

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLIPLOIDES EN *CITRUS*

por

Mario GIAMBIASI RODRÍGUEZ

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de *Magister*
en Ciencias Agrarias opción Ciencias
Vegetales.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2014

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. (Dr.) Marco Dalla Rizza, Ing. Agr. (Dra.) Alicia Castillo, e Ing. Agr. (Dra.) Mariana Sotelo, el 2 de diciembre de 2014. Autor: Lic. Mario Giambiasi. Director: Ing. Agr. (PhD.) Pablo Speranza, Co-director: Ing. Agr. (Dr.) Fernando Rivas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis tutores Fernando Rivas y Pablo Speranza por la oportunidad que me han dado y todo lo que me han enseñado en estos años.

Agradezco a ANII por otorgarme la beca de Maestría.

También quiero agradecer a mis compañeros de INIA Salto Grande, a Alicia Castillo, Álvaro Otero y especialmente a Ana Arruabarrena por el apoyo brindado.

A las autoridades de INIA por permitirme realizar los trabajos de investigación en sus instalaciones.

Agradezco a mi familia y a Valentina por ser el pilar de todo esto y de mi vida.

TABLA DE CONTENIDOS

AROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
 1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	 1
1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS CÍTRICOS.....	1
1.2. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA Y ORÍGENES DE LAS VARIEDADES.....	1
1.3. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA.....	2
1.4. OBJETIVOS DE MEJORAMIENTO EN CÍTRICOS.....	2
1.5. MEJORAMIENTO GENÉTICO EN CÍTRICOS.....	3
1.5.1. <u>Selección clonal (Prospección)</u>	3
1.5.2. <u>Mutagénesis inducida</u>	4
1.5.3. <u>Hibridación sexual</u>	4
1.6. MANIPULACIÓN DE LA PLOIDÍA.....	4
1.6.1. <u>Poliploides naturales</u>	5
1.6.2. <u>Obtención de poliploides</u>	6
1.7. CARACTERIZACIÓN DE POLIPLOIDES POR MEDIO DE MARCADORES MOLECULARES Y CITOMETRÍA DE FLUJO.....	7
 2. <u>OBTENCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO FRIABLE DE MANDARINAS</u>	 9
2.1. RESUMEN	9
2.2. ABSTRACT	10
2.3. INTRODUCCIÓN.....	11

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.4.1. <u>Obtención de callo embriogénico</u>	12
2.4.2. <u>Selección de callo embriogénico friable</u>	14
2.5. RESULTADOS.....	15
2.6. DISCUSIÓN.....	18
2.7. BIBLIOGRAFÍA.....	20
3. <u>OBTENCIÓN DE TETRAPLOIDES DE CITRUS MEDIANTE ELECTROFUSIÓN DE PROTOPLASTOS: AJUSTE DE LAS DIFERENTES ETAPAS</u>	23
3.1. RESUMEN.....	23
3.2. ABSTRACT.....	24
3.3. INTRODUCCIÓN.....	25
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.4.1. <u>Obtención de callo embriogénico</u>	28
3.4.2. <u>Aislamiento de Protoplastos</u>	29
3.4.3. <u>Fusión eléctrica y regeneración de híbridos</u>	31
3.5. RESULTADOS.....	32
3.5.1. <u>Aislamiento de protoplastos</u>	32
3.5.2. <u>Fusión eléctrica y regeneración de híbridos</u>	36
3.6. DISCUSIÓN.....	39
3.6.1. <u>Aislamiento de protoplastos</u>	39
3.6.2. <u>Fusión eléctrica y regeneración de híbridos</u>	40
3.7. BIBLIOGRAFÍA.....	43
4. <u>CHARACTERIZATION OF CITRUS POLYPLOIDS REVEALS EVIDENCE OF 2N POLLEN PRODUCTION BY FDR</u>	47
4.1. ABSTRACT.....	47
4.2. INTRODUCTION.....	48

4.3. MATERIALS AND METHODS.....	49
4.3.1. <u>Plant material</u>	49
4.3.2. <u>Genotyping</u>	50
4.3.3. <u>PCR reaction and analysis</u>	51
4.3.4. <u>Allelic configuration</u>	51
4.3.5. <u>Origin and mechanism of 2n gamete generation</u>	51
4.4. RESULTS.....	52
4.4.1. <u>SSR amplification and segregation</u>	52
4.4.2. <u>Allelic configuration of tetraploid and triploid plants</u>	53
4.4.3. <u>Source and mechanism of 2n gamete production</u>	54
4.5. DISCUSSION.....	57
4.5.1. <u>Allelic configuration: tetraploid and triploid</u>	57
4.5.2. <u>Origin and mechanism of 2n gamete generation</u>	57
4.6. REFERENCES.....	59
5. <u>CONCLUSIONES FINALES</u>	63
6. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	65
7. <u>ANEXO</u>	72

RESUMEN

Los triploides resultan de la combinación de gametos haploides y diploides durante la hibridación sexual. Los gametos diploides pueden provenir de un tetraploide o ser gametos no reducidos ($2n$) procedentes de plantas diploides. Plantas tetraploides pueden ser originados por duplicación somática o hibridación somática. La hibridación somática a través de fusión de protoplastos en *Citrus* ha permitido la generación de nuevos genotipos tetraploides que combinen los genomas nucleares y citoplasmáticos de dos genotipos. Sin embargo, antes de realizar esta técnica, deben ser ajustados varios pasos con precisión. Los objetivos de esta tesis fueron: A) determinar el mecanismo y el progenitor que produce gametos $2n$ que dan lugar a cuatro triploides espontáneos; B) confirmar la constitución genética de las plantas tetraploides obtenidos por duplicación somática; C) ajustar todos los pasos de la técnica de hibridación somática, incluyendo la obtención de callo embriogénico friable y la regeneración de embriones. En los objetivos A y B, la constitución genética de los triploides, tetraploides y sus parentales se estableció mediante el uso de marcadores moleculares codominantes. Los resultados indican que los gametos $2n$ pueden formarse tanto en el parental femenino como en el masculino, y la evidencia apoya que el mecanismo de formación de los gametos $2n$ es genéticamente equivalente a la restitución de la primera división meiótica. Los tetraploides formados por duplicación somática mostraron la misma constitución genética que sus genotipos parentales. En el objetivo C, los óvulos de ocho genotipos de mandarina fueron transferidos a medio de cultivo *in vitro* en tres fechas de siembra. Sesenta días después de la antesis, un aumento en la inducción de callo fue observado. Los mayores rendimientos de protoplastos viables se produjeron con callos de color blanco y hojas recogidas de una cámara de crecimiento a 100 lux y 28 °C. Para la fusión de protoplastos se evaluaron diferentes potenciales eléctricos. Tensiones de 250 V/cm para la alineación y 2000 V/cm para la fusión producen el mayor número de fusiones. La regeneración se lleva a cabo mediante protocolos establecidos, pero es una etapa compleja. Estos resultados proporcionan nuevas capacidades para generar variabilidad nacional y oportunidades para el mejoramiento de la fruta cítrica.

Palabras clave: Fruta sin semilla, gametos $2n$, hibridación somática.

OBTENTION AND CHARACTERIZATION OF POLYPLOIDS IN CITRUS

SUMMARY

Triploids result by combining haploid and diploid gametes during sexual hybridization. Diploid gametes can arise from a tetraploid individual or unreduced gametes ($2n$) originated from diploid plants. Tetraploid plants can be originated by somatic doubling or somatic hybridization. Somatic hybridization through protoplast fusion in *Citrus* has allowed the generation of new tetraploid genotypes that combine the nuclear and cytoplasmic genomes of two genotypes. However, prior to performing this technique, several steps must be adjusted accurately. The objectives of this thesis were: A) to determine the mechanism and the progenitor that produced $2n$ gametes giving rise four spontaneous triploids; B) to confirm the genetic constitution of tetraploid plants obtained by somatic doubling; C) to adjust all the steps of the somatic hybridization technique including the obtention of friable embryogenic calli up to embryo regeneration. For the objectives A and B, the genetic constitution of the triploid, tetraploid and their parental genotypes were established using codominant molecular markers. The results indicate that $2n$ gametes can be formed in both the male and female parent, and the evidence supports that the mechanism of $2n$ gamete formation is genetically equivalent to the restitution of the first meiotic division. Tetraploids formed by somatic duplication showed the same genetic constitution of their parental genotypes. For the objectives C, ovules of eight tangerine genotypes were transferred to culture media in three sowing dates. Sixty days after anthesis, an increase in callus induction was observed. Higher yields of viable protoplasts were obtained from white calli and leaves collected in a growth chamber at 100 lux and 28 °C. For protoplast fusion different electrical potentials were evaluated. Voltages of 250 V/cm for alignment and 2000 V/cm for fusion produced the largest number of mergers. Regeneration is being carried out according to established protocols, but it is a complex stage. These results provide new capabilities to generate national variability, and opportunities for the *Citrus* Breeding.

Keywords: Seedlessness, $2n$ gametes, somatic hybridization.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS CÍTRICOS

Los cítricos son el principal cultivo frutal del mundo, con una producción de unos 110 millones de toneladas anuales. En este ámbito Brasil lidera la producción de Naranjas con 18.155.000 Tn, mientras que China es el mayor productor de Mandarinas con 10.142.430 Tn (FAO, 2012). En Uruguay se producen 156.727 Tn de Naranjas y unas 124.700 Tn de Mandarinas, exportando anualmente aproximadamente el 50% de su producción, lo que lo convierte en el tercer exportador de cítricos para consumo en fresco del hemisferio sur, detrás de Sudáfrica y Argentina (DIEA, 2012).

La citricultura uruguaya ocupa una superficie total de 16.250 ha efectivas, donde el 75% de la producción está destinada a la exportación (fruta fresca y derivados industriales) por un valor FOB del orden de los U\$S 70.000.000 (DIEA, 2012). El principal destino de la exportación son los países de la Unión Europea y Rusia, donde se coloca más del 90% de las exportaciones (Rivas *et al.*, 2010). Estos mercados buscan productos fáciles de preparar y consumir (sin semilla y fácil pelado), saludables, sin renunciar al sabor y calidad externa. Sobre esos ejes descansan las tendencias del consumo y por tanto, las oportunidades que tiene Uruguay para mantenerse como un proveedor de cítricos de excepción. Para ello la citricultura de Uruguay debe estar en continua actualización de conocimientos y adopción de nuevas tecnologías, entre ellas, la innovación en nuevas variedades de acuerdo a las tendencias de consumo de los mercados destino. Así la ausencia de semillas es un factor clave para obtener precios competitivos en mercados exigentes (Navarro *et al.*, 2003; Pastore A, com. pers. 14/10/2015).

1.2. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA Y ORÍGENES DE LAS VARIEDADES

Los cítricos pertenecen a la familia de las Rutáceas, subfamilia Aurantoideas. Esta se divide en dos tribus, siendo la de mayor importancia Citrinae, debido a que contiene los tres géneros con valor comercial: *Poncirus*, *Fortunella* y *Citrus* (Swingle y Reece, 1967).

El género *Citrus* incluye 16 especies de interés comercial que se originaron hace unos 20 millones de años a partir de hibridaciones interespecíficas entre las especies *C. grandis*, *C. reticulata* y *C. medica* (Barkley *et al.*, 2006). A partir de allí el hombre comenzó a realizar

combinaciones entre especies para obtener nuevas plantas que reunieran las características buscadas y así se fueron dispersando por todo el mundo (Moore, 2001). La mayoría de los híbridos que hoy se conocen son derivados de una combinación entre *C. reticulata* y *C. grandis*, con diferentes proporciones de ADN de cada especie (Wu *et al.*, 2014).

1.3. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

En el género *Citrus* se encuentran especies que presentan reproducción sexual y asexual. En la reproducción sexual es necesario que un grano de polen de un parental masculino alcance el pistilo de un parental femenino. El polen forma un tubo polínico para fecundar los óvulos y estos dan lugar a las semillas (Agusti *et al.*, 2003). En la reproducción sexual se observan dos tipos de mecanismos asociados a la combinación de genes. Se encuentran variedades autocompatibles, que pueden polinizarse a sí mismas, o los árboles de la misma variedad (clones). Por otro lado se encuentran variedades autoincompatibles las cuales no pueden polinizarse a sí mismas, necesitando de otras variedades que las polinicen para producir semillas. A este tipo de fecundación se la conoce como polinización cruzada. Es importante destacar que en la reproducción sexual, cada vez que ocurre la fecundación se forma un embrión cigótico en cada semilla. La mayoría de las especies del género *Citrus* presentan reproducción asexual o apomixis de origen nucelar y de tipo facultativo; por lo cual no es necesario que exista fecundación (solamente con el estímulo de la polinización puede ser suficiente) para producir un embrión. Mediante esta forma de reproducción se obtienen semillas poliembriónicas, las que poseen más de un embrión dentro de un óvulo (García *et al.*, 1999). Esta forma de reproducción ofrece un medio para la clonación de plantas a partir de semilla (Spillane *et al.*, 2001). Independientemente del mecanismo de reproducción, algunas variedades presentan esterilidad de origen genético, citológico o gamético que les impide la formación de semillas. Este hecho es favorable gracias a que algunos cítricos pueden desarrollar un fruto a pesar de que no presente semillas, este fenómeno natural se lo denomina partenocárpia (Agusti *et al.*, 2003).

1.4. OBJETIVOS DE MEJORAMIENTO EN CÍTRICOS

En los últimos años los mercados han incrementado las exigencias de los nuevos estándares de calidad. Exigen frutos sin semillas, de fácil pelado, calidad de piel excelente

(tanto en color como textura), alto contenido de °Brix, e inocuidad (Rivas *et al.*, 2010). Por otro lado, los productores necesitan maximizar sus rendimientos y reducir la mano de obra para hacer rentable la actividad. Estas exigencias impuestas por los consumidores y productores son abordadas por los programas de mejoramiento, donde se buscan soluciones a nivel genético a estas cuestiones. Las estrategias de mejora son diferentes de acuerdo a las características varietales que se pretende mejorar y la forma de reproducción del genotipo involucrado.

1.5. MEJORAMIENTO GENÉTICO EN CÍTRICOS

En varias partes del mundo se han adoptado y desarrollado programas de mejora genética con el fin de mejorar la calidad y cantidad de la producción de cítricos. Entre las líneas de mejora se destacan: la selección clonal, la mutagénesis inducida, la hibridación sexual y la generación de poliploides, entre otras. No existe una metodología mejor que otra, cada una se adapta mejor a las diferentes exigencias y condiciones.

1.5.1. Selección clonal (Prospección)

Los cítricos han sido propagados vegetativamente por muchas generaciones, lo que genera acumulación de mutaciones espontáneas. Este evento, relativamente frecuente en los cítricos, indica una cierta inestabilidad genética de los mismos. Se ha propuesto que la inestabilidad se debe a la acción de elementos transponibles, que serían responsables de la aparición de estas mutaciones (Breto *et al.*, 2001). Este hecho genera variabilidad que puede ser utilizada en el mejoramiento genético (Ollitrault *et al.*, 2012). La selección clonal busca identificar plantas o partes de ellas con características de interés, generadas por mutaciones espontáneas (Navarro, 2005). Gracias a este tipo de selección se han obtenido la gran mayoría de las variedades utilizadas comercialmente en el mundo (Xu *et al.*, 2013), especialmente los grupos 'Navel', 'Clementinas' y 'Satsumas' (Gmitter *et al.*, 2007). La búsqueda de mutaciones espontáneas o la inducción de las mismas son las metodologías más utilizadas para mejorar características puntuales en especies o variedades uniclonales, con reproducción apomíctica (Gmitter *et al.*, 2009).

1.5.2. Mutagénesis inducida

La mutagénesis inducida es una técnica que permite cambiar uno o pocos caracteres negativos de una variedad, sin modificar de forma significativa su fondo genético (Gmitter *et al.*, 2009). Una de sus principales aplicaciones es reducir el número de semillas en los frutos. Esto se logra por la rotura de cromosomas, seguida de un apareamiento asimétrico de los extremos truncados (Bermejo, 2011). El tratamiento mutagénico más utilizado es la irradiación con rayos Gamma sobre semillas o yemas (Ollitrault *et al.*, 2012).

1.5.3. Hibridación sexual

Mediante la hibridación sexual es posible aumentar la heterocigosis de la población, gracias a la combinación de ADN de dos especies o variedades. La selección natural y artificial de estos nuevos individuos, han posibilitado la evolución dirigida del género *Citrus* hacia la obtención de nuevos genotipos (Moore, 2001). Sin embargo el número de genotipos de interés obtenidos por hibridación sexual ha sido muy limitado. Esto se debe a que existen limitaciones como: tiempo y el espacio necesario, poliembrionía, la depresión por endogamia y la juvenilidad, que obstaculizan la efectividad de la hibridación sexual (Gmitter *et al.*, 2009).

1.6. MANIPULACIÓN DE LA PLOIDÍA

El género *Citrus* presenta $2n=2x=18$ cromosomas y los individuos diploides son los más habituales. Sin embargo se han encontrado o inducido genotipos euploides y aneuploides, sobre todo tetraploides y triploides (Ollitrault *et al.*, 2012). Desde el punto de vista comercial y agronómico los triploides resultan muy importantes ya que son totalmente estériles y por tanto tienen la capacidad de producir frutos sin semillas y de no inducir la formación de semillas en otras variedades (Grosser y Gmitter, 1990). Esta esterilidad se debe a que durante la meiosis se originan asociaciones multivalentes entre los cromosomas, causando la formación de gametos con distintas dotaciones cromosómicas que reducen la viabilidad de los mismos (Reforgiato *et al.*, 2005). Por otro lado, los tetraploides pueden ser utilizados como parentales para la obtención de triploides (An *et al.*, 2008; Pensabene, 2008; Grosser y Gmitter., 2010).

1.6.1. Poliploides naturales

La frecuencia de formación de triploides y tetraploides naturales en *Citrus* es baja y la probabilidad de que sobrevivan en la naturaleza es casi nula. Los tetraploides se forman naturalmente por duplicaciones en células nucelares de semillas poliembriónicas, con una frecuencia del 2% aproximadamente (Barrett *et al.*, 1978). La germinación del embrión tetraploide es posible, pero la competencia en el desarrollo con embriones diploides, de crecimiento más acelerado, hace que gran parte de los plantines tetraploides se pierdan por selección natural (Ollitrault *et al.*, 2012).

Los triploides se forman naturalmente mediante la combinación de un gameto $2n$ y un gameto normal. La formación de gametos $2n$ en plantas ocurre con una frecuencia de 0,1 a 10% (Cuenca *et al.*, 2011) y es causada por aberraciones meióticas. Estas son agrupadas de acuerdo a sus consecuencias genéticas. La primer agrupación corresponde a la restitución en la primera división (FDR) y equivale a que los cromosomas homólogos no se separan durante la meiosis-I, mientras que sí lo hacen las cromátidas hermanas durante la segunda división. Los gametos desarrollados por FDR generalmente son heterocigotos ya que mantienen ambos juegos de cromosomas de su parental, excepto en fragmentos cross-over (Bieling *et al.*, 2003). La segunda agrupación corresponde a la restitución de la segunda división (SDR). En este caso las consecuencias equivalen a la separación normal de los cromosomas homólogos durante la meiosis-I, pero la cromátidas hermanas no logran separarse en la meiosis-II. Por lo tanto los gametos formados por SDR generalmente son homocigotos debido a que tienen un solo juego los cromosomas del parental, pero duplicados (Bretgnolle y Thompson, 1995). Desde el punto de vista del mejoramiento genético los gametos $2n$ formados por FDR resultan más valiosos que los formados por SDR ya que transmiten mayor diversidad (Dewitte *et al.*, 2011).

La escasa sobrevivencia de los triploides se debe a que las semillas no poseen endospermo desarrollado, lo que causa la muerte del embrión (Viloria *et al.*, 2005). De todas formas, la lima 'Tahiti' es un triploide natural que logró sortear estas barreras y hoy en día se cultiva ampliamente de forma comercial.

1.6.2. Obtención de poliploides

En las últimas décadas se comenzó a desarrollar metodologías para obtener plantas triploides y tetraploides (Navarro *et al.*, 2003).

Los triploides pueden obtenerse por diversos métodos:

a) *Cruzamientos individuos $2x \times 2x$* . En uno de los parentales debe ocurrir la formación de gametos no reducidos ($2n$) que se fecundan con gametos haploides del otro parental. La mayor limitación de este procedimiento es el escaso número de genotipos no apomícticos que producen gametos femeninos no reducidos y la baja frecuencia de polen $2n$ (Viloria *et al.*, 2005).

b) *Cruzamiento de $4x \times 2x$* . El parental $4x$ puede ser masculino o femenino. Poder contar con madres monoembríonicas tetraploides permite ampliar la cantidad de combinaciones genéticas. Pero existen enormes dificultades para encontrar plantas que reúnan estas características y que además aporten genes de interés (Pensabene, 2008). Lo más habitual es utilizar la planta tetraploide como donadora de polen $2x$ (Grosser y Gmitter, 2010).

Sin importar la metodología, las semillas que contienen los embriones triploides no poseen endospermo desarrollado (Viloria *et al.*, 2005), por lo que es necesario rescatar los embriones formados mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Los embriones procedentes de semillas sub desarrolladas de 1 mm de longitud se aíslan en condiciones estériles y se cultivan en medio de cultivo. Las plántulas obtenidas por este procedimiento son analizadas con Citometría de flujo para evaluar su ploidía (Navarro *et al.*, 2003).

Los tetraploides pueden formarse por dos vías:

a) *Duplicación somática*. La duplicación somática puede ocurrir en forma natural en células nucleares de semillas poliembriónicas con una baja frecuencia (Barrett *et al.*, 1978). Una forma de inducir duplicaciones somáticas es a través de productos químicos que inhiben la división celular de los ápices meristemáticos. Al igual que en duplicación natural, la duplicación inducida no genera nueva variabilidad genética (Aleza *et al.*, 2011).

b) *Hibridación somática.* La hibridación somática 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 heterocarionte, a partir de la cual se puede regenerar una planta completa empleando técnicas de cultivo *in vitro* (Ollitrault *et al.*, 2012). Las células somáticas utilizadas provienen de callo embriogénico regenerado a partir de óvulos de frutos inmaduros y de células de mesófilo (Pensabene, 2008; Grosser y Gmitter, 2010). Una de las ventajas de la hibridación somática es que se logra incorporar los genomas intactos de los parentales en un híbrido somático, por lo que debería manifestar los genes dominantes de ambos parentales (Gmitter *et al.*, 2009). A través de esta técnica se incrementa el número de parentales a utilizar, ya que se incorporan parentales estériles o sexualmente incompatibles. Es posible obtener híbridos interespecíficos y también híbridos entre individuos de géneros afines (sexualmente incompatibles), superando así las barreras de la biología reproductiva (Grosser y Gmitter, 2010). Otra ventaja es la posibilidad de modificar los caracteres determinados por el genoma citoplasmático. Los genomas mitocondrial y cloroplástico juegan un papel importante en la determinación directa de algunos caracteres de interés y también en la regulación de caracteres resultantes de la interacción núcleo-citoplasma (Cheng *et al.*, 2003).

1.7. CARACTERIZACIÓN DE POLIPLOIDES POR MEDIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO Y MARCADORES MOLECULARES

La detección de los poliploides y su caracterización genética requiere del ajuste de herramientas combinadas tales como la Citometría de flujo y el uso de marcadores moleculares.

La citometría de flujo permite cuantificar la cantidad de ADN de un tejido de una forma robusta y precisa. Además permite procesar varias muestras en un corto período de tiempo (Wu *et al.*, 2005). Por otro lado, la caracterización genética se realiza mediante marcadores moleculares. En particular, los SSR (*simple sequence repeat*) son marcadores moleculares específicos, reproducibles, codominantes y robustos (Kijas *et al.*, 1997). Se considera que son los más adecuados para caracterizar poliploides (Grosser y Gmitter, 2010), pero para poder utilizarlos es necesario que los productos de amplificación obtenidos sean alelos de un

mismo locus y segreguen de forma mendeliana aún en híbridos interespecíficos (Kijas *et al.*, 1997). Una ventaja de los SSR es que, mediante una electroforesis capilar, es posible evaluar el tamaño de los fragmentos (medido en pares de bases) y la cantidad de fragmentos amplificados (medido en intensidad de fluorescencia) (Caruso *et al.*, 2007). Por otro lado la técnica de MAC-PR (*microsatellite DNA allele counting-peak ratios*) utiliza el área de los picos del electroferograma para determinar la dosis del alelo. Además calcula factores de corrección para hacer el análisis más preciso (Esselink *et al.*, 2004; Nybom *et al.*, 2004). Esto permite evaluar la dosis de cada alelo y determinar la configuración alélica de diploides, triploides y tetraploides con alelos repetidos (Landergrott *et al.*, 2006; Luro *et al.*, 2008; Ferrante *et al.*, 2009; Ollitrault *et al.*, 2010). Si se utilizan estas metodologías es necesario detectar y eliminar amplificaciones no deseadas del PCR, lo que se logra haciendo repeticiones en cada muestra (Polz y Cavanaugh, 1998; Kanagawa, 2003).

2. Obtención de callo embriogénico friable de mandarinas

Giambiasi Mario¹, Arruabarrena Ana¹, Rivas Fernando¹

¹Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Salto Grande. Camino al Terrible s/n- Salto, Uruguay. CP: 50000.

2.1. Resumen

Los cítricos se exportan a mercados exigentes y la ausencia de semilla es relevante. Resulta necesario adaptar soluciones tecnológicas como la hibridación somática para generar híbridos sin semillas. Esta técnica demanda la obtención de callos embriogénicos a partir de óvulos. Los porcentajes de inducción de callos son en general bajos, pero variables como “genotipo” y “estadio de desarrollo de óvulos”, permiten mejorarlos. También es necesario que los callos presenten un aspecto friable con actividad metabólica elevada. Esto puede ser evaluado mediante test de Tetrazolio. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la frecuencia de inducción de callos embriogénicos en mandarinas y optimizar dicho proceso, teniendo en cuenta las variables: genotipo y fecha de siembra de óvulos. Además se analizaron los niveles de actividad metabólica de callos obtenidos. Se sembraron *in vitro* óvulos de ocho variedades de mandarina en tres fechas de siembra luego de la antesis. Seis meses después, se obtuvieron 692 callos embriogénicos (2,8%) de los 24.000 óvulos sembrados. Todas las variedades estudiadas mostraron porcentajes de inducción diferentes variando entre 0 (A218) y 8% (Murcott). Para las diferentes variedades se observó que la mayoría produjo un mayor porcentaje de inducción a los 60 de la antesis ($p \leq 0,01$). Por otro lado se trataron callos de ‘Murcott’ de diferentes coloraciones con tetrazolio al 0,5% por triplicado. Se observó que los callos más blancos presentan mayor actividad metabólica. Se

concluye que es indispensable tener en cuenta la variedad y la fecha de siembra para obtener resultados exitosos.

Palabras clave: Hibridación somática, Tetraploides, Mandarinas sin semilla

Obtaining friable embryogenic callus of tangerines

2.2. Abstract

Citrus fruits are exported to demanding markets and the absence of seed is important. Should be adapted technological solutions such as somatic hybridization to generate seedless hybrids. This technique demands obtaining embryogenic callus from eggs. The callus induction percentages are generally low but variables as "genotype" and "developmental stage of eggs" allow improved. You also need to submit a friable callus appearance with high metabolic activity. This can be assessed by tetrazolium test. The objectives of this study were to evaluate the frequency of embryogenic callus induction of mandarin and optimize the process, taking into account the variables genotype and planting date eggs. Furthermore, metabolic activity levels callus obtained were analyzed. Were seeded in vitro ova eight varieties of mandarin in three sowing dates after anthesis. Six months later, 692 embryogenic calluses (2.8%) of the 24,000 planted eggs were obtained. All varieties studied showed different induction percentages ranging from 0 (A218) and 8% (Murcott). For different varieties was observed that most produced a higher percentage of induction at 60 of anthesis ($p \leq 0.01$). Furthermore corns 'Murcott' differently colored 0.5% tetrazolium treated triplicate. It was observed that callus whiter present higher metabolic activity. It is conclude that it is essential to consider the variety and planting date for successful results.

Keywords: somatic hybridization, tetraploid, Seedless mangerines

2.3. Introducción

Los cítricos representan el principal producto hortofrutícola en Uruguay, alcanzando volúmenes de 250 mil toneladas anuales. Aproximadamente la mitad de la fruta se exporta a mercados exigentes, que penalizan la presencia de semillas (Rivas *et al.*, 2010). Existen diferentes herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético que requieren de callo embriogénico friable, como lo son la variación somaclonal, la transgénesis, la duplicación somática y la hibridación somática (Navarro *et al.*, 2003; Reforgiato *et al.*, 2005; Dutt *et al.*, 2010).

El callo embriogénico en cítricos está formado por un conglomerado de proembriones constituidos por células capaces de regenerar una planta completa. Se considera que el callo está en un estado friable cuando presenta un crecimiento continuo sin la generación de embriones. Obtener este tipo de callos es considerado, por la mayoría de los autores, la etapa crítica para realizar una hibridación somática (Pensabene, 2008; Grosser y Gmitter, 2010). Dichos callos son originados a partir células individuales de óvulos de frutos inmaduros, los que son sembrados en medios de cultivo *in vitro* especiales. Se ha visto que los porcentajes de inducción de callos son en general muy bajos, pero existen diversas variables que afectan dicho porcentaje y se las puede utilizar para favorecer la inducción de los callos (Vardi *et al.*, 2008). Dentro de estas variables se encuentran: la variedad a utilizar para la extracción de óvulos y el estadio fenológico de estos óvulos. Se ha visto que los porcentajes de inducción de callos son significativamente diferentes entre las variedades, como lo son los casos de *C. macrophylla* con un 1% de inducción y *C. sinensis* con un 10% (Jiménez *et al.*, 1995; Pensabene, 2008). Por otro lado, es relevante el estadio de los óvulos

para la inducción de callos. Dicho estadio se representa habitualmente con la fecha de siembra luego de la antesis. Pensabene (2008), recomienda la siembra de óvulos dentro del período de 15 a 60 días luego de la antesis (DDA) para *C. macrophylla* y Jiménez (1995) siembra óvulos de entre 30 y 90 DDA para obtener callos embriogénicos de naranja dulce (*C. sinensis*) y naranja agria (*C. aurantium*).

Por otro lado es necesario evaluar el estado de los callos antes de ser utilizados; deben presentar un aspecto friable con una actividad metabólica elevada. La actividad metabólica puede ser evaluada mediante la reducción enzimática del Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio a 1,3,5-trifenilformazan (precipitado rojo) en las mitocondrias.

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la frecuencia de inducción de callos embriogénicos en diferentes genotipos de mandarinas y optimizar dicho proceso a través de la modificación del estado de desarrollo de los óvulos (presentada como días post antesis). También se buscó ajustar una metodología para identificar callo embriogénico friable.

2.4. Materiales y Métodos

2.4.1 Obtención de callo embriogénico

Para la obtención de callos embriogénicos se recolectaron frutos de ocho variedades de mandarina en libre polinización: 'Afourer' (*C. reticulata* × *C. sinensis*), 'F6P8' (híbrido interespecífico complejo), 'Montenegrina' (*C. deliciosa*), 'Sunburst' (híbrido interespecífico complejo), 'Ortanique' (*C. reticulata* × *C. sinensis*), 'M9' (híbrido interespecífico complejo), 'A218' (híbrido interespecífico complejo) y 'Murcott' (*C. reticulata* × *C. sinensis*) en tres fechas diferentes: 30, 60 y 90 DDA como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Fecha de antesis y siembra de óvulos para ocho variedades de Mandarinas. DDA: Días después de la antesis.

Variedad	Antesis	Siembra de óvulos (DDA)		
		30	60	90
Afourer	19/9/11	20/10/11	16/11/11	13/12/11
F6P8	19/9/11	20/10/11	16/11/11	14/12/11
Montenegrina	21/9/11	20/10/11	16/11/11	14/12/11
Sunburst	29/9/11	25/10/11	25/11/11	21/12/11
Ortanique	26/9/11	24/10/11	24/11/11	20/12/11
M9	28/9/12	25/10/11	24/11/11	20/12/11
A218	26/9/12	24/10/11	25/11/11	21/12/11
Murcott	6/10/11	7/11/11	7/12/11	3/1/12

Inmediatamente de cosechados, los frutitos fueron desinfectados por inmersión en una solución acuosa de NaClO al 3% (v/v) con 0,1% de Tween-20 durante 10 min. Se extrajeron 1000 óvulos por variedad y por fecha de siembra, los cuales se cultivaron en medio DOG (Anexo) en placas de Petri. Los mismos fueron incubados a 28 °C en oscuridad. Se realizaron repiques de los óvulos cada 30-40 días en el mismo medio y condiciones de incubación. En cada transferencia se seleccionaron aquellos explantes o secciones de los mismos que mostraron tendencia a la formación de callo friable y se eliminaron aquellos necrosados.

Luego de 10 meses de haber sembrado los óvulos, se contó el número total de callos embriogénicos inducidos por cada variedad y se calculó el porcentaje de callo inducido, con respecto a los 3000 óvulos sembrados, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de callos regenerados por variedad} = \frac{\text{callos obtenidos}}{\text{óvulos sembrados}} \times 100$$

También, para las ocho variedades, se determinó cuantos callos se indujeron en cada fecha de siembra y se calculó el promedio de callos regenerados en las diferentes siembras.

$$\text{Promedio de callo regenerado en siembra} = \frac{\text{callos regenerados en } n}{n^{\circ} \text{ de variedades}}$$

Para el estudio de influencia de la fecha de siembra en la regeneración de callos y la elección de la mejor fecha de siembra en mandarinas, se realizó un análisis LSMEANS del programa estadístico SAS Systems, asumiendo una distribución binomial ($p \leq 0,01$). Luego, para determinar cuál es la fecha más recomendable para la siembra de óvulos, se realizó un promedio de los callos regenerados en cada fecha.

2.4.2. Selección de callo embriogénico friable

Se estudiaron callos de diferentes coloraciones (Blancos, Amarillos, Marrones) para seleccionar los que presenten elevada actividad metabólica, principal características de callos friables. Los callos fueron pesados y tratados con tetrazolio al 0,5% durante 16 h. Luego fueron lavados con agua destilada sobre un filtro de papel y colocados en tubos Eppendorf, al que se agregó 1 mL de alcohol 95%. Estos fueron incubados a 70 °C durante 15 min. Seguidamente se tomó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 487nm (Nano Drop 2000c; Thermo). Finalmente se realizó el cociente entre el valor de absorbancia y el peso individual de cada callo y se hizo un análisis de varianza con un test de Tukey ($p \leq 0,05$; $n = 3$).

2.5. Resultados

La regeneración de callos comenzó a ocurrir a partir de la cuarta semana de la siembra de los óvulos. Los repiques mensuales favorecieron el crecimiento de los callos como se aprecia en la Figura 1.



Figura 1. La imagen muestra la apariencia de los callos embriogénicos friables de 'Afourer' (siembra de óvulos a 60 días de la antesis). Izquierda: Regeneración de callo a los 60 días de la siembra de óvulos. Derecha: Callo embriogénico a 120 días de la siembra.

De los 24.000 óvulos sembrados, solo se obtuvieron 692 callos embriogénicos friables (2,88%). Si se compara entre las variedades, se observan resultados que están en el entorno del 0 y el 8% de regeneración (Tabla 2).

Tabla 2. El número de callos obtenidos a los seis meses del cultivo de óvulos no fue el mismo para las ocho variedades de Mandarinas. Los óvulos fueron sembrados a los 30, 60 y 90 días después de la antesis (DDA). Además se muestra el número total de callos obtenidos por variedad y el porcentaje de inducción.

Variedad	DDA			Nº total de callos
	30	60	90	
Afourer	15	58	45	118 (4%)
F6P8	1	0	0	1 (0%)
Montenegrina	6	42	22	70 (2%)
Sunburst	25	117	83	225 (7%)
Ortanique	0	8	6	14(0,5%)
M9	15	9	7	31 (1%)
A218	0	0	0	0 (0%)
Murcott	108	71	54	233 (8%)

Mediante el análisis estadístico se determinó que la fecha de siembra es una variable relevante para la obtención de callos embriogénicos. El análisis de las varianzas para las tres fechas mostró una diferencia significativa entre los 30 y 60 DDA, así como también 60 y 90 DDA con un $p \leq 0,01$. Entre las fechas 30 y 90 DDA no se observó diferencia significativa ($p \leq 0,01$). La mejor fecha de siembra se determinó mediante el promedio de los callos generados por fecha, encontrando que a los 60 DDA se regeneraron más cantidad de callos, como se aprecia en la Tabla 3.

Tabla 3. Promedio de callos regenerados en cada fecha de siembra. Se utilizaron los datos de ocho genotipos de Mandarinas. DDA: días después de la antesis.

	DDA		
	30	60	90
Promedio de callos regenerados	21,3	38,1	27,1

El test de tetrazolio mostró acumulación de precipitado rojo en todos los tipos de callos estudiados, pero la cantidad de precipitado no fue el mismo. Se observó una mayor acumulación de precipitado en callos blancos, disminuyendo en amarillos y aún más en marrones (Figura 2).

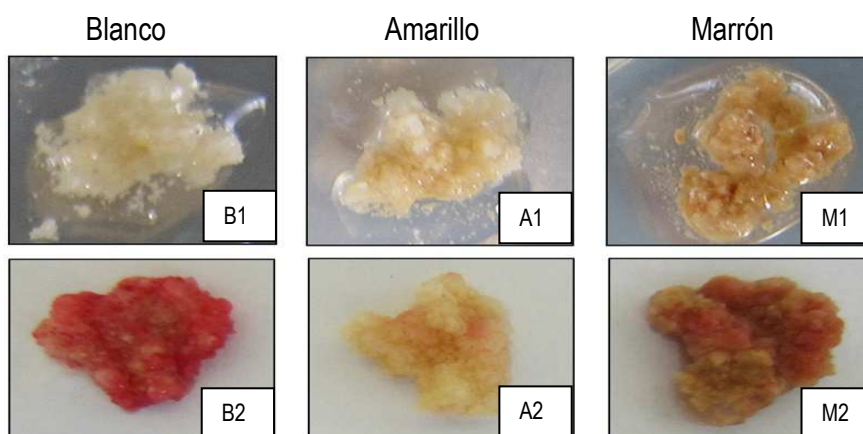


Figura 2. Test de tetrazolio en callos con diferente coloración. B1: Callo blanco antes del tratamiento; B2: Callo blanco luego del tratamiento; A1: Callo amarillo antes del tratamiento; A2: Callos amarillo luego del tratamiento; M1: Callo marrón antes del tratamiento; M2: Callo marrón luego del tratamiento. Se puede apreciar que el callo marrón (M2) y amarillo (A2) parecen tener zonas muy reducidas con alta actividad metabólica (zonas rojas) con respecto al callo blanco (B2).

Los valores de absorbancia y los cocientes absorbancia/peso también fueron diferentes en los callos estudiados. Según el análisis de varianza no hay diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre los callos marrones y amarillos, pero sí la hay con respecto a los callos blancos (Figura 3).

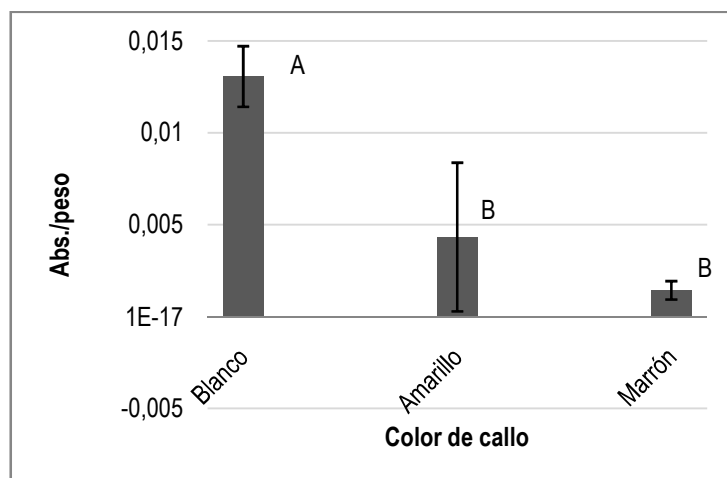


Figura 3. Los cocientes de absorbancia/peso más altos fueron para callos blancos, lo que demuestra mayor actividad metabólica que en callos amarillos y marrones. Diferentes letras para los diferentes colores de callo representan diferencias estadísticas en viabilidad a $p \leq 0,05$ (Test de Tukey).

2.6. Discusión

La obtención de callo embriogénico friable es un trabajo complejo por su bajo porcentaje de éxito y porque requiere mucho tiempo y múltiples habilidades (Pensabene, 2008; Grosser y Gmitter, 2010). En este trabajo queda evidenciada la baja eficiencia del proceso de regeneración (2,88%), explicada por múltiples factores. Dentro de éstos se encuentran, la facilidad de diferenciación celular que posee este tipo de células, lo que da lugar a embriones (indeseados en este trabajo) en poco tiempo. También ocurre la oxidación temprana de los óvulos de algunas variedades, lo que produce la muerte del tejido. Además se dan altos niveles de contaminación por hongos y bacterias, debido a que se trabaja con medios de cultivo muy nutritivos a temperaturas de 28 °C por largos períodos de tiempo. Por estas razones, es importante aumentar las repeticiones (número de óvulos sembrados) para aumentar la probabilidad de éxito. Otra forma de incrementar dicha probabilidad es utilizando

genotipos que regeneren mayor cantidad de callos. Como se demostró en este trabajo, hay variedades que tienen la capacidad de inducir más callos que otras, entre 0 y 8% de regeneración (Tabla 2). Estas diferencias responden a la facilidad de diferenciación que tienen las células de las distintas variedades de mandarinas. Los mecanismos de diferenciación celular y las diferentes velocidades de los mismos aún no son conocidos, pero es evidente que en genotipos muy emparentados, caso 'Afourer' y 'Murcott', el comportamiento es similar siendo dos de las tres especies que produjeron mayor número de callos. Por otro lado, las variedades monoembriónicas no muestran la capacidad de inducir callos friables (Pensabene, 2008). En este caso la única variedad poliembriónica utilizada fue 'F6P8', la que no produjo ningún callo, ya que las células de sus óvulos se diferenciaron en su totalidad a estructuras embrionarias o amorfas.

Otra forma de aumentar la probabilidad de éxito en la regeneración de callos, es mediante la elección del estado fenológico de los óvulos (estudiado como DDA). En este trabajo se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) entre las tres fechas de siembra seleccionadas. Estas diferencias confirman que el estado de desarrollo de los óvulos es un factor clave para la regeneración de callo. Mediante el cálculo de los promedios de callo obtenido en cada fecha de siembra, se pudo concluir que los 60 DDA es el estado fenológico más adecuado para la siembra de óvulos (Tabla 3). Koltunow *et al.* (1995) afirma que en la nucela de los óvulos se ubican algunas células diferenciadas que dan lugar a los embriones nucelares. En la fase de antésis se encuentran dos o tres células inductoras de embriones por óvulo, pero este número aumenta considerablemente hacia los 60 DDA. Las causas de la mayor obtención de callos a los 60 DDA aún no han sido dilucidadas, pero se estima que las células inductoras de embriones se encuentran en un número considerable y en una fase

donde aún no recibieron el estímulo para diferenciarse (Grosser y Gmitter, 1990), es por ello que pueden ser las responsables de la inducción de los callos en las condiciones del medio de cultivo. A los 30 DDA se sospecha que los óvulos presentan menor cantidad de células inductoras de embriones nucleares que a los 60 DDA por lo cual se generan menos callos en cultivo in vitro. Una observación que contribuye a este razonamiento es que los óvulos sembrados a los 30 DDA que no indujeron callos, no mostraron ningún tipo de crecimiento. Por otra parte, los óvulos sembrados a los 90 DDA que no dieron callos se diferenciaron a embriones o estructuras amorfas. Esto se puede explicar con las observaciones de (Koltunow *et al.* 1995), donde observó que a los 80-90 días de la antéesis las células iniciadoras de embriones nucleares cambian de morfología convirtiéndose en embriones.

En el test de tetrazolio se observaron diferentes cantidades de precipitado rojo en los diferentes tipos de callo. La diferencia significativa ($p \leq 0,05$) estuvo dada por los callos blancos, donde se formó más precipitado que en callos amarillos y marrones. Esto sugiere que los callos blancos tienen un metabolismo mitocondrial acelerado. De igual forma Grosser y Gmitter (1990) define callo friable como aquel que crece exponencialmente. Esta alta actividad mitocondrial puede ser la responsable de la capacidad embriogénica de los callos. Grosser y Gmitter (2005) y Pensabene (2008) afirman que los híbridos somáticos heredan las mitocondrias de los callos, lugar donde se metaboliza el tetrazolio.

A partir de las consideraciones anteriores se puede concluir que la regeneración de callos embriogénicos es un proceso controlado por variables que permiten su optimización. Dentro de estas variables se encuentran el genotipo utilizado y el estado fenológico de los óvulos. Se comprobó que las variedades de mandarina inducen callo embriogénico en un rango del 0 al 8%, por lo que es importante la selección de las variedades para trabajar. Por

otro lado se encontró que la fecha de siembra es un factor que afecta considerablemente la probabilidad de éxito. La fecha más adecuada para la siembra de óvulos de mandarina, es a los 60 DDA. Los callos con alta actividad metabólica generalmente presentan coloraciones blancas, por lo que son los más adecuados para su utilización en técnicas que requieran la formación posterior de embriones y plantas.

Agradecimientos

Se agradece a Alicia Castillo por el apoyo en el cultivo de los óvulos y a Álvaro Otero por la colaboración en el análisis estadístico.

2.7. Bibliografía

Dutt M, Lee D, Grosser J. 2010. Bifunctional selection reporter systems for genetic transformation of *Citrus*: mannose and kanamycin based systems. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 46: 467-476.

Grosser J, Gmitter, F. 2010. 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, Gmitter F. 2005. Applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. In *Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 41: 220-225.

Jiménez V. 1995. Regeneración in vitro mediante embriogénesis somática de variedades de cítricos. Obtención de callo friable y suspensiones celulares de naranja dulce (*C.*

- sinensis*) y naranja agria (*C. aurantium*) cultivadas en costa rica. *Agronomía Costarricense*. 19: 7-18.
- Koltunow A, Soltys K, Nito N, McClure S. 1995. Anther, ovule, seed, and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Canadian Journal of Botany*. 73: 1567-1582.
- Navarro L, Juárez J, Olivares-Fuster O, Aleza P, Pina J, Ballester Olmos J, Cervera M, Fagoaga C, Durbán J, Pérez R, Peña L. 2003. Aplicaciones de la biotecnología para la mejora genética de cítricos. *Vida Rural*. 43: 3-4.
- Pensabene J. 2008. Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. 226p.
- Reforgiato G, Russo G, Recupero S. 2005. New promising *Citrus* triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. *Horticultural Science*. 40: 516-520.
- Rivas F, Bertalmío A, Manzi M. 2010. La reconversión varietal en la citricultura uruguaya: un enfoque holístico en tiempos de cambio. *Revista INIA Uruguay*. 21: 41-44.
- Vardi A, Levin I, Carmi N, 2008. Induction of seedlessness in citrus: from classical techniques to emerging biotechnological approaches. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 133: 117-126.

3. Obtención de tetraploides de Citrus mediante electrofusión de protoplastos: ajuste de las diferentes etapas

Giambiasi Mario¹, Arruabarrena Ana¹, Rivas Fernando¹

¹Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Salto Grande. Camino al Terrible s/n- Salto, Uruguay. CP: 50000.

Autor de correspondencia: mgiambiasi@inia.org.uy.

3.1. Resumen

La ausencia de semillas es un factor que define la competitividad del Sector citrícola. Esto puede ser logrado mediante variedades estériles, como es el caso de los triploides. Uno de los métodos de obtención de triploides es a partir del cruzamiento dirigido entre individuos tetraploides y diploides, para lo cual es necesario la obtención de individuos tetraploides. El objetivo de este trabajo fue obtener híbridos somáticos mediante electrofusión de protoplastos. Los objetivos específicos se basaron en el ajuste de las etapas de: a) Purificación de protoplastos de callos y hojas; b) Fusión de protoplastos; c) Regeneración de micro-callos y embriones. Para la obtención de híbridos somáticos se utilizó el protocolo desarrollado por Grosser y Gmitter (1990) realizándose ajustes al protocolo de purificación de protoplastos a partir de callos de diferentes coloraciones y de hojas cultivadas en diferentes condiciones de luz y temperatura. También se ajustaron los voltajes de fusión de protoplastos y diferentes combinaciones de genotipos. Se determinó que callos con color blanco y hojas provenientes de plantas cultivadas a 100 lux y 28 °C producen mayor rendimiento de protoplastos. Los voltajes de fusión que lograron una relación adecuada de protoplastos

fusionados/ protoplastos dañados fueron de 250 V/cm para la alineación y 2000 V/cm para la fusión. Se lograron regenerar micro colonias de células fusionadas, pero no se logró obtener embriones aún. El genotipo y las condiciones ambientales afectan el éxito en la obtención de protoplastos de callo y hoja y la regeneración de las células luego de la fusión.

Palabras clave: Fusión de protoplastos; Manipulación Ploidía; Frutos sin semilla; Hibridación somática.

Obtaining tetraploid citrus by electrofusion of protoplasts: setting different stages

3.2. Abstract

The absence of seeds is a feature that defines the competitiveness of the citrus sector in export markets. This feature can be achieved by using sterile varieties such as triploid. One of the methods for obtaining triploids is crossing tetraploid and diploid individuals. In order to do this, tetraploid individuals must be obtained. The aim of this study was to obtain somatic hybrids by electrofusion of protoplasts. Specific objectives were to adjust the different steps of the process: a) Purification of protoplast from callus and leaves; b) Fusion of protoplasts c) Regeneration of micro-calluses and embryos. The protocol developed by Grosser and Gmitter (1990) for obtaining somatic hybrids was used in this work. However, protocol adjustments were performed in the purification of protoplast using callus with different colorations and leaves grown under different conditions of light and temperature. Protoplast fusion voltages and different combinations of genotypes were adjusted. It was determined that white callus and leaves from plants grown under 100 lux and 28 °C produce higher yield of protoplasts.

The appropriate fusion voltages to achieve an adequate ratio of fusions/damaged protoplasts were 250 V/cm for alignment and 2000 V/cm for fusion of protoplasts. It was possible to regenerate micro colonies from fused cells. However, embryos and plantlets could not be obtained. The genotype and environmental conditions can affect the yield of leaf and callus protoplasts and also the regeneration of cells after fusion.

3.3. Introducción

La citricultura es el rubro frutícola de mayor impacto socioeconómico de Uruguay, ocupando 17.000 hectáreas efectivas y más de 20.000 puestos de trabajo. Actualmente se exporta 140.000 toneladas anuales de cítricos en fresco, principalmente a países de la Unión Europea, Rusia (DIEA, 2012) y recientemente Estados Unidos. La exportación a este tipo de mercados exige tener presente que los parámetros cualitativos de calidad de fruta, entre ellos la ausencia de semillas, son factores clave para mantener la competitividad del Sector Citrícola Nacional (Rivas *et al.*, 2010). El hecho de abastecer a los Mercados con nuevas variedades de mandarinas sin semillas redundará en un sobreprecio (Pastore A, com. pers. 14/10/2015).

La ausencia de semillas en presencia de polen compatible, generalmente es consecuencia de algún tipo de esterilidad gamética o también por irregularidades meióticas asociadas a niveles de ploidía impar, como ocurre en individuos triploides (Ollitrault *et al.*, 2012). La obtención de plantas triploides ha demostrado ser un enfoque prometedor para lograr obtener fruta sin semillas. Estos genotipos presentan esterilidad femenina y masculina por lo que producen frutos sin semillas y además tienen la ventaja de no polinizar otras variedades (Aleza *et al.*, 2012). Las plantas triploides son poco comunes en la naturaleza,

pero pueden ser obtenidas mediante el rescate de los embriones formados a partir de la unión de un gameto diploide ($2x$) y uno haploide (x). El gameto diploide puede provenir de un proceso de no reducción dado en una planta diploide o de una planta tetraploide (Gmitter *et al.*, 2009).

La producción de gametos no reducidos en individuos diploides es relativamente común en cítricos (0–2%), pero es un proceso azaroso y su ocurrencia está muy ligada a la variedad. Es por ello que se considera que es conveniente partir de gametos provenientes de individuos tetraploides para incrementar los porcentajes de éxito y realizar las combinaciones que resulten más adecuadas (Grosser y Gmitter, 1990).

Los tetraploides no son comunes en la naturaleza y actualmente no se encuentra diversidad de los mismos, pero es posible obtenerlos por duplicación o hibridación somática (Gmitter *et al.*, 2009). Esta última técnica se basa en el aislamiento y posterior unión de dos células no sexuales (somáticas) sin pared celular (protoplastos), para formar una única célula híbrida a partir de la cual se puede regenerar una planta completa empleando técnicas de cultivo *in vitro*. Mediante esta técnica es posible obtener híbridos tetraploides incluso a partir de diferentes especies incompatibles, generando gran variabilidad (Grosser y Gmitter, 1990). La hibridación somática también permite reunir en un individuo el genoma citoplasmático de los dos parentales permitiendo nuevas combinaciones, lo que no ocurre en la hibridación sexual, donde se hereda únicamente el genoma citoplasmático femenino (Grosser y Ollitrault, 2000). Las células somáticas utilizadas provienen del callo embriogénico regenerado a partir de óvulos de frutos inmaduros de un parental y de células del mesófilo del otro parental. A partir de las células fusionadas se generan callos híbridos que presentarán diferencias en cuanto a la ploidía y a la combinación de los genomas de los parentales. A partir de técnicas

combinadas de Citometría de flujo y Marcadores moleculares, se deberán seleccionar aquellos que sean tetraploides y combinen los genomas de los dos progenitores (Wu *et al.*, 2005; Pensabene, 2008; Grosser y Gmitter, 2010).

La fusión de protoplastos puede llevarse a cabo por dos metodologías. La primera de ellas es el método químico utilizando polietilenglicol (PEG) para fusionar las células. Esta técnica surgió a principios de la década de los 80' y desde entonces se la ha utilizado para combinar diferentes especies del género *Citrus* como 'Murcott' (*C. reticulata* × *C. sinensis*) × *C. máxima* (Grosser *et al.*, 2007); *C. sinensis* × *C. unshiu* (An *et al.*, 2008) y *C. clementina* × *C. sinensis* (Wu *et al.*, 2005). Se caracteriza por prescindir de instrumental sofisticado, ser eficiente y no interferir con la viabilidad de los protoplastos (Grosser y Gmitter, 1990). La segunda metodología es la fusión eléctrica, la cual utiliza campos eléctricos creados por corriente alterna y continua para fusionar las células. Los protoplastos son sometidos a un campo de corriente alterna para alinearlos por dielectroforesis formando hileras de células que siguen los campos de corriente. Una vez que los protoplastos están en contacto se aplican pulsos de corriente continua que inducen la fusión de las membranas celulares. La corriente continua ejerce un doble efecto en las células: la formación de poros reversibles a nivel de la membrana plasmática y un efecto de empuje de las células unas contra otras. La intensidad de los campos eléctricos y la duración del pulso de corriente son los dos parámetros que más influyen en el proceso de fusión eléctrico (Nickloff *et al.*, 1998). Comparado con la fusión química, este método se destaca por la gran eficiencia de fusiones (10-15%) utilizando protoplastos de cítricos (Hidaka y Omura, 1992). El pulso de corriente continua activa los procesos de división celular, promoviendo así la embriogénesis somática (Gilmour *et al.*, 1989). La aplicación de este método resulta muy simple y reproducible,

además de facilitar un control directo sobre los parámetros de fusión, lo que permite obtener un mayor número de fusiones; como desventaja, este método requiere disponer de un equipo de fusión capaz de transmitir tanto corriente alterna como continua, así como de electrodos específicos. Este método de fusión eléctrica fue aplicado por primera vez en cítricos por investigadores japoneses que consiguieron híbridos somáticos utilizando genotipos del género *Citrus* y otros géneros afines sexualmente incompatibles (Hidaka y Omura, 1992). Además se destacan los trabajos de hibridación realizados por Guo y Deng (1998) generando individuos de *C. reticulata* × *C. sinensis* + *Murraya paniculata* (L.); Cai *et al.*, (2007) generando híbridos de *Citrus unshiu* + *C. sinensis*; Olivares *et al.*, (2005) con *C. aurantifolia* + *C. sinensis*. El método de fusión debe ser adaptado a los diferentes genotipos y condiciones de trabajo. Esto hace que se deban utilizar diferentes variantes en estos métodos, incluso la combinación de ambos.

El objetivo principal de este capítulo fue obtener híbridos somáticos mediante electrofusión a partir de variedades e híbridos de mandarinas con potencial económico para Uruguay. Los objetivos específicos fueron ajustar las siguientes etapas del proceso de electrofusión de protoplastos: A) Purificación de protoplastos de callos y hojas; B) Fusión de protoplastos; C) Regeneración de micro-callos, embriones.

3.4. Materiales y Métodos

3.4.1. Obtención de callo embriogénico

La metodología utilizada para la obtención de callos embriogénicos se basó en el protocolo de Grosser y Gmitter (1990). Los genotipos utilizados para la obtención de callos embriogénicos fueron: 'Ortanique', 'C54-4' ('Clementina' x 'Murcott'), 'Murcott', 'Afourer' y 'M9'

(‘Ellendale’ x Satsuma cv. ‘Owari’), los que se encuentran en el Banco de germoplasma de INIA Salto Grande.

3.4.2. Extracción y purificación de protoplastos

Para la extracción y purificación de protoplastos de callo se utilizó el protocolo propuesto por Grosser y Gmitter (1990). El material vegetal utilizado se muestra en la Tabla 1. Todos ellos se encuentran en el Banco de germoplasma de INIA Salto Grande.

Tabla 1. Genotipos utilizados para la extracción y fusión de protoplastos.

Especie	Variedad	Utilidad
<i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>	Ortanique	Extracción protoplastos de callo
Híbrido interespecífico complejo	C54-4-4	Extracción protoplastos de callo
<i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>	Murcott	Extracción protoplastos de callo
<i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>	Afourer	Extracción protoplastos de callo
Híbrido interespecífico complejo	M9	Extracción protoplastos de callo
Híbrido interespecífico complejo	F2P3	Extracción protoplastos de hoja
Híbrido interespecífico complejo	F6P8	Extracción protoplastos de hoja
Híbrido interespecífico complejo	A218	Extracción protoplastos de hoja
Híbrido interespecífico complejo	M19	Extracción protoplastos de hoja
Híbrido interespecífico complejo	B475	Extracción protoplastos de hoja

En primer lugar se buscó identificar el tipo de callo que produce mayor cantidad de protoplastos viables. Para ello se utilizaron callos de diferentes coloraciones (blanco, blanco-amarillo, amarillo-marrón y marrón), se tomó aproximadamente 2 g de cada uno y se los colocó en una placa Petri de 5 cm de diámetro. Inmediatamente se añadieron 2,5 mL de

medio de cultivo BH3 0,7 M (Anexo) y 1,5 mL de la solución enzimática (Anexo). Se incubó durante 14 h en agitación a una velocidad de 25 rpm, en oscuridad y a una temperatura de 23 °C. A continuación se procedió a la purificación y cuantificación de los protoplastos mediante centrifugación en gradiente de manitol-sacarosa según Grosser y Gmitter (2010) y utilizando una cámara de Newbauer respectivamente. Se realizaron tres repeticiones y se comparó el desarrollo de callo entre las variedades mediante el test de Tukey ($p \leq 0,01$). Se identificó la coloración del callo más adecuada para la purificación de protoplastos.

Para la extracción y purificación de protoplastos de hoja se utilizó el protocolo desarrollado por Grosser y Gmitter (1990) con las modificaciones de Pensabene (2008). En primer lugar se definieron dos condiciones ambientales para recolectar las hojas a utilizar en la extracción: 1) invernáculo sin malla sombra en invierno 2013, donde las temperaturas registradas se encontraron entre -2 y 27 °C e intensidad de luz que alcanzó los 3000 lux. 2) cámara de crecimiento con luz y temperatura controladas (100 lux y 27 °C). Se colectaron hojas de tres a cuatro semanas de edad (plenamente expandidas), inmediatamente fueron esterilizadas mediante inmersión en una solución de NaClO al 10% con 0,1% de Tween-20 durante 10 min y a continuación se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Las hojas fueron cortadas perpendicularmente al nervio central y colocadas en matraces de vidrio de 25 mL que contenían 5 mL de medio BH3 0,6 M (Anexo) y 3 mL de solución enzimática. La incubación, purificación y conteo de los protoplastos de hoja se realizó de la misma forma que para los protoplastos de callo. Para este ensayo se seleccionaron cinco plantas por tratamiento del híbrido 'F2P3' y 3 hojas/planta. La separación de medias fue realizada mediante el test de Tukey ($p \leq 0,01$). Por otro lado se realizó un ensayo para determinar la existencia de diferencias en los rendimientos de protoplastos de hojas de diferentes

variedades de mandarinas. Para ello se seleccionaron cinco híbridos nacionales cultivados en cámara de cultivo ('F2P3', 'F6P8', 'B475', 'A218', 'M19'), se realizó la extracción por triplicado y se realizó un test de Tukey con $p \leq 0,05$.

3.4.3. Fusión eléctrica y regeneración de híbridos

Los protoplastos aislados se resuspendieron en una solución de manitol 0,7M y CaCl_2 0,25 mM a una concentración de $0,45 \times 10^6$ protoplastos/mL para los protoplastos de hoja y $0,55 \times 10^6$ protoplastos/mL para los de callo (Grosser y Gmitter, 2010). Se mezclaron volúmenes iguales de las suspensiones de protoplastos de callo y hoja y se colocaron en una cámara de fusión (Helix fusión chamber; Eppendorf) de 250 μL de capacidad y una distancia entre electrodos de 1 mm. La cámara de fusión se esterilizó mediante inmersión en etanol al 90% durante 5 min. Luego se colocó la mezcla de protoplastos dentro de la cámara y se inició un programa automático de fusión eléctrica mediante un electroporador de células (Eppendorf).

Para la primera fase del proceso de fusión se utilizaron voltajes en el entorno de 250 V/cm durante 30 s (Guo y Deng, 1998). En la segunda fase del proceso se ajustaron visualmente los voltajes donde se observaron fusiones sin que haya muerte masiva de los protoplastos (entorno de 2000 V/cm). Cada pulso tuvo una duración de 35 μs (Guo y Deng, 1998) y se repitió dos veces en cada ciclo. El ajuste de los voltajes de electrofusión utilizando la microcámara de fusión puede realizarse utilizando un microscopio óptico de campo claro. Una vez terminado el proceso de fusión, los protoplastos fueron colocados en una placa de Petri de 5 cm de diámetro y a los cuales se añadió 12 gotas de medio BH3 6M y 6 gotas en el

contorno de la solución celular. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 28 °C en condiciones de muy baja luminosidad (20 lux).

Luego de la fusión, a las suspensiones celulares se agregó 12 a 15 gotas de medio BH3 4M cada siete días hasta visualizar microcolonias. Tras uno o dos meses de realizada la fusión, se transfirió el contenido de cada placa a placas Petri de 9 cm con medio EME maltosa 0,4 M. Las placas se mantuvieron en cámaras de cultivo a una temperatura de 26 °C bajo un flujo fotosintético de 40 lux con el fin de iniciar la embriogénesis somática de las colonias a partir de la cuarta semana de cultivo.

3.5. Resultados

3.5.1. Aislamiento de protoplastos

La purificación de protoplastos a partir de callos con diferentes coloraciones mostró rendimientos diferentes. Los callos blancos produjeron el mayor número de protoplastos viables, mientras que los callos marrones prácticamente no produjeron protoplastos. En el tratamiento Marrón-Amarillo se obtuvo mayor número de protoplastos que en tratamiento Marrón, pero menor número que en el tratamiento Amarillo-Blanco (Figura 1).

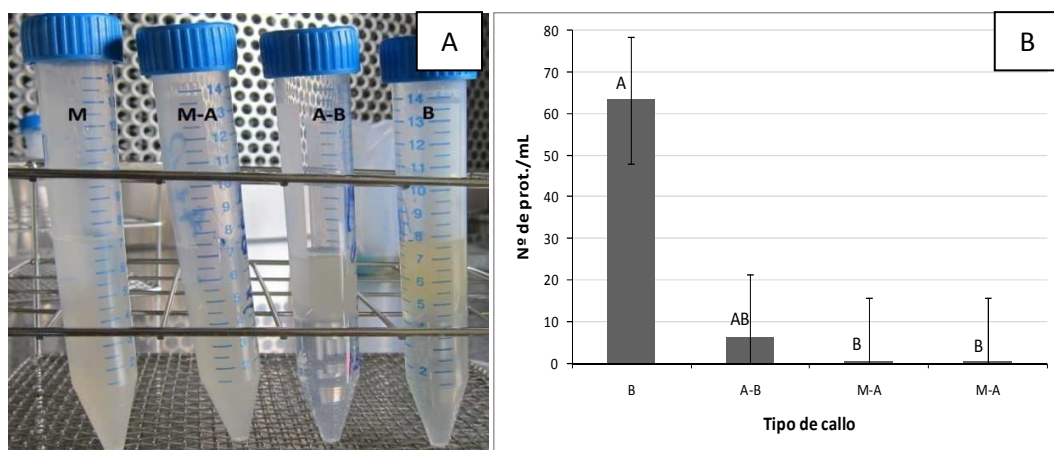


Figura 1. Rendimiento en la extracción de protoplastos de callo. A) Ensayo de extracción utilizando callos de Murcott. B) Rendimiento de protoplastos extraídos por tipo de coloración (n=3) de la variedad Murcott; ref: B=Callo Blanco; A-B=Amarillo-Blanco; M-A=Marrón amarillento. Las medias se compararon con el test de Tukey. Letras diferentes entre coloraciones indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$). Las barras de desvío representan $\pm \sigma$ de las medias.

Las cinco variedades utilizadas para realizar este estudio ('Ortanique', 'C54-4' y 'Murcott', 'Afourer', 'M9') mostraron el mismo comportamiento, donde los callos más blancos proporcionaron más protoplastos viables. Por otro lado, si se comparan los rendimientos de protoplastos entre las variedades utilizadas (utilizando callos blancos en todos los casos), se observó que 'Murcott' proporcionó aproximadamente diez veces más protoplastos que las demás variedades (Figura 2).

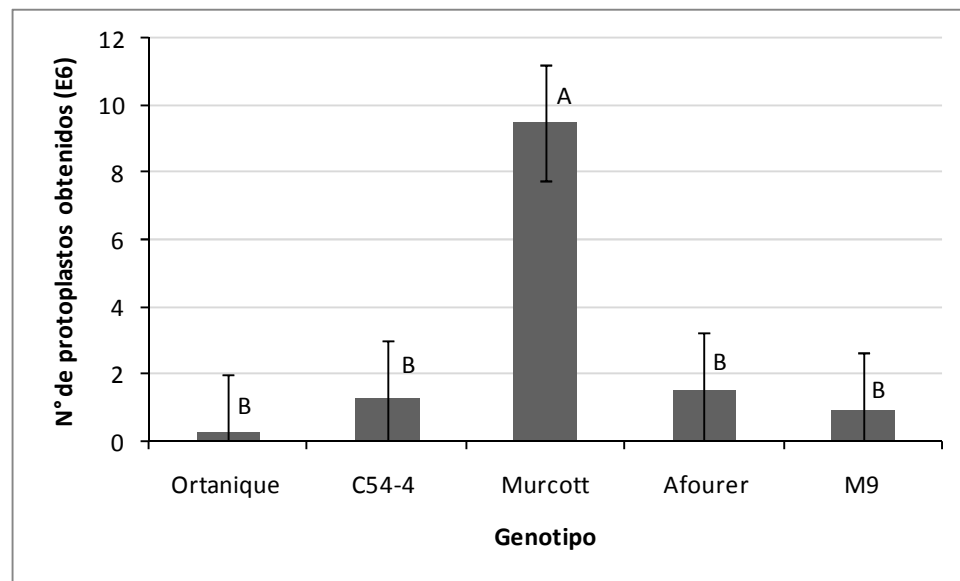


Figura 2. Rendimiento de protoplastos de callo en cinco variedades de mandarinas (n=3). Se realizaron tres repeticiones por variedad. Letras diferentes indican diferencias significativas entre variedades ($p \leq 0,01$). Separación de medias realizada a través del test de Tukey. Las barras de desvío representan $\pm \sigma$ de las medias.

La purificación de protoplastos a partir de hojas produjo diferencias significativas ($p \leq 0,01$) entre los dos tratamientos. Las hojas provenientes de cámara de crecimiento produjeron más protoplastos que las de invernáculo (Figura 3).

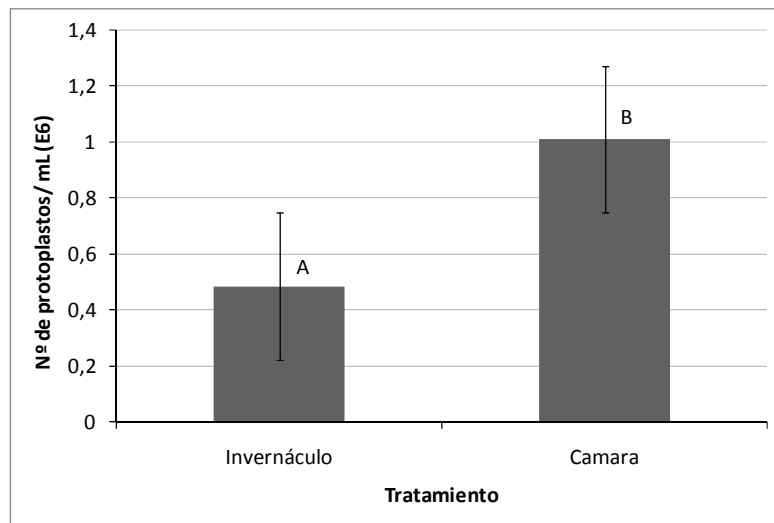


Figura 3. Rendimiento de la extracción de protoplastos de hojas de 'F2P3' ('Ellendale' x 'Page') bajo diferentes condiciones de crecimiento: Invernáculo y Cámara de crecimiento. Las medias se compararon con el test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,01$. Las barras de desvío representan $\pm \sigma$ de las medias.

El rendimiento de los protoplastos de hoja fue diferente entre algunas variedades de mandarinas (Figura 4). La variedad que generó mayor número de protoplastos de hoja fue 'F2P3', las variedades 'F6P8', 'A218' y 'M19' tuvieron un rendimiento intermedio, en cambio la variedad 'B475' tuvo el rendimiento menor.

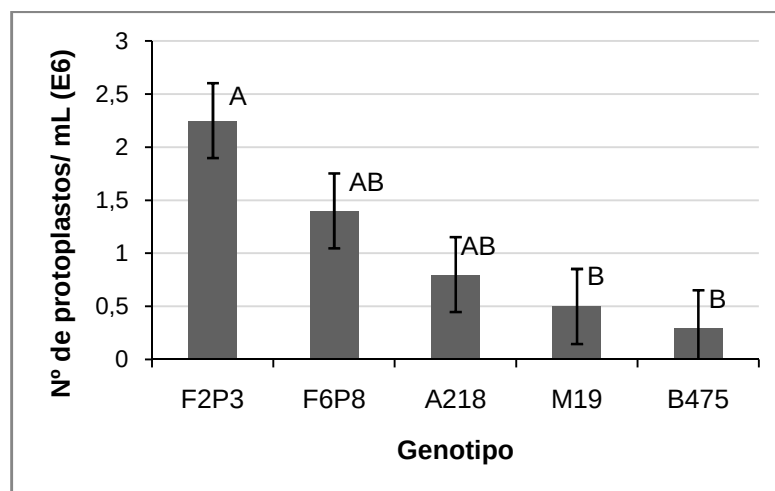


Figura 4. Rendimiento de la extracción de protoplastos de hoja en cinco variedades de mandarina. La separación de medias fue realizada mediante test de Tukey ($p \leq 0,05$); $n=3$. Las barras de desvío representan $\pm \sigma$ de las medias.

3.5.2. Fusión eléctrica y regeneración de híbridos

El voltaje de alineación (corriente alterna) que permitió alinear las células en el tiempo requerido (30 s) y sin dañarlas, fue de 250 V/cm. El voltaje de fusión (corriente continua) más adecuado fue 2000 V/cm, ya que a voltajes menores no se observaron fusiones y a mayores voltajes se observan protoplastos dañados. En la Figura 5 se muestra el proceso de alineación de los protoplastos.

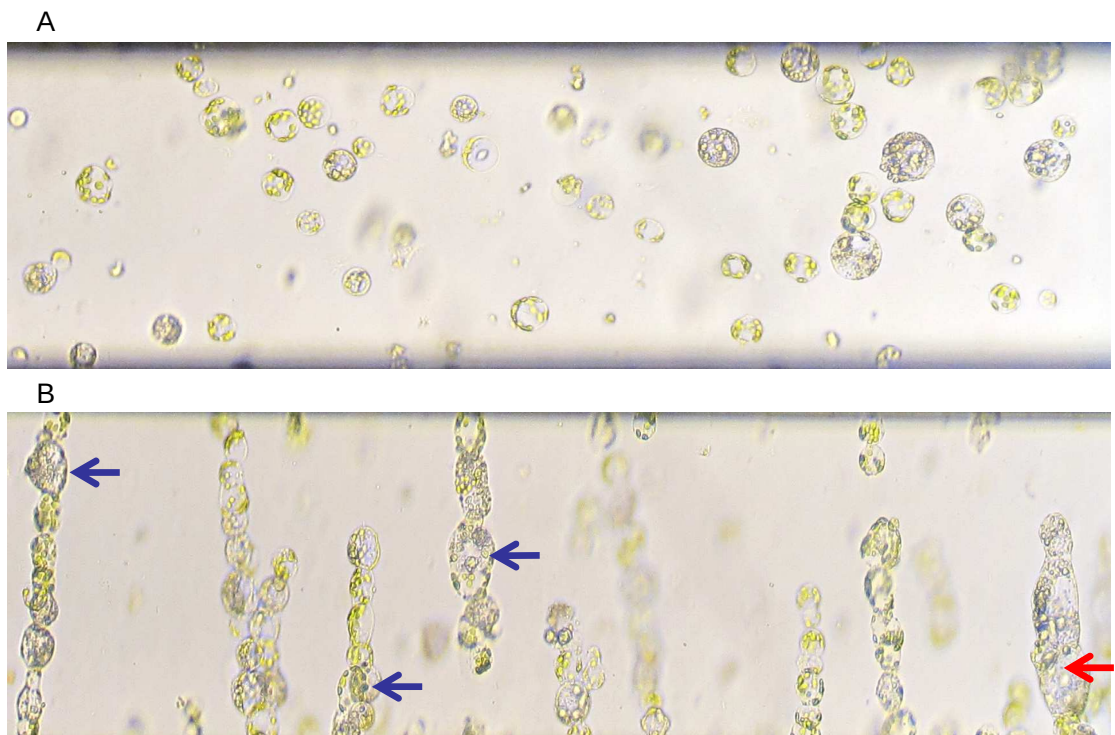


Figura 5. Proceso de alineación de protoplastos en microcámara. A) Protoplastos de hoja (verdes) y callo (incolores) antes del pulso de corriente alterna. B) Protoplastos luego de haber pasado por corriente alterna (alineación) y continua (fusión). Las flecha azules indican protoplastos fusionados; las flechas rojas indican multifusiones.

Las siete combinaciones de genotipos realizados se muestran en la Tabla 1. Las evaluaciones de los productos obtenidos en cada caso arrojaron resultados diferentes. No todas las combinaciones fueron capaces de producir microcolonias y los porcentajes de inducción variaron entre un 36% ('Murcott' x 'F2P3') y 0% ('Murcott' x 'A218'). Solamente las microcolonias de las combinaciones 'Murcott' x 'F2P3' y 'Ortanique' x 'F2P3' produjeron microcallos.

Tabla 1. Esquema de combinaciones realizadas mediante electrofusión. Se muestra el número fusiones realizadas, número de microcolonias, microcallos regenerados en cada combinación. Los porcentajes se calcularon mediante la cantidad de tejido regenerado (microcolonias o microcallos), con respecto a la cantidad de fusiones realizadas.

Cruzamiento	Nº de	Nº (%)	Nº (%)	Nº
Callo/Hoja	fusiones	Microcolonias	Microcallos	Embriones
	realizadas	obtenidas	obtenidos	regenerados
M9 / F2P3	32	13 (40)	2 (6)	0
M9/F6P8	24	5 (21)	0 (0)	0
Murcott/ F2P3	96	35 (36)	11(11)	0
Murcott/ A218	24	0 (0)	0 (0)	0
Murcott/ M19	24	3 (13)	0 (0)	0
Ortanique/ F2P3	32	9 (28)	1(3)	0
C54-4/ F2P3	32	7 (22)	0 (0)	0
TOTAL	264	72 (27)	14 (5)	0

Los microcallos obtenidos no fueron capaces de diferenciarse en embriones. En la Figura 6 se describe la secuencia de los diferentes estadios desde la mezcla de protoplastos, microcolonias y microcallos.

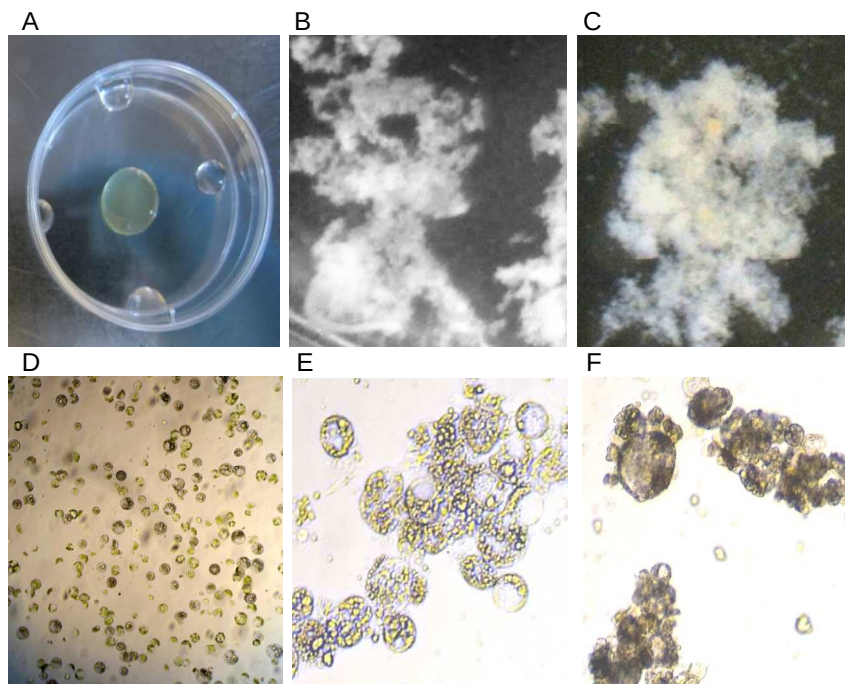


Figura 6. Proceso de obtención de microcallo a partir de protoplastos. A y D: mezcla de protoplastos de callo y hojas inmediatamente luego de la fusión. B y E: microcolonia a 10 días de la fusión. C y F: microcallos a 25 días de la fusión. Las imágenes B y C fueron tomadas en lupa binocular. Imagen D tomada con microscopio (4x). Imagen E y F tomadas con microscopio (40x).

3.6. Discusión

3.6.1. Aislamiento de protoplastos

La purificación de protoplastos a partir de callos friables blancos producen el mayor número de protoplastos viables, mientras que los callos marrones prácticamente no producen protoplastos. Estas observaciones coinciden con las observaciones de Grosser y Gmitter (1990) y Jiménez (1996), donde resaltan la necesidad de utilizar callo embriogénico friable para la obtención de protoplastos viables, identificado por su coloración y crecimiento. Las coloraciones amarillentas produjeron un número intermedio de protoplastos viables. Este tipo

de callo está formado por algunas células viables y otras envejecidas. Las primeras tienen una coloración clara y son responsables de producir protoplastos viables durante el proceso de digestión enzimática, mientras que las células envejecidas presentaron un color marrón causado por la oxidación. La mezcla de estos dos tipos de células dio lugar a un callo amarillento con un rendimiento de protoplastos intermedio.

Si se compara el rendimiento de protoplastos de callo de diferentes variedades se observa que la variedad 'Murcott' se destacó sobre las demás. Como lo sugieren varios autores (Grosser y Gmitter 1990; Wu *et al.*, 2005; Gmitter *et al.*, 2009) existen diferencias importantes en la capacidad de los diferentes genotipos para inducir callo y purificar sus protoplastos. Se ha encontrado que la mayoría de los trabajos utilizan *C. sinensis* como parental de callo ya que se obtienen buenos rendimientos de protoplastos, mientras que las variedades de Clementinas producen muy bajos rendimientos de protoplastos (Pensabene, 2008).

En este trabajo se demostró además la influencia de la temperatura y la luz en el rendimiento de la extracción de protoplastos de hojas de mandarinas. Se observó cómo las variaciones de temperatura y luz registradas en invierno dentro de un invernáculo pueden afectar negativamente el rendimiento de protoplastos de hoja en comparación de plantas cultivadas en cámara de crecimiento con luz y a temperatura controlada. Pensabene (2008) recomienda que las hojas de 'Clemenules' destinadas a la purificación de protoplastos deben provenir de cultivo *in vitro* o de plantas cultivadas a temperatura y luminosidad controladas. La luz estimula la absorción de iones y la acumulación de solutos orgánicos, lo que aumenta la presión osmótica y la turgencia celular desencadenando la apertura de los estomas (Guardiola y García, 1990). Estos cambios en la presión interna y externa de las células

puede afectar la integridad de la membrana celular en el momento de la digestión. Otra posible causa de la diferencia de rendimiento de protoplastos podría ser que las plantas cultivadas en condiciones de luminosidad elevada presentan un número inferior de cloroplastos. Está demostrado que excesos de luminosidad facilitan la foto oxidación de los pigmentos del cloroplasto (Agusti *et al.*, 2003). Esto podría determinar que las hojas cultivadas en condiciones de elevada luminosidad suelen presentar un color más claro respecto a las hojas de una planta cultivada en condiciones de luminosidad reducida. Por otro lado las bajas temperaturas pueden causar daños intracelulares por la formación de cristales (González, 2013). Estos daños pueden afectar la integridad de la membrana y a la viabilidad celular en el momento de la digestión.

Se ha observado una diferencia significativa en los rendimientos de protoplastos de hoja de las variedades de mandarinas estudiadas. Grosser y Gmitter (1990) propusieron un protocolo para la purificación de protoplastos de hoja que se adaptaba a una gran lista de variedades de naranjas y mandarinas, sin embargo luego se debieron hacer ajustes para genotipos específicos como fue el caso de Clementinas (Pensabene, 2008) y algunas otras mandarinas (Grosser y Gmitter, 2010). Nuestros resultados indican que no todos los genotipos se comportan de la misma forma frente a un proceso de extracción de protoplastos, por lo que es importante considerar este efecto.

3.6.2. Fusión eléctrica y regeneración de híbridos

Se observó que el voltaje de alineación de 250 V/cm fue adecuado ya que permitió un alineamiento perfecto de los protoplastos de mandarinas en un tiempo ajustado de 30 s. Por otro lado Pensabene (2008) logró alinear protoplastos de *C. macrophylla* y de *C. clementina*

con 100 V/cm. El voltaje de fusión utilizado en este trabajo fue de 2000 V/cm y se consideró adecuado para nuestras condiciones ya que se obtuvieron protoplastos fusionados sin que se produzca la muerte de los mismos. Pensabene (2008) utilizó un voltaje de fusión de 1200 V/cm para fusionar protoplastos de *C. macrophylla* y de *C. clementina*, mientras que Olivares *et al.*, (2005) y Guo y Deng (1998) utilizaron 1500 V/cm para fusionar naranjas dulces con *Murraya paniculata* (L.) y *C. sinensis* (L.) respectivamente. La diferencia de voltaje que se escogió en cada uno de los casos dependió de las condiciones de trabajo y en especial a la procedencia de los protoplastos utilizados. Se ha observado que protoplastos de variedades o especies diferentes tienen un comportamiento distinto frente a un campo eléctrico; esto se atribuye a diferencias estructurales en las membranas de los protoplastos que favorecen o no la fusión celular (Nickloff, 1998).

Las combinaciones de genotipos realizadas en este trabajo produjeron resultados diferentes. Los porcentajes de obtención de microcolonias variaron entre 0 y 40%, mientras que la de obtención de micro callos de 0 a 11% y no se obtuvieron plantas. Pensabene (2008) obtuvo un 10% de regeneración de micro callos de una fusión entre protoplastos de citrange 'Carrizo' y *C. macrophylla* y un 2% de regeneración de plantas. Guo y Deng (1998) obtuvo un 15% de microcolonias y pocas plantas de bajo vigor. De acuerdo con estos resultados, habría tres factores relevantes para lograr obtener plantas surgidas de una hibridación somática. El primero de ellos es partir de protoplastos de callo embriogénico con un hábito de crecimiento exponencial y con capacidad de producir embriones (Grosser y Gmitter, 2010). El segundo punto a considerar es sobre la necesidad de utilizar hojas de tres a cuatro semanas de edad que no hayan pasado por períodos de estrés térmico ni lumínico (Pensabene, 2008). Finalmente el tercer factor es la combinación de las variedades. Como lo mencionó Grosser y

Gmitter (1990) no todas las combinaciones arrojan los mismos resultados. Si la combinación no resulta adecuada, puede ocurrir que no regeneren plantas o que presenten problemas de bajo vigor (Guo y Deng, 1998; Grosser y Ollitrault, 2000; Ferrante et al., 2009). Reunir estos tres factores resulta una tarea compleja, por lo que la hibridación somática resulta un proceso de muchos ajustes, con la necesidad del profundo conocimiento de los diferentes pasos para identificar los puntos críticos responsables del éxito o fracaso de la técnica.

Se concluye que la electrofusión es una técnica que permite generar tetraploides, pero es necesario ajustar todos los pasos del protocolo para nuestras condiciones. El genotipo y las condiciones ambientales afectan el éxito en la obtención de protoplastos de callo y hoja, y la regeneración de las células luego de la fusión. Para los híbridos probados, los callos embriogénicos de color blanco y las hojas jóvenes cultivadas a 28 °C y 100 lux son los tejidos que producen mayor rendimiento de protoplastos viables luego de la extracción enzimática. Los voltajes de fusión que lograron una relación adecuada de protoplastos fusionados/protoplastos muertos fueron 250 V/cm para la alineación y 2000 V/cm para la fusión. La regeneración de microcolonias y embriones a partir de las células fusionadas es una de las etapas más complejas de todo el proceso.

Agradecimientos

Se agradece a Alicia Castillo por el apoyo en temas relacionados al cultivo *in vitro*. Giovanni Pensabene y Jude Grosser por brindar información sobre fusión de protoplastos.

3.7 . Bibliografía

- Agusti M, Fuentes A, Mesejo C, Juan M, Almela, V. 2003. Cuajado y Desarrollo de los Frutos Cítricos. Valencia: Generalitat Valenciana. 82p.
- An H, Jin S, Kang B, Park H. 2008. Production of somatic hybrids between satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and navel orange (*Citrus sinensis*) by protoplast fusion. Journal of Plant Biology. 51(3): 186-191.
- Barrett H, Hutchison D. 1978. Spontaneous Tetraploidy in Apomietic Seedlings of Citrus. Economic Botany. 32: 27-45.
- Cai X, Jing F, Xiu-Xin D, Guo W. 2007. Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile Satsuma mandarin and two seedy Citrus cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 90(3): 275-283.
- Ferrante J, Pietro S. 2009. Assessment of the origin of new citrus tetraploid hybrids ($2n=4x$) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. Euphytica. 173(2): 223-233.
- Gilmour D, Davey M, Cocking E. 1989. Production of Somatic Hybrid Tissues Following Chemical and Electrical Fusion of Protoplasts from Albino Cell-Suspensions of Medicago-Sativa and Medicago-Borealis. Plant Cell Reports, 8(1): 29-32.
- Gmitter F, Soneji J, Rao, M. 2009. Citrus Breeding. In: Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species. Jain S (Ed). New York: Springer. pp. 105-134.

- Grosser J, Gmitter F. 2010. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 104(3): 343-357.
- Grosser J, Chandler J, Duncan L. 2007. Production of mandarin+pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Horticulturae*. 113(1): 33-36.
- Grosser J, Ollitrault P. 2000. Invited review : somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *Fruit and Horticultural Crops. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 36: 434-449.
- Grosser J, Gmitter F. 1990. Protoplast Fusion and Citrus Improvement. *Plant Breeding Reviews*. 8: 339-374.
- Guardiola J, García L. 1990. Fisiología vegetal I: Nutrición y transporte. Madrid: De Síntesis. pp. 440-448.
- Guo W, Deng X. 1998. Somatic hybrid plantlets regeneration between Citrus and its wild relative, *Murraya paniculata* via protoplast electrofusion. *Plant Cell Reports*. 18: 297-300.
- Hidaka T, Omura M. 1992. Regeneration of Somatic Hybrid Plants Obtained by Electrical Fusion Between Satsuma Mandarin (*C. Unshiu*) and Rough Lemon (*C. Jambhiri*) Or Yuzu (*C. Junos*). *Japanese Journal of Breeding*, 42(1): 79 – 89.
- Jiménez V. 1996. El cultivo de protoplastos en cítricos y su potencial para el mejoramiento. *Aronomía Costarricense*. 20(2): 187-204.

- Nickloff J. 1998. Plant cell electroporation and electrofusion protocols. Totowna: Humana Press Inc. 196p.
- Olivares-Fuster O, Duran-Vila N, Navarro L. 2005. Electrochemical protoplast fusion in citrus. Plant cell reports. 24(2): 112-119.
- Ollitrault P, Navarro L. 2012. "Citrus". In: Fruit Breeding. Badenes M y Byrne J. (Ed). Boston: Springer US. pp. 623-662.
- Pensabene J. 2008. Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. 226p.
- Rivas F, Bertalmío A, Manzi M. 2010. La reconversión varietal en la citricultura uruguaya: un enfoque holístico en tiempos de cambio. Revista INIA Uruguay. 21: 41-44.
- Wu J, Ferguson R, Mooney P. 2005. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid Citrus breeding. Euphytica. 141(3): 229-235.

4. Characterization of Citrus polyploids reveals evidence of $2n$ pollen production by FDR

Mario Giambiasi¹, Ana Arruabarrena¹, Fernando Rivas¹, Pablo Speranza²

¹Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Salto Grande. Camino al Terrible s/n- Salto, Uruguay. CP: 50000.

² Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Corresponding author: mgiambiasi@inia.org.uy.

4.1. ABSTRACT

Triploid and tetraploid genotypes are very important for Citrus breeding in order to produce triploid seedless cultivars. Natural triploids can also arise from the combination of a $2n$ gamete and an n gamete. The genetic structure of $2n$ gametes and origin in *Citrus* is still controversial, although most authors suggest that $2n$ gametes are formed in the female parent by Second Division Restitution (SDR). In this work we used nine microsatellite markers to characterize induced somatic tetraploids and spontaneous triploids of Citrus and determine the source and mechanism of $2n$ gamete formation originating the triploids. We analyzed two spontaneous and two induced tetraploids and four triploids hybrids obtained by embryo rescue from underdeveloped seeds originated by manual or open pollination. Allelic configurations were determined based on allele sizes and long/short allele intensity ratios. The four tetraploid plants analyzed had the same alleles than their diploid homolog genotypes in the same copy ratio. In the four analyzed triploid, were found to $2n$ gamete originated by Restitution First Division mechanism. Additionally it was discovered the origin of three of these gametes, two were originated from the male parent and one in female parent. The frequency of $2n$ pollen formation under field conditions in Uruguay may not be as low as suggested in the literature. In all cases multilocus genotypes suggest FDR as the non reduction mechanism.

Keywords: $2n$ gametes; triploid; tetraploid; SSRs; allelic configuration.

4.2. INTRODUCTION

The production of triploids is one of the strategies to obtain seedless *Citrus* cultivars (Grosser and Gmitter, 2010). The vast majority of natural *Citrus* cultivars are diploid ($2n=2x=18$), nevertheless euploid and aneuploid polyploid genotypes have also been found; most frequently triploid and tetraploid (Gmitter et al., 2009). Tetraploid genotypes have been used extensively as parents in breeding programs to produce seedless triploid cultivars by crossing tetraploid and diploid genotypes (An et al., 2008; Pensabene, 2008; Grosser and Gmitter, 2010).

Tetraploids can be generated by somatic duplication or hybridization of somatic cells (Gmitter et al., 2009). Somatic duplication can occur spontaneously in nucellar cells of polyembryonic seeds and if a complete embryo is developed from these cells, a tetraploid plant can be obtained. This phenomenon occurs in 0.1 to 2.5% of plantlets arising from polyembryonic seeds and its frequency varies with different genotypes and environmental conditions (Barrett and Hutchison, 1978). One way to artificially induce somatic duplication is by using chemicals that inhibit cell division of meristematic tissues (Aleza et al., 2011). The advantage of this method is that when applied on adult plant meristems, the juvenile stage (3-7 years in *Citrus*) can be avoided. These two mechanisms of chromosome duplication generate plants with a genetic constitution basically identical to that of its parental line (Gmitter et al., 1991), thus new combinations of traits for use in breeding programs are not generated at this stage. The production of tetraploid hybrids by protoplast fusion allows the combination of the complete diploid genotypes of its parental individuals without any recombination. In addition, this technique enables the combination of genotypes that are difficult to cross by sexual hybridization (Grosser and Gmitter, 1990).

Triploid genotypes can also arise spontaneously from hybridization between two diploids individuals when a normally reduced gamete of one parent combines with an unreduced ($2n$) gamete produced by the other parent (Watanabe et al., 1992). Crosses among two diploid parents followed by embryo rescue in *Citrus* have been extensively used to recover triploids (Aleza et al., 2010). The formation of $2n$ gametes in plants occurs at variable rates and it is caused by meiotic aberrations (Cuenca et al., 2011). These meiotic abnormalities are grouped according to their genetic consequences. The first group corresponds to First Division

Restitution (FDR) type mechanisms, equivalent to the non-segregation of the homologous chromosomes. Usually FDR-like gametes are heterozygote since they contain copies of both homeologous parental chromosomes with the exception of crossed-over distal fragments (Bielig et al., 2003). The second group corresponds to Second Division Restitution (SDR) type mechanisms. In this case $2n$ gametes contain two sister chromatids. Therefore, the gametes formed by SDR-like mechanisms are highly homozygous (Bretagnolle and Thompson, 1995). For breeding purposes, $2n$ gametes formed by FDR-like mechanisms are more valuable than those formed by SDR like mechanisms since greater variability can be transmitted to the progeny (Dewitte et al., 2011).

Efforts have been made to determine which type of $2n$ gametes occur in Citrus due to their relevance in breeding programs. Cytogenetic studies indicate that triploid hybrids are the result of the fertilization of unreduced egg cells by haploid pollen (Esen and Soot, 1971). The frequency of non-reduction of the female gametes has been estimated to range from 1% to 20% depending on the genotype and environmental conditions. Luro *et al.* (2000) using isozyme markers found that only one triploid was originated by $2n$ pollen, whereas 71 triploids were originated by $2n$ eggs. Using six Simple Sequence Repeat markers (SSR), Chen et al. (2008) and Ferrante et al. (2009) found that sweet orange and 'Femminello' lemon produced $2n$ eggs by FDR. Cuenca et al. (2011) suggested that 'Fortune' mandarins produced $2n$ eggs by SDR using a set of 35 SSR markers.

In this work we used SSR markers to characterize induced somatic tetraploids and spontaneous triploids of Citrus and to determine the source and mechanism of $2n$ gamete formation that originated triploids at INIA's Citrus Breeding Program.

4.3. MATERIALS AND METHODS

4.3.1. Plant material

The plant material used in this study belongs to the Citrus Breeding Program and Citrus germplasm bank shared by the National Agricultural Research Institute (INIA) and the University of the Republic (Uruguay) which is located in Salto, Uruguay (Table 1). We analyzed adult tetraploid plants from genotypes named 'F4P8' and 'F2P3' ('Ellendale' x

'Page') obtained by colchicine treatment of bud sticks and two spontaneous tetraploid genotypes named 'A218' ('Ellendale' x 'W. Leaf') and 'Murcott'. The triploids analyzed in this work were obtained by embryo rescue from underdeveloped seeds originated by either manual or open pollination. Two triploids were originated by directed pollination ('Carte Noire x 'Sunburst' and lemons 'Fino x Ana Claudia') and two triploids were obtained from open pollinated seeds from 'Marisol' and 'Clemenules'. Ploidy was confirmed for all genotypes by flow cytometry using the CyFlow Ploidy Analyser (Partec). Nuclei extraction, purification and DNA staining was carried out as described by (Ollitrault et al., 1994).

Table 1. Species, genotypes, collection site and ploidy levels of individuals used in the analysis.

Species	Genotypes	Collection site	Ploidy
<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan.	'CarteNoir'	INIA Salto Grande	2x
<i>Interspecific complex hybrid</i>	'Sunburst'	INIA Salto Grande	2x
<i>C. limon</i> (L. Osbeck)	'Fino'	INIA Salto Grande	2x
<i>C. limon</i> (L. Osbeck)	'Ana Claudia'	INIA Salto Grande	2x
<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan.	'Marisol'	INIA Salto Grande	2x
<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan.	'Clemenules'	INIA Salto Grande	2x
<i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>	'Murcott'	INIA Salto Grande	2x& 4x
<i>Interspecific complex hybrid</i>	A218	EFFAS	2x& 4x
<i>Interspecific complex hybrid</i>	F2P3	EFFAS	2x& 4x
<i>Interspecific complex hybrid</i>	F4P8	EFFAS	2x& 4x
<i>Interspecific complex hybrid</i>	'CarteNoir' X 'Sunburst'	INIA Salto Grande	3x
<i>C. limon</i> (L. Osbeck)	'Fino' x 'Ana Claudia'	INIA Salto Grande	3x
<i>C. clementina</i> x ?	'Marisol'3x	INIA Salto Grande	3x
<i>C. clementina</i> x ?	'Clemenules'3x	INIA Salto Grande	3x

4.3.2. Genotyping

SSR locus selection. Nine SSR loci representing all of the *Citrus* linkage groups were selected from the literature (Table 2). Thirty individuals of a hybrid progeny from a cross between 'Ellendale' and 'Page' were used to confirm amplification reproducibility and Mendelian segregation ratios of these markers under our laboratory and genotyping procedures.

4.3.3. PCR reaction and analysis

DNA extraction was performed from leaves using the CTAB method described by Doyle and Doyle (1987). PCR and reaction conditions were performed following Kijas *et al.* (1997) procedures. Samples were subsequently analyzed by capillary electrophoresis in an automated sequencer ABI3130 (Applied Biosystems). The resulting electropherograms were analyzed using the Peak Scanner free software (Applied Biosystems). A database containing the allele configuration of all genotypes and the fluorescence intensity of the marker peaks was assembled.

4.3.4. Allelic configuration

The allele constitution of the diploid parental genotypes was established directly following usual procedures. In a triploid individual however, when two alleles are found either the third homologue is a null allele or one of the two alleles is present as two copies. To address these cases we followed the MAC-PR approach (Esselink *et al.*, 2004) using fluorescence intensity (peak height) instead of peak area, and five PCR reaction replicates in all cases to produce better estimates of peak intensity ratios (Polz and Cavanaugh, 1998; Kanagawa, 2003). Short/long Allele Fluorescence Intensity Ratios (AFIR) were calculated and compared for triploid, tetraploids and their parental lines to identify the repeated alleles for each locus. To confirm that tetraploids had the same allelic configuration as their corresponding diploids, AFIR for each locus were individually compared by a Tukey test ($p \leq 0.01$).

4.3.5. Origin and mechanism of $2n$ gamete generation

The origin and mechanism of $2n$ gamete formation was determined by comparing the allelic configuration of triploids with their parents for all SSRs analyzed. The genotype of the gametes contributed by each parent was inferred locus by locus based on the presence and the number of copies of each allele in the triploid. Homozygous loci showing a single allele were in general not considered informative; in contrast, triallelic heterozygous loci, can be directly interpreted. For biallelic heterozygous loci the gametic contributions were inferred by comparing the genotypes and AFIR of both parents and progeny.

4.4. RESULTS

4.4.1. SSR amplification and segregation

The nine selected loci amplified regularly and segregation patterns did not differ significantly from expected Mendelian ratios (Table2). For all genotype/locus combinations the intensity of the shorter allele in biallelic loci was higher than that of the longer allele (Table 3). This was also true for all individual runs (data not shown).

Table 2. Selected SSR locus description and segregation analysis in a 30 individual progeny from an 'Ellendale' x 'Page' cross.

Locus	Primer Sequence (5'- 3')	Linkage group	Size range (pb)	SSR motif	χ^2 (p =0.05)	Reference
TAA15	F: GAAAGGGTTACTTGACCAGGC R: CTTCCCAGCTGCACAAGC	1	119 - 734	TAA	0.41	Kijas <i>et al.</i> (1997)
TAA41	F: AGGTCTACATTGGCATTGTC R: ACATGCAGTGCTATAATGAATG	2	122 - 185	TAA	0.33	Kijas <i>et al.</i> (1997)
Cac15	F: TAAATCTCCACTCTGCAAAGC R: GATAGGAAGCGTCGTAGACCC	3	52 - 521	CAC	0.76	Kijas <i>et al.</i> (1997)
mCrD06	F: CCTTTTCACAGTTTGCTAT R: TCAATTCCTCTAGTGTGTGT	4	16 - 354	TG GA	0.93	Cuenca <i>et al.</i> (2011)
Mest 56	F: AGTCCGCCTTTGCTTTTCT R: GGTGCAAAAGAGAGCGAGAG	5	104 - 503	CA	0.60	Aleza <i>et al.</i> (2011)
TAA 1	F:GACAACATCAACAACAGCAAGAG R: AAGAAGAAGAGCCCCATTAGC	6	93 - 386	TAA	1.00	Aleza <i>et al.</i> (2011)
CI02E08	F: GGTTTGTGGGAGGTG R: TGATTAGCATGTTGCG	7	276 - 302	GA	0.12	Pensabene (2008)
CI01C60	F: GGACCACAACAAAGACAG R: TGGAGACACAAAGAAGAA	8	147 - 185	CT	0.14	Pensabene (2008)
CI07C09	F: GACCCTGCCTCCAAAGTATC R: GTGGCTGTTGAGGGGTTG	9	240-272	GA	0.12	Pensabene (2008)

4.4.2. Allelic configuration of tetraploid and triploid plants

All tetraploids showed the same multilocus genotype as their corresponding diploid genotypes (Table 3). The peak sizes and intensity ratios were similar to those observed in diploids (Figure 1) and there was no significant difference of AFIR ($p \leq 0.01$) between tetraploid and their respective diploid plants (data not shown).

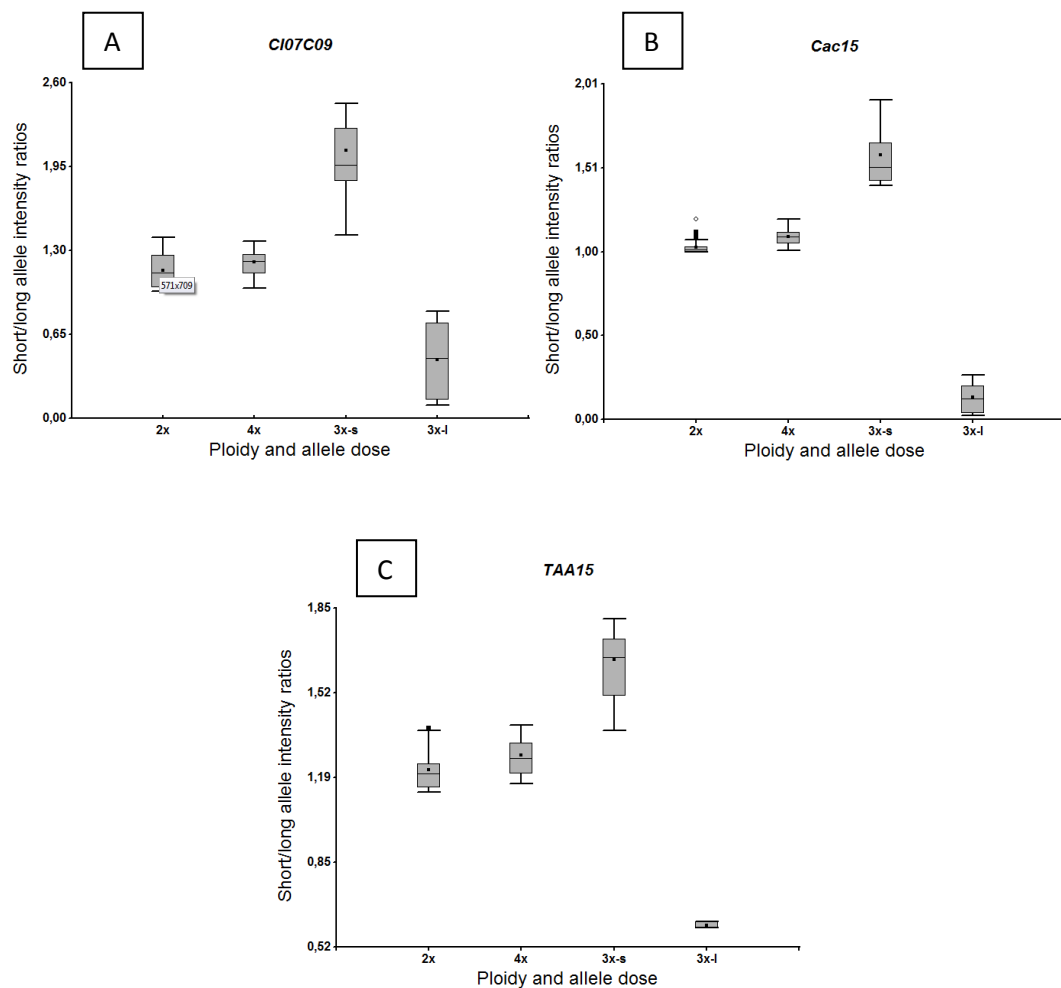


Figure1. Mean Short/long allele ratio diploid (2x), tetraploid (4x), repeated short allele triploids (3x-c), repeated long allele with triploid (3x-l). Means were analyzed with Tukey's test ($p \leq 0.01$). Different letters show significant differences. The Box-Plots are shown for each SSR: A) CI07C09; B) CaC15; C) TAA15. Deviation bars represent $\pm \sigma$ of means.

All triploid plants displayed combinations of the alleles present in their parents for all loci. Copy number for biallelic SSR loci, was easily determined (Table 3). Unlike for tetraploids, intensity

values often differs from those observed in the diploids for the same biallelic constitution (Table 3) as well as AFIR relationships (Figure 1). For repeated short alleles, AFIR was clearly higher than that of a diploid, whereas for repeated long alleles, AFIR was much lower than that of diploid individuals containing the same allele combination. Analysis of variance showed that these differences in peak intensity ratios were significant ($p \leq 0.01$). Three alleles were inferred for all informative loci, thus no null alleles were identified in the polyploids analyzed.

4.4.3. Source and mechanism of $2n$ gamete production

The origin of $2n$ gametes was unambiguously determined in all triploid plants. The triploid 'Carte Noir x Sunburst' showed two peaks for eight loci and one peak for one locus. The inferred multilocus genotype shows that two alleles from 'Carte Noir' are present in each biallelic locus. For the nine loci analyzed, the inferred $2n$ gamete had both alleles from 'Carte Noir' (Figure 2).

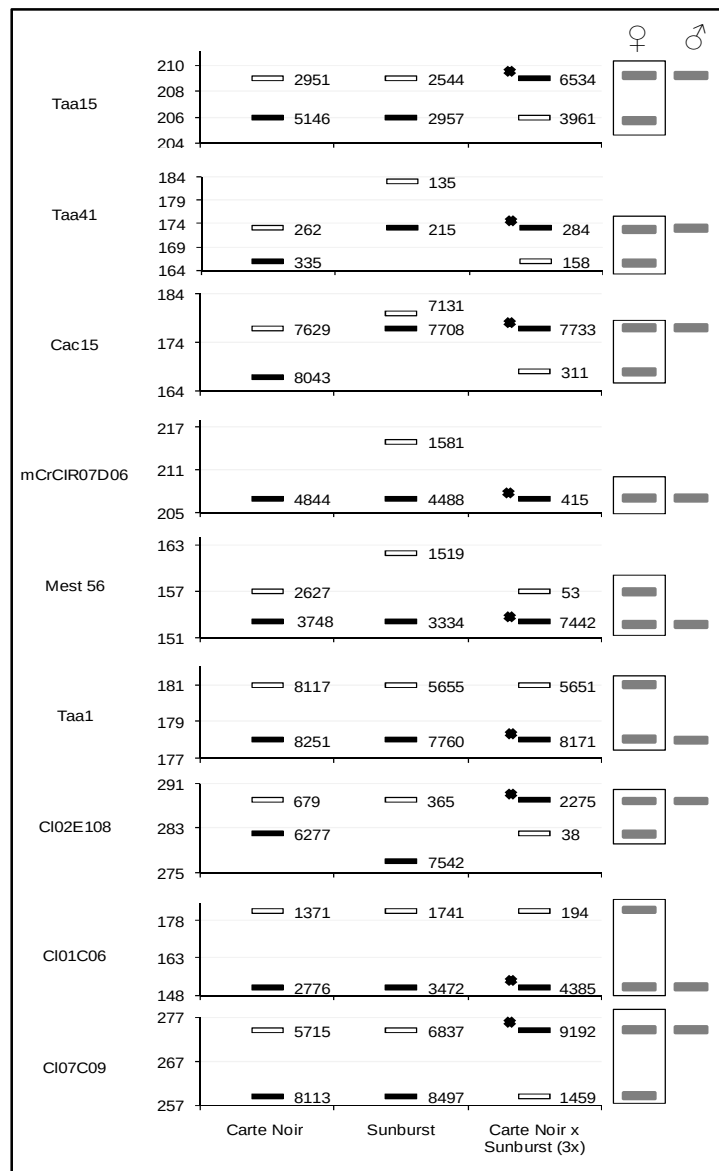


Figure 2. Genetic constitution of the triploid hybrid 'Carte Noir x Sunburst' (3x) and its parental genotypes based on nine SSR loci. Numbers besides allele positions represent the average of the fluorescence intensity of five PCR replicates for each allele. Black rectangles identify the allele with the higher intensity and asterisks (*) identify the allele inferred to be present as two copies. The deduced gametes contributed by each parent are represented on the right two columns.

The triploid individual obtained from open pollination of 'Marisol', showed two alleles for seven loci and one peak for two loci. In all cases the hybrid showed one allele from its maternal parent (Table 3).

Table 3. Analysis of the genotype of all individuals diploid, triploid and tetraploid with nine SSRs. 'Carte Noir' (CN), 'Sunburst' (S), 'Marisol 2x' (M 2x), 'Marisol 3x' (M 3x), 'Clemenules 2x' (C 2x), 'Clemenules 3x' (C 3x), 'Fino' (LF), 'Ana Claudia' (AC), 'Fino x Ana Claudia' (LfxAC 3x), 'F4P8' (2x and 4x), 'F2P3' (2x and 4x), 'A218'(2x and 4x), 'Murcott'(2x and 4x).

	CN (2x)	S (2)	CN x S (3x)	M (2x)	M (3x)	C (2x)	C (3x)	LF (2x)	AC (2x)	Lfx AC (3x)	F4P 8	F2P 3	A2 18	Mu r cot t
Taa15 (cr 1)	206 209	206 209	206 209	206 209	206 209	206 209	206 221	183	183	183	183 209	209 221	183 221	206 221
Taa41 (cr 2)	166 173	173 183	166 173	166 173	173	166 173	155 173 183	163 168	163 168	163 168	155 173	155 173	155 167	164 170
Cac15 (cr 3)	168 177	177 180	168 177	168 177	168 177	168 177	159 168	177 180	177 180	177 180	167 179	176 179	167 176	149 176
mCrD 06 (cr4)	207	207 215	207	156	156	156 160	160 167	207 215	207 215	207 215	186 207	186 206	198 206	162 202
Mest 56 (cr 5)	153 157	153 162	153 157	153 157	153 157	153 157	153 157	155	155	155	153 162	152 162	156 164	162
Taa1 (cr 6)	178 181	178 181	178 181	178 181	178 181	178 181	178 181	187 196	187 196	187 196	178 181	178 181	178 181	178 181
CI02E 08 (cr 7)	282 288	277 288	282 288	282 288	277 282	282 288	277 282 288	277 302	277 302	277 302	276 288	276 282	276 282	276 282
CI01C 06 (cr 8)	151 182	151 182	151 182	151 182	151 177	151 182	149 177 182	177 185	177 185	177 185	151 177	147 177	151	149 151
CI07C 09 (cr 9)	259 274	259 274	259 274	259 274	259 263	259 274	259 274	259 267	259 267	259 267	256 272	256	244	260 272

In three of the 2-peak loci, alleles not present in 'Marisol' were observed and locusCI02E108 showed that one of these new alleles is duplicated. The inferred multilocus genotype implies a $2n$ gamete originated in the male parent. All the informative loci in this cross (Cac15, Mest 56, TAA1, CI01C06 and CI07C09) show that the $2n$ gamete was highly heterozygous (Table 3).

The triploid obtained from open pollination of 'Clemenules', showed two peaks for six loci and three peaks for the three remaining loci. For TAA41 and CI01C06 loci, two alleles that were not present in 'Clemenules' were observed. The same occurred for mCrCIR07D06, but in this

case the unknown allele was duplicated (Table 3). These three markers showed that $2n$ gamete must be originated in the male unknown pollen parent. The information provided by the remaining six loci is congruent with this result implying again a highly heterozygous male unreduced gamete (Table 3).

Finally, the triploid 'Fino x Ana Claudia' and its two parents showed the same alleles at all loci. Seven of the loci were heterozygous. Variation in the AFIR of the triploid was observed when compared to its parents; however, it was not possible to identify the origin of the $2n$ gamete since both parents showed the same multilocus genotype. Nonetheless, because of the heterozygosity levels observed, it can be inferred that the $2n$ gamete involved was highly heterozygous (Table 3).

4.5. DISCUSSION

4.5.1. Allelic configuration: tetraploid and triploid

Tetraploid plants are expected to share the same alleles and AFIR as their diploid homolog genotypes because in the duplication process no recombination is involved, although mutations may still occur (Gmitter et al., 1991). On the other hand, in the case of triploid plants, combinations of the parental genotypes were observed for all polymorphic loci. These results were expected since triploids were produced by sexual hybridization, and consequently the number of different alleles received from each parent depends on the source of the $2n$ gamete and also on the mechanism (FDR or SDR) by which this gamete was generated (Chen *et al.*, 2008).

4.5.2. Origin and mechanism of $2n$ gamete generation

The genotype of the triploid 'Carte Noir x Sunburst 3x' suggests that it was formed by the combination of a $2n$ gamete from the female parent and a haploid gamete from the male parent. Furthermore, because all the heterozygosity present in the female parent was inherited by the hybrid, the mechanism involved is most likely FDR. These results are in agreement with those from several authors that suggest that $2n$ gametes in *Citrus* are usually originated in female parents (Esen and Soot, 1971; Chen et al., 2008; Cuenca et al., 2011). Using isozyme profiles, Luro *et al.* (2000) concluded that the most common mechanism of

non-reduction responsible for diplogyny in 'Clementine' is SDR; however our inferred multilocus genotype provides compelling evidence of FDR.

On the other hand, in the case of the triploids 'Marisol 3x' and 'Clemenules 3x' the $2n$ gamete was provided by the male parent. This result was again unlikely when compared with the proportions obtained by Luro *et al.* (2000) who analyzed a great number of spontaneous triploids and found that only in 2% of the cases the unreduced gametes were provided by the male parent. In spite of this, direct or indirect evidence in $2n$ pollen production in *Citrus* can be found in several other works (Russo and Torrisi 1995; Cavalcante, *et al.*, 2000; Del Bosco *et al.*, 1999; Honsho *et al.*, 2012). Further research on the production of $2n$ pollen in *Citrus* and the factors that influence their occurrence may be valuable for the direct creation of triploid hybrids. The results obtained in this study suggest that the frequency of $2n$ pollen formation under local conditions should be taken in consideration.

As expected in the case of the triploid lemon 'Fino x Ana Claudia' we were not able to determine the origin of the $2n$ gamete. Both parents are likely variants of the same clone and the expected genetic effect of this cross is equivalent to a self-fertilization. Identification of the source of the $2n$ gamete would only have been possible if polymorphism had originated by mutation in the analyzed loci. Heterozygosity remained unchanged in the hybrid relative to its parents probably because the $2n$ gamete involved in fertilization was formed by FDR-like mechanism.

In all the cases studied in this work in which $2n$ gametes are present, evidence on FDR-like non reduction was compelling. First, we selected nine non-linked codominant markers representing the nine linkage groups and confirmed that under our amplification and genotyping conditions, segregation was Mendelian and could be reliably interpreted. Using these markers, for all polymorphic loci analyzed, the inferred $2n$ gametes contributed two alleles to the triploid and we did not find a case where both parents provided only one allele (either one or two copies) in any polymorphic locus/genotype combination. Furthermore, in all cases, the multilocus genotype of the triploid suggests that the $2n$ gamete involved, regardless of whether it was contributed by the male or female parent, carried the complete genotype of that parent for the nine loci. Unreduced gametes in *Citrus* have been reported be the result of

both SDR (Cuenca et al., 2011; Xie et al., 2014) and FDR (Chen et al., 2008; Ferrante et al., 2009) mechanisms. Although the cytological mechanism causing gamete non-reduction in *Citrus* has seldom been described, Del Bosco et al. (1999) found evidence of parallel spindles during meiosis in lemon, a mechanism that is well known to produce FDR-like pollen in *Solanum* (Mok y Peloquin, 1975).

4.6. REFERENCES

- Aleza P, Froelicher Y, Schwarz S, Agustí M, Hernández M, Juárez J, Luro F (2011) Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Annals of botany* 108(1): 37-50.
- 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(9): 1023-34.
- An H, Jin S, Kang B, Park H (2008) Production of somatic hybrids between satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and navel orange (*Citrus sinensis*) by protoplast fusion. *Journal of Plant Biology* 51(3): 186-191.
- Barrett H, Hutchison D (1978) Spontaneous Tetraploidy in Apomictic Seedlings of Citrus. *Economic Botany* 32: 27-45.
- Bielig L, Mariani A, Berding N (2003) Cytological studies of 2n male gamete formation in sugarcane. *Euphytica* 133: 117-124.
- Cavalcante H, Schi M, Dornelles A (2000) Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of 'Lee' mandarin [*Citrus clementina* x (*C. paradise* x *C. tangerina*)]. *Scientia Horticulturae* 86: 103-114.
- Chen C, Lyon M, O'Malley D, Federici C, Gmitter J, Grosser J, Chaparro J (2008) Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. *Plant Science* 174(1): 1-8.

- Cuenca 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.
- Del Bosco S, Tusa N, Conicella C (1999) Microsporogenesis in a citrus interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. *Heredity* 83: 373-7.
- Dewitte K, Laere V, Van Huylenbroeck J (2012) Use of $2n$ Gametes. In *Plant Breeding*. Abdurakhmonov I. (Ed.). Shanghai: In Tech. pp. 60-68.
- Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Esen A, Soot R (1971) Unexpected Triploid in Citrus: Their Origin, Identification, and Possible Use. *Heredity* 62: 329-333.
- Esselink G, 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.
- Ferrante S, Lucretti S, Reale S, Patrizio A, Abbate L, Tusa N, Scarano M (2009) Assessment of the origin of new citrus tetraploid hybrids ($2n=4x$) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. *Euphytica* 173(2): 223-233.
- Gmitter F, Soneji J, Rao M (2009) Citrus Breeding. In: *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*. Jain S (Ed). New York: Springer. pp. 105-134.
- Gmitter F, Ling X, Cai C, Grosser J (1991) Colchicine-induced polyploidy in Citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Science* 74(1): 135-141.
- Grosser J, Gmitter F (2010) Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104(3): 343-357.

- Grosser J, Gmitter F (1990) Protoplast Fusion and Citrus Improvement. *Plant Breeding Reviews*. 8: 339-374.
- Honsho C, Yamamura E, Tsuruta K, Yoshimaru Y, Yasuda K, Uchida A, Kunitake H (2012) Unreduced 2n Pollen Production in 'Nishiuchi Konatsu' Hyuganatsu as Inferred by Pollen Characteristics and Progeny Ploidy Level. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 81(1): 19-26.
- Kanagawa T (2003) Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of bioscience and bioengineering* 96(4): 317-23.
- Luro F, Manddy F, Ollitrault P, Rist D. 2000. Identification of 2n Gamete Parental Origin and Mode of Nuclear Restitution of Spontaneous Triploid Citrus hybrids. In: *Proceedings of 9th International Citrus Congress*, December 3–7. Orlando: International Society of Citriculture. pp. 168-169.
- Mok D, Peloquin S (1975) Breeding value of 2n pollen (diplandroids) in tetraploid x diploid crosses in potatoes. *Theoretical and applied genetics* 46(6): 307-14.
- Ollitrault F, Legave J, Michaux N, Hirsch A (1994) Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*. *Scientia Horticulturae* 57: 303-313.
- Pensabene G (2008) Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española. Tesis Doctorado. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. 126p.
- Polz M, Cavanaugh C (1998) Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 3724- 3730.
- Russo F, Torrisi M (1951) Il poliploidismo nei Citrus. Autopoliploidi e allopoliploid. *Ann. Sper agr.* 5: 1041-1062.
- Watanabe K, Iwanagat M (1992) Transmission of bacterial wilt resistance by First Division Restitution (FDR) 2n pollen via 4x X 2x crosses in potatoes. *Euphytica* 60: 21-26.

Xie K, Wang X, Biswas M, Liang W, Xu Q, Grosser J, Guo W (2014) 2n megagametophyte formed via SDR contributes to tetraploidization in polyembryonic “Nadorcott” tangor crossed by citrus allotetraploids. Plant cell reports. doi:10.1007/s00299-014-1643-2

5. CONCLUSIONES FINALES

La demanda de genotipos triploides que cumplan con las diferentes exigencias de los mercados y de los productores requiere de un conjunto de metodologías de manipulación y análisis que permita tanto aprovechar la ocurrencia de gametos naturalmente no reducidos o producir individuos tetraploides que produzcan gametos diploides para producir triploides por hibridación con individuos diploides. En esta tesis se pusieron a punto varias metodologías requeridas para cumplir varias partes del proceso.

Los gametos no reducidos generados por plantas diploides pueden surgir tanto en la megasporogénesis como en la microsporogénesis, aunque parece ser más frecuente en el parental femenino. De todas formas la ocurrencia de gametos $2n$ parece ser afectada por el genotipo y el ambiente. Los mecanismos de formación de este tipo de gameto (femenino o masculino) equivalen a una restitución en la primera división meiótica, según los resultados de este trabajo.

La duplicación somática permite la obtención de plantas tetraploides de una forma más directa y sencilla que la hibridación somática. Esta técnica requiere varios ajustes en las diferentes etapas: Obtención de callo; Purificación de protoplastos de callo y hoja; voltajes de fusión; regeneración de embriones y plantas tetraploides.

La regeneración de callos embriogénicos es un proceso ineficiente, pero existen variables que permiten optimizar dicho proceso. Dentro de estas variables se encuentran, el genotipo utilizado y el estado fenológico de los óvulos. Se comprobó que las variedades de mandarina inducen callo embriogénico en un rango del 0 al 8%, por lo que es importante la selección de las variedades para trabajar. Por otro lado se determinó que la fecha de siembra es un factor que afecta considerablemente la probabilidad de éxito. La fecha más adecuada para la siembra de óvulos de mandarina es a los 60 DDA. Los callos con alta actividad metabólica generalmente presentan coloraciones blancas, por lo que son los más adecuados para su utilización en técnicas que requieran la formación posterior de embriones y plantas.

El genotipo y las condiciones ambientales afectan el éxito en la obtención de protoplastos de callo, hoja y la regeneración de las células luego de la fusión. Para los híbridos ensayados, los callos embriogénicos de color blanco y las hojas jóvenes cultivadas a 28°C y 100 lux son los tejidos que producen mayor rendimiento de protoplastos viables luego de la extracción enzimática. Los voltajes de fusión que lograron una relación adecuada de protoplastos fusionados/protoplastos muertos fueron 250 v/cm para la alineación y 2000 v/cm para la fusión. La regeneración de microcolonias y embriones a partir de las células fusionadas es una de las etapas más complejas de todo el proceso.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleza P, Juárez J, Cuenca J, Ollitrault P, Navarro L. 2012. Extensive citrus triploid hybrid production by 2x×4x sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant cell reports*. 31(9): 1723-35.
- Aleza P, Froelicher Y, Schwarz S, Agustí M, Hernández M, Juárez J, Luro F. 2011. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Annals of botany*. 108(1): 37-50.
- 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(9): 1023-34.
- Agusti M, Fuentes A, Mesejo C, Juan M, Almela, V. 2003. Cuajado y Desarrollo de los Frutos Cítricos. Valencia: Generalitat Valenciana. 82p.
- An H, Jin S, Kang B, Park H. 2008. Production of somatic hybrids between Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and navel orange (*Citrus sinensis*) by protoplast fusion. *Journal of Plant Biology*. 51(3): 186-191.
- Barkley N, Roose M, Krueger R, Federici C. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 112(8): 1519-31.
- Barrett H, Hutchison D. 1978. Spontaneous Tetraploidy in Apomictic Seedlings of *Citrus*. *Economic Botany*. 32(1): 27-45.
- Bermejo A. 2011. Influence of Gamma Irradiation on Seedless *Citrus* Production: Pollen Germination and Fruit Quality. *Food and Nutrition Sciences*. 2(3): 169-180.

- Bielig L, Mariani A, Berding N. 2003. Cytological studies of $2n$ male gamete formation in sugarcane. *Euphytica*. 133(1): 117-124.
- Bretagnolle F, Thompson J. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol*. 129(1): 1-22.
- Breto M, Ruiz C, Pina J, Asins M. 2001. The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan, a vegetatively propagated crop species. *Molecular phylogenetics and evolution*. 21(2): 285-293.
- Cai X, Jing F, Xiu-Xin D, Guo W. 2007. Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile Satsuma mandarin and two seedy *Citrus* cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 90(3): 275-283.
- Caruso M, Federici C, Roose M. 2007. EST-SSR markers for asparagus genetic diversity evaluation and cultivar identification. *Molecular Breeding*. 21(2): 195-204.
- Cavalcante H, Schi M, Dornelles A. 2000. Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of 'Lee' mandarin [*C. clementina* x (*C. paradise* x *C. tangerina*)]. *Scientia Horticulturae*. 86: 103-114.
- Chen C, Lyon M, O'Malley D, Federici C, Gmitter J, Grosser J, Chaparro J. 2008. Origin and frequency of $2n$ gametes in *Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. *Plant Science*. 174(1): 1-8.
- Cheng Y, Guo W, Deng X. 2003. Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) plus Meiwakumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids. *Plant Cell Reports*. 21(5): 445-451.
- Cuenca 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 chiasm interference in mandarin cv 'Fortune'. *Heredity*. 107: 462-470.

- Del Bosco S, Tusa N, Conicella C. 1999. Microsporogenesis in a *Citrus* interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. *Heredity*. 83: 373-377.
- Dewitte A, Laere K, Huylenbroeck J. 2011. Use of $2n$ Gametes in Plant Breeding. In: Plant Breeding. Abdurakhmonov I. (Ed.). Shanghai: In Tech. pp 60-86.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2012. Encuesta citrícola “primavera 2012”. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 18 Julio 2014. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,5,113,O,S,0,6376%3BS%3B1%3B120,>.
- Doyle J, Doyle J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 19:11-15.
- Dutt M, Lee D, Grosser J. 2010. Bifunctional selection reporter systems for genetic transformation of *Citrus*: mannose and kanamycin based systems. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 46: 467–476.
- Esen A, Soot R. 1971. Unexpected Triploid in *Citrus*: Their Origin, Identification, and Possible Use. *Heredity*. 62: 329–333.
- Esselink G, 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.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2012. *Citrus* fruit fresh and processed annual statistics. Consultado 18 Julio 2014. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf
- Ferrante S, Lucretti S, Reale S, Patrizio A, Abbate L, Tusa N, Scarano M. 2009. Assessment of the origin of new *citrus* tetraploid hybrids ($2n=4x$) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. *Euphytica*. 173(2): 223-233.

- García R, Asíns M, Forner J, Carbonell E. 1999. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor Appl Genet*. 99: 511-518.
- Gilmour D, Davey M, Cocking E. 1989. Production of Somatic Hybrid Tissues Following Chemical and Electrical Fusion of Protoplasts from Albino Cell-Suspensions of *Medicago-Sativa* and *Medicago-Borealis*. *Plant Cell Reports*. 8(1): 29-32.
- Gmitter F, Soneji J, Rao M. 2009. Citrus Breeding. In: *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*. Jain S. (Ed). New York: Springer. pp. 105-134.
- Gmitter F, Chen Ch, Rao M, Soneji J. 2007. Citrus Fruits. In: *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Kole C. (Ed). Berlin: Springer-Verlag. pp. 265-279.
- Gmitter F, Ling X, Cai C, Grosser J. 1991. Colchicine-induced polyploidy in Citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Science*. 74(1): 135-141.
- González M. 2013. Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. San José: IICA. 216p.
- Grosser J, Gmitter F. 2010. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 104(3): 343-357.
- Grosser J, Chandler J, Duncan L. 2007. Production of mandarin + pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Horticulture*. 113(1):33-36.
- Grosser J, Gmitter F. 2005. Applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. In *Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 41: 220-225.

- Grosser J, Ollitrault P. 2000. Invited review : somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. Fruit and Horticultural Crops. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 36:434-449.
- Grosser J, Gmitter F. 1990. Protoplast Fusion and Citrus Improvement. Plant Breeding Reviews. 8: 339-374.
- Guardiola J, García L. 1990. Fisiología vegetal I: Nutrición y transporte. Madrid: De Síntesis. 440p.
- Guo W, Deng X. 1998. Somatic hybrid plantlets regeneration between Citrus and its wild relative, *Murraya paniculata* via protoplast electrofusion. Plant Cell Reports. 18: 297-300.
- Hidaka T, Omura M. 1992. Regeneration of Somatic Hybrid Plants Obtained by Electrical Fusion Between Satsuma Mandarin (*C. Unshiu*) and Rough Lemon (*C. Jambhiri*) Or Yuzu (*C. Junos*). Japanese Journal of Breeding. 42(1): 79-89.
- Honsho C, Yamamura E, Tsuruta K, Yoshimaru Y, Yasuda K, Uchida A, Kunitake H. 2012. Unreduced 2n Pollen Production in 'Nishiuchi Konatsu' Hyuganatsu as Inferred by Pollen Characteristics and Progeny Ploidy Level. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 81(1): 19-26.
- Jiménez V. 1996. El cultivo de protoplastos en cítricos y su potencial para el mejoramiento. Aronomía Costarricense. 20(2): 187-204.
- Jiménez V. 1995. Regeneración in vitro mediante embriogénesis somática de variedades de cítricos. Obtención de callo friable y suspensiones celulares de naranja dulce (*C. sinensis*) y naranja agria (*C. aurantium*) cultivadas en costa rica. Agronomía Costarricense. 19: 7-18.
- Koltunow A, Soltys K, Nito N, McClure S. 1995. Anther, ovule, seed, and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. Canadian Journal of Botany. 73: 1567-1582.

- Kanagawa T. 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of bioscience and bioengineering*. 96(4): 317-323.
- Kijas J, Thomas M, Fowler J, Roose M. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theoretical and Applied Genetics*. 94(5): 701-706.
- Landergott U, Naciri Y, Schneller J, Holderegger R. 2006. Allelic configuration and polysomic inheritance of highly variable microsatellites in tetraploid gynodioecious *Thymus praecox* agg. *Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 113(3): 453-65.
- Luro F, 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*) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC genomics*. 9: 287.
- Luro F, Manddy F, Ollitrault P, Rist D. 2000. Identification of $2n$ Gamete Parental Origin and Mode of Nuclear Restitution of Spontaneous Triploid Citrus hybrids. In: *Proceedings of 9th International Citrus Congress, December 3–7. Orlando: International Society of Citriculture*. pp. 168-169.
- Mok D, Peloquin S. 1975. Breeding value of $2n$ pollen (diplandroids) in tetraploid x diploid crosses in potatoes. *Theoretical and applied genetics*. 46(6), 307-14.
- Moore G. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in genetics*. 17(9): 536-540.
- Navarro L. 2005. Aplicaciones de la biotecnología en los cítricos y otros cultivos. *Comunidad valenciana agraria*. 5: 3-12.
- Navarro L, Aleza P, Pina J, Cervera M, Fagoaga C. 2003. Aplicaciones de la biotecnología para la mejora de los cítricos. *Comunidad valenciana agraria*. 3: 42-45.

- Nickloff J. 1998. Plant cell electroporation and electrofusion protocols. Totowna: Humana Press Inc. 196p.
- Nybohm H, Esselink G, Werlemark G, Vosman B. 2004. Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploid and hemisexual dog-roses, *Rosa L. Sect. Caninae* DC. *Heredity*. 92(3): 139-50.
- Olivares-Fuster O, Duran-Vila N, Navarro L. 2005. Electrochemical protoplast fusion in citrus. *Plant cell reports*. 24(2):112-119.
- Ollitrault P, Navarro L. 2012. Citrus. In *Fruit Breeding*. Badenes M. (Ed). Boston: Springer US. pp. 623-662.
- Ollitrault F, Terol J, Pina J, 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(11): 124-129.
- Ollitrault F, Legave J, Michaux N, Hirsch A. 1994. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*. *Scientia Horticulturae*. 57: 303-313.
- Pensabene G. 2008. Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española. Tesis Doctorado. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. 126p.
- Pillitteri L, Lovatt C, Walling L. 2004. Isolation and Characterization of a terminal flower homolog and its correlation with juvenility in Citrus. *Plant Cell Biology*. 135: 1540-1551.
- Polz M, Cavanaugh C. 1998. Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10): 3724-3730.
- Reforgiato G, Russo G, Recupero. 2005. New Promising Citrus Triploid Hybrids Selected from Crosses between Monoembryonic Diploid Female and Tetraploid Male Parents. *Horticulture Science*. 40(3): 516-520.

- Rivas F, Bertalmío A, Manzi M. 2010. La reconversión varietal en la citricultura uruguaya: un enfoque holístico en tiempos de cambio. *Revista INIA Uruguay*. 21: 41- 44.
- Russo F, Torrisi M. 1951. Il poliploidismo nei Citrus. Autopoliploidi e allopoliploidi. *Ann Sper Agr (Roma)*. 5: 1041-1062.
- Spillane C, Steimer A, Grossniklaus U. 2001. Apomixis in agriculture: the quest for clonal seeds. *Sexual Plant Reproduction*. 14(4): 179-187.
- Swingle W, Reece P. 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In: The citrus industry. Reuther W, Batchelor L, Webber H. (Eds). Berkeley: University of California. pp. 190-430.
- Vardi A, Levin I, Carmi N. 2008. Induction of seedlessness in citrus: from classical techniques to emerging biotechnological approaches. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 133: 117-126.
- Viloria Z, Grosser J, Bracho B. 2005. Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interploid hybridization. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 82(2): 159-167.
- Watanabe K, Iwanagat M. 1992. Transmission of bacterial wilt resistance by First Division Restitution (FDR) $2n$ pollen via $4x \times 2x$ crosses in potatoes. *Euphytica*. 60: 21-26.
- Wu A, Prochnik S, Jenkins J, Salse J, Hellsten U, Murat F. 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature biotechnology*. 32(7): 656-662.
- Wu J, Ferguson R, Mooney, P. 2005. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid Citrus breeding. *Euphytica*. 141(3): 229-235.
- Xie K, Wang X, Biswas M, Liang W, Xu Q, Grosser J, Guo W. 2014. $2n$ megagametophyte formed via SDR contributes to tetraploidization in polyembryonic "Nadorcott" tangor crossed by citrus allotetraploids. *Plant cell reports*. doi:10.1007/s00299-014-1643-2

Xu Q, Chen L, Ruan X, Chen D, Zhu A, Chen Ch, Bertrand D, Jiao W, Hao B, Lyon M, Jiongjiong Ch, Gao S, Xing F, Lan H, Chang J, Ge X, Lei X, Hu Q, Miao Y, Wang L, Xiao S, Kumar B, Wenfang Z, Guo F, Cao H, Yang X, Xu X, Yun-Jiang Che, Xu J, Liu J, Luo O, Tang Z, Guo X, Kuang H, Zhang H, Roose M, Nagarajan M, Deng X, Ruan Y. 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature genetics*. 45(1): 59-66.

7. ANEXO

SOLUCIONES STOCK

MT macroelementos (50x) g/L

NH ₄ NO ₃	82,5
KNO ₃	95
MgSO ₄ * 7H ₂ O	18,5
KH ₂ PO ₄	7,5
K ₂ HPO	41

MT microelementos (100x) g/L

H ₃ BO ₃	0,62
MnSO ₄ * H ₂ O	1,68
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,86
KI	0,083
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,025
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,0025
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,0025

MT sales de hierro (100x) g/L

Na ₂ EDTA	3,724
FeSO ₄ * 7H ₂ O	2,784

MT sales de calcio (100x) g/L

CaCl ₂ * 2H ₂ O	44,43
---------------------------------------	-------

MT vitaminas (100x) g/L

Myo-inositol	10
Tiamina-HCl	1
Piridoxina-HCl	1
Acido nicotínico	0,5
Glicina	0,2

BH3 – SOLUCIONES STOCK

BH3 macroelementos (100x) g/L

MgSO ₄ * 7 H ₂ O	37
KH ₂ PO ₄	15
K ₂ HPO ₄	42
KCl	150

BH3 KI stock g/100 mL

KI	0,075
----	-------

BH3 Ácidos orgánicos (50x) g/100 mL

Acido piruvico	0,1
Acido citrico	0,2
Acido malico	0,2
Acido fumarico	0,2

Sugar + Sug. Alcohols (100X) g/100 mL

Fructosa	2,5
Ribosa	2,5
Xylosa	2,5
Manosa	2,5
Ramnososa	2,5

Celobiosa	2,5
Galactosa	2,5
Manitol	2,5

BH3 multivitaminas A g/100 mL

Pantotenato de calcio	0,05
Acido ascórbico	0,1
Cloruro de Colina	0,05
Acido p-amino-benzoico	0,001
Acido fólico	0,02
Riboflavina	0,01
Biotina	0,001

BH3 multivitaminas B g/100 mL

Retinol (Vit. A)	0,001
Colecalciferol (Vit. D3)	0,001
Vit. B12	0,002

MEDIOS DE CULTIVO

EME sacarosa 1 L

MT macro stock	20 mL
MT micro stock	10 mL
MT vitaminas stock	10 mL
MT calcio stock	10 mL
MT hierro stock	10 mL
Sacarosa	50 g
Extracto de malta	0,5 g
Agar	8 g
pH= 5,8	

Esterilizar 15 minutos a 121 °C

EME MALTOSA 1 L

MT macro stock	20 mL
MT micro stock	10 mL
MT vitaminas stock	10 mL
MT calcio stock	10 mL
MT hierro stock	10 mL
Maltosa	52,6 g
Extracto de malta	0,5 g
Agar	8 g

pH= 5,8

Esterilizar 15 minutos a 121oC

BH30,6M 1 L

BH3 macro stock	10 mL
MT micro stock	10 mL
MT vitaminas stock	10 mL
MT calcio stock	10 mL
MT hierro stock	10 mL
BH3 multivitaminas stock A	2 mL
BH3 multivitaminas stock B	1 mL
BH3 KI stock	1 mL
Sugar alcohol stock	10 mL
BH3 organic acid stock	20 mL
Agua de coco	20 mL
Extracto de malta	1 g
Sacarosa*	51.34 g

Manitol * 81.99 g

Glutamina 3.1 g

Casein enzyme hydrolysate 0.25 g

pH= 5.7

Esterilización por filtración (0,22 µm)

* Para BH3 0,7M añadir 85.56 g/L de sacarosa y 81,99 de Manitol.

* Para BH3 0,4M añadir 101 g/L de Sacarosa y 27,33g/L de Manitol.

SOLUCIONES PARA AISLAMIENTO Y FUSIÓN DEPROTOPLASTOS

Solución enzimática

Onozuka R.S (Cellulase) 2%

Macerase (Macerozyme R-10) 2%

Manitol 0,6 M

CaCl₂ 24 mM

NaH₂PO₄ 0,92 mM

M.E.S. 6,15 mM

pH= 5,6

Esterilización por filtración (0,22 µm)

Solución Fusión Eléctrica: 100 mL

Manitol 12,8 g

CaCl₂ 0.25 mM 25 µL CaCl₂ 1 M stock

Esterilizar por filtración (0,22 µm)

Stock sales CPW1 100 mL

MgSO ₄ * 7H ₂ O	2,5 g
KNO ₃	1 g
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	0,272 g
KI	1,6 mg
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,025 mg

Stock sales CPW2 100 mL

CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,5 g
---------------------------------------	-------

Solución sacarosa 25% 100 mL

Sacarosa	25 g
Stock CPW	11 mL
Stock CPW	21 mL

pH = 5,7

Esterilizar por filtración (0,22 µm)

Solución manitol 13% 100 mL

Manitol	13 g
Stock CPW	11 mL
Stock CPW	21 mL

pH= 5,7

Esterilizar por filtración (0,22 µm)