

## Estudio del modo de herencia del mandarina Moncada tetraploide

M. Garavello<sup>1-2</sup>, N. Ortega<sup>2</sup>, A. Garcia-Lor<sup>2</sup>, J. Cuenca<sup>2</sup> y P. Aleza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Mejoramiento Cítrico, EEA Concordia Estación Yuquerí (CC 34) Concordia (E3200QK), Entre Ríos, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Departamento de citricultura y Producción Vegetal, Km. 10, CV-315, 7, 46113 Moncada, Valencia, España.

**Palabras clave:** Tetrasómico, disómico, triploide, mandarina, marcadores SSR y SNP

### Resumen

Los cítricos son generalmente diploides (2x), con una dotación cromosómica básica  $x=9$ , aunque también existen genotipos con mayor número de cromosomas, siendo los más comunes triploides (3x) y tetraploides (4x). En el programa de mejora genética del IVIA se han obtenido plantas tetraploides estables de mandarina 'Moncada' mediante el tratamiento con colchicina y orizalina de ápices microinjertados. Con el fin de estudiar el tipo de herencia que presenta este genotipo tetraploide, se realizaron hibridaciones sexuales entre clementina 'Clemenules' diploide y 'Moncada' 4x y entre 'Moncada' 4x y el mandarina 'Ananas' diploide para la obtención de híbridos triploides. La restitución de la heterocigosidad parental (RHP) en las progenies triploides obtenidas se ha analizado con marcadores SSR y SNP posicionados en zonas centroméricas y teloméricas de los nueve grupos de ligamiento del mapa genético de clementina. Los resultados obtenidos indican que el mandarina 'Moncada' 4x presenta una herencia tetrasómica en todos los grupos de ligamiento excepto en los grupos de ligamiento 4 y 8, en los cuales se observa un tipo de herencia intermedia (disómica-tetrasómica). Además, se han observado diferencias de RHP según se utilice 'Moncada' 4x como progenitor masculino o femenino. Los resultados obtenidos son de gran interés para seleccionar la estrategia más adecuada en la obtención de híbridos triploides.

### INTRODUCCIÓN

La poliploidía representa una gran fuerza evolutiva para las especies vegetales, lo que permite su diversificación y diferenciación, y es considerada como un importante mecanismo de especiación y adaptación (Honscho et al., 2016). En cítricos, la importancia de los genotipos triploides radica en que producen fruta sin semillas ya que en general son estériles y no inducen la formación de semillas en otras variedades mediante polinización cruzada (Navarro et al., 2015), mientras que los genotipos tetraploides presentan un gran interés para su utilización como parentales de poblaciones triploides. En cítricos, se pueden obtener plantas tetraploides estables a partir de la duplicación espontánea del número de cromosomas en células de la nucela en genotipos apomícticos (Aleza et al., 2011) o mediante la utilización de agentes químicos antimitóticos como colchicina y orizalina en variedades no apomícticas (Aleza et al., 2009). Estas plantas tetraploides son dobles diploides, ya que contienen la información duplicada del genotipo diploide a partir del cual se han obtenido. Las plantas tetraploides se utilizan de forma rutinaria en programas de mejora genética de cítricos dirigidos hacia la obtención de híbridos triploides mediante hibridaciones sexuales interploides (Aleza et al., 2012). En este tipo de hibridaciones, los híbridos triploides se forman a partir de la fusión de un gameto diploide procedente del parental tetraploide con un gameto haploide procedente del parental diploide.

La estructura genética de los gametos 2x depende del emparejamiento preferencial de los cromosomas y por lo tanto de la relación entre segregación disómica y tetrasómica. La segregación tetrasómica se origina cuando cada uno de los cuatro cromosomas homólogos se aparean aleatoriamente con cualquiera de sus homólogos, formando bivalentes o tetravalentes durante la meiosis originando valores de RHP que pueden oscilar entre el 55-66%, dependiendo de la doble reducción. La segregación disómica sin embargo ocurre cuando hay dos sets de cromosomas homólogos, cada uno compuesto por dos cromosomas homólogos, y el emparejamiento durante la meiosis se origina exclusivamente con sus homólogos originando valores de RHP del 100%.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el modo de herencia que presenta el mandarino 'Moncada' 4x, utilizado como parental masculino y femenino, en hibridaciones sexuales para la obtención de híbridos 3x.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Se realizaron hibridaciones sexuales entre clementina 'Clemenules' (♀) y 'Moncada' 4x (♂) (CMO) y entre 'Moncada' 4x (♀) y mandarino 'Ananas' (♂) (MOA) para la obtención de híbridos 3x en parcelas experimentales del IVIA (Moncada, Valencia).

### **Análisis genético con marcadores Simple Sequence Repeat (SSR) y Single Nucleotide Polymorphism (SNP)**

La regeneración de las plantas y determinación del nivel de ploidía se realizó según la metodología descrita por Aleza et al. (2012). Se analizaron con marcadores moleculares 92 y 72 híbridos 3x obtenidos en las hibridaciones CMO y MOA, respectivamente, utilizando un total de 30 SSRs y 13 SNPs, 15 SSR y tres SNP para CMO y 15 SSR y 10 SNP para MOA, distribuidos uniformemente en los nueve GL del mapa genético de clementina. Todos los marcadores presentaron heterocigosidad para el mandarino 'Moncada' 4x y con uno o ningún alelo en común con el otro parental; clementina 'Clemenules' y mandarino 'Ananas'. La extracción de ADN se realizó utilizando el Plant DNAeasy kit de Qiagen (Valencia, CA, USA). Las condiciones de PCR y el análisis genético con marcadores se realizó siguiendo la metodología descrita por Cuenca et al. (2013) y Aleza et al. (2016).

Para cada marcador se calculó la restitución de la heterocigosidad parental (RHP) como el porcentaje de individuos con la misma configuración alélica heterocigótica que el mandarino 'Moncada' 4x y la RHP promedio para cada GL. Los fragmentos de PCR para SSR se corrieron en un analizador genético automático CEQ-8000 (Beckman Coulter®), analizando los resultados mediante el software GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter®). El genotipado con marcadores SNPs se realizó utilizando la tecnología KASPar, analizando los resultados mediante el software KlusterCaller™.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En primer lugar, con el análisis genético se verificó que el origen del gameto 2x proviniera del parental 'Moncada' 4x en todos los triploides analizados, como se muestra en las Figuras 1 y 2. Los resultados del análisis genético se utilizaron para determinar la RHP en cada progenie obtenida. El análisis de los resultados de los SSR y SNP se realizó según Cuenca et al. (2011), Cuenca et al. (2013), respectivamente. Los resultados de la RHP para los marcadores utilizados para mandarino 'Moncada' 4x como progenitor masculino se sitúan en general entre 55-66%, en todos los grupos de

ligamientos (GL) ajustándose a una segregación tetrasómica; excepto para el marcador SSR Mest15 en el GL5 que es mayor al 75% (Tabla 1). Por otra parte, los resultados de la RHP para el mandarino 'Moncada' 4x utilizado como progenitor femenino evidencian un comportamiento diferencial según el GL. Para todos los LG excepto para los GLs 4 y 8, se puede considerar que la RHP se ajusta a una segregación tetrasómica, mientras que, en estos GL, los valores son superiores a 66% para todos los marcadores considerados (Tabla 2), evidenciando ambos un tipo de herencia intermedia como los observados por Aleza et al. (2016) en el GL4 de clementina 'Clemenules' 4x. Los gametos masculinos de mandarino 'Moncada' 4x presentan una segregación tetrasómica en todos los grupos de ligamiento; en cambio, los gametos femeninos de este mandarino presentan una herencia diferencial según el grupo de ligamiento, siendo intermedia para los grupos 4 y 8 y tetrasómica para los otros grupos. Estos resultados son de gran utilidad para definir las estrategias a seguir en los programas de mejora genética de cítricos en la obtención de futuras progenies de híbridos triploides en los que se utilice el mandarino 'Moncada' 4x como parental masculino o femenino.

### Referencias

- Aleza P., Juárez J., Hernández M., Ollitrault P., Navarro L. 2012. Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on  $4x \times 2x$  sexual hybridisations. *Tree Genetics & Genome*. 8: 1293–1306.
- Aleza P., Juárez J., Cuenca J., Ollitrault P., Navarro L. 2016. Inheritance in doubled-diploid clementine and comparative study with SDR unreduced gametes of diploid clementine. *Plant Cell Reports*. DOI 10.1007/s00299-016-1972-4
- Cuenca J., Aleza P., Navarro L., Ollitrault P. 2013. Assignment of SNP allelic configuration in polyploids using competitive allele-specific PCR: Application to citrus triploid progeny. *Annals of Botany* 111(4).
- Cuenca J., Froelicher Y., Aleza P., Juárez 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, pages 462–470
- Honsho C., Sakata A., Tanaka H., Ishimura S., Tetsumura T. 2016. Single pollen genotyping to estimate mode of unreduced pollen formation in *Citrus tamurana* cv. Nishiuchi Konatsu. *Plant Reprod.*
- Jeridi M., Perrier X., Rodier-Goud M., Ferchichi A., D'Hont A., Bakry F. 2012. Cytogenetic evidence of mixed disomic and polysomic inheritance in an allotetraploid (AABB) Musa genotype. *Ann. Bot.* 110 1593–1606. 10.1093/aob/mcs220
- Krug C. 1943. Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. *Botanical Gazette*:602-611

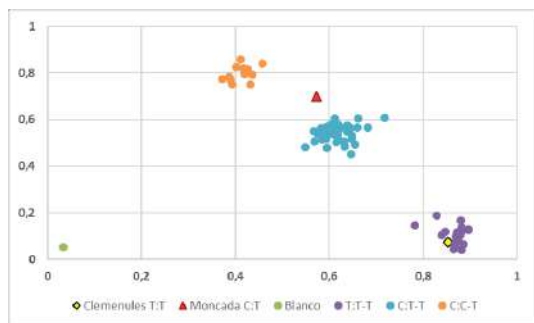


Fig 1: Perfiles obtenidos usando el marcador SNP INVA-P855 en 'Clemenules' 2x, mandarino 'Moncada' 4x y la población de híbridos triploides obtenida

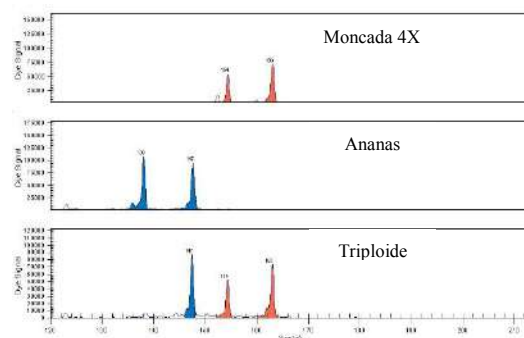


Fig 2: Perfiles obtenidos usando el marcador SSR TAA41 en mandarino 'Moncada' 4x, mandarino 'Anana' diploide y un híbrido triploide obtenido entre estos parentales.

Tabla 1: Resultados de la restitución de la heterocigosidad parental por grupo de ligamiento y marcador para el cruce de mandarina 'Clemenules' 2x por mandarina 'Moncada' 4x.

|     | SSR/SNP   | RHP   |     | SSR/SNP  | RHP   |
|-----|-----------|-------|-----|----------|-------|
| GL1 | CIBE5720  | 51,6% | GL5 | CMS30    | 48,9% |
|     | CI02G08   | 64,4% |     | Mest15   | 75,3% |
| GL2 | CI07D05   | 51,1% |     | CI07E12  | 54,8% |
|     | CI02D09   | 55,1% | GL6 | MEST123  | 60,7% |
|     | TAA41     | 42,7% | GL7 | CI07C07  | 55,6% |
| GL3 | CX0124    | 52,2% |     | FLS-M400 | 53,5% |
|     | CHS-M183  | 45,2% | GL8 | CI02A09  | 65,9% |
|     | INVA-P855 | 65,5% |     | CI01F04a | 62,5% |
| GL4 | CI03D12a  | 56,8% | GL9 | CI07F11  | 63,2% |

Tabla 2: Resultados de la restitución de la heterocigosidad parental por grupo de ligamiento y marcador para el cruce de mandarina de mandarina 'Moncada' 4x por mandarina 'Ananas' 2x.

|            | SSR/SNP    | RHP      |       | SSR/SNP     | RHP   |     | SSR/SNP    | RHP   |
|------------|------------|----------|-------|-------------|-------|-----|------------|-------|
| GL1        | CI02G08    | 61,1%    | GL4   | MEST70      | 79,2% | GL6 | CI02F12    | 69,4% |
|            | EMA-M30    | 55,7%    |       | CHI-M598    | 76,1% |     | AOC-M290   | 67,1% |
| GL2        | CI02D09    | 53,0%    |       | CI06A02     | 75,4% | GL7 | MEST 107   | 58,7% |
|            | CAC15      | 52,8%    |       | CIC 0446-01 | 83,3% |     | CI07C07    | 64,3% |
|            | TAA41      | 54,3%    |       | CI03D12a    | 81,7% | GL8 | CI01F04a   | 73,4% |
| CIC3712-01 | 54,2%      | MEST 104 | 54,1% | CI07B05     | 75,0% |     |            |       |
| GL3        | MEST256    | 54,3%    | GL5   | CI02417-04  | 61,1% | GL9 | CI07F11    | 58,3% |
|            | CIC4681-02 | 77,1%    |       | CIC5842-02  | 50,7% |     | CIC5087-01 | 55,6% |
|            | ATMR-M728  | 62,5%    |       |             |       |     |            |       |