
- Miwa, K., Fujiwara, T., 2010. Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. *Annals of Botany* 105, 1103-1108.
- Miwa, K., Takano, J., Fujiwara, T., 2006. Improvement of seed yields under boron-limiting conditions through Overexpression of *BORI*,

- a boron transporter for xylem loading in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 46, 1084-1091.
- Molassiotis, A., Tanou, G., Diamantidis, G., Patakas, A., Therios, I., 2006. Effects of 4-month Fe-deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defence in two peach rootstocks differing in Fe-deficiency tolerance. *Journal of Plant Physiology* 163, 176-185.
- Morales, F., Grasa, R., Abadía, A., Abadía, J., 1998. Iron chlorosis paradox in fruit trees. *Plant nutrition* 21, 815-825.
- Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., 1991. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiology*, 886-893.
- Moran R., Porath D. 1980. Chlorophyll determination in intact tissues using N,N-dimethylformamide. *Plant Physiology* 65: 478-479.
- Moreira, C.D., Chase, C.D., Gmitter, F.G., Grosser, J.W., 2000. Inheritance of organelle genomes in citrus somatic cybrids. *Molecular Breeding* 6, 401-405.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Marti, M.R., Guerri, J., Pena, L., 2008. Plant diseases that changed the world. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* 9, 251-268.
- Moreno, P., Guerri, J., Munoz, N., 1990. Identification of Spanish Strains of Citrus Tristeza Virus by Analysis of Double-Stranded-RNA. *Phytopathology* 80, 477-482.
- Moriguchi, T., Motomura, T., Hidaka, T., Akihama, T., Omura, M., 1997. Analysis of mitochondrial genomes among Citrus plants produced by the interspecific somatic fusion of 'Seminole' tangelo with rough lemon. *Plant Cell Reports* 16, 397-400.
- Mouat, M.C.H., Anderson, L.B., 1973. Effect of ploidy change on root cation-exchange capacity and mineral composition in red clover. *Journal of Agricultural Research* 17, 55-58.
- Mouhaya, W., Allario, T., Brumos, J., Andrés, F., Froelicher, Y., Luro, L., Talón, M., Ollitrault, P., Morillon, R., 2010. Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Functional Plant Biology* 37, 647-685.
- Mourao, F.D.A., Pio, R., Januzzi, M., Beatriz, M., Azevedo, F.A., Schinor, E.H., Entelmann, F.A., Rodrigues, A., Andre, S., Cantuarias-Aviles, T.E., 2008. Evaluation of citrus somatic hybrids for tolerance to *Phytophthora nicotianae* and citrus tristeza virus. *Scientia Horticulturae* 115, 301-308.
- Moya, J.L., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., Talon, M., 2003. Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-

- tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. *Journal of Experimental Botany* 54, 825-833.
- Moya, J.L., Tadeo, F.R., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., Talon, M., 2002. Transmissible salt tolerance traits identified through reciprocal grafts between sensitive Carrizo and tolerant Cleopatra citrus genotypes. *Journal of Plant Physiology* 159, 991-998.
- Moya, J.L., Primo-Millo, E., Talon, M., 1999. Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant Cell and Environment* 22, 1425-1433.
- Mukherjee, S., Cameron, J.W., 1958. Tree size and chromosome number in a trial of tetraploid trifoliate orange as citrus rootstock, 267-272.
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651-681.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environment* 25, 239-250.
- Mylavarapu, J.L. Oldham, K.K. Crouse, D.H. Hardy, S. Heckendorn, D.K. Joines, C.C. Mitchell, T. Provin, H.J. Savoy, L. Sonon, J.J. Wang, D.D. Warncke, H. Zhang, 2014. Soil Test Methods from the Southern United States. Southern Extension and Research Activity Information Exchange Group - 6 (SERA-IEG-6), Clemson University, SC, USA.
- Nable, R.O., Bañuelos, G.S., Paull, J.G., 1997. Boron Toxicity. *Plant and Soil* 193, 181-198.
- Nassar, N.M.A., 2006. The synthesis of a new cassava-derived species, *Manihot vieiri* Nassar. *Genetics and Molecular Research* 5, 536-541.
- Nassar, N.M.A., 1992. Production of Triploid Cassava, *Manihot-Esculenta* Crantz by Hybrid Diploid Gametes. *Field Crops Research* 30, 173-182.
- Navarro, L., 2015. The Spanish citrus industry. *Acta Horticulturae*, 1065, 41-48.
- Navarro, L., Aleza, P., Cuenca, J., Juárez, J., Pina, J.A., Ortega, C., Navarro, A., Ortega, V., 2015. The Mandarin Triploid Breeding Program in Spain. *Acta Horticulturae* 1065, 389-395.
- Navarro, L., Olivares-Fuster, O., Juarez, J., Aleza, P., Pina, J., Ballester-Olmos, J., Cervera, M., Fagoaga, C., Duran-Vila, N., Pena, L., 2004. Applications of biotechnology to citrus improvement in Spain. *Citrus and Other Subtropical and Tropical Fruit Crops: Issues, Advances and Opportunities*, 221-234.
- Navarro, L., Pina, J.A., Juárez, J., Ballester-Olmos, J.F., Arregui, J.M., Ortega, C., Navarro, A., Duran-Vila, N., Guerri, J., Moreno, P., Cambra, M., Zaragoza, S., 2002. The Citrus Variety Improvement Program in Spain in the Period 1975-2001. *Proceedings of the 15th*

- Conference of the international Organization of Citrus Virologists IOCV, Riverside, California, 306-316.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Pina, J., 2003. Recovery of Triploid Seedless Mandarin Hybrids from  $2n \times 2n$  and  $2n \times 4n$  Crosses by Embryo Rescue and Flow Cytometry. *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*, Proceedings of the 10<sup>th</sup> IAPTC&B Congress June 23–28, 2002 Orlando, Florida, U.S.A., 541-544
- Navarro, L., 1990. Shoot-Tip Grafting Invitro of Woody Species and its Influence on Plant-Age. *Plant Ages*, NATO ASI Series 186. 117-123
- Navarro, L., Juárez, J., Pina, J.A., Ballester-Olmos, J.F., 1984. The citrus quarantine station in Spain. *Proceedings of the ninth Conference of the international Organization of Citrus Virologists IOCV*, Riverside, California, 365-370.
- Navarro, L., Roistacher, C., Murashige, T., 1975. Improvement of Shoot-Tip Grafting Invitro for Virus-Free Citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 100, 471-479.
- Nicolosi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., Tribulato, E., 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 1155-1166.
- Nieves, M., García, A., Cerdá, A., 1991. Effects of Salinity and Rootstock on Lemon Fruit-Quality. *Journal of Horticultural Science* 66, 127-130.
- Norvell, W.A., 1991. Reactions of metal chelates in soils and nutrient solutions., in: Mortvedt, J.J., Cox, F.R., Shuman, L.M., Welch, R.M. (Eds.), *Micronutrients in Agriculture*, 4th ed. SSSA Book Series, Madison, Wisconsin, USA, pp. 187-227.
- O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A.G., 2004. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Reviews of Plant Biology* 55, 109-139.
- O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G., Albersheim, P., 1996. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *Journal of Biological Chemistry* 271, 22923-22930.
- Oberwalder, B., Schilde-Rentschler, L., Ruoss, B., Wittemann, S., Ninnemann, H., 1998. Asymmetric protoplast fusions between wild species and breeding lines of potato - effect of recipients and genome stability. *Theoretical and Applied Genetics* 97, 1347-1354.
- Olivares-Fuster, O., Duran-Vila, N., Navarro, L., 2005. Electrochemical protoplast fusion in citrus. *Plant Cell Reports* 24, 112-119.

- Olivares-Fuster, O., Peña, L., Duran-Vila, N., Navarro, L., 2002. Green fluorescent protein as a visual marker in somatic hybridization. *Annals of Botany* 89, 491-497.
- Olivares-Fuster, O., Asíns, M., Duran-Vila, N., Navarro, L., 2000. Cryopreserved callus, a source of protoplasts for citrus improvement. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75, 635-640.
- Olivares-Fuster, O., 1998. Hibridación somática de cítricos. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- Ollitrault, F., Terol, J., Pina, J.A., Navarro, L., Talon, M., Ollitrault, P., 2010. Development of SSR Markers from *Citrus Clementina* (Rutaceae) Bac End Sequences and Interspecific Transferability in Citrus. *American Journal of Botany* 97, E124-E129.
- Ollitrault, P., Navarro, L., 2012. Citrus, in: Badenes, M.L., Byrne, D.H. (Eds.). Springer U. S, pp. 623-662.
- Ollitrault, P., Terol, J., Chen, C., Federici, C.T., Lotfy, S., Hippolyte, I., Ollitrault, F., Berard, A., Chauveau, A., Cuenca, J., Costantino, G., Kacar, Y., Mu, L., Garcia-Lor, A., Froelicher, Y., Aleza, P., Boland, A., Billot, C., Navarro, L., Luro, F., Roose, M.L., Gmitter, F.G., Talon, M., Brunel, D., 2012a. A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics* 13, 593.
- Ollitrault, P., Terol, J., Garcia-Lor, A., Berard, A., Chauveau, A., Froelicher, Y., Belzile, C., Morillon, R., Navarro, L., Brunel, D., Talon, M., 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.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F., Froelicher, Y., 2008. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant breeding reviews* 30, 323.
- Ollitrault, P., Jacquemond, C., Dubois, C., Luro, F., 2003. Citrus, in: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J.C. (Eds.), Genetic diversity of cultivated tropical plants. Science Publishers Inc., Enfield, pp. 193-217.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Froelicher, Y., Luro, F., Cottin, R., 2001. La diversité des agrumes: structuration et exploitation par hybridation somatique. *Comptes-rendus de l'Académie d'agriculture* 86, 197-221.
- Ollitrault, P., Froelicher, Y., Dambier, D., Seker, M., 2000. Rootstock breeding by somatic hybridisation for the Mediterranean citrus industry. *Proceedings of the First International Symposium on Citrus Biotechnology*, 157-162.
- Ollitrault, P., Michaux-Ferrière, N., 1992. Application of flow cytometry for citrus genetic and breeding. 1, 193-198.

- Osborn, T.C., Pires, J.C., Birchler, J.A., Auger, D.L., Chen, Z.J., Lee, H.S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R.W., Colot, V., Martienssen, R.A., 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* 19, 141-147.
- Otto, S.P., Whitton, J., 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annu. Review of Genetics* 34, 401-437.
- Ozkan, H., Levy, A.A., Feldman, M., 2001. Allopolyploidy induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) grup. *Plant Cell* 13, 1735-47.
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Therios, I.N., Patakas, A., Giannakoula, A., 2004. Boron toxicity in 'Clementine' mandarin plants grafted on two rootstocks. *Plant science* 166, 539-547.
- Park, T.H., Kim, J.B., Hutten, R.C.B., Van Eck, H.J., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., 2007. Genetic positioning of centromeres using half-tetrad analysis in a 4x-2x cross population of potato. *Genetics* 176, 85-94.
- Pathak, A.N., Kalra, Y.P., 1971. Antagonism between Potassium, Calcium and Magnesium in several varieties of hybrid corn. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 130, 118-124.
- Pedrero, F., Mounzer, O., Alarcon, J.J., Bayona, J.M., Nicolas, E., 2013. The viability of irrigating mandarin trees with saline reclaimed water in a semi-arid Mediterranean region: a preliminary assessment. *Irrigation Science* 31, 759-768.
- Penjor, T., Yamamoto, M., Uehara, M., Ide, M., Matsumoto, N., Matsumoto, R., Nagano, Y., 2013. Phylogenetic Relationships of Citrus and Its Relatives Based on matK Gene Sequences. *PLoS One* 8, e62574.
- Pensabene-Bellavia, G., Ruiz, M., Aleza, P., Olivares-Fuster, O., Ollitrault, P., Navarro, L., 2015. Chromosome instability in Carrizo citrange + *Citrus macrophylla* somatic hybrids. *Scientia Horticulturae* 166, 677-685.
- Pensabene-Bellavia, G., 2009. Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- Perez, R.M., Galiana, A.M., Navarro, L., Duran-Vila, N., 1998. Embryogenesis *in vitro* of several Citrus species and cultivars. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 73, 796-802.
- Perez-Perez, J.G., Syvertsen, J.P., Botia, P., García-Sánchez, F., 2007. Leaf water relations and net gas exchange responses of salinized Carrizo citrange seedlings during drought stress and recovery. *Annals of Botany* 100, 335-345.
- Pestana, M., de Varennes, A., Abadía, J., Faria, E., 2005. Differential tolerance to iron deficiency of citrus rootstocks grown in nutrient solution. *Scientia Horticulturae* 104, 25-36.

- Pestana, M., Varennes, A., Araújo-Faria, E., 2003. Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1, 46-51.
- Pestana, M., Correia, P.J., David, M., Abadia, A., Abadia, J., de Varennes, A., 2011. Response of five citrus rootstocks to iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174, 837-846.
- Peterson, C.A., Lefcourt, B.E.M., 1990. Development of endodermal Casparian bands and xylem in lateral roots of broad bean. *Canadian Journal of Botany* 68, 2729-2735.
- Peterson, C.A., Murrmann, M., Steudle, E., 1993. Location of the major barriers to water and ion movement in young corn roots of *Zea mays* L. *Planta* 190, 127-136.
- Pina, J.A., Chomé, P., Vives, M.C., Navarro, L., 2015. The Citrus Nursery Tree Certification Program in Spain. *Acta Horticulturae*. 1065, 745-751.
- Pitman, M.G., 1976. Ion uptake by plant roots, in: Lüttge, U., Pitman, M.G. (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. II., New series ed. Springer-Verlag, New York, pp. 93-128.
- Platt, R.G., Bitters, W.P., 1971. Characteristics of rootstocks used for citrus in California.
- Podda, A., Checcucci, G., Mouhaya, W., Centeno, D., Rofidal, V., Del Carratore, R., Luro, F., Morillon, R., Ollitrault, P., Maserti, B.E., 2013. Salt-stress induced changes in the leaf proteome of diploid and tetraploid mandarins with contrasting Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> accumulation behaviour. *Journal of Plant Physiology* 170, 1101-1112.
- Price, L., 1968. Iron compounds and plant nutrition. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 239-248.
- Pustovoitova, T.N., Eremin, G.V., Rassvetaeva, E.G., Zhdanova, N.E., Zholkevich, V.N., 1996. Drought resistance, recovery capacity, and phytohormone content in polyploid plum leaves. *Russ. Journal of Plant Physiology* 43, 232-235.
- Rabotti, G., De Nisi, P., Zocchi, G., 1995. Metabolic implications in the biochemical responses to iron deficiency in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots. *Plant Physiology* 107, 1195-1199.
- Rabotti, G., Zocchi, G., 1994. Plasma membrane-bound H<sup>+</sup>-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiologia Plantarum* 90, 779-785.
- Ramsey, J., 2011. Polyploidy and ecological adaptation in wild yarrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 108, 7096-7101.
- Ream, C.L., Furr, J.R., 1976. Salt tolerance of some Citrus species, relatives and hybrids tested as rootstocks. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101, 265-267.



- Reid, R., 2007. Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley. *Plant and Cell Physiology* 48, 1673-1678.
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., Guerinot, M.L., 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397, 694-697.
- Rodríguez-Gamir, J., Ancillo, G., Legaz, F., Primo-Millo, E., Forner-Giner, M.A., 2012. Influence of salinity on pip gene expression in citrus roots and its relationship with root hydraulic conductance, transpiration and chloride exclusion from leaves. *Environmental and Experimental Botany* 78, 163-166.
- Rodríguez-Gamir, J., Intrigliolo, D.S., Primo-Millo, E., Forner-Giner, M.A., 2010. Relationships between xylem anatomy, root hydraulic conductivity, leaf/root ratio and transpiration in citrus trees on different rootstocks. *Physiologia Plantarum* 139, 159-169.
- Romero-Aranda, R., Moya, J.L., Tadeo, F.R., Legaz, F., Primo-Millo, E., Talon, M., 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant Cell Environ.* 21, 1243-1253.
- Romero-Aranda, R., Bondada, B.R., Syvertsen, J.P., Grosser, J.W., 1997. Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid citrus. *Annals of Botany* 79, 153-160.
- Römheld, V., 2000. The chlorosis paradox: Fe inactivation in leaves as a secondary event in Fe deficiency chlorosis. *Journal of Plant Nutrition* 23, 1629-1643.
- Ruiz, M., Quiñones, A., Martínez-Alcántara, B., Aleza, P., Morillon, R., Navarro, L., Primo-Millo, E., Martínez-Cuenca, M.R., 2016a. Effects of salinity on diploid (2x) and doubled diploid (4x) *Citrus macrophylla* genotypes. *Scientia Horticulturae* 207, 33-40.
- Ruiz, M., Quiñones, A., Martínez-Alcántara, B., Aleza, P., Morillon, R., Navarro, L., Primo-Millo, E., and Martínez-Cuenca, M., 2016b. Tetraploidy enhances boron-excess tolerance in carrizo citrange (*Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf). *Frontiers in Plant Science* 7:701.
- Saito, W., Ohgawara, T., Shimitzu, J., Ishii, S., Kobayashi, S., 1993. Citrus Cybrid Regeneration Following Cell-Fusion between Nucellar Cells and Mesophyll-Cells. *Plant Science* 88, 195-201.
- Sakata, Y., Monma, S., 1993. Genetic instability of a progeny from a somatic hybrid between tomato (*Lycopersicon esculentum*) and *L. peruvianum*. *Plant Science* 90, 225-232.
- Saleh, B., Allario, T., Dambier, D., Ollitrault, P., Morillon, R., 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes Rendus Biologies* 331, 703-710.

- Salibe, A.A., Cereda, E.E., 1984. Limitations on the use of Volkamer lemon as rootstocks for citrus, 371-374.
- Salmon, A., Ainouche, M.L., 2010. Polyploidy and DNA methylation: new tools available. *Molecular Ecology* 19, 213-215.
- Salmon, A., Ainouche, M., Wendel, J., 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* 14, 1163-1175.
- Santi, S., Schmidt, W., 2009. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist* 183, 1072-1084.
- Sanz, M., Cavero, J., Abadía, J., 1992. Iron chlorosis in Ebro river basin, Spain. *Journal of Plant Nutrition*, 1971-1981.
- Satpute, A.D., Chen, C., Gmitter, F.G., Jr., Ling, P., Yu, Q., Grosser, M.R., Grosser, J.W., Chase, C.D., 2015. Cybridization of Grapefruit with 'Dancy' Mandarin Leads to Improved Fruit Characteristics. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 140, 427-435.
- Savage, E.M., Gardner, F.E., 1965. The origin and history of Troyer and Carrizo citranges, in: Reuther, W., Webber, H.J., Batchelor, L.D. (Eds.), *The Citrus Industry*, Vol.1. University of California Press, Riverside, California.
- Schenk, W., 1962. Der heutige Stand der Affinitätsforschung in der Rebenveredlung. *Weinberg u. Keller* 9, 391-402.
- Scholander, P.F., Bradstreet, E.D., Hemmingsten, E.A., Hammel, H.T., 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148, 339-346.
- Schmidt, W., 1999. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist* 141, 1-26.
- Schnurbusch, T., Hayes, J., Hrmova, M., Baumann, U., Ramesh, S.A., Tyerman, S.D., Langridge, P., Sutton, T., 2010. Boron toxicity tolerance in barley through reduced expression of the multifunctional aquaporin HvNIP2:1. *Plant Physiology* 153, 1706-1715.
- Schwartz, S., 2001a. Autotetraploides espontáneos en patrones de cítricos: incidencia, características y comportamiento en vivero y campo. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Schwartz, S.F., Juarez, J., Pina, J.A., Agustí, M., Navarro, L., 2001b. Analysis of the ploidy level of seedlings from tetraploid citrus rootstock. *Proceedings of the 6th International Congress Citrus Nurserymen*, 140-143.
- Scora, R.W., 1975. On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 102, 369-375.
- Seibert, M., 1993. Biochemical, biophysical and structural characterization of the isolate photosystem II reaction center complex, in: Norris, J., Deisehhofer, J. (Eds.), *The Photosynthetic Reaction Center*. Vol. 1. Academic Press, San Diego, CA, USA., pp. 319-356.

- Semagn, K., Babu, R., Hearne, S., Olsen, M., 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding* 33, 1-14.
- Shafieizargar, A., Awang, Y., Juraimi, A.S., Othman, R., 2013. Comparative studies between diploid and tetraploid Dez Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] under salinity stress. *Australian Journal of Crop Science* 7, 1436-1441.
- Shear, C.B., Crane, H.L., Myers, A.T., 1948. Nutrient-element balance: application of the concept to the interpretation of foliar analysis. *American Society for Horticultural Science* 51, 319-326.
- Shannon, M.C., Grieve, C.M., 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae* 78, 5-38.
- Smith, M.W., Gultzow, D.L., Newman, T.K., 2013. First fruiting intergeneric hybrids between Citrus and Citropsis. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 138, 57-63.
- Smyda-Dajmund, P., Śliwka, J., Wasilewicz-Flis, I., Jakuczun, H., Zimnoch-Guzowska, E., 2016. Genetic composition of interspecific potato somatic hybrids and autofused 4x plants evaluated by DArT and cytoplasmic DNA markers. *Plant Cell Reports* 35, 1345-1358.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., 1995. The Dynamic Nature of Polyploid Genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92, 8089-8091.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E., 2009. The Role of Hybridization in Plant Speciation. *Annual Review of Plant Biology* 60, 561-588.
- Spiegel-Roy, P., Goldschmidt, E.E., 1996. *Biology of Citrus*. Press syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- Starrantino, A., Recupero, G., 1981. Citrus hybrids obtained *in vitro* from 2x females x 4x males. In: K. Matsumoto (ed.). *Proceedings of the International Society for Citriculture, Okitsu, Japan*. 1, 31-32.
- Stebbins, G.L., 1980. Polyploidy in plants: Unsolved problems and prospects., in: Walter, H.L. (Ed.), *Basic Life Sciences*. Vol. 13. Springer US, pp. 495-520.
- Stebbins, G.L., 1950. *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York, US.
- Storey, R., Walker, R.R., 1999. Citrus and salinity. *Scientia Horticulturae* 78, 39-81.
- Storey, R., Walker, R.R., 1987. Some Effects of Root Anatomy on K, Na and Cl Loading of Citrus Roots and Leaves. *Journal of Experimental Botany* 38, 1769-1780.
- Stupar, R.M., Bhaskar, P.B., Yandell, B.S., Rensink, W.A., Hart, A.L., Ouyang, S., Veilleux, R.E., Busse, J.S., Erhardt, R.J., Buell, C.R., Jiang, J., 2007. Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* 176, 2055-2067.

- Sundberg, E., Glimelius, K., 1991. Effects of Parental Ploidy Level and Genetic-Divergence on Chromosome Elimination and Chloroplast Segregation in Somatic Hybrids within Brassicaceae. *Theoretical and Applied Genetics* 83, 81-88.
- Susín, S., Abadía, A., Gonzalez-Reyes, J.A., Lucena, J.J., Abadía, J., 1996. The pH requirements for *in vivo* activity of the iron-deficiency turbo ferric chelate reductase. *Plant Physiology* 110, 111-123.
- Sutton, T., Baumann, U., Hayes, J., Collins, N.C., Shi, B.J., Schnurbusch, T., Hay, A., Mayo, G., Pallotta, M., Tester, M., Langridge, P., 2007. Boron-toxicity tolerance in barley arising from efflux transporter amplification. *Science* 318, 1446-1448.
- Swingle, W.T., Reece, P.C., 1967. The botany of Citrus and its wild relatives., in: Reuther, W., Webber, H., Batchelor, L. (Eds.), *The Citrus Industry*. Vol. 1. University of California, Berkeley, USA., pp. 190-430.
- Syvertsen, J.P., Garcia-Sánchez, F., 2014. Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. *Environmental and Experimental Botany* 103, 128-137.
- Syvertsen, J.P., Yelenosky, G., 1988. Salinity can Enhance Freeze Tolerance of Citrus Rootstock Seedlings by Modifying Growth, Water Relations, and Mineral-Nutrition. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113, 889-893.
- Syvertsen, J.P., Melgar, J.C., Garcia-Sánchez, F., 2010. Salinity Tolerance and Leaf Water Use Efficiency in Citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135, 33-39.
- Syvertsen, J.P., Graham, J.H., 1985. Hydraulic Conductivity of Roots, Mineral-Nutrition, and Leaf Gas-Exchange of Citrus Rootstocks. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110, 865-869.
- Syvertsen, J.P., Lee, L.S., Grosser, J.W., 2000. Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO<sup>2</sup>. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 228-234.
- Tachikawa, T., Tanaka, Y., Hara, S., 1971. Investigation on the breeding of Citrus trees. Study on the breeding of triploid Citrus varieties. *Bulletin of the Shizuoka Prefectural Citrus Experiment Station* 4, 33-44.
- Tagliavini, M., Rombolá, A.D., 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *European Journal of Agronomy*, 71-92.
- Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S., Fujiwara, T., 2010. Polar localization and degradation of Arabidopsis boron

- transporters through distinct trafficking pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 107, 5220-5225.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von Wiren, N., Fujiwara, T., 2006. The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18, 1498-1509.
- Takano, J., Miwa, K., von Wiren, N., Fujiwara, T., 2005a. Boron dependent endocytosis and degradation of boron transporter AtBOR1. *Plant Cell Physiology* 46, 151-151.
- Takano, J., Miwa, K., Yuan, X., von Wiren, N., Fujiwara, T., 2005b. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 12276-12281.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T., Fujiwara, T., 2002. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature* 420, 337-340.
- Takano, J., Miwa, K., Fujiwara, T., 2008. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends Plant Sci.* 13, 451-457.
- Tan, F., Tu, H., Liang, W., Long, J., Wu, X., Zhang, H., Guo, W., 2015. Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement. *BMC Plant Biol.* 15, 89.
- Tanaka, M., Takano, J., Chiba, Y., Lombardo, F., Ogasawara, Y., Onouchi, H., Naito, S., Fujiwara, T., 2011. Boron-dependent degradation of NIP5:1 mRNA for acclimation to excess boron conditions in Arabidopsis. *The Plant Cell* 23, 3547-3559.
- Tanaka, T., 1977. Fundamental discussion of Citrus classification. *Studia citrologica* 14, 1-6.
- Tanaka, T., 1954. Species problem in Citrus (Revisio Aurantiacearum IX). Japanese Society for Promotion of Science .
- Teakle, N.L., Tyerman, S.D., 2010. Mechanisms of Cl<sup>-</sup> transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ.* 33, 566-589.
- Terry, N., Zayed, A.M., 1995. Physiology and biochemistry of leaves under iron deficiency, in: Abadía, J. (Ed.), Iron nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland, pp. 283-294.
- Terry, N., Abadía, J., 1986. Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition* 3-7, 609-646.
- Tiffin, L.O., Brown, J.C., 1962. Iron chelates in soybean exudate. *Science*, 466-480.

- Treeby, M., Uren, N., 1993. Iron deficiency stress responses amongst citrus rootstocks. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 156, 75-81.
- Tregeagle, J.M., Tisdall, J.M., Tester, M., Walker, R.R., 2010. Cl<sup>-</sup> uptake, transport and accumulation in grapevine rootstocks of differing capacity for Cl<sup>-</sup> exclusion. *Functional Plant Biology* 37, 665-673.
- Tu, Y., Jiang, A., Gan, L., Hossain, M., Zhang, J., Peng, B., Xiong, Y., Song, Z., Cai, D., Xu, W., Zhang, J., He, Y., 2014. Genome duplication improves rice root resistance to salt stress. *Rice* 7, 15.
- Turrell, F.M., Vanselow, A.P., 1946. Tables of Coefficients for Estimating Oblate and Prolate Spheroidal Surfaces and Volumes from Spherical Surfaces and Volumes for Finding Fruit Surfaces and Volumes. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 48, 326-336.
- Tusa, N., Del Bosco, S.F., Nigro, F., Ippolito, A., 2000. Response of cybrids and a somatic hybrid of lemon to *Phoma tracheiphila* infections. *HortScience* 35, 125-127.
- Tyree, M.T., Patiño, S., Behnink, J., Alexander, J., 1995. Dynamic measurements of root hydraulic conductance using a high-pressure flowmeter in the laboratory and field. *Journal of Experimental Botany* 46, 83-94.
- USDA, 2013. *Citrus: World Markets and Trade*.
- Uzun, A., Yesiloglu, T., 2012. Genetic diversity in Citrus, in: Anonymous, *Genetic diversity in plants*, 11. Caliskan, M. ed. InTech.
- Vardi, A., Galun, E., 1988. Recent Advances in Protoplast Culture of Horticultural Crops - Citrus. *Scientia Horticulturae* 37, 217-230.
- Vardi, A., Breiman, A., Galun, E., 1987. Citrus Cybrids - Production by Donor-Recipient Protoplast-Fusion and Verification by Mitochondrial-DNA Restriction Profiles. *Theoretical and Applied Genetics* 75, 51-58.
- Vardi, A., Spiegelroy, P., Galun, E., 1982. Plant-Regeneration from Citrus Protoplasts - Variability in Methodological Requirements among Cultivars and Species. *Theoretical and Applied Genetics* 62, 171-176.
- Vert, G.A., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F., Curie, C., 2002. IRT1 an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and plant growth. *Plant Cell* 14, 1223-1233.
- Vert, G.A., Briat, J.F., Curie, C., 2001. Arabidopsis *IRT2* gene encodes a root-periphery transporter. *Plant Journal*, 26 (2) 181-189.
- Vidal, E., Moreno, A., Bertolini, E., Martínez, M.C., Corrales, A.R., Cambra, M., 2012. Epidemiology of Citrus tristeza virus in nursery blocks of *Citrus macrophylla* and evaluation of control measures. *Spanish Journal of Agricultural Research* 10, 1107-1116.

- Wakana, A., Hanada, N., Park, S., Fukudome, I., Kajiwara, K., 2005. Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 50, 93-102.
- Walker, R.R., 1986. Sodium exclusion and potassium-sodium selectivity in salt treated Trifoliata orange (*Poncirus trifoliata*) and Cleopatra mandarin (*Citrus reticulata*) plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 135, 293-303.
- Walker, R.R., Törökfalvy, E., Grieve, A.M., Prior, L.D., 1983. Water relations and ion concentrations of leaves on salt-stressed citrus plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 10, 256-267.
- Walker, R.R., Douglas, T.J., 1983. Effect of Salinity Level on Uptake and Distribution of Chloride, Sodium and Potassium Ions in Citrus Plants. *Aust. J. Agric. Res.* 34, 145-153.
- Walker, R.R., Torokfalvi, E., Downton, W.J.S., 1982. Photosynthetic Responses of the Citrus Varieties Rangpur Lime and Etrog Citron to Salt Treatment. *Australian Journal of Plant Physiology*, 783-790.
- Walker, K.A., 1980. Polyploidy and agriculture, in: Lewis, W.H. (Ed.), *Basic life sciences*. Washington University, Plenum Press, New York, pp. 491-492.
- Walker, R.R., Sedgley, M., Blessing, M.A., Douglas, T.J., 1984. Anatomy, ultrastructure and assimilate concentrations of roots of citrus genotypes differing in ability for salt exclusion. *Journal of Experimental Botany* 35, 1481-1494.
- Wallace, J.M., 1978. Virus and viruslike diseases, in: Reuther, W., E. C. Calavan, and G. E. Carman (Ed.), *The Citrus Industry, Revised IV ed.* The University of California's Division of Agriculture and Natural Resources, Berkeley, California, USA, pp. 67-184.
- Wallace, A., Bear, F.E., 1949. Influence of potassium and boron on nutrient element balance and growth of ranger alfalfa. *Plant Physiology* 24, 664-680.
- Weir, C.C., 1969. Nutrient Element Balance in Citrus Nutrition. *Plant Soil* 30, 405-409
- Wang, Z., Wang, M., Liu, L., Meng, F., 2013. Physiological and Proteomic Responses of Diploid and Tetraploid Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) Subjected to Salt Stress. *International Journal of Molecular Science* 14, 20299-20325.
- Wang, J., Tian, L., Lee, H., Chen, Z.J., 2006a. Nonadditive regulation of *FRI* and *FLC* loci mediates flowering-time variation in Arabidopsis allopolybrids. *Genetics* 173, 965-974.
- Wang, J., Tian, L., Lee, H., Wei, N., Jiang, H., Watson, B., Madlung, A., Osborn, T., Doerge, R., Comai, L., Chen, Z., 2006b. Genomewide nonadditive gene regulation in Arabidopsis allotetraploids. *Genetics* 172, 507-517.

- Warner, D.A., Edwards, G.E., 1993. Effects of Polyploidy on Photosynthesis. *Photosynthesis Research* 35, 135-147.
- Warner, D.A., Edwards, G.E., 1989. Effects of Polyploidy on Photosynthetic Rates, Photosynthetic Enzymes, Contents of DNA, Chlorophyll, and Sizes and Numbers of Photosynthetic Cells in the C4 Dicot *Atriplex confertifolia*. *Plant Physiol* 91, 1143-1151
- Warner, D.A., Ku, M.S.B., Edwards, G.E., 1987. Photosynthesis, Leaf Anatomy, and Cellular Constituents in the Polyploid C4 Grass *Panicum virgatum*. *Plant Physiology* 84, 461-466.
- Waters, B.M., Blevins, D.G., Eide, D.J., 2002. Characterization of FRO1, a pea ferric chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiology*, 85-94.
- Webber, H.J., 1943. Cultivated varieties of citrus. in: Webber, H.J., Batchelor, D. (Eds.), *The citrus industry. History, world distribution, botany and varieties*. University of California, Berkeley, CA, US., pp. 475-668.
- Webber, H., 1967. History and development of the Citrus Industry, in: Reuther, W., Webber, H.J., Batchelor, L. (Eds.), *The Citrus Industry*. Vol. 1. University of California Press., Berkeley, USA., pp. 1-39.
- Weising, K., Gardner, R.C., 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42, 9-19.
- Wendel, J., Doyle, J., 2005. Polyploidy and evolution in plants, in: Henry, R.J. (Ed.), *Plant diversity and evolution. Genotypic and phenotypic variation in higher plants*. CAB International, Wallingford, U. K., pp. 97-117.
- White, P.F., Robson, A.D., 1990. Response of Lupins (*Lupinus angustifolius* L.) and peas (*Pisum sativum* L.) to Fe deficiency induced by low concentration of Fe in solution or by addition of  $\text{HCO}_3^-$ . *Plant Soil*, 39-47.
- White, P.J., 2001. The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of Experimental Botany* 52, 891-899.
- Wood, T.E., Takebayashi, N., Barker, M.S., Mayrose, I., Greenspoon, P.B., Rieseberg, L., H., 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106, 13875-13879.
- Wu, G.A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., Perrier, X., Ruiz, M., Scalabrin, S., Terol, J., Takita, M.A., Labadie, K., Poulain, J., Couloux, A., Jabbari, K., Cattonaro, F., Del Fabbro, C., Pinosio, S., Zuccolo, A., Chapman, J., Grimwood, J., Tadeo, F.R., Estornell, L.H., Munoz-Sanz, J.V., Ibanez, V., Herrero-Ortega, A., Aleza, P., Perez-Perez, J., Ramon, D., Brunel, D., Luro, F., Chen, C., Farmerie, W.G., Desany, B., Kodira, C.,



- Mohiuddin, M., Harkins, T., Fredrikson, K., Burns, P., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Reforgiato, G., Freitas-Astua, J., Quetier, F., Navarro, L., Roose, M., Wincker, P., Schmutz, J., Morgante, M., Machado, M.A., Talon, M., Jaillon, O., Ollitrault, P., Gmitter, F., Rokhsar, D., 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology* 32, 656.
- Wutscher, H.K., 1979. Citrus rootstocks. *Horticultural reviews of the American society for horticultural science* 1, 237-269.
- Xiao, S., Biswas, M.K., Li, M., Deng, X., Xu, Q., Guo, W., 2014. Production and molecular characterization of diploid and tetraploid somatic cybrid plants between male sterile Satsuma mandarin and seedy sweet orange cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 116, 81-88.
- Xu, S., Cai, D., Tan, F., Fang, Y., Xie, K., Grosser, J.W., Guo, W., 2014. Citrus somatic hybrid: an alternative system to study rapid structural and epigenetic reorganization in allotetraploid genomes. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 119, 511-522.
- Yaakov, B., Kashkush, K., 2011. Methylation, transcription, and rearrangements of transposable elements in synthetic allopolyploids. *International journal of plant genomics* , 569826.
- Yamamoto, M., Kobayashi, S., 1995. A cybrid plant produced by electrofusion between *Citrus unshiu* (satsuma mandarin) and *C. sinensis* (sweet orange). *Plant tissue culture letters* 12, 131-137.
- Yang, C., Zhao, L., Zhang, H., Yang, Z., Wang, H., Wen, S., Zhang, C., Rustgi, S., Von Wettstein, D., Liu, B., 2014. Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 111, 11882-11887.
- Yelenosky, G., Brown, R.T., Hearn, C.J., 1973. Tolerance of trifoliolate orange selections and hybrids to freezes. 86, 99-104.
- Yildiz, M., Terzi, H., 2013. Effect of NaCl Stress on Chlorophyll Biosynthesis, Proline, Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzymes in Leaves of Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Barley Cultivars. *Journal of Agricultural Sciences.* 19, 79-88.
- Yu, Z., Haberer, G., Matthes, M., Rattei, T., Mayer, K.F.X., Gierl, A., Torres-Ruiz, R.A., 2010. Impact of natural genetic variation on the transcriptome of autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107, 17809-17814.
- Zaragoza, S., 2007. Aproximación a la historia de los cítricos. Origen, dispersión y evolución de su uso y cultivo. Tesis doctoral, Universidad politécnica de Valencia.

- Zhang, J., Zhang, M., Deng, X., 2007. Obtaining autotetraploids in vitro at a high frequency in *Citrus sinensis*. *Plant cell tissue and organ culture* 89, 216.
- Zhang, X.Y., Hu, C.G., Yao, J.L., 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *Journal of Plant Physiology* 167, 88-94.
- Zhang, Y.M., Zhang, H.M., Liu, Z.H., Li, H.C., Guo, X.L., Li, G., 2015. The wheat NHX antiporter gene TaNHX2 confers salt tolerance in transgenic alfalfa by increasing the retention capacity of intracellular potassium. *Plant Molecular Biology* 87, 317-327.
- Zheng, B., Wu, X., Ge, X., Deng, X., Grosser, J.W., Guo, W., 2012. Comparative Transcript Profiling of a Male Sterile Cybrid Pummelo and Its Fertile Type Revealed Altered Gene Expression Related to Flower Development. *PLoS One* 7, e43758.

Este trabajo ha sido co-financiado por el Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA-GVA) y el proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) AGL2011-2490.



## AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, mi agradecimiento es para mis directores de tesis Raphaël Morillon, Luis Navarro y Eduardo Primo, por haberme dado la oportunidad de hacer el doctorado. Gracias por vuestro respaldo durante estos años, vuestro ejemplo, el tiempo y esfuerzo dedicados, por ofrecerme vuestra sabiduría y por haberme animado en los momentos más intensos. También quiero expresar mi gratitud a mi tutora Rosa Peirò. Gracias por ofrecerme tu apoyo firme y tu disposición infinita.

Además, he tenido la gran suerte de contar con unas compañeras y mentoras excepcionales que me han ayudado muchísimo a crecer y me han dedicado su tiempo, su talento y su esfuerzo. Mil gracias Ana Quiñones, Belén Martínez y M<sup>a</sup> Rus Martínez, las palabras se quedan cortas...sois mis hadas madrinas.

Tengo que agradecer también la amplia experiencia y la dedicación que José Antonio Pina, Rafa Montalt, Josep Peris y el equipo dirigido por Diego Conchilla han puesto a mi disposición para los ensayos en invernadero. Gracias, porque vuestra ayuda ha sido fundamental, he aprendido y disfrutado muchísimo con vosotros durante estos años. Además, la colaboración de Ricardo Bellver ha sido indispensable para realizar el estudio de campo, muchísimas gracias por tu amabilidad y por tu buen hacer.

La guía que otros investigadores me han brindado ha sido también clave para recorrer este camino. Gracias Paco Legaz, Quico Tadeo, Ángeles Calatayud, M<sup>a</sup> Ángeles Forner, Vicent Arbona, Pepe Juárez, Pablo Aleza y Patrick Ollitrault por vuestra colaboración. Y gracias, especialmente, Tatiana Pina y Gema Ancillo por vuestro gran apoyo y la confianza que habéis depositado en mí, al ofrecerme oportunidades para seguir creciendo.

Otra gran suerte ha sido poder contar con la ayuda de los equipos técnicos de Citricultura y Biotecnología. Gracias por vuestra dedicación y apoyo. Especialmente, gracias Carmen Ortega, Violeta Ortega, Toni Navarro, Juan Romero, M<sup>a</sup> Carmen Prieto, Tere García, Carmen Casamayor y Enric Alcayde por que habéis sido imprescindibles para sacar adelante éste trabajo.

Siempre recuerdo a las personas que fueron mis ‘baldosas amarillas’, especialmente a Idoia Garmendia, Fernando Martínez y José Antonio Daròs. A vosotros también, mil gracias por vuestra acogida, amabilidad y dedicación. El paso por vuestro laboratorio me ayudó a crecer, me animó a permanecer y me permitió llegar hasta aquí.

Pero, sin duda alguna, la experiencia más gratificante que he vivido estos años ha sido la cálida acogida que he recibido por parte de mis compañeros los ‘IVIAS y exIVIAS’ y también por parte de los entomólogos. Sobre todo, gracias por vuestra amistad y por tantas risas inolvidables. Especialmente, gracias Andrés García, José Cuenca, Housseem Rouiss, Franck Curk, M<sup>a</sup> Cruz Castillo, Regina Niños, Jesús Agüero, Berta Alquézar, Elsa Pons, Ana Rodríguez, Pablo Lemos, Nuria Soler, Montse Plomer, Verò Raga, y María Hernández por ofrecerme vuestra experiencia y apoyo siempre.

Tengo mucho que agradecer también a mi familia y amigos. Gracias por ser mi sustento, por vuestra pacencia, comprensión, aliento y disculpa en las ausencias. Especialmente, gracias madre, padre y Manu por creer en mí, gracias Amparo y Paco por vuestra acogida, gracias a mis ‘Genios’, ‘F\*ckers’ y a mis queridas ‘Polvorones de tomate’ por vuestra alegría, gracias primas Ruiz y Fernando & Javi por vuestra compañía y gracias Francesc por tu apoyo diario y por recordarme siempre que todo va a salir bien.





