



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y POR NIVEL DE PLOIDÍA DE HÍBRIDOS INTERESPECIFICOS DE LIMÓN MEXICANO

SILVIA HERÉNDIRA CARRILLO MEDRANO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis titulada: **Identificación, caracterización morfológica, molecular y por nivel de ploidía de híbridos interespecíficos de limón mexicano**, realizada por la alumna: **Silvia Heréndira Carrillo Medrano** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa

ASESOR

Dr. Serafín Cruz Izquierdo

ASESOR

Dr. Marciano Manuel Robles González

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2015

IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y POR NIVEL DE PLOIDÍA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE LIMÓN MEXICANO

Silvia Heréndira Carrillo Medrano, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

El desarrollo de variedades tolerantes mediante hibridaciones interespecíficas e intergenéricas puede ayudar a enfrentar y reducir los impactos de enfermedades que amenazan al cultivo de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle]. La identificación temprana de plantas híbridas permitirá eficientar los trabajos en el programa de mejoramiento genético de este cítrico. El objetivo del estudio fue identificar, caracterizar morfológica, molecular y por nivel de ploidía híbridos interespecíficos de limón mexicano. Para la identificación de híbridos se utilizaron algunos caracteres morfológicos presentes en los progenitores, como presencia de antocianinas en brotes tiernos, yemas vegetativas y botones florales, hojas compuestas y coriáceas de mayor espesor y glándulas de aceite abultadas. Las plantas de cruces entre genotipos 2x X 4x y su recíproca con características de poliploidía, se sometieron al análisis de citometría de flujo. De las 326 plantas analizadas, 132 (55.85%) se identificaron como plantas triploides. Se utilizó la técnica de marcadores genéticos denominados microsatélites (SSR). Los iniciadores utilizados fueron TAA41, TAA45, cAGG9 y TAA52. Los cuatro iniciadores permitieron la identificación de plantas híbridas, sin embargo, los iniciadores TAA45 y cAGG9 lograron identificar el mayor número de plantas híbridas con 145 y 130 respectivamente. En general todas las plantas que resultaron híbridas comparten caracteres morfológicos, aunque no está claro cómo se heredan algunas de esas características, pues cuando se cruzan se crean nuevas combinaciones genéticas donde segregan y se recombinan de manera aleatoria sus alelos y generan una gran diversidad de fenotipos.

Palabras Clave: Microsatélites, *Citrus aurantifolia*, HLB, VTC, antracnosis

IDENTIFICATION, MORPHOLOGICAL, MOLECULAR AND PLOIDY LEVEL OF INTERSPECIFIC HYBRIDS OF MEXICAN LIME

Silvia Heréndira Carrillo Medrano, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

The development of tolerant varieties through interspecific and intergeneric hybridizations can help to address and reduce the impact of diseases threatening the production of Mexican lime [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle]. Early identification of hybrid plants will enable more efficient work in the breeding program of this citrus. The objective of the study was to identify, characterize morphologically and molecularly and ploidy level of interspecific hybrids of Mexican lime. For identification of hybrids some morphological characters present in the parents, as presence of anthocyanins in shoots buds and vegetative buds, leaves composed and leathery thicker and oil glands bulky were evaluated. Plants cross between genotypes 4x x 2x and their interaction with polyploidy characteristics, the flow cytometric analysis were subjected. Of the 326 plants analyzed, 132 (55.85%) were identified as triploid plants. The technique of genetic markers called microsatellites (SSR) was used. The primers used were TAA41, TAA45, cAGG9 and TAA52. All primers allowed the identification of hybrid plants, however, cAGG9 and TAA45 identified most hybrids plants 145 and 130 hybrids respectively. In general, all hybrid plants shared morphological characters, though it is unclear how some of these characteristics are inherited, because when they cross new genetic combinations are segregated and recombined randomly their alleles thus creating and generating great diversity of phenotypes.

Key words: microsatellites, *Citrus aurantifolia*, HLB, VTC, anthracnose

Para el amor de mi vida

Isis Camila

Y mi gran ejemplo

Silvia Medrano Villa

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Colegio de Postgraduados y al programa de Mejoramiento Genético de Limón Mexicano del INIFAP-Tecomán.

A mi consejo particular. Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa, Dr. M. Manuel Robles Gonzales, Dr. Serafín Cruz Izquierdo.

A mi mágico por todo su amor y apoyo incondicional.

A mis amigos Bárbara, Eva, Eneida, Fernando, Bibiana, Geremias, Marisol.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias INIFAP

A todos los que contribuyeron con el desarrollo de este trabajo

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Mejoramiento genético	5
2.2 Mejoramiento de Cítricos	5
2.2.1 Mutantes o variantes naturales e inducidos.....	7
2.2.2 Hibridación somática	8
2.2.3 Hibridación interploide	9
2.2.4 Importancia de los cítricos triploides	11
2.2.5 Limitantes en el mejoramiento genético de cítricos.....	12
2.2.6 Rescate y germinación <i>in vitro</i> de embriones inmaduros	13
2.3 Métodos de Identificación de Híbridos.....	13
2.3.1 Marcadores moleculares	14
2.3.2 RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) o ADN polimórfico amplificado aleatoriamente.....	14
2.3.3 AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) o polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados.....	15
2.3.4 Marcadores Microsatélites.....	16
2.3.5 Isoenzimas	17
2.3.6 Citometría de flujo.....	17
2.3.7 Caracteres morfológicos.....	18
2.4 Importancia del Cultivo de Limón Mexicano	19
2.5 Problemas Fitosanitarios del Limón Mexicano.....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1 Identificación de híbridos en base a caracteres morfológicos	25
3.2 Identificación de híbridos mediante su nivel de ploidía.....	26
3.3 Identificación de híbridos mediante marcadores moleculares	26

3.3.1 Extracción de ADN genómico.....	27
3.3.2 Cuantificación de ADN.....	27
3.3.3 Amplificación por PCR	28
3.3.4 Análisis de datos	28
3.4 Caracterización morfológica de híbridos de limón mexicano	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1 Identificación de híbridos mediante su nivel de ploidía.....	32
4.2 Identificación de híbridos mediante marcadores moleculares	38
4.3 Caracterización morfológica de híbridos de limón mexicano	63
V CONCLUSIONES	71
VI. LITERATURA CITADA.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a) Presencia de antocianinas en brotes tiernos, b) y en botones florales, c) hojas compuestas y d) hojas coriáceas de mayor espesor y glándulas de aceite abultadas.	25
Figura 2. Caracteres morfológicos de los progenitores Limón Mexicano, Rosenber, 'Eureka' y citrange 'C-35' utilizados para la caracterización morfológica de híbridos.....	30
Figura 3. Histograma generado del análisis con citometria de flujo de la cruce 'Rosemberg' x 'Mex13'.....	32
Figura 4. Histograma generado del análisis con citometria de flujo de la cruce 'Mex13' x 'Eureka'.....	33
Figura 5. Histograma generado del análisis con citometria de flujo de la cruce 'Mex13' x 'Limoneira 8a'.....	34
Figura 6. Perfiles de SSR generados con el iniciador cAGG9 para progenies de cruces de: Mex 13 X 'Rosenberg' (a), 'Colimex' X 'Rosemberg' (b) y 'Mex13' X 'Limoneira 8a' (c). M: Marcador de peso molecular 1Kb, línea 1: Progenitor femenino, Línea 2: Progenitor masculino, Líneas 40-52, 23-34 y 35.-210: Plantas progenie.....	44
Figura 7. Perfiles de SSR generados con el iniciador TAA45 para progenies de cruces de: 'Colimex' X 'Rosenberg' (a), 'Mex13' X 'C-35' (b) y 'Mex13' X 'Rosenberg' (c). M: Marcador de peso molecular 1Kb, línea 1, 6 y 11: Progenitor femenino, Línea 2, 7 y 12: Progenitor masculino, Líneas32-34, 67-70, 68, 90-102 y 40-47: Plantas progenie.....	45

Figura 8. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Colimex' x Citrange'Yuma' construido con el método UPGMA.....	47
Figura 9. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Colimex' x 'C-Swingle' construido con el método UPGMA.....	48
Figura 10. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Colimex' x 'HS11' construido con el método UPGMA.	49
Figura 11. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Colimex' x 'Limequat' construido con el método UPGMA.....	50
Figura 12. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Colimex' x 'Rosenberg' construido con el método UPGMA.....	51
Figura 13. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'Eureka' construido con el método UPGMA	53
Figura 14. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'C-35' construido con el método UPGMA.	55
Figura 15. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'C-35' construido con el método UPGMA	55

Figura 16. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'C-35' construido con el método UPGMA	56
Figura 17. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'Limoneira 8a' construido con el método UPGMA.....	57
Figura 18. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'Rosenberg' construido con el método UPGMA.....	58
Figura 19. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Rosenberg' x 'Colimex' construido con el método UPGMA.....	59
Figura 20. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Rosenberg' x 'Mex20' construido con el método UPGMA.....	60
Figura 21. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Rosenberg' x 'Mex13' construido con el método UPGMA.....	61
Figura 22. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Colimex' x 'C-32' construido con el método UPGMA	62
Figura 23. Caracteres morfológicos obtenidos en hojas de híbridos de limón mexicano.	64

Figura 24. Dispersión de los progenitores e híbridos sobre el plano de los dos primeros factores. AF-área foliar, FLF- forma de lámina foliar, ANT- antocianinas, P/AA-presencia-ausencia de alas, AA-anchura del ala y FA- forma del ala..... 70

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Árboles progenie de cruzas interploides e intergenericas entre limón mexicano con limones italianos y citranges.....	24
Cuadro 2. Iniciadores de microsátélites utilizados en la detección de híbridos de limón mexicano.....	29
Cuadro 3. Caracteres morfológicos utilizados para la caracterización de híbridos obtenidos en las diferentes cruzas de limón mexicano	31
Cuadro 4. Individuos analizados con citometría de flujo para definir su nivel de ploidía.....	37
Cuadro 5. Número de plantas híbridas identificadas con cuatro marcadores moleculares SSR.....	42

I. INTRODUCCIÓN

En la región del Pacífico mexicano se cultivan aproximadamente 81,221.9 ha con limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle]. Los principales estados productores son Colima, Oaxaca y Guerrero. La producción anual de fruta es superior a 1.04 millones de toneladas con un valor estimado de 3,371 millones de pesos (SIAP, 2013). Esta agroindustria genera una gran cantidad de empleos para diversas actividades que se desarrollan ya sea en el campo, en las empacadoras, la industria, el transporte y la comercialización de fruta o subproductos. Además existe un gran número de viveros dedicados a la producción de plantas de cítricos y proveedores de insumos para los distintos eslabones de esta cadena productiva, que se benefician con este cultivo.

En los últimos años el cultivo del limón mexicano se encuentra seriamente amenazado por la llegada de enfermedades que ponen en riesgo su permanencia como la actividad agrícola más importante para el estado de Colima y de gran relevancia para los estados de Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Destaca la antracnosis (*Colletotrichum acutatum*), tristeza de los cítricos (VTC) y el huanglongbing (HLB). El desarrollo de variedades tolerantes puede ayudar a enfrentar y reducir los impactos de estas enfermedades. El programa de mejoramiento genético de limón mexicano del INIFAP-Tecomán ha generado plantas híbridas interespecíficas e intergenéricas, en la búsqueda de genotipos con resistencia o mayor tolerancia a estas enfermedades y de esta forma preservar el cultivo de limón mexicano en el país.

Reportes indican que al cruzar genotipos de cítricos diploides (2x) con genotipos tetraploides (4x) es posible obtener segregantes triploides (3x) (Cameron y Burnett, 1978; Cameron y Soost, 1969; Esen y Soost, 1972; Oiyama, 1991; Starrantino y Recupero, 1982). Las evidencias más recientes de variedades triploides de cítricos obtenidas por hibridación sexual interploide son las variedades de toronja (*C. paradisi* Macf.) 'Oro Blanco' y 'Melogold' que fueron desarrolladas en California (Soost y Cameron, 1980; 1985). Al igual que la

mayoría de los cítricos, el limón mexicano es diploide (2x). Aunque también se cuenta con genotipos tetraploides (4x). Al cruzar esta especie vía hibridación sexual con genotipos tetraploides ($2n = 4x$) que contengan características de tolerancia a los problemas sanitarios antes mencionados es posible generar variedades triploides sin semillas tolerantes a esos problemas.

El mejoramiento convencional tiene importantes limitaciones debido a la compleja biología reproductiva de estas especies. La mayoría de los genotipos de cítricos son apomícticos y desarrollan embriones adventicios directamente de las células nucelares los cuales limitan o excluyen el desarrollo de embriones cigóticos, (Kobayashi *et al.*, 1979; Ruiz *et al.*, 2000). El rescate oportuno y germinación *in vitro* de embriones inmaduros permite obtener poblaciones de plantas entre las que se encuentran genotipos de origen híbrido. La identificación temprana de las plantas híbridas es de gran importancia, ya que evita el manejo y mantenimiento de plantas no híbridas, lo que resulta en ahorro de esfuerzo y recursos.

Por lo anterior la identificación de los embriones híbridos sexuales pueden requerir análisis adicionales, tales como la citología, citometría de flujo, isoenzimas, o análisis molecular (Tusa *et al.*, 2002). Los marcadores moleculares son herramientas muy útiles que ayudan a los mejoradores de plantas a hacer frente a éste y otros temas: permiten el estudio de la variación genética, la búsqueda de nuevas fuentes de genes de importancia agronómica, la identificación de los cultivares y manejo eficiente de las generaciones segregantes en programas de mejoramiento genético a través de la ayuda de marcadores de selección (Asíns *et al.*, 1998).

La citometría de flujo desarrollada para la investigación médica es ahora ampliamente utilizada para el análisis del contenido de ADN de las plantas (Arumuganathan y Earle, 1991a, b). El interés de la citometría de flujo para el análisis de la ploidía de cítricos y para el mejoramiento de poliploides fue enfatizado por Ollitrault y Michaux-Ferriere (1992). Desde esa fecha, esta técnica

ha abierto una nueva vía para la manipulación de la ploidía de cítricos. La citometría de flujo se utiliza ahora como una herramienta de rutina para el mejoramiento de cítricos, tanto para las progenies sexuales o híbridos somáticos.

La selección morfológica se basa en la detección de variaciones fenotípicas en el híbrido al compararlo con los progenitores (Lindsay *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2004). Algunas características, como el tipo de crecimiento (tallo erecto, tallo rastrero o semirastrero) y color de la flor, han sido utilizadas para este fin (Mendis *et al.*, 1991).

Del programa de mejoramiento genético de limón mexicano mediante hibridación convencional y asistida por el rescate y germinación *in vitro* de embriones inmaduros que lleva a cabo el INIFAP, en Colima, se generó una población de cerca de 2,500 plantas. Está pendiente la identificación y selección de híbridos para poder avanzar en el proceso de mejoramiento varietal.

Por lo anterior en el presente trabajo se plantearon los siguientes **objetivos**:

Objetivo general

Identificar, caracterizar morfológica, molecular y por nivel de ploidia, plantas híbridas generadas de cruzamientos interespecíficos e interploides entre limón mexicano con limones italianos, citranges e híbridos somáticos entre citranges y naranjo dulce.

Objetivos específicos

1. Identificar mediante marcadores morfológicos, citometría de flujo y marcadores moleculares las plantas híbridas generadas de cruzamientos entre limón mexicano con limones italianos, citranges e híbridos somáticos entre citranges y naranjo dulce.

2. Caracterizar morfológicamente las plantas híbridas generadas de cruzamientos entre limón mexicano con limones italianos, citranges e híbridos somáticos entre citranges y naranjo dulce.

La **hipótesis** del trabajo con la cual se desarrolló la investigación fue:

Los marcadores moleculares permiten hacer la identificación rápida y eficiente de progenies híbridas de cruzamientos entre limón mexicano con otros cítricos y junto con los marcadores morfológicos permiten hacer la caracterización genética de los híbridos generados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Mejoramiento genético

Desde tiempos remotos, el mejoramiento genético de plantas es considerada como un arte y una ciencia que ha permitido incorporar características de interés en las plantas cultivadas (Robles-Gonzales *et al.*, 2015). Este arte fue desarrollado tiempo antes de que se conocieran las leyes de la herencia biológica (Acquaah, 2007). Con los principios de la genética se fomentó el crecimiento y evolución de este arte y se transformó en una tecnología basada en la ciencia y que ahora es fundamental para el desarrollo de los programas de mejoramiento genético de los cultivos (Jauhar, 2006).

El secreto del proceso fundamental de mejoramiento genético es el cambio adaptativo por sustitución alélica bajo selección. La mutación, la hibridación interespecífica y la transgénesis pueden aportar nuevos caracteres a la diversidad de un cultivo, no obstante el proceso fundamental, luego que tales caracteres son incorporados al germoplasma, no se modifica. La mejora genética de un organismo se basa en la capacidad de lograr una tarea específica o hacer una función precisa (Giudici *et al.*, 2005).

2.2 Mejoramiento de Cítricos

De acuerdo con Ollitrault y Navarro (2012) los cultivares existentes de naranja dulce (*C. sinensis* L. Osbeck), limón (*C. limón* (L.) Burm), clementinas (*C. clementina* hort. ex Tanaka), satsumas (*C. unshiu* (Mak.) Marc.) y toronjas se han seleccionado de mutaciones espontáneas o inducidas, mientras que la selección de mutantes y mejoramiento sexual han permitido avanzar en el progreso varietal de mandarinas. La mayoría de los cultivares de cítricos son el resultado de la selección de mutaciones espontáneas identificados en campo. La calidad del fruto (tamaño, color, ausencia de semillas) y la extensión de la temporada de cosecha

son los principales objetivos de selección. Nuevos cultivares obtenidos por este método, son liberados constantemente, principalmente en clementinas satsumas y naranjas dulces, sobre todo del grupo 'navel'. Mutantes inducidos de mandarinas (*C. reticulata* Blanco) principalmente sin semillas se han liberado recientemente en Israel (Moreno *et al.*, 2008) y los EE.UU.

La selección de algunos cultivares interesantes entre mandarina x híbridos de pomelo los tangelos ('Nova', 'Orlando', 'Minneola',) e híbridos de mandarinas ('Fairchild', 'Fremont', 'Fortune', 'Kara', 'Kinnow', 'Wilking' y 'Honey'), fueron desarrollados en el viejo proyecto de mejoramiento sexual de mandarina realizado en EE.UU. (Frost 1948). La variedad 'Kinnow' es muy importante para el subcontinente de la India y Pakistán. El cultivar Fortune, presenta maduración tardía, pero no ha mostrado un éxito total en algunas zonas templadas, debido a su alta susceptibilidad a *Alternaria alternata* pv. *Citri* (Ollitrault y Navarro 2012).

Ollitrault y Navarro (2012), indican que los híbridos naturales han sido una fuente importante de nuevos cultivares. La primera en aparecer fue 'Clementina' (*C. clementina* hort. ex Tanaka) a principios del siglo pasado en el jardín de un orfanato en Argelia, como una cruce natural entre mandarina y naranja dulce. Las clementinas son ahora las principales mandarinas cultivadas en la zona mediterránea, en varios países de América y Sudáfrica. Otros híbridos de importancia son las mandarinas 'Ponkan', cultivada ampliamente en los países asiáticos y Brasil, 'Murcott' cultivada en Florida y Brasil el 'Imperial' y 'Ellendale' descubiertas en el siglo XIX en Australia, y el tangor 'Ortanique' (*C. reticulata* x *C. sinensis*), descubierto en Jamaica en 1920. Un híbrido natural más reciente que está alcanzando un desarrollo comercial significativo por su maduración tardía es la mandarina 'Afourer' o 'Nadorcott' probablemente un híbrido entre 'Murcott' y una mandarina, descubierta en Marruecos.

Con respecto a los cultivares triploides sin semillas, estos han sido liberados en Italia, EE.UU., Japón, y España. Ejemplo de estos son el cultivar 'Tacle'

(Starrantino, 1999), un tangor que se obtuvo en Sicilia cruzando al diploide 'Clementina' con la naranja dulce 'Tarocco'. autotetraploide. Otros híbridos triploides de Tangor y mandarinas así como algunos tipos de limón, se han publicado recientemente por el mismo grupo (Russo *et al.*, 2004). En California se liberaron tres híbridos triploides de mandarina de media y finales de temporada (Williams y Roose 2004). En Japón, un híbrido triploide de *C. sudachi* obtenido de una cruce de un diploide y un genotipo tetraploide se ha presentado para su registro (Tokunaga *et al.*, 2005). En España se han registrado 13 híbridos triploides obtenidos de cruces $2x \times 2x$ usando mandarina 'Fortuna' como progenitor femenino y dos de ellos ya fueron liberados para su propagación comercial (Navarro *et al.*, 2006; Aleza *et al.*, 2010b; Cuenca *et al.*, 2010).

Los programas de mejoramiento en cítricos están dirigidos principalmente a mejorar el color de la fruta, tamaño, forma, sabor, y el rendimiento, así como a la obtención de variedades con bajo contenido de semillas, fácil pelado y resistencia a factores bióticos y abióticos. El objetivo principal de mejoramiento de cultivares varía según las especies y localidades (Pensabene, 2009). Entre los métodos de mejoramiento genético empleados destacan: la mutagénesis inducida, hibridación somática, y la hibridación sexual.

2.2.1 Mutantes o variantes naturales e inducidos

La selección de mutantes espontáneos es el método más antiguo del mejoramiento de cítricos. La mayoría de las variedades cultivadas en todo el mundo se han obtenido mediante este proceso. España, Marruecos y Córcega han desarrollado clementinas con períodos de producción prolongados, mayor tamaño y color del fruto. En Japón, la diversificación de la mandarina Satsuma (*C. Unshiu*), naranjas dulces limones y pomelos se han desarrollado por este método. Las mutaciones en los meristemas pueden conducir a la formación de quimeras como se ha reportado en algunos pomelos rojos o rosas, naranja dulce Shamouti,

y algunos limones. Algunas quimeras variegadas son de interés para fines ornamentales (Ollitrault y Navarro 2012).

La mutagénesis inducida para el mejoramiento de cultivos se ha utilizado en varias ocasiones desde 1935. La irradiación gamma ha sido el método más común. Se puede inducir una amplia gama de mutaciones (puntuales, rompimiento y rearrreglo de cromosomas). Este último es particularmente interesante para la selección de fruta sin semilla (Hearn 1984) debido a translocaciones e inversiones que pueden causar esterilidad. Roose y Williams (2007) recomiendan la exposición de injertos de 30 a 50 Gy para inducir mutantes sin semillas. Ejemplos clásicos de cultivares obtenidos por los programas de irradiación son el pomelo, 'Star Ruby' de pulpa roja obtenida por irradiación de semillas de pomelo Hudson (*C. paradisi* Macf.) (Hensz, 1971) y más recientemente la selección de mandarina 'Murcott' (*C. reticulata* Blanco) llamada 'Mor', producida por la mutación de yemas (Vardi *et al.*, 1993) y la mandarina sin semilla 'Tango' producida por irradiación de yemas de 'Afourer' (Nadorcott) (Roose y Williams 2007). En España, irradiando ápices de clementina (*C. clementina* hort. ex Tanaka) 'Clemenules' se obtuvo la variedad 'Nulessin' (Asins *et al.*, 2002), se caracteriza por una fertilidad reducida. La variación somaclonal se ha utilizado con éxito en Florida para el mejoramiento de naranja dulce (Grosser *et al.*, 2007), esto con el objetivo de extender el período de cosecha, mejorar las características de calidad y reducir el contenido de semillas en la fruta.

2.2.2 Hibridación somática

La hibridación somática a partir de la fusión de células o de protoplastos derivados de células somáticas, surgió hace unos 30 años como una herramienta muy promisoriosa para sortear problemas de incompatibilidad precigótica (Polci y Friedrich, 2010) entre especies y géneros, proporcionando así una alternativa biotecnológica eficiente para el mejoramiento de cultivos (Bajaj, 1994). Desde el primer informe de éxito en la hibridación somática en tabaco (Carlson *et al.*, 1972),

durante los últimos 40 años, cientos de informes se publicaron para extender los procedimientos a géneros de plantas adicionales y evaluar el potencial de la utilización de híbridos somáticos en muchos cultivos incluyendo cítricos (Grosser y Gmitter, 2011). El primer híbrido somático entre *C. sinensis* (L.) Osb y *P. trifoliata* se obtuvo por Ohgawara *et al.* (1985). A partir de eso, cientos de híbridos somáticos alotetraploides se han producido tanto para el mejoramiento de variedades de copa como para portainjerto (Grosser y Gmitter, 1990, 2005; Grosser *et al.*, 2000). La hibridación somática ha demostrado ser una herramienta clave para generar progenitores alotetraploides para su uso posterior en cruzas interploides y de esa forma obtener triploides sin semilla de mandarinas pomelos toronjas limas y limones (Grosser y Gmitter, 2005, 2009; Vilorio y Grosser, 2005).

2.2.3 Hibridación interploide

Se le conoce como hibridación Interploide, a la cruce entre dos genotipos con diferentes niveles de ploidía del mismo o diferente género o especie (Bauer, 2006). Esta, es una herramienta útil para la introducción de rasgos genéticos en el desarrollo de nuevos cultivares y mejoramiento de los mismos (Van *et al.*, 2005).

Las cruzas interploides proporcionan un medio para aumentar la heterocigosidad por la poliploidización sexual en comparación con la asexual inducida (Yan *et al.*, 1997, Beuselinck *et al.*, 2003). A pesar de esto, la hibridación interploide se ha reportado en pocos cultivos, incluidos los cítricos (Jaskani *et al.*, 2005, Recupero *et al.*, 2005), uvas (Park *et al.*, 2002), y plátano (Pillay *et al.*, 2006; Jenny *et al.*, 2003) con el objetivo de producir frutos sin semilla. También se reportan en plantas ornamentales para obtención de nuevas características de flor y follaje (Van *et al.*, 2005; Olsen y Ranney, 2006; Sakay *et al.*, 2008).

La hibridación sexual interploide es una de las líneas de investigación que se está abordando en programas de mejoramiento genético de países productores de cítricos (Ollitrault *et al.*, 2002; Tusa *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 2002; Grosser *et*

al., 2000; Grosser y Gmitter, 2005). Esta alternativa gana mayor fuerza por la riqueza de los híbridos somáticos alotetraploides que se están produciendo por la hibridación somática (Grosser *et al.*, 2000) y que pueden ser utilizados como progenitores en los nuevos cruzamientos (Khan y Grosser, 2004).

Actualmente existen programas de mejoramiento genético de cítricos en varias partes del mundo y sus trabajos están enfocados principalmente a la generación de variedades de fruta sin semilla o producción de genotipos para uso como portainjertos pero que integren además de buena compatibilidad con las variedades, tolerancia a patógenos y adaptación a suelos con salinidad y carbonatos de calcio (Grosser *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2002; Tusa *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 2002; Grosser y Gmitter, 2005; Cristofani *et al.*, 2002; Shi-Ping *et al.*, 2009; Liu y Deng, 2007; Soares-Filho, 2007).

Las cruzas interploides, ya sea diploide x tetraploide o su recíproca se están utilizando cada vez más en los cítricos para generar híbridos sin semillas (Oiyama y Kobayashi, 1990; Roose y Williams, 2000; Startino, 1992; Tusa *et al.*, 1996). Algunos reportes indican que al cruzar genotipos de cítricos diploides (2x) con genotipos tetraploides (4x) es posible obtener segregantes triploides (3x) (Cameron y Burnett, 1978; Cameron y Soost, 1969; Esen y Soost, 1972; Oiyama, 1991; Starrantino y Recupero, 1982). Las evidencias más recientes de variedades triploides de cítricos obtenidas por hibridación sexual interploide son las variedades de toronja, 'Oro Blanco' y 'Melogold' que fueron desarrolladas en California (Soost y Cameron, 1980; 1985). Al igual que la mayoría de los cítricos, el limón mexicano es diploide (2x), pero se cuenta con genotipos tetraploides (4x). Al cruzar esta especie vía hibridación sexual con genotipos tetraploides ($2n = 4x$) que contengan características de tolerancia a problemas fitosanitarios es posible generar variedades triploides sin semillas tolerantes a esos problemas.

2.2.4 Importancia de los cítricos triploides

Todas las especies de cítricos diploides cultivadas derivan de cuatro taxones (*C. reticulata*, *C. maxima*, *C. médica* y *C. micrantha*) (Barkley *et al.*, 2006; Bayer *et al.*, 2009.; Froelicher *et al.*, 2011; Nicolosi *et al.*, 2000;). El interés por las variedades de cítricos tetraploides fue provocado por la estrategia de desarrollar cultivares triploides sin semilla, al cruzar genotipos diploides con genotipos tetraploides (Esen y Soost, 1972; Ollitrault *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008).

Dicho interés surgió debido al número excesivo de semillas que presentan algunos cítricos y que estaba siendo inaceptable en los mercados internacionales (Jin-Hu y Mooney, 2002). Por lo tanto, la importancia de la selección de nuevos híbridos que presenten ausencia de semillas se hizo patente. Esto es difícil de lograr utilizando los métodos de reproducción normal (Soost y Cameron, 1975; Gmitter y Ling, 1991; Tusa *et al.*, 1996), pero gracias a los avances en el campo del cultivo de tejidos vegetales y la manipulación del número de cromosomas, es posible obtener líneas comerciales de cítricos triploides (Krug y Bacchi, 1943; Soost y Cameron, 1980, 1985).

Una serie de diferentes enfoques incluida la biotecnología molecular, se han utilizado para inducir progenie triploide sin semillas. Estos enfoques incluyen:

- La selección de triploides espontáneos de la progenie derivada de la cruce de 2x X 2x (Esen y Soost, 1971; Geraci *et al.*, 1977; Geraci, 1978);
- Variación somática *In vitro* (Deng *et al.*, 1985.)
- Cultivo *in vitro* de endospermos (Wang y Chang, 1978; Gmitter *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1991);
- Hibridación somática a partir de fusión de protoplastos de diploides con haploides (Kobayashi *et al.*, 1997.)
- Hibridación interploide de padres diploides con tetraploides (Esen y Soost, 1972; Vilorio *et al.*, 2005),
- Transformación genética (Koltunow *et al.*, 1998).

Según Jin-Hu y Mooney (2002), pese a la falta de reproducción adecuada de padres tetraploides que ha obstaculizado el progreso hacia el desarrollo de una amplia gama de cultivares de calidad sin semilla, el uso de la hibridación interploide entre plantas 4x X 2x ha sido el método más eficaz para obtener progenie triploide. Aunque este método es más eficiente si se utiliza al tetraploide como progenitor femenino (Esen y Soost, 1972; Soost y Cameron, 1975; Cameron y Burnett, 1978). El uso de progenitores tetraploides poliembriónicos puede reducir la eficiencia de la hibridación interploide, a través de la supresión del desarrollo del embrión cigótico. Esto dará como resultado el aborto del embrión en el estado temprano de su desarrollo, por lo que se requiere la utilización de rescate de embriones en estado inmaduro a través de cultivo de tejidos. Por lo anterior la utilización de progenitores femeninos tetraploides poliembriónicos requiere de la identificación y selección de plántulas cigóticas (Jin-Hu y Mooney, 2002).

2.2.5 Limitantes en el mejoramiento genético de cítricos

Las estrategias de mejoramiento de cítricos toman ventaja de su capacidad de propagación vegetativa e integran los avances de la biotecnología. El mejoramiento convencional tiene importantes limitaciones debido a la compleja biología reproductiva de estas especies. La mayoría de los genotipos son apomícticos con excepción de las cidras, clementinas y algunas mandarinas. El fenómeno de la apomixis, también conocida como embrionía nucelar o poliembriónía origina embriones directos de las células maternas, que dan como resultado embriones con una constitución genética idéntica a la de la planta madre (García *et al.*, 1999; Aleza *et al.*, 2010). Estos embriones limitan o excluyen en etapas muy tempranas de su desarrollo a los embriones cigóticos (Moore *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1979; Ruiz *et al.*, 2000). Este fenómeno limita la recuperación de plántulas sexuales, por lo que en muchos programas se evitan los genotipos apomícticos como progenitores femeninos, los que presentan alta esterilidad de polen y/u óvulos, así como los que presentan incompatibilidad en las

cruzas. La apomixis también es un problema importante en el mejoramiento de cítricos, ya que interrumpe la segregación y recombinación en las siguientes generaciones de plantas y limita en gran medida la variabilidad genética obtenida por polinización controlada y en la mayoría de las combinaciones de cruzas no sería posible determinar el origen genético de la morfología de las plantas (Pérez-Tornero y Porras, 2008).

Otra limitante en el mejoramiento genético de cítricos es el largo periodo juvenil, que en la mayoría de las especies de cítricos se requieren al menos 5 años para iniciar la floración y otros más para que se pierdan los caracteres no deseables como por ejemplo tamaño de las espinas, carácter asociado con la juvenilidad.

2.2.6 Rescate y germinación *in vitro* de embriones inmaduros

Aunque el fenómeno de la apomixis ha obstaculizado el mejoramiento genético de los cítricos mediante hibridación sexual, hoy día este método ha ganado eficiencia gracias a la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* que permiten el rescate y cultivo de embriones cigóticos en estado inmaduro y de esta forma lograr el desarrollo de las plantas híbridas (Viloria *et al.*, 2005). Esta es una herramienta muy útil para superar el problema de aborto o muerte prematura de embriones en trabajos de hibridación sexual de cítricos y mediante esta estrategia, muchas plantas triploides han sido obtenidas por cruzamientos interploides, (Ollitrault *et al.*, 2002; Tusa *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 2002; Grosser *et al.*, 2000; Grosser y Gmitter, 2005; Viloria *et al.*, 2005; Mei-lian *et al.*, 2007).

2.3 Métodos de Identificación de Híbridos

La generación de progenie cigótica puede requerir de pruebas morfológicas, histoquímicas, isoenzimas, citológicas e incluso técnicas moleculares para su identificación y selección (Jin-Hu y Mooney, 2002; Tusa *et al.*, 2002).

2.3.1 Marcadores moleculares

Debido a la heterocigosidad de los progenitores y el largo período juvenil, el desarrollo de marcadores enfocado a la introgresión y selección temprana es la clave para hacer más eficiente el mejoramiento sexual de cítricos.

Los marcadores moleculares son herramientas útiles para el análisis de las variaciones genéticas y proporcionan un medio eficiente para vincular la variación fenotípica y genotípica (Varshney *et al.*, 2005). En los últimos años, el progreso en el desarrollo de sistemas basados en marcadores de ADN ha ayudado a la comprensión de los recursos genéticos. Estos marcadores moleculares se clasifican como: a) la hibridación basada en marcadores es decir, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980), b) marcadores basados en la PCR, la amplificación aleatoria de ADN polimórficos (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Vos *et al.*, 1995), entre-secuencias simples repetidas (ISSR) y los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) (Litt y Luty, 1989) y c) la secuencia basada en marcadores es decir, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Varshney *et al.*, 2007;. Sehgal y Raina, 2008). La mayoría de estos marcadores moleculares se han desarrollado ya sea de la biblioteca de ADN genómico (por ejemplo, RFLP o SSRs) o de la amplificación al azar por PCR de ADN genómico (RAPD) o ambos (AFLP) (Varshney *et al.*, 2007).

2.3.2 RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) o ADN polimórfico amplificado aleatoriamente.

La metodología de RAPD fue desarrollada de forma independiente por dos grupos de Estados Unidos. Un grupo la denominó RAPD y el otro AP-PCR (Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores arbitrarios). La técnica es una variante de PCR que utiliza un solo

oligonucleótidos de 10 bp con la capacidad de unirse a regiones específicas en el genoma (Valadez y Kahl, 2000).

En los estudios de herencia, los productos de amplificación se comportan como marcadores dominantes. Los marcadores RAPD se basan en una técnica sencilla de bajo costo de implementación, automatizable y no radioactiva. A diferencia de los marcadores basados en PCR convencional no se requiere información nucleotídica previa para su desarrollo, se dispone de un número ilimitado de marcadores y el nivel de loci polimórficos es alto. La desventaja principal de esta técnica es su baja reproducibilidad entre laboratorios, en el sentido de que pequeñas modificaciones en la técnica como la concentración inicial de ADN, modelo de termociclador, origen de ADN, Polimerasa termoestable, etc., pueden alterar el patrón de fragmentos de ADN generados por RAPD de una muestra (Vermerris, 2008).

Siragusa *et al.* (2006), reportan la utilización de este tipo de marcadores para identificar accesiones de *C. aurantium* y su variabilidad genética. Nageswara *et al.*, 2008, los utilizaron para identificar embriones cigóticos y nucelares en cruces hechas entre mandarina y pomelo.

2.3.3 AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) o polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados

Los marcadores AFLP constituyen una herramienta poderosa de análisis del genoma dado que poseen un alto poder de detección de la variabilidad genética sin requerir información previa sobre su secuencia, son en su mayoría dominantes y altamente reproducibles (Azofeifa-Delgado, 2006). Según Martínez *et al.* (2010) desde su desarrollo y divulgación esta técnica se utiliza ampliamente en el análisis de plantas.

Estos marcadores se pueden utilizar en estudios que implican la identidad genética, la paternidad y la identificación de clones y cultivares, y estudios filogenéticos de especies estrechamente relacionadas (Spooner *et al.*, 2005). La técnica se ha utilizado en algunos cultivares de cítricos con diferentes objetivos. Kepiro y Roose (2010), evaluaron la poliembrionia nucelar en híbridos de pomelo 'Chandler' con *P. trifoliata* utilizando AFLP. Guo *et al.* (2000), utilizaron estos marcadores para confirmar híbridos somáticos intergenéricos entre *C. reticulata* y *P. trifoliata*. Bastianel *et al.* (2009), realizó un estudio para identificar loci de rasgos cuantitativos (QTLs) en un mapa de ligamiento utilizando AFLPs. Xiao-Yong *et al.*, 2007, caracterizaron brotes de híbridos somáticos entre *C. unshiu* y *C. sinensis*.

2.3.4 Marcadores Microsatélites

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas ocasionalmente por todo el ADN (Azofeifa-Delgado, 2006). Estos marcadores también denominados como Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP), Simple Sequence Repeat Polymorphism (SSRP), Simple Sequence Repeats (SSR) o Sequence Tagged Microsatellite Sites (STMS) se encuentran distribuidos por todo el genoma de la mayoría de las especies eucariotas (Martínez *et al.*, 2010).

Entre todos estos marcadores los SSR han adquirido una gran importancia en la genética de las plantas y el mejoramiento debido a muchos atributos deseables, incluyendo hipervariabilidad, naturaleza multialelica, herencia codominante, reproducibilidad, abundancia relativa, una amplia cobertura del genoma (incluyendo genomas de organelos), localización cromosómica específica, susceptibilidad a la automatización y genotipado de alto rendimiento (Parida *et al.*, 2009). Los microsatélites (Litt y Luty, 1989), diversamente conocidos como repeticiones cortas en tándem (STRs, Edwards *et al.*, 1991), secuencias simples repetidas (SSR, Jacob *et al.*, 1991) o Simple polimorfismo de longitud de la

secuencia (SSLP, Tautz, 1989) son tándem repetidas de 1-6 pares de bases que tienen una frecuencia en todos los genomas procariotas y eucariotas analizados hasta la fecha (Zane *et al.*, 2002).

Algunos SSR de cítricos, principalmente di- y tri-nucleótidos, se han clonado a partir de una biblioteca genómica para la evaluación, caracterización, identificación de cultivares y mapeo genético de cítricos (Kijas *et al.*, 1997). Ruiz *et al.* (2000), utilizaron SSR para identificar plantas sexuales de cruces entre *P. trifoliata* (L.) Raf. var. 'Flying Dragon' y ttangor 'Ortanique'. Ferrante *et al.* (2010), identificaron con SSR, la procedencia de híbridos tetraploides obtenidos espontáneamente de diferentes cruces interploides ($2x \times 4x$) entre limón 'Femminello' diploide y el híbrido somático alotetraploide ($2n = 4x = 36$) de limón mexicano + Naranja 'Valencia y entre las mandarinas diploides 'Wilking' y 'Fortune' y la mandarina 'Dancy' autotetraploide ($2n = 4x = 36$).

2.3.5 Isoenzimas

Las isoenzimas han sido muy utilizados y aún se consideran un método de caracterización eficaz y fácil de emplear. Las isoenzimas más empleadas en la caracterización de híbridos somáticos de cítricos son la peroxidasa (Tusa *et al.*, 1990; Deng *et al.*, 1992; Grosser *et al.*, 1992), la fosfogluco-mutasa (Grosser *et al.*, 1992; Tusa *et al.*, 1992) y la fosfogluco-isomerasa (Tusa *et al.*, 1990; Tusa *et al.*, 1992). La principal desventaja que presenta el análisis con isoenzimas es el limitado número de isoenzimas porlimórficas conocidas, por lo que muchos híbridos intraespecíficos y algunos interespecíficos no se pueden distinguir de sus progenitores (Pensabene, 2009).

2.3.6 Citometría de flujo

La citometría de flujo desarrollada para la investigación médica es ahora ampliamente utilizada para el análisis del contenido de ADN de las plantas

(Arumuganathan y Earle, 1991). Esta técnica permite una estimación del volumen y la fluorescencia de las células o núcleos aislados. La sonda fluorescente cuantifica el contenido de ADN nuclear. Un número elevado (104 a 106 núcleos / minuto) pueden ser rápidamente analizados y los resultados se presentan como un histograma integral de la fluorescencia. La posición del pico en el eje es proporcional al contenido de ADN de los núcleos. En general, al analizar hojas jóvenes, dos picos se obtienen. De acuerdo con el ciclo celular, el primero se define por los núcleos de los ciclos celulares (G0) o el ADN antes de la etapa de síntesis (G1), mientras que la segunda representa los núcleos de ADN después de la síntesis de la etapa de la mitosis. Se recomienda el uso de un control interno (los núcleos con el contenido de ADN ya conocido o núcleos de genotipos de la misma especie con la ploidía identificada) para la determinación del tamaño absoluto del genoma o nivel de ploidía de la muestra.

El interés de la citometría de flujo para el análisis de la ploidía de cítricos y para el mejoramiento de poliploides fue enfatizado por primera vez por Ollitrault y Michaux-Ferrière (1992). Desde esa fecha, esta técnica ha abierto una nueva vía para la manipulación de la ploidía de cítricos. La citometría de flujo se utiliza ahora como una herramienta de rutina para la identificación de plantas con diferente nivel de ploidía en programas de mejoramiento de cítricos, tanto para las progenies sexuales como para los híbridos somáticos.

2.3.7 Caracteres morfológicos

Entre las dos clases de marcadores genéticos, se encuentran los morfológicos. Tradicionalmente la identificación y caracterización de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos. (Rallo *et al.*, 2002). La selección morfológica se basa en la detección de variaciones fenotípicas en el híbrido al compararlo con los progenitores (Lindsay *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2004). Algunas características, como el tipo de crecimiento (tallo erecto, tallo rastrero o semirastrero) y color de la flor, hojas trifoliadas como las del progenitor

Poncirus (Pensabene, 2009), han sido utilizadas para este fin (Mendis *et al.*, 1991). Este tipo de marcadores presenta muchas limitantes pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos. Un ejemplo de esto es la presencia o ausencia de espinas en los cítricos (Azofeifa-Delgado, 2006).

La identificación morfológica, sin involucrar otro tipo de marcador, tiene el problema de que es necesario cultivar la mayor cantidad de plantas posible, junto con los progenitores durante un período de tiempo considerable, hasta que las características se manifiesten, para luego realizar la selección al comparar los fenotipos. Por otra parte, pueden ocurrir cambios epigenéticos que limiten el número de marcadores que pueden ser evaluados sin equivocación en la población segregante. La selección en etapas tempranas de desarrollo, por medio de metodologías que no requieran la regeneración de gran cantidad de plantas que luego serán desechadas, evita, en gran medida, esta problemática (Hammatt *et al.*, 1990).

2.4 Importancia del Cultivo de Limón Mexicano

A nivel internacional se cultivan tres especies de cítricos ácidos que precisamente por su sabor ácido y el uso que el consumidor les da, son considerados como limones: el limón mexicano o lima key el limón persa (*C. latifolia* Tanaka) y limón italiano o verdadero. Botánicamente, tanto el primer cultivo como el segundo, no son propiamente limones ya que en realidad pertenecen al grupo de las limas ácidas (Medina *et al.*, 2001).

En la región del Pacífico mexicano se cultivan aproximadamente 83,317 Ha con limón mexicano. Los principales estados productores son Michoacán, Colima, Oaxaca y Guerrero. La producción anual de fruta es superior a 1,041 millones de toneladas, que alcanzan un valor estimados de 2,535 millones de pesos (SIAP, 2013). Esta agroindustria genera una gran cantidad de empleos para diversas actividades que se desarrollan ya sea en el campo, en las empacadoras, la industria, el transporte y la comercialización de fruta o subproductos. Además

existe un gran número de viveros dedicados a la producción de plantas de cítricos y proveedores de insumos para los distintos eslabones de esta cadena productiva, que se benefician con este cultivo.

2.5 Problemas Fitosanitarios del Limón Mexicano

En los últimos años el cultivo del limón mexicano ha venido enfrentando nuevos retos, planteados principalmente por problemas fitosanitarios, que amenazan su permanencia como la actividad agrícola más importante para el estado de Colima y de gran relevancia en Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Destacan las enfermedades de tipo fungoso como la antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) que se presenta durante el periodo de lluvias y que afecta el rendimiento y la calidad de fruta en los meses de otoño-invierno. Debido a lo anterior la economía de los productores se ve impactada de manera negativa, ya que para su control se efectúan numerosas aspersiones de fungicidas con una inversión anual cercana a los 45 millones de pesos, lo cual incrementa notablemente los costos de producción (Orozco-Santos *et al.*, 2005). Además es conocido que el uso frecuente de pesticidas impide el establecimiento de la entomofauna benéfica encargada del control biológico de plagas y enfermedades, se favorece la contaminación del medio ambiente y aumentan los riesgos de daños a la salud humana.

La tristeza es una enfermedad causada por el Virus tristeza de los cítricos (VTC), a menudo referida como el complejo del Virus tristeza de los cítricos (Nikolaeva *et al.*, 1996); es también la enfermedad de tipo viral de mayor importancia económica que afecta al cultivo de los cítricos a nivel mundial (Rocha-Peña *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 1998; Barzegar *et al.*, 2006) ha causado epidemias en Argentina, Brasil, Venezuela, Israel, España y los Estados Unidos, por nombrar sólo algunos (Bar-Joseph *et al.*, 1989, Rocha-Peña *et al.*, 1995, Moreno *et al.*, 2008) y ha sido responsable de la pérdida de más de 100 millones de árboles reportados como muertos o improductivos durante el siglo pasado (Moreno *et al.*, 2008).

En México para hacer frente al VTC, se implementó una estrategia de reconversión que consiste en promover la sustitución de las plantaciones de cítricos donde se usa como portainjerto al naranjo agrio (sensible a VTC), por plantas injertadas sobre portainjertos tolerantes y de esa manera prevenir el daño en cítricos (Robles-García, 2005). Sin embargo, en el caso del limón mexicano esta estrategia no resuelve el problema de tristeza, ya que esta especie es afectada por VTC aunque se usen portainjertos tolerantes. Se debe considerar que los tres elementos que favorecen una epidemia de tristeza son: la planta susceptible (limón mexicano), el organismo vector (pulgón café) y el patógeno (VTC); éstos están presentes en México y se anticipa que solo es cuestión de tiempo para que se presente una epidemia que sin duda causará un colapso en la agroindustria, como ha ocurrido con otros cítricos en otras regiones (Whiteside *et al.*, 1998; Orozco-Santos, 1994).

La enfermedad del huanglongbing (HLB) es considerada actualmente como la más devastadora para los cítricos a nivel mundial siendo más peligrosa aun que el VTC (Halbert y Manjunath, 2004; Bové, 2006; Beattie *et al.*, 2008; da Graça, 2008, 2010; Manjunath *et al.*, 2008). El principal organismo asociado a los síntomas del HLB es una bacteria de tipo Gram-negativa, la cual está restringida al floema de las plantas hospederas y que es conocida como *Candidatus Liberibacter* spp. Esta bacteria es diseminada de manera natural por el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), insecto presente en Colima desde el 2004 (Bové, 2006).

En México el HLB fue detectado por primera vez en julio de 2009 en árboles de traspatio en el municipio de Tizimín en el estado de Yucatán. En ese mismo año también fue encontrado en Nayarit y Jalisco (Trujillo, 2010a). Para el 2010, se informó de la presencia de esta enfermedad en un predio cercano a la costa, en la zona productora de limón mexicano en el estado de Colima (Trujillo, 2010b). A partir de esa primera detección, mes a mes se fueron registrando más árboles que

presentan síntomas de HLB en todas las zonas productoras de cítricos de la entidad hasta completar el 100% en el 2013 (Robles *et al.*, 2013).

Para hacer frente y reducir los impactos de enfermedades emergentes y de alto riesgo, se requiere generar nuevas variedades con resistencia o mayor tolerancia a estas enfermedades y de esta forma conservar el cultivo de limón mexicano en el país. El INIFAP-Colima viene realizando un programa de mejoramiento genético de limón mexicano mediante hibridación sexual interploide, auxiliado por las técnicas de rescate y cultivo *in vitro* de los embriones en estado inmaduro. Estos trabajos han generado cerca de 2500 plantas, muchas de las cuales son probablemente híbridas interespecíficas e intergenéricas.

Como se mencionó anteriormente muchos cultivares de cítricos producen semillas apomíticas por un mecanismo denominado embrionía nucelar debido a que la embriogénesis adventicia se inicia a partir de las células del tejido nucelar que rodea el saco embrionario (Kobayashi *et al.*, 1979). Estos embriones son genéticamente idénticos al progenitor materno. Dicha característica es utilizada para propagar plantas genéticamente uniformes para su uso como portainjertos para cítricos. En muchas variedades, un embrión sexual (cigoto) también se puede desarrollar dentro de la misma semilla (Kepiro y Roose, 2010). Los embriones cigóticos tienen dificultades para sobrevivir (Esen y Soost, 1977), ya que deben competir por nutrientes y espacio con los embriones que se desarrollan a partir de tejido nucelar (Soost y Rose, 1996). Por lo tanto, una sola semilla de cítricos puede contener uno o más embriones de los cuales puede existir uno que fue producido sexualmente. Tales semillas se denominan poliembriónicas y los cultivares que las producen se dice que son poliembriónicos. Existen genotipos con poliembriónía que pueden producir muchas semillas pero puede germinar sólo una plántula ya sea nucelar o cigótica (Kepiro y Roose, 2010).

El porcentaje de semillas que contienen múltiples embriones y la proporción de plantas que son de origen sexual vs nucelar, varían considerablemente con el

cultivar (Kepiro y Roose, 2010). Los cultivares que producen una alta proporción de semillas de las que emergen múltiples plántulas también producen un alto porcentaje de plantas nucelares (Soost y Roose, 1996). *C. máxima* variedad 'Merrill' producen sólo plántulas sexuales (cigóticas), mientras que muchos otros incluidos la naranja la toronja el limón algunas mandarinas y la naranja trifoliada producen semillas poliembriónicas que contienen embriones nucelares. En los cultivares que presentan embrionía nucelar, los datos fenotípicos de las cruces y estudios de marcadores moleculares muestran que la proporción de plantas que son de origen nucelar varía ampliamente (Ruiz *et al.*, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo sobre identificación de plantas híbridas se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México y en Laboratorio de Biotecnología de plantas del Campo Experimental Tecomán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Tecomán, Colima, México.

Para el estudio se utilizó una población de 203 plantas originadas de 13 cruzas (cuadro 1) realizadas en los años 2009 al 2012 en Campo Experimental Tecomán del INIFAP entre genotipos de limón mexicano con limones italianos, citranges e híbridos somáticos, estos últimos generados por la fusión de protoplastos de citranges y naranjo dulce

Cuadro 1. Árboles progenie de cruzas interploides e intergenericas entre limón mexicano con limones italianos y citranges.

Número de craza	Cruza		Número de muestra	Año de craza
	♀	♂		
1	Rosenberg (2x)	X Colimex (2x)	20	2009
2	Colimex (2x)	X Rosenberg (2x)	14	2009
3	Mex13' (4x)	X Limoneira 8a (2x)	12	2010
4	Mex13 (4x)	X Rosenberg' (2x)	19	2010
5	Mex13 (4x)	X Eureka (2x)	10	2010
6	Rosenberg (2x)	X Mex20 (4x)	8	2010
7	Rosenberg (2x)	X Mex13 (4x)	7	2010
8	Mex13 (4x)	X C-35 (2x)	50	2011
9	Colimex (2x)	X HS11 (4x)	21	2011
10	Colimex (2x)	X Limequat (2x)	6	2012
11	Colimex (2x)	X C-32 (2x)	17	2012
12	Colimex (2x)	X C-Swingle (2x)	8	2012
13	Colimex (2x)	X CitrangeYuma (2x)	11	2012

2x= diploide, 3x= triploide, 4x= tetraploide

3.1 Identificación de híbridos en base a caracteres morfológicos

Para la identificación de híbridos se utilizaron como marcadores algunos caracteres morfológicos que presentan los progenitores. Las plantas en estudio se revisaron para detectar y seleccionar aquellas que mostraron: 1) presencia de antocianinas en los brotes tiernos, en las yemas vegetativas o en botones florales como tienen los limones italianos, 2) presencia de hojas compuestas como en los citranges y 3) hojas coriáceas de mayor espesor y glándulas de aceite abultadas como en genotipos de limón mexicano tetraploides (figura 1).



Figura 1. a) Presencia de antocianinas en brotes tiernos, b) y en botones florales, c) hojas compuestas y d) hojas coriáceas de mayor espesor y glándulas de aceite abultadas.

3.2 Identificación de híbridos mediante su nivel de ploidía

Las plantas que resultaron de las cruzas entre genotipos 2x X 4x y su recíproca y que mostraron características de poliploidía como hojas compuestas, coriáceas de mayor espesor y glándulas de aceite abultadas se sometieron al análisis de ploidía. Para ello, se utilizaron hojas jóvenes del brote terminal. Se tomó una porción de 0.5 cm² de hoja, se agregó 500 µl de DAPI Staining Solution y se fraccionó muy finamente con una navaja de afeitar, lo más rápido posible. Posteriormente se agregaron 1000 µl más de la solución DAPI y se mezcló durante 30 segundos. Después la muestra se pasó por un filtro de 30 µm y se colocó en un tubo de ensayo de 3.5 ml para su posterior análisis en el citómetro de flujo marca PARTEC. El citómetro de flujo se estandarizó utilizando a limón mexicano diploide, limón persa triploide y al genotipo tetraploide 'Mex13' de limón mexicano al inicio de cada uso. El análisis de datos se realizó con el programa CyView versión 2.2-DNA-DAPI de Partec, que definió los picos o los grupos de partículas con absorbancia parecida y proporcionó algunos parámetros representativos como la media de absorbancia del pico, la mediana, coeficiente de variación etc. Los picos vienen definidos automáticamente por el citómetro y evidenciados en blanco.

3.3 Identificación de híbridos mediante marcadores moleculares

Se utilizó la técnica de marcadores genéticos denominados microsatélites (SSR). Esta prueba se realizó para detectar híbridos de limón mexicano en plantas obtenidas de cruza intra e interploides independientemente de que presentaron o no los marcadores morfológicos de los progenitores, pues en algunos casos el marcador morfológico no se observaron. En el caso de plantas con algún marcador genético o identificadas con el citómetro de flujo, la prueba ayudó a confirmar la condición híbrida de los genotipos progenie.

3.3.1 Extracción de ADN genómico

El ADN total fue extraído a partir de hojas jóvenes de acuerdo con el método de Doyle y Doyle, 1987, con modificaciones (Hernández, 2013). En un tubo eppendorf se depositó 0.1 g de tejido vegetal junto con 600µl de buffer salino y se trituró en un disruptor Retsch® MM400 a 25 frecuencias (f/s) por tres minutos. Posteriormente se resuspendió en buffer de extracción CTAB 2% (1.4 M NaCl, 100 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 8.0) y 3 µl de β-Mercaptoetanol al 100%. Se mezcló el contenido del tubo en vortex por 10 segundos y se incubó a 55°C por 30 minutos. A continuación se agregó 400µl de Fenol:Cloroformo:Alcoholisoamílico en una proporción 25:24:1 respectivamente, mezclando la muestra en vortex por 10 segundos. Se centrifugó la muestra por 10 minutos a 14000 rpm a 4°C y se colectó 500 µl de la fase acuosa evitando que las fases se mezclaran. Posteriormente se agregó 50 µl de acetato de amonio y 500 µl de isopropanol y se incubó la muestra por 10 minutos a temperatura de -20 °C. A continuación se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante sin perder la pastilla que se formó. Se adicionó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó por 1 minuto a 14000 rpm a 4°C. Transcurrido el tiempo, se secó la muestra a temperatura ambiente hasta la evaporación del etanol. Finalmente se resuspendió la pastilla en 50µl de agua libre de ARNasa y se almacenó la muestra a -20 °C. La calidad y pureza de ADN obtenido se corroboró en Nanodrop 2000.

3.3.2 Cuantificación de ADN

Se evaluó la calidad y pureza del ADN total de muestras vegetales por espectrofotometría de microvolúmenes en NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). El ADN se cuantificó a través de la lectura de absorbancia de luz ultravioleta (A). Se determinó la concentración de ácidos nucleicos a 260 nm. La pureza del ADN total y presencia de contaminantes se determinó calculando el cociente A260/A280 y A260/A230.

3.3.3 Amplificación por PCR

La amplificación por PCR de segmentos específicos de ADN mediante juegos de oligos reportados por Kijas *et al.* (1997) (cuadro 2), se realizó en un volumen total de 20 µl utilizando 10 µl de iTaq™ Universal Probes supermix BioRad^{MR} (dNTPs, iTaq ADN polimerasa, MgCl₂, potenciadores, estabilizantes, colorantes y normalización ROX) y 2.5 µl de cada iniciador Forward y Reverse. El programa de amplificación consistió en un ciclo a 94°C durante 5 min, seguido de 32 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 30 s y 72°C durante 1 min. Una extensión final de 4 minutos a 72°C. La temperatura de hibridación se redujo a 45°C durante 30 s para promover la amplificación del cebador TAA52 (Kijas *et al.*, 1997).

La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó en un termociclador Bio-Rad T100™ Thermal Cycler. Los productos de la amplificación de PCR, se analizaron en gel de acrilamida al 8% y se revelaron con nitrato de plata al 0.2%. Se usó un marcador de peso molecular de 1kb (invitrogen). Las condiciones de corrida de las muestra fueron 190 V y 200 mA por 90 min.

3.3.4 Análisis de datos

Para cada cruza, se realizaron dendogramas con datos de los cuatro iniciadores a partir de la identificación de presencia (1) o ausencia (0) de bandas, a través del método de agrupamiento pareado no ponderado con medias aritméticas (UPGMA) y distancia Eucladiana al cuadrado. Los análisis se realizaron con el uso del paquete estadístico Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc 2.21) (Rohlf, 2000).

Cuadro 2. Iniciadores de microsatélites utilizados en la detección de híbridos de limón mexicano.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Secuencia 3´-5´
TAA41	AGGTCTACATTGGCATTGTC	ACATGCAGTGCTATAATGAATG
TAA45	GCACCTTTTATACCTGACTCGG	TTCAGCATTGAGTTGGTTACG
TAA52	GATCTTGACTGAACTTAAAG	ATGTATTGTGTTGATAACG
cAGG9	AATGCTGAAGATAATCCGCG	TGCCTTGCTCTCCACTCC

3.4 Caracterización morfológica de híbridos de limón mexicano

A las plantas o genotipos que resultaron híbridos, se les hizo su caracterización morfológica de acuerdo al manual de descriptores para cítricos del Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI, 2000). En el cuadro 3 se muestran los 11 caracteres morfológicos registrados para los diferentes híbridos obtenidos. Adicionales a estos, para el caso de las cruzas de limón mexicano con limón italiano, se tomó la presencia o ausencia de antocianinas en brotes vegetativos tiernos y que en este clima solo es expresado por los limones italianos y para las cruzas de limón mexicano con citranges se utilizaron marcadores morfológicos como tipo de crecimiento de los árboles con ramas largas y erectas y el tipo de hoja compuesta o simple expresada por los citranges (Figura 2).



Peciole alado en limón mexicana



Peciole sin alas en limón Rosenberg



Ausencia de antocianinas en limón



Presencia de antocianinas en limón 'Eureka'



Hojas unifoliadas en limón mexicano



Hojas trifoliadas en citrange C-35

Figura 2. Caracteres morfológicos de los progenitores Limón Mexicano, Rosenber, 'Eureka' y citrange 'C-35' utilizados para la caracterización morfológica de híbridos

Cuadro 3. Caracteres morfológicos utilizados para la caracterización de híbridos obtenidos en las diferentes cruzas de limón mexicano

AF-Área foliar	PRT-Porte del árbol
ANT-Antocianinas	1 Limón mexicano
0 Ausente	2 Citrange
1 Presente	
DH-División de la hoja	MLF-Margen de lámina foliar
1 Simple	1 Crenado
2 Bifoliada	2 Dentado
3 Trifoliada	3 Entero
	4 Ondulado
ILF-Inserción de lámina foliar	AH-Ápice de la hoja
1 Sésil (ausencia de peciolo)	1 Atenuado
2 Brevipetiolada (petiolo más corto que lámina foliar)	2 Acuminado
3 Longipetiolada (petiolo más largo que lámina foliar)	3 Agudo
	4 Obtuso
	5 Redondeado
LLF-Longitud de lámina foliar	A/PA- Ausencia presencia de alas
1 Chica (< de 5 cm)	0 Ausente
2 Mediana (5 – 8 cm)	1 Presente
3 Grande (> 8 cm)	
ALF-Anchura de lámina foliar	AA-Anchura del ala
3 Angosta (< 3 cm)	3 Angosta
5 Mediana (3 – 5 cm)	5 Media
7 Ancha (> 5 cm)	7 Ancha
FLF-Forma de lámina foliar	FA- Forma del ala
1 Elíptica	1 Obcordiforme
2 Oval	2 Obdeltada
3 Oboval	3 Oboval
4 Lanceolada	4 Lineal
5 Orbicular	
6 Obcordiforme	

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de híbridos mediante su nivel de ploidía

En las Figuras 3, 4 y 5, se muestran algunos ejemplos de los múltiples histogramas obtenidos de los análisis con citometría de flujo de las 326 plantas obtenidas de las cruzas 2x x 4x y 4x x 2x. En la gráfica de la cruz 'Rosenberg' x 'Mex13' (Figura 3) se observa el nivel de absorbancia de las partículas analizadas (núcleos de las hojas teñidas), que es proporcional al tamaño del genoma analizado y el número de núcleos con el mismo nivel de absorbancia. Con 770 partículas analizadas, una media de 97 y un coeficiente de variación de 7.4, se definió la condición triploide de dicha cruz. La citometría de flujo ha demostrado ser útil para el rápido análisis de ploidía del ADN nuclear en cítricos y otras plantas, donde las técnicas citológicas clásicas son difíciles de realizar (Scarano *et al.*, 2002).

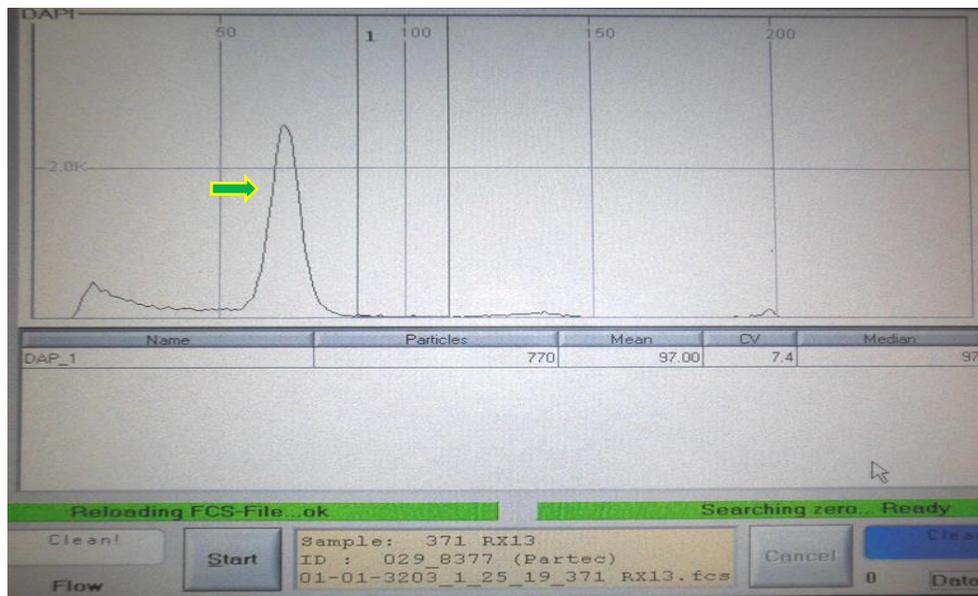


Figura 3. Histograma generado del análisis con citometria de flujo de la cruz 'Rosenberg' x 'Mex13'.

En la gráfica de la cruz 'Mex13' x 'Eureka' (Figura 4) se observa el nivel de absorbancia de las partículas analizadas (núcleos de las hojas teñidas), que es proporcional al tamaño del genoma analizado y el número de núcleos con el mismo nivel de absorbancia. Con 60 partículas analizadas, una media de 97 y un coeficiente de variación de 8.7, se pudo definir la condición triploide de dicha cruz.

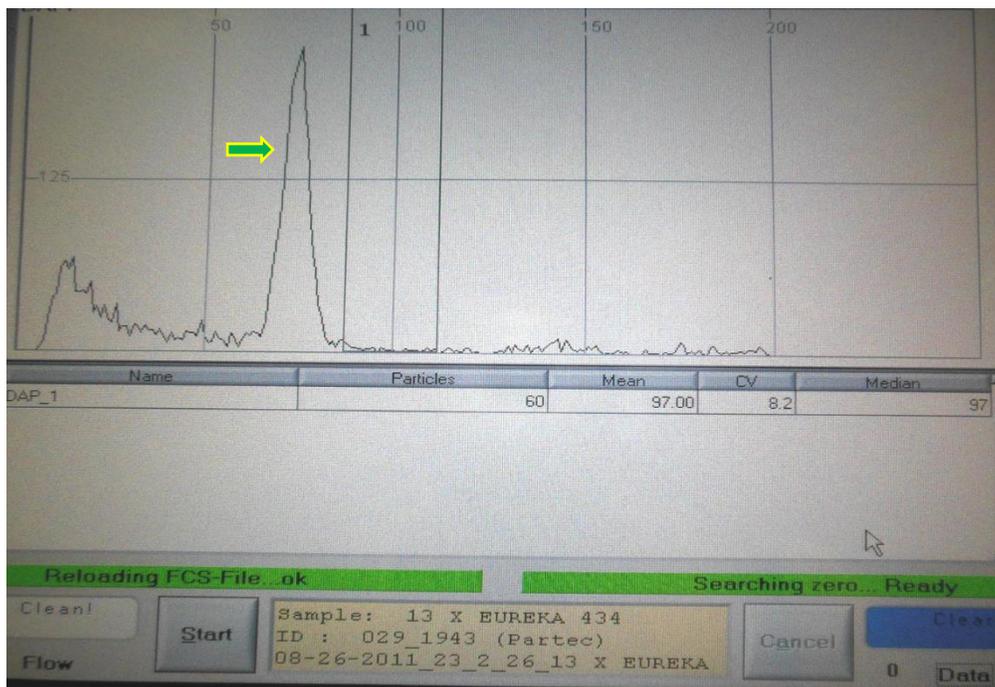


Figura 4. Histograma generado del análisis con citometria de flujo de la cruz 'Mex13' x 'Eureka'.

La gráfica de la cruce 'Mex13' x 'Limoneira 8a' (Figura 5) muestra el nivel de absorbancia de las partículas analizadas (núcleos de las hojas teñidas), que es proporcional al tamaño del genoma analizado y el número de núcleos con el mismo nivel de absorbancia. Con 77 partículas analizadas, una media de 98 y un coeficiente de variación de 7.4, se definió la condición triploide de dicha cruce.

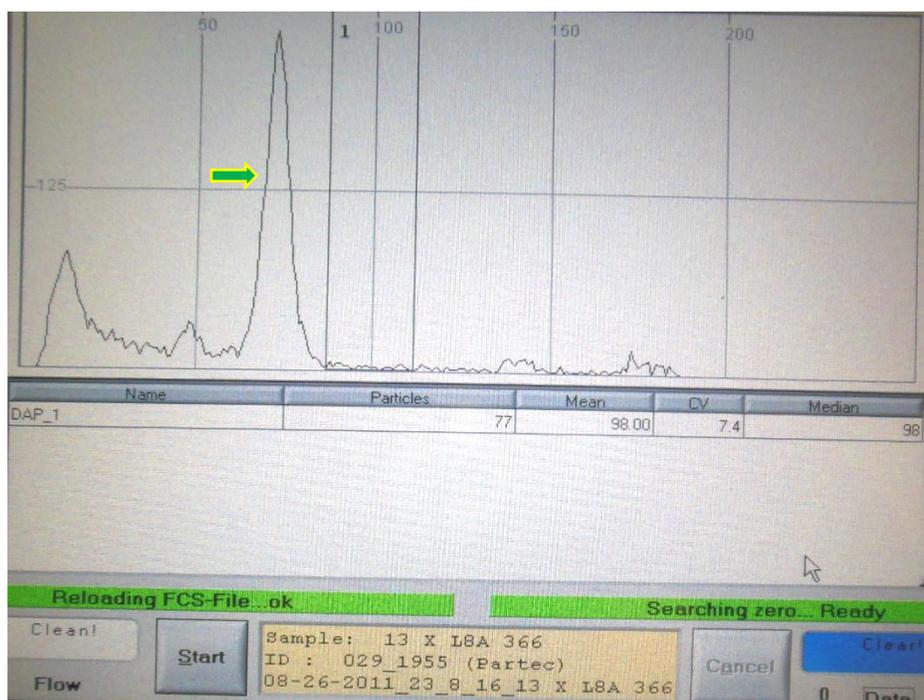


Figura 5. Histograma generado del análisis con citometría de flujo de la cruce 'Mex13' x 'Limoneira 8a'.

En el cuadro 4, se muestran las plantas analizadas con citometría de flujo y el número obtenido en las diferentes ploidías. De las 326 plantas progenie analizadas, 132 (55.85%) se identificaron como plantas triploides. De la misma forma fueron detectadas plantas diploides y tetraploides, algunas de estas plantas posiblemente no provienen de embriones cigóticos. La mayoría de las plantas identificadas como diploides provenientes de cruces 2x X 4x y las tetraploides de la cruce 4x X 2x, por lo que lo más probable es que sean de origen nucelar. Sin

embargo las plantas diploides de cruzas 4x X 2x, pueden tener origen sexual y haberse formado de la combinación de dos gametos x como lo señalan Esen *et al.* (1978) quienes llevaron a cabo estudios histológicos que demuestran que en hibridaciones 4x x 2x las semillas pequeñas con endospermos pentaploide contenían embriones triploides, e indicaron que estos se originan de megagametofitos reducidos y polen haploide. De igual forma las plantas tetraploides de cruzas 2x X 4x, pueden haberse formado de un gameto no reducido del progenitor diploide con el gameto 2x del progenitor tetraploide. Será necesario comprobar esto mediante marcadores moleculares.

Se observó diferencia en la proporción de plantas triploides entre cruzas donde el progenitor femenino es tetraploide con respecto a las cruzas donde el progenitor femenino es diploide. En las cruzas 4x X 2x, de un total de 153 plantas se obtuvieron 128 (83.7%) individuos triploides, 12.4% diploides y 4.6% tetraploides. Para las cruzas 2x X 4x, de 173 plantas analizadas se detectaron 54 (31.2%) plantas triploides, 65% diploides y 3.5% tetraploides. Algunas cruzas 4x X 2x, no generaron plantas tetraploides.

Aunque el número de muestras utilizadas no fue homogéneo para todas las combinaciones, el mayor número de triploides fueron observados en las cruzas 4x X 2x. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado con Aleza *et al.* (2012) quienes identificaron el mayor porcentaje de plantas triploides (98.3%) al cruzar clementina 'Clemenules' 4x con mandarinas, tangores, pomelos y naranja dulce 2x, también identificaron el 0.34% plantas diploides y 0.34% tetraploides. De la misma forma Shi-Ping *et al.* (2008), reportan en crusa de tangerina diploide (*C. reticulata* cv. 'Bendizao') con un híbrido somático alotetraploide HR (*C. sinensis* cv. Hamlin + *C. jambhiri* cv. Limón rugoso) la obtención de 35% de individuos diploides, 52% triploides y 2.4% de tetraploides. Aleza *et al.* (2012) indican que las hibridaciones 4x x 2x son más eficaces en la recuperación de híbridos triploides de cítricos que en hibridaciones 2x x 2x o 2x x 4x.

Viloria y Grosser *et al.* (2005) obtuvieron una alta variación en el número de híbridos triploides recuperados en hibridaciones de 2x x 4x con cinco genotipos de limón. El porcentaje de híbridos triploides informados por estos autores, vario desde 7.6 hasta 20.4%. En este sentido, Esen y Soost (1971) propusieron que la producción de híbridos triploides de cítricos en hibridaciones 2x X 4x se ve obstaculizada por el desarrollo precoz del endospermo. Plantearon que la relación de ploidía 3/4 del embrión y endospermo causó la inducción de aborto de semillas y la degeneración del endospermo. En consecuencia, un alto número de embriones fallan después de la hibridación 2x x 4x, lo que reduce la frecuencia de la producción de híbridos triploides viables. Ferrante *et al.* (2010) reportaron la obtención de 13 plántulas diploides, 37 triploides y 8 genotipos tetraploides de cruza interploides entre genotipos alotetraploides con autotetraploides. Las proporciones de plantas obtenidas de los tres niveles de ploidía en las cruza interploides puede estar determinada por los genotipos utilizados en las cruza.

En cuanto a la relación de ploidia entre el embrión y endospermo, diversos estudios en *Arabidopsis* y papa sugieren que un determinante principal del aborto de semillas podría ser la contribución materna/paterna al endospermo (Adams *et al.*, 2000; Vinkenoog *et al.*, 2003) o el número balanceado del endospermo. Carputo *et al.* (2003) reportaron que las semillas producidas en hibridación 2x x 4x contenían embriones triploides y que esas plantas pudieron originarse como consecuencia del megagametofito no reducido con grano de polen haploide con una relación más adecuada de ploidía endospermo/embrión (3/5) o la contribución materna/paterna. La alta frecuencia de triploides presumiblemente fue el resultado de la apomixis, una característica específica de los cítricos (Leblanc *et al.*, 1995) lo que podría ser interpretado por la hipótesis de Número Balanceado del Endospermo (Johnston *et al.*, 1980). Tanto el embrión y la semilla dependen del desarrollo funcional del endospermo (Brink y Cooper, 1947; Scott *et al.*, 1998). Sin embargo, durante las cruza interploides e interespecíficas, el endospermo con frecuencia se colapsa, lo que resulta en un desarrollo anormal de la semilla (Shi-

Ping *et al.*, 2009). Lin (1975) señaló que una proporción 2/1 en la proporción del genoma materno/paterno era fundamental para el crecimiento normal del endospermo del maíz.

Estudios citogenéticos han demostrado que durante la meiosis de los híbridos triploides de cítricos, se forman asociaciones bivalentes, trivalentes y univalentes (Cameron y Frost, 1968) produciendo gametos estériles. Por otra parte, es común el aborto de la megasporogénesis durante el período comprendido entre la primera división del saco embrionario y el óvulo fecundado (Fatta del Bosco *et al.*, 1992).

Cuadro 4. Individuos analizados con citometría de flujo para definir su nivel de ploidía.

Cruza		Individuos analizados	Ploidía		
			2X	3X	4X
Combinación 4x X 2x					
♀	♂				
Mex13 X Limoneira 8a		32	7	25	0
Mex13 X Rosenberg		19	0	19	0
Mex13 X Eureka		21	8	13	1
Mex13 x C-35		81	4	71	6
Subtotal		153	19	128	7
Combinación 2x X 4x					
♀	♂				
Rosenberg X Mex13		24	15	9	0
Rosenberg X Mex20		81	56	19	6
Colimex X HS11		68	42	26	0
Subtotal		173	113	54	6
Total de plantas		326	132	182	13

4.2 Identificación de híbridos mediante marcadores moleculares

Las plantas híbridas se identificaron por la presencia de bandas del progenitor masculino amplificadas por PCR utilizando 4 iniciadores microsatélites. De 203 plantas obtenidas en la F1 de las diferentes cruzas realizadas fueron identificadas como plantas cigóticas o híbridos 145 (71%) (Cuadro 5). Distintas proporciones de plántulas cigóticas también se han observado en otras especies y cruzas de cítricos.

Frost y Soost (1967) informaron de frecuencias de plantas cigóticas de 78.7% y 14.0% en tangerinas 'King' y 'Willow leaf' respectivamente, usando polen de *Poncirus trifoliata*. Hearn (1973) por su parte, reportó que la selección de naranja dulce 'Mediterranean' 62% de plántulas cigóticas cuando se utilizó como progenitor masculino a *P. trifoliata*. Soost *et al.* (1980) encontraron una frecuencia de plantas cigóticas de aproximadamente 85% usando como progenitor femenino a la mandarina 'King' y masculino a la mandarina 'Parson Special'. Varios estudios han demostrado que la frecuencia de plántulas cigóticas no excede el 15%, pero esto dependerá de las especies involucradas en la cruce, en algunos casos se obtienen solamente individuos nucelares (Cameron y Soost, 1980; Hirai *et al.*, 1986; Ashari *et al.*, 1988; Roose y Traugh, 1988).

Moore y Castle (1988), identificaron el 24% de plántulas cigóticas de limón 'volkameriana' utilizando marcadores basados en isoenzimas. Hwang y Yeuh (1989) reportaron frecuencias cigóticas de 42.8% y 66.7% en cruces de mandarina 'Tankan' como progenitor femenino con naranja agria y *P. trifoliata* como progenitores masculinos respectivamente. Además, los autores informaron una frecuencia cigótica de 2.7% al 10.7% cuando utilizaron mandarina 'Tankan' como el progenitor femenino y diferentes cultivares de naranja como progenitores masculinos. Hwang (1991) obtuvo 73% de plántulas cigóticas de limón "Eureka" en cruces con naranja trifoliada, y 38% a 56% en cultivares de limón "Eureka" y 'Lisboa' en cruces con naranja dulce. Cristofani y Machado (1998) identificaron 6%

plántulas cigóticas de limón 'Cravo' mediante marcadores RAPD en una muestra de 50 plantas tomadas de una población de 576. Por su parte, Bastianel *et al.* (1998) también mediante marcadores RAPD, identificaron 26.7% plántulas híbridas de cruza de tangerina 'Montenegrina' con tangerina 'King'. Mientras que para el portainjerto *C. volkameriana*, García *et al.* (1999) reportaron sólo el 22% de plantas cigóticas derivadas de polinización abierta, y el 60% de las plántulas cigóticas se obtuvieron después de la polinización con *P. trifoliata*. Ruiz *et al.* (2000), utilizando marcadores SSR, clasificó 86.95% de plántulas híbridas de cruza entre 'Flying Dragon' y tangor 'Ortanique'. Yun *et al.* (2007), obtuvieron 0.0% a 13.4% plántulas híbridas en cruza donde se utilizó a las mandarinas 'Miyagawa Wase', 'Okitsu Wase' y 'Shiranuhi' como progenitores femeninos y mandarina 'Ponkan' y citrumelo 'Swingle' como progenitores masculinos. Rao *et al.* (2008) cruzó diferentes cultivares de mandarinas y toronjas para obtener portainjertos alternativos a la naranja agria y utilizando marcadores SSR identificó 22.2% de plántulas híbridas de estas cruza. Yildiz *et al.* (2013) identificaron 86 plántulas (36.91%) nucelares y 63% cigóticas en cruza con mandarina 'Fremont' como progenitor femenino y la variedad "Rio Red" como progenitor masculino. Cuando utilizaron a la mandarina 'Robinson' como el progenitor femenino, esta proporción fue de 31.09% (83 plántulas nucelares) y 69% cigóticas.

De acuerdo con García *et al.* (1999) los embriones cigóticos producidos por autopolinización son menos vigorosos y pueden no ser competitivos con los nucelares. Los porcentajes de progenie cigótica encontrado en varios híbridos de cítricos dependen de la semilla del progenitor utilizado (Spiegel-Roy *et al.*, 1977), el origen del polen (Cameron y Soost, 1980), y las influencias ambientales (Khan y Roose, 1988; Moore y Castle, 1988; Roose y Traugh, 1988).

Las plantas obtenidas diploides, triploides y tetraploides de cada combinación fueron evaluadas utilizando iniciadores SSR. Los cuatro lograron identificar plantas híbridas (Cuadro 5). Con el iniciador TAA45 fue posible obtener el mayor número de híbridos (145) siendo este el mejor de todos, seguido del cAGG9 y el TAA52

con 130 y 125 híbridos respectivamente. Caso contrario a los resultados obtenidos en este estudio, se reportaron por Yildiz *et al.* (2013) quienes encontraron en una población en estudio que los iniciadores AG14 y TAA03 fueron más eficaces para distinguir individuos cigóticos y el cebador TAA45 no fue capaz de identificar las plántulas cigóticas.

Con respecto al iniciador TAA41, fue este el que menos plantas identificó (114). Resultados similares fueron encontrados por Yildiz *et al.* (2013) quienes reportaron que en combinaciones donde utilizaron la mandarina 'Fremont' como progenitor femenino, el iniciador TAA41 fue capaz de identificar solo 47 plantas cigóticas. Estos mismos autores reportan que en combinaciones donde se utilizó la mandarina 'Robinson' como el progenitor femenino, los iniciadores AG14 y TAA03 identificaron 59 y 58 plantas cigóticas respectivamente, más que el iniciador TAA41. En contraste, los iniciadores CAT01, TAA01, TAA45 y TAA52 (cuando se utilizó a la mandarina 'Fremont' y 'Robinson como progenitores femeninos) no fueron útiles en la determinación de la identidad de plantas cigóticas.

En las poblaciones que son derivadas de una cruce, todos los individuos que son cigóticos muestran un genotipo diferente al de la madre en cualquier locus de discriminación, esto va a ocurrir siempre y cuando el padre tenga alelos diferentes a los de la madre (Ruiz *et al.*, 2000). La variación en el número de bandas amplificadas por diferentes iniciadores puede deberse a factores como la estructura del iniciador, la cantidad de plantilla y el número de sitios reconocidos en el genoma (Muralidharan y Wakeland, 1993).

Otros autores, entre ellos Nageswara *et al.* (2008) identificaron 77.80% plántulas nucelares y 22.20% plántulas cigóticas, con marcadores EST-SSR, en híbridos de introgresión de mandarina y pomelo Otros autores como Mei-lian *et al.* (2007) reportan en cruces de tangerina roja (*C. reticulata* Blanco) X naranja trifoliada (*P. trifoliata* (L.)) 111 individuos híbridos a través de rescate de embriones y verificados por marcadores SSR y 44 plantas híbridas a partir de cruces de

mandarina Satsuma (*C. unshiu* Marc) X naranja trifoliada (*P. trifoliata* (L.)). De la misma manera Oliveira *et al.* (2002) reportan la identificación de híbridos derivados de cruzas entre tangor 'Murcott' [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.] y naranja dulce 'Pera' con análisis de marcadores SSR. Siragusa, *et al.* (2006) identificaron y evaluaron la variabilidad genética de accesiones de naranja dulce con marcadores moleculares SSR. También Aleza *et al.* (2012) identificaron híbridos que muestran el alelo específico del progenitor masculino con marcadores moleculares SSR en cruzas 4x X 2x de varios cítricos. En otros estudios Aleza *et al.* (2010) utilizaron marcadores de SSR para demostrar que todas las plantas recuperadas de semillas no desarrolladas obtenidas a partir de hibridaciones sexuales 2x X 4x fueron resultado del embrión cigótico.

Fang y Roose (1997) mencionan que las mutaciones en la mayoría de los casos pueden causar cambios significativos en la morfología de árbol, pero con las modificaciones que ocurren en la secuencia de ADN, son difíciles de detectar. Novelli *et al.* (2006) también informaron que a pesar de considerables diferencias morfológicas, hay pocos polimorfismos RFLP, RAPD y SSR. Sobre la base de marcadores SSR, Cao *et al.* (2007) no pudieron detectar diferencias entre 16 mandarinas Satsuma y por tanto el posible origen de la mutación de estas variantes. Los resultados de este estudio sugieren que el análisis de marcadores moleculares puede contribuir significativamente a los programas de mejoramiento de cítricos, coadyuvando en la detección y selección temprana de los híbridos y con ello contribuyen al ahorro de tiempo y recursos.

Cuadro 5. Número de plantas híbridas identificadas con cuatro marcadores moleculares SSR.

Cruza		Iniciador cAGG9	Iniciador TAA41	Iniciador TAA45	Iniciador TAA52
♀	♂				
Rosenberg (2x)	X Colimex (2x)	7	6	3	2
Colimex (2x)	X Rosenberg (2x)	7	8	11	12
Mex13 (4x)	X Limoneira 8a (2x)	7	8	10	3
Mex13' (4x)	X 'Rosenberg (2x)	12	15	13	17
Mex13 (4x)	X Eureka (2x)	4	5	7	9
Rosenberg (2x)	X Mex20 (4x)	2	0	6	3
Rosenberg (2x)	X Mex13 (4x)	1	1	0	1
Mex13 (4x)	X C-35 (2x)	39	32	48	53
Colimex (2x)	X HS11 (4x)	25	20	20	14
Colimex (2x)	X Limequat (2x)	5	0	2	2
Colimex (2x)	X C-32 (2x)	3	2	16	2
Mex13 (4x)	X C-35 (2x)	39	32	48	53
Colimex (2x)	X C-Swingle (2x)	2	9	2	2
Colimex(2x)	X Citrange Yuma (2x)	16	8	7	5
Total de plantas híbridas		130	114	145	125

2x= diploide, 3x= triploide, 4x= tetraploide

De las 203 plantas analizadas, se generaron perfiles con los cuatro iniciadores SSR utilizados en el estudio. En la Figura 6, se presentan algunos híbridos identificados con uno de los iniciadores que mejores resultados presentó (cAGG9). De la cruce 'Mex13' X 'Rosenberg' (Figura 6a), se puede observar que los individuos 41, 43, 44, 48 y 51, presentaron las bandas del progenitor masculino 'Rosenberg', por lo cual fueron identificados como híbridos. En la cruce 'Colimex' X 'Rosenberg' (Figura 6b), los individuos 23, 25, 26, 29, 30, 31 y 32, al igual que en la cruce anterior mostraron las bandas del progenitor masculino, por lo que fueron identificados como plantas híbridas. Por último en la cruce de 'Mex13' X 'Limoneira 8a' (Figura 6c), los individuos 35, 39, 202, 203, 204, 208 y 210, mostraron las bandas del progenitor masculino 'Limoneira 8a', por lo que también se identificaron como híbridos.

En la Figura 7, se presentan algunos híbridos identificados con uno de los iniciadores que mejores resultados presentó (TAA45). De la cruce 'Mex13' X 'Eureka' (Figura 7a) se puede observar que los individuos 197 y 201, presentaron las bandas del progenitor masculino 'Eureka', por lo cual fueron identificados como híbridos. En la cruce 'Mex13' X 'Limoneira 8a' (Figura 7b) los individuos 208 y 2010, al igual que en la cruce anterior mostraron las bandas del progenitor masculino 'Limoneira 8a' (Figura 7c) por lo que fueron identificados como plantas híbridas. En la cruce de 'Mex13' X 'Rosenberg', los individuos 40 al 48, 50 y 51 mostraron las bandas del progenitor masculino 'Rosenberg', por lo que también se identificaron como híbridos.

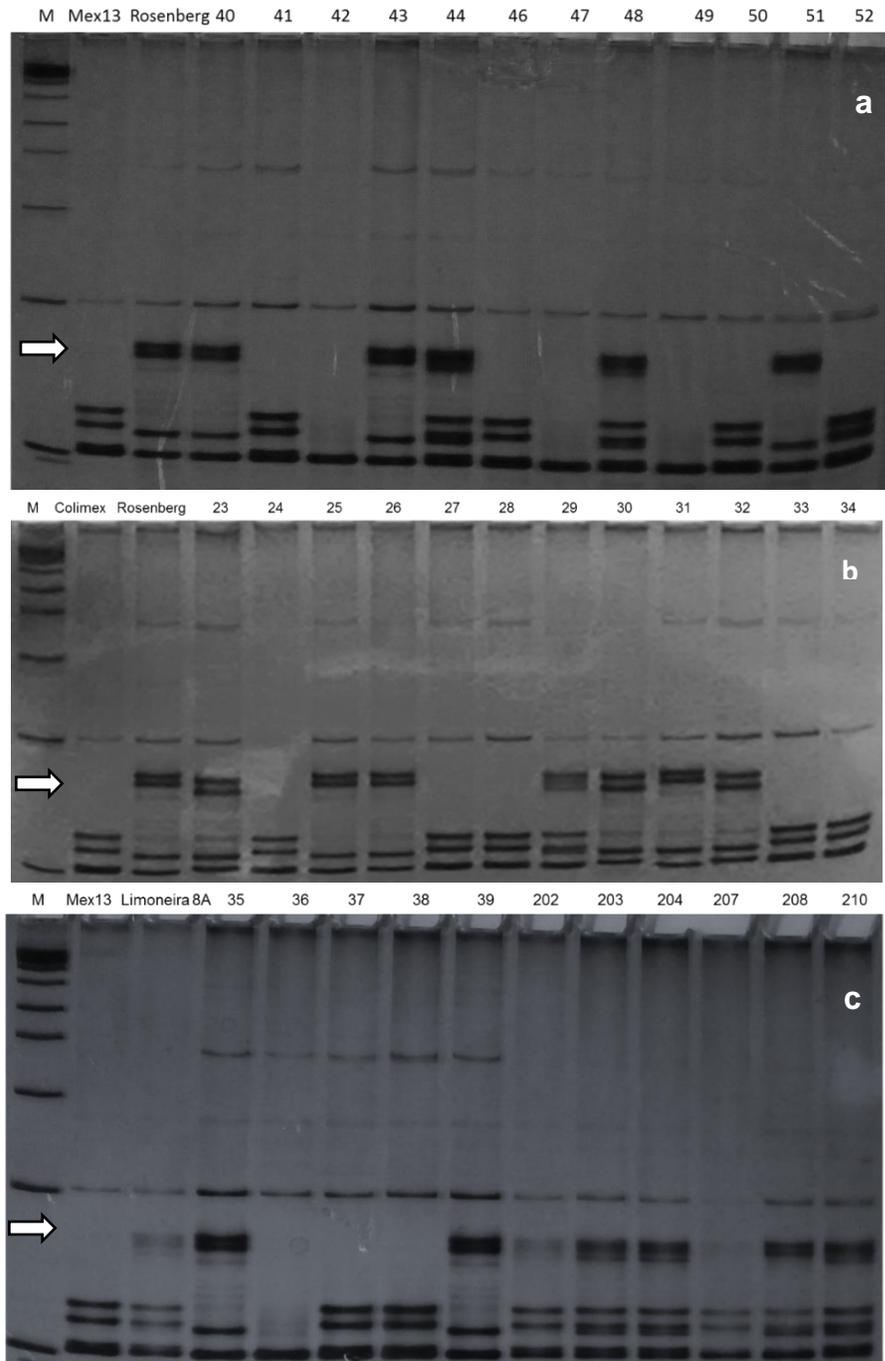


Figura 6. Perfiles de SSR generados con el iniciador cAGG9 para progenies de cruza de: Mex 13 X 'Rosenberg' (a), 'Colimex' X 'Rosemberg' (b) y 'Mex13' X 'Limoneira 8a' (c). M: Marcador de peso molecular 1Kb, línea 1: Progenitor femenino, Línea 2: Progenitor masculino, Líneas 40-52, 23-34 y 35.-210: Plantas progenie.

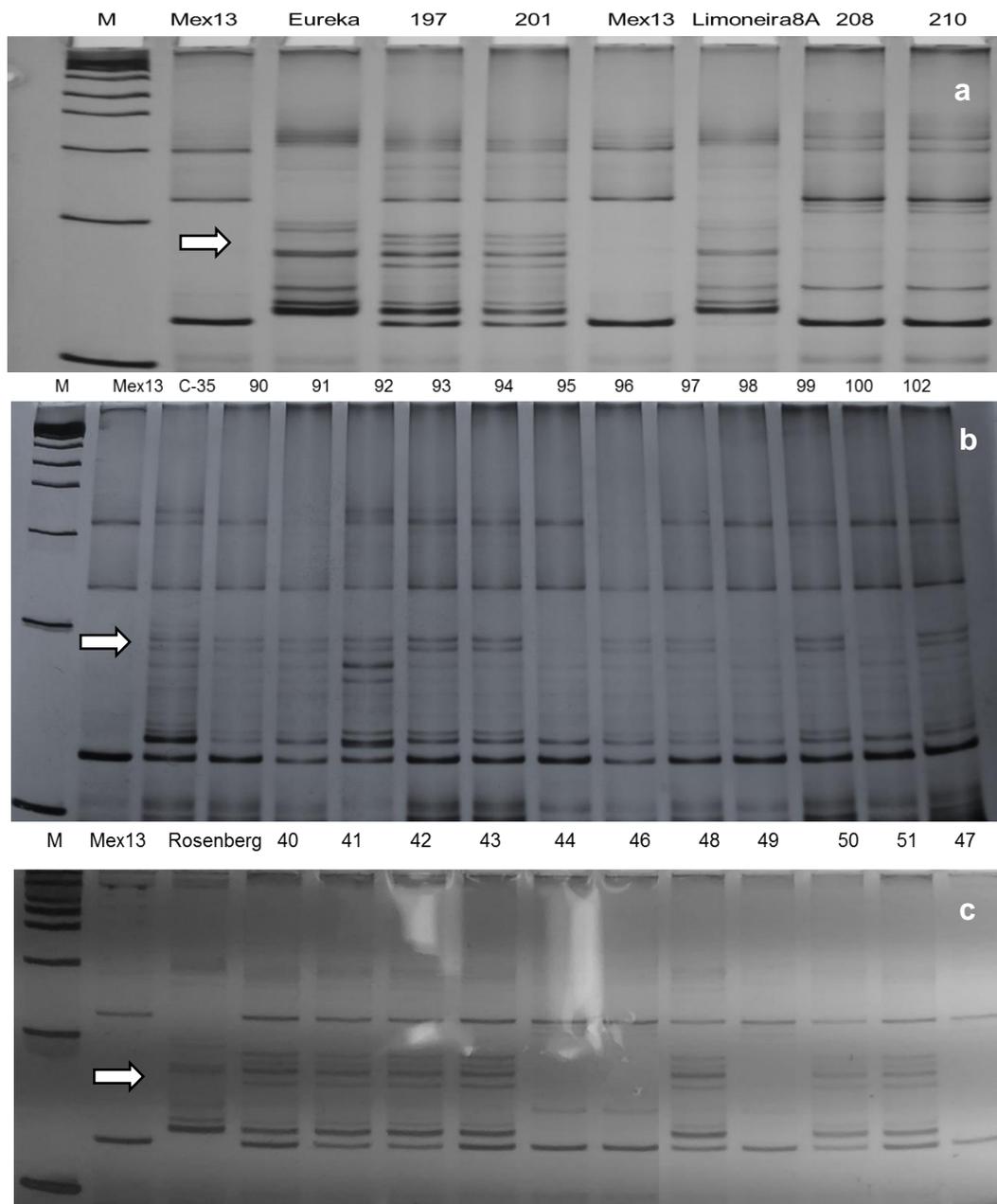


Figura 7. Perfiles de SSR generados con el iniciador TAA45 para progenies de cruces de: 'Colimex' X 'Rosenberg' (a), 'Mex13' X 'C-35' (b) y 'Mex13' X 'Rosenberg' (c). M: Marcador de peso molecular 1Kb, línea 1, 6 y 11: Progenitor femenino, Línea 2, 7 y 12: Progenitor masculino, Líneas 32-34, 67-70, 68, 90-102 y 40-47: Plantas progenie.

Al realizar los dendogramas con los datos de los cuatro marcadores SSR de los individuos obtenidos con las distintas cruzas se pudo detectar que el coeficiente de similitud de la distancia eucladiana vario desde 0.00 a 999.09 entre los 203 individuos que se analizaron. Esto se debe a la gran variabilidad generada en estos cruzamientos, ya que se combinaron los genomas de diferentes especies e inclusive de géneros distintos. Por otra parte, tanto los limones mexicanos como los limones italianos son híbridos ancestrales y están en forma heterocigótica y por lo tanto al segregarse los alelos en los gametos y luego al recombinarse en el cruzamiento, están generando nuevas combinaciones genéticas. Por su parte, los citranges están formados por el genoma de *C. sinensis* y *P. trifoliata*, también en condición altamente heterocigótica, lo que aumenta la diversidad genética. Este resultado coincide con lo reportado por Herrero *et al.* (1996) quienes señalan que las limas y limones muestran un alto porcentaje de heterocigosidad

En la Figura 8 se muestra el dendograma construido con los perfiles de SSR de la cruce de 'Colimex' X Citrange 'Yuma' en el que se pueden apreciar tres grupos o racimos. En el primer grupo, se encuentran los individuos H180, H211, H219, H216, H215, H214, H213, H212, H217 y H218, estos presentaron un alto grado de similitud con el progenitor femenino 'Colimex', lo que indica que son genéticamente idénticas con este y por lo tanto, estas plantas tienen origen nucelar. De acuerdo con (Ruiz *et al.*, 2000) la mayoría de los cítricos son apomícticos y desarrollan embriones adventicios directamente de las células nucleares y por lo tanto tienen el mismo genoma que la planta madre. El segundo grupo está compuesto por los individuos H181, H183, H191, H184 y H185. Estos se ubican entre ambos progenitores lo que significa que comparten varios marcadores genéticos que fueron detectados por tres de los iniciadores y por lo tanto son híbridos. Por último el tercer grupo se integró por Citrange 'Yuma' y los individuos H182 y H186. Estos presentaron valores altos de similitud con el progenitor masculino pues mostraron mayor número de marcadores moleculares detectados con los cuatro iniciadores. Estos marcadores genéticos pueden tener

relación con los fenotipos de estas plantas. Algunos caracteres morfológicos que comparten las plantas que conforman el segundo y tercer grupo fueron: alas angostas y de forma oboval-obdelta, ausencia de antocianinas en hojas y estructura del árbol similar a los citranges.

En algunos individuos con perfiles de SSR que no muestran algunos marcadores genéticos ni del progenitor femenino ni del progenitor maculino. Es probable que al segregar los alelos en los gametos y darse la recombinación en la cruce, modificó algunas secuencias en el nuevo genóma del híbrido y no permitió que el iniciador las pudiera amplificar.

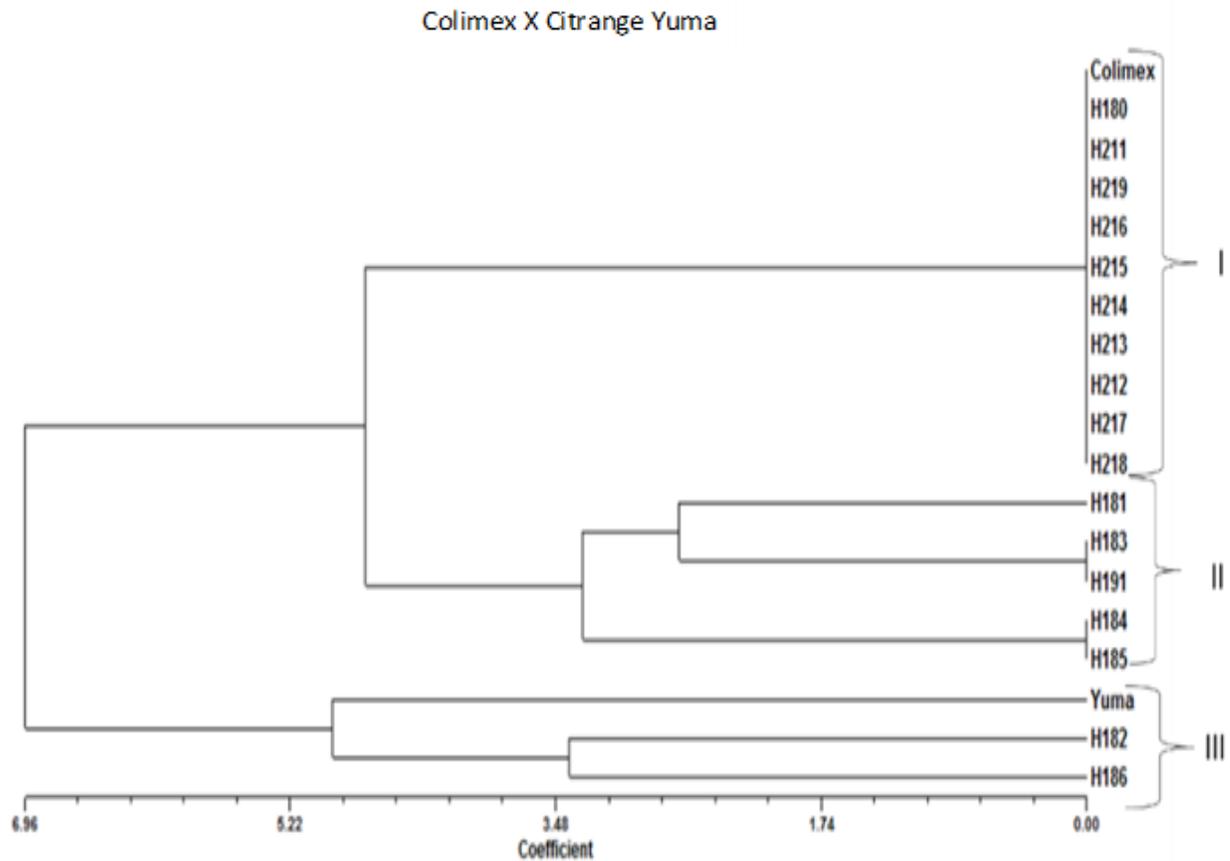


Figura 8. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Colimex' x Citrange 'Yuma' construido con el método UPGMA

En el dendograma construido con los perfiles de SSR de la cruce 'Colime' x 'C-Swingle' se observan tres grupos (Figura 9). El primer grupo lo formó el progenitor femenino 'Colimex'. El segundo grupo por los híbridos H171, H172, H173, H178, H177, H176, H175, H174, H179 y H229, que compartieron marcadores genéticos con ambos progenitores. El tercer grupo lo formaron el progenitor masculino 'C-Swingle' y los híbridos H179 y H229. En este caso los individuos progenie compartieron mayor número de marcadores genéticos con 'C-Swingle'. Tanto los individuos del grupo II y los del grupo III son híbridos originados de esta cruce. En relación a los caracteres morfológicos, los individuos presentaron los mismos caracteres que en la cruce 'Colimex' x Citrange 'Yuma'. Según Shahsavari *et al.* (2007) en un estudio de germoplasma de cítricos, las poblaciones de plantas mostraron características morfológicas muy similares, sin embargo, los fenotipos moleculares revelaron diferencias sustanciales de similitud entre los híbridos y los progenitores.

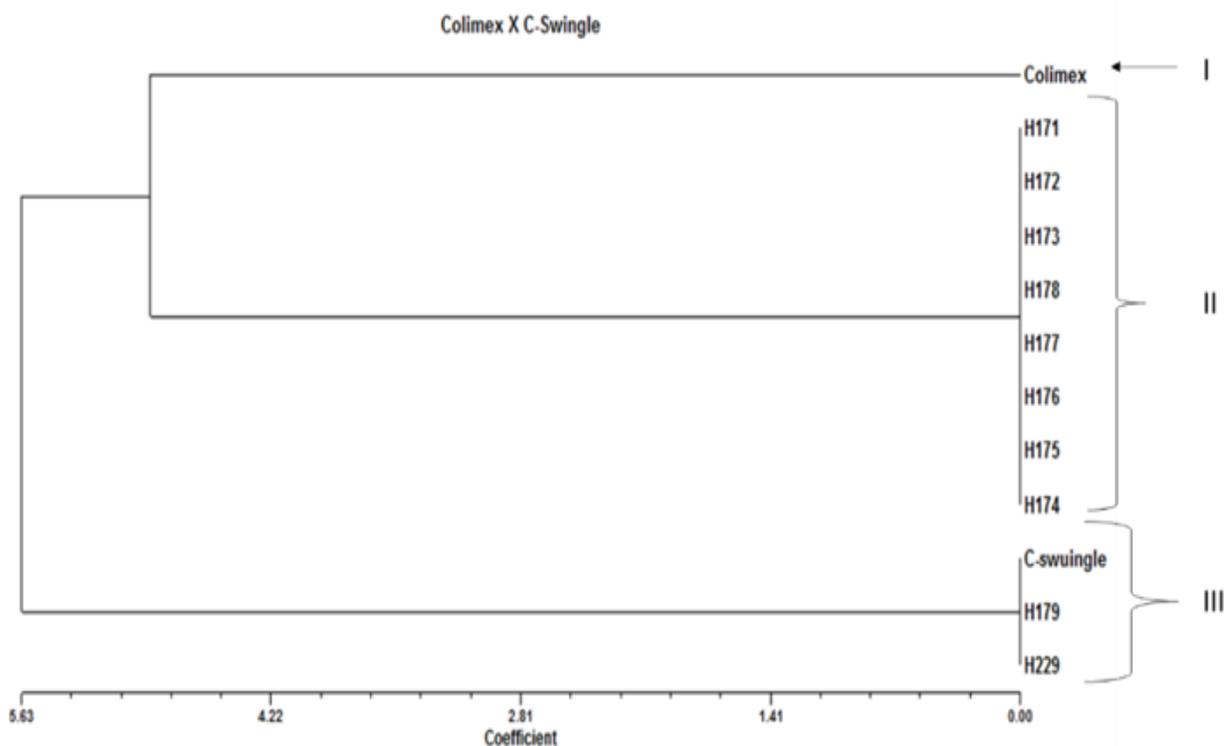


Figura 9. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Colimex' x 'C-Swingle' construido con el método UPGMA.

En la Figura 10 construida con los perfiles de SSR de la cruz "Colimex" x HS11, se muestran los cuatro grupos en los que se separaron los individuos el dendograma construido. El primer grupo, lo formó el progenitor femenino "Colimex". El segundo por los individuos H233, H234, H238, H254, H253, H250, H248, H249, H245, H251, H243, H242, H241, H247, H239, H240, H236, H244, H246, H235, H237 y el progenitor masculino HS11. Estos presentaron valores altos de similitud con dicho progenitor pues mostraron mayor número de marcadores moleculares detectados con los cuatro iniciadores. De acuerdo con Corazza-Nunes *et al.* (2002) en una evaluación de la variabilidad genética encontraron el 100% de similitud en cinco de 38 accesiones de cítricos. En el tercer y cuarto grupo se encuentran los individuos H232 y H252 respectivamente, que al igual que los anteriores se identificaron como híbridos, pero solo con solo tres de los iniciadores. Los caracteres morfológicos que comparten los individuos son los mismos que en la cruz 'Colimex' x Citrange 'Yuma'.

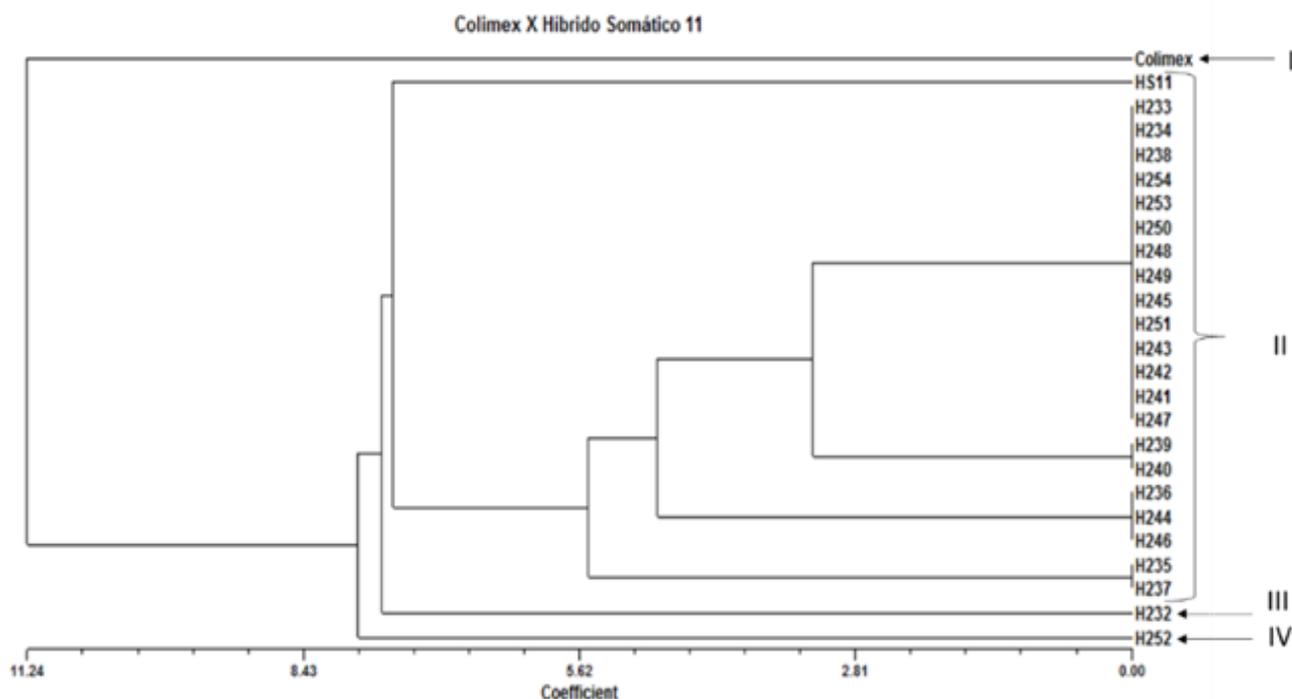


Figura 10. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruz de 'Colimex' x 'HS11' construido con el método UPGMA.

En el dendograma construido con los perfiles de SSR de la cruce 'Colimex' x 'Limequat' se observan dos grupos (Figura 11). El primer grupo lo integró el progenitor femenino 'Colimex', los individuos H221 y H224, que comparten características similares a este y que fueron detectadas como plantas híbridas con tres de los iniciadores. Con respecto al segundo grupo, este lo formaron 'Limequat' y los híbridos H225, H222, H223 identificados con uno y dos de los iniciadores. Los caracteres morfológicos, que presentaron los individuos son los mismos que en la cruce 'Colimex' x Citrange 'Yuma'.

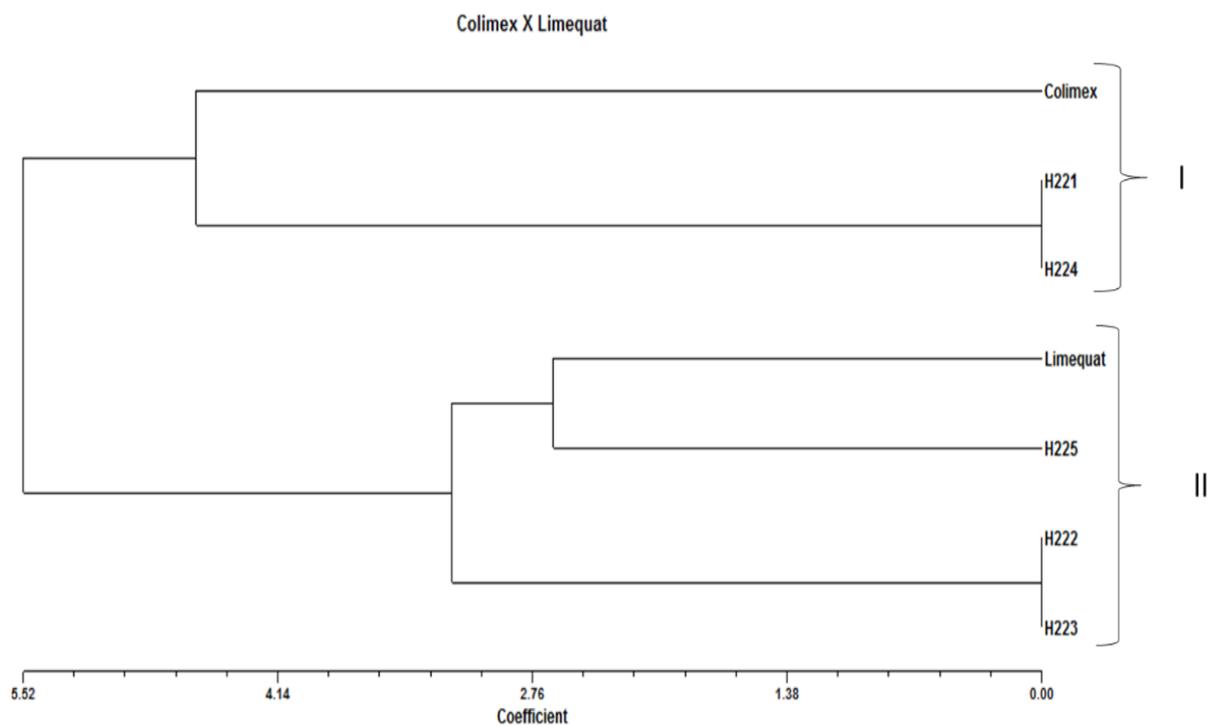


Figura 11. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Colimex' x 'Limequat' construido con el método UPGMA

En la Figura 12 se muestra el dendograma formado por tres grupos, construido con los perfiles de SSR de la cruz 'Colimex' X 'Rosenberg'. El primer grupo, lo formó el progenitor femenino 'Colimex', los individuos H3, H9. Estos presentaron un alto grado de similitud con el progenitor femenino lo que indica que son genéticamente idénticas y por lo tanto, estas plantas tienen origen nucelar. En este mismo grupo se ubican los híbridos identificados con dos y tres de los iniciadores H6, H8, H11, H19 y H17, todos ellos comparten características de ambos progenitores. El segundo grupo está formado por 'Rosenberg', los híbridos H2, H7 y H16, en quienes se observó un alto grado de similitud con este progenitor y fueron identificados con los cuatro iniciadores. Dentro de este mismo grupo se encuentran los híbridos H4, H5, H13, H18, H1, H10, H20 y H12, identificados con uno, dos y tres de los iniciadores. El tercer grupo está formado por los individuos H14 y H15, que también fueron identificados como plantas nucleares. Cuando una población se deriva de una cruz, todos los individuos cigóticos muestran un genotipo diferente al de la madre en cualquier locus de discriminación, siempre y cuando el padre tenga alelos diferentes a los de la madre (Ruiz *et al.*, 2000). Los caracteres morfológicos, que presentaron los individuos son los mismos que en la cruz "Colimex" x Citrange 'Yuma'.

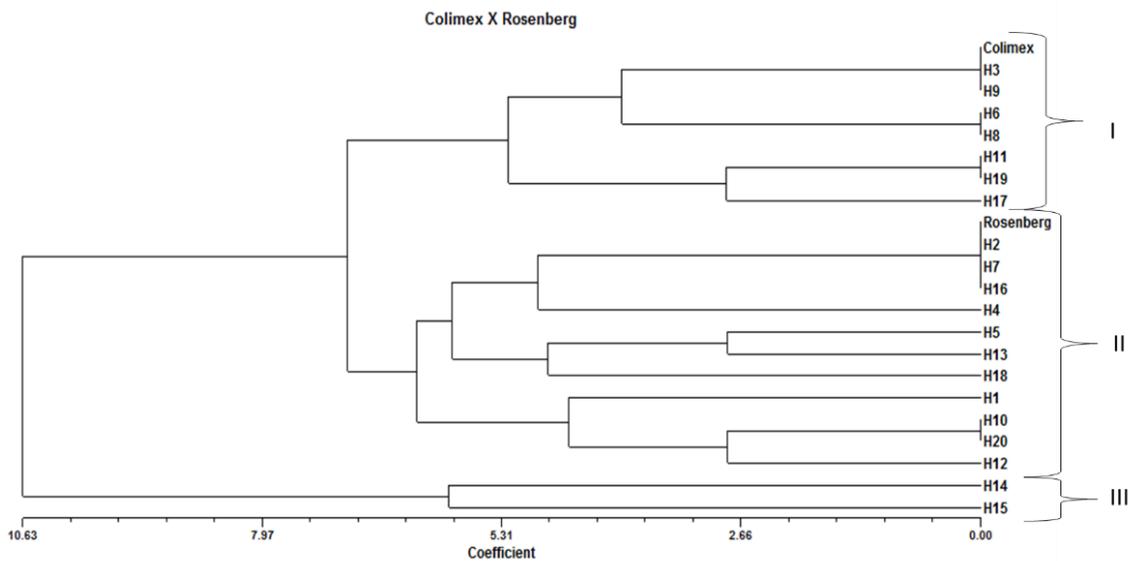


Figura 12. Dendograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruz de 'Colimex' x 'Rosenberg' construido con el método UPGMA

El dendograma construido con los perfiles de SSR de la cruz 'Mex13' x 'Eureka' (Figura 13) presenta los tres grupos en los que se dividieron los 12 individuos. El primer grupo, lo formó el progenitor femenino 'Mex13' y el individuo H62, quienes comparten características genéticas similares y fue identificado como planta nucelar. En el segundo grupo se ubicó el progenitor masculino 'Eureka' y los individuos H58, H59, H197, H201, estos presentaron alto grado de similitud con el progenitor masculino ya que fueron identificados como híbridos por los cuatro iniciadores. En este mismo grupo se encuentran los individuos H56, H57, H63 también identificados como híbridos por tres de los iniciadores. El último grupo lo forman los híbridos H60 y H6, identificados por solo dos de los iniciadores. Estos resultados son similares a los reportados por Nageswara *et al.* (2008) quienes en cruces de mandarina (*C. reticulata* Blanco) y pomelo (*C. maxima* Merr.) reportaron 95% de similitud genética entre los progenitores y sus híbridos con bajo coeficiente de variación. algunos caracteres morfológicos que comparten los individuos son: presencia y ausencia de alas angostas y de forma oboval-obdelta y presencia y ausencia de antocianinas en hojas.

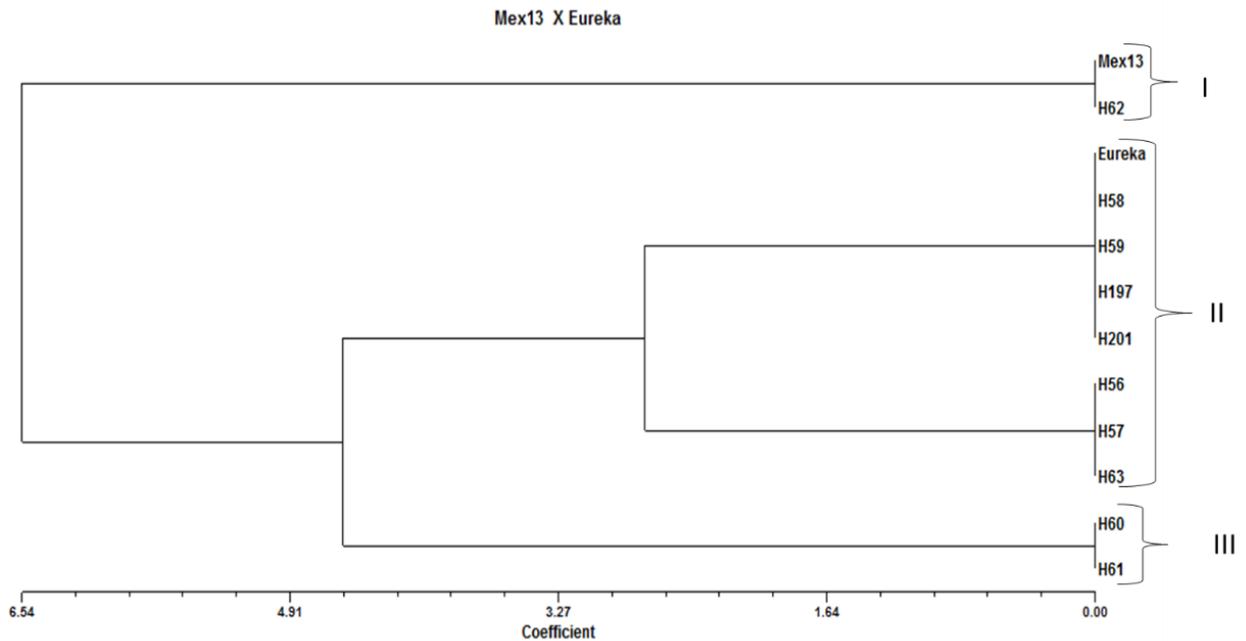


Figura 13. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'Eureka' construido con el método UPGMA

La cruce 'Mex13' x 'C-35', se construyeron tres dendogramas, con los perfiles de SSR. En el primer dendograma se presentan los primeros los 17 individuos analizados (Figura 14). Se observan tres grupos en los que fuerón separados los individuos. El primer grupo, lo formó el progenitor femenino 'Mex13'. En el segundo se agrupó el progenitor masculino 'C-35', y los individuos H90, H91, H107, H106, H105, H104, H103, H102, H93, H100, H99, H98, H97, H96, H95 y H92, todos similares a este progenitor e identificados con los cuatro iniciadores. En el tercer grupo se encuentra el individuo H101, este fue similar al progenitor femenino e identificado como planta nuclear.

En la Figura 15 se puede observar el segundo dendograma de los 19 individuos los cuales fuerón separados en tres grupos. El primer grupo, lo formó el progenitor

femenino 'Mex13'. El segundo grupo esta formado por el progenitor masculino 'C-35', los individuos H108, H109, H125, H124, H123, H122, H121, H120, H119, H118, H117, H110, H115, H114, H113, H112 y H111, todos con características similares al 'C-35' e identificados por los cuatro iniciadores como plantas híbridas. Algunos autores como Bastianel *et al.* (1998) reportaron en un análisis de conglomerados de los padres y la progenie de la cruce entre Montenegrina x Rey, la separación de los individuos en grupos distintos con una disimilitud genética de 20%. En el tercer grupo se encuentra los individuos H116 y H126, identificados como plantas nucelares.

En el tercer dendograma se observan los 20 individuos restantes de esta cruce (Figura 16). En el dendograma se pueden observar los tres grupos en los que fueron separados los individuos. El primer grupo lo formó el progenitor femenino 'Mex13'. El segundo grupo lo integró el progenitor masculino 'C-35', los individuos H130, H131, H147, H132, H143, H142, H140, H139, H138, H137, H135, H141, H144, H129, H145, H127, H128, H133 y el H146, todos estos comparten características similares a 'C-35' y fueron identificados como plantas híbridas por dos, tres y cuatro de los iniciadores. En el tercer grupo se encuentra el individuo H134, este se identificó como planta nucelar. Algunos de los caracteres morfológicos, que presentaron los individuos son los mismos que en la cruce 'Colimex' x Citrange 'Yuma'. En un estudio de germoplasma de cítricos, Shahsavari *et al.* (2007) reportaron que los limones (*C. limon* L. Burm. F.), 'Lisboa', 'limón Rock' y 'limón forma de pera' se separaron de otros genotipos al analizar el polimorfismo con marcadores moleculares ISSR con valor de similitud de 0.65. En general los 56 individuos de esta cruce comparten características similares al progenitor masculino 'C-35', las cuales fueron identificadas con los cuatro iniciadores probados.

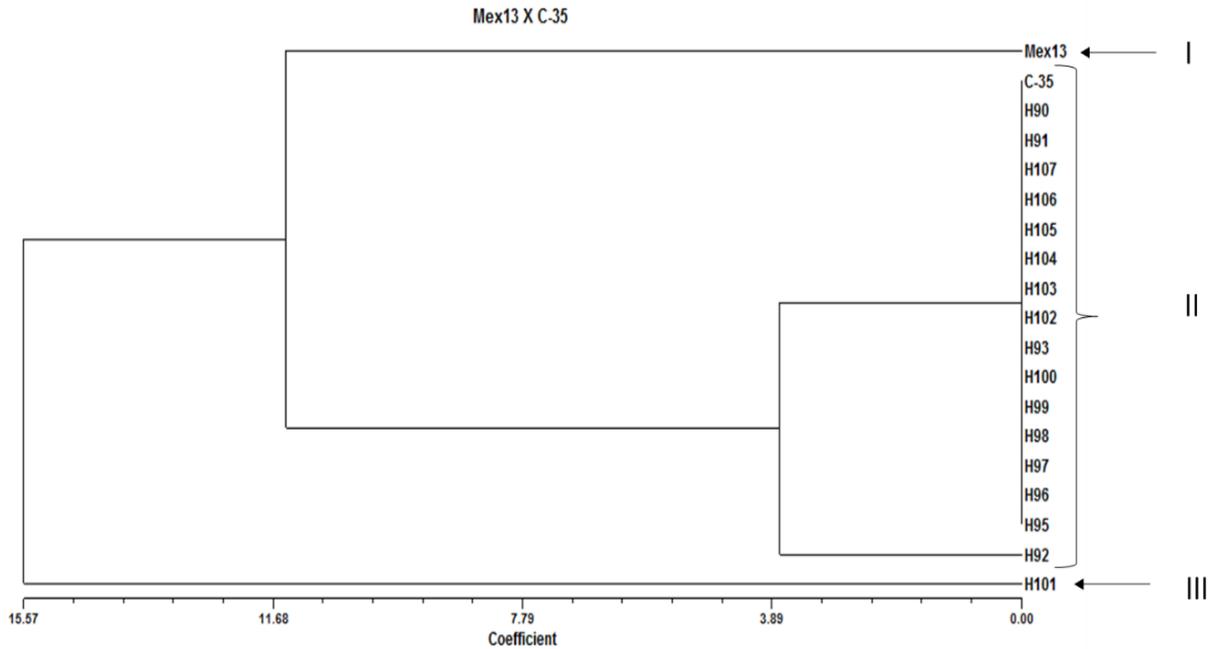


Figura 14. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'C-35' construido con el método UPGMA.

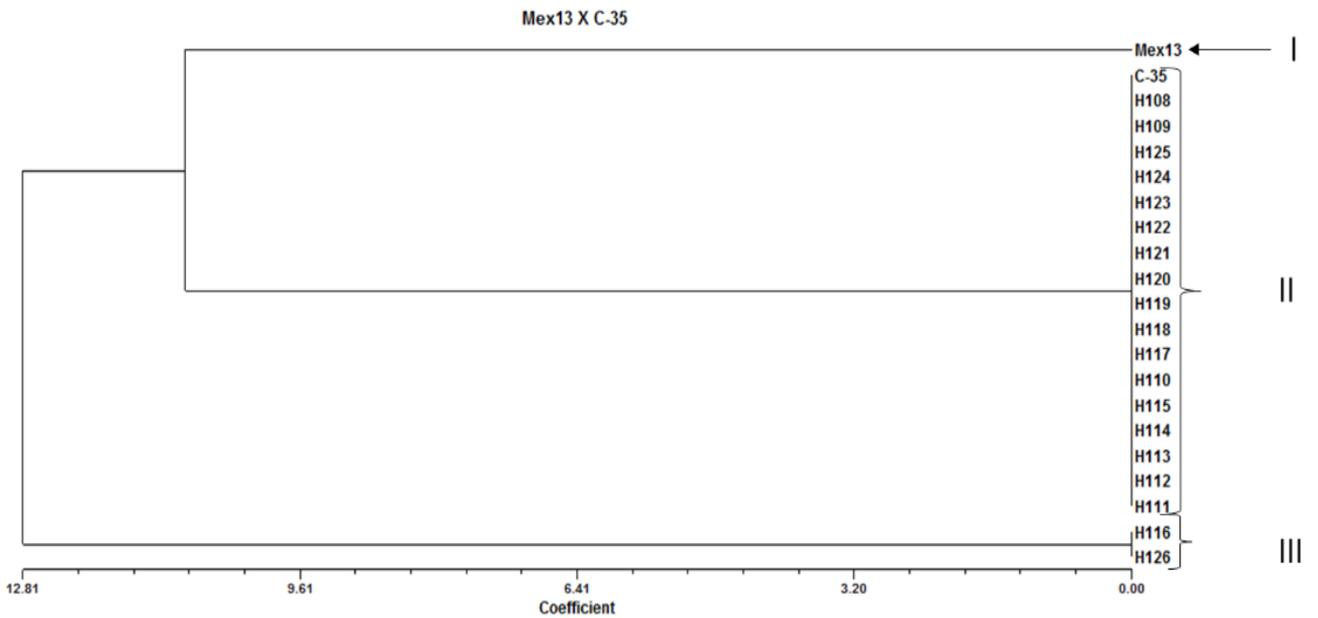


Figura 15. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'C-35' construido con el método UPGMA

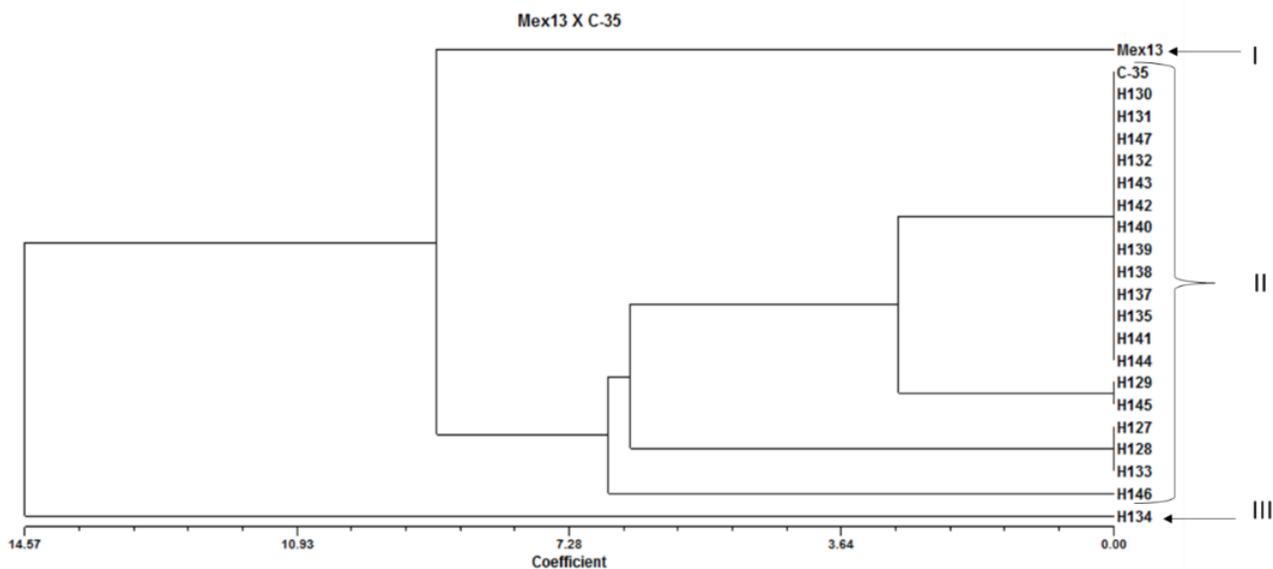


Figura 16. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'C-35' construido con el método UPGMA

En el dendrograma construido con los perfiles de SSR, de la cruce 'Mex13' X 'Limoneira 8a', se pueden observar tres grupos (Figura 17). El primer grupo lo formó el progenitor femenino 'Mex13', y el individuo H38, quien presentó similitud a dicho progenitor, por lo que fue identificado como planta nucelar. En este mismo grupo se encuentran los individuos H37, H35 y H39, identificadas como plantas híbridas por uno y dos de los iniciadores. En el segundo se encuentran los individuos H36, H202, H203, H210, H208, H204, H206 y H207, que fueron identificados con dos y tres de los iniciadores como híbridos. Por último, el tercer grupo lo formó el progenitor masculino 'Limoneira 8a'. Todas las plantas identificadas como híbridas comparten características con los progenitores. Algunos de los caracteres morfológicos, que presentaron los individuos son los mismos que en la cruce 'Colimex' x Citrange 'Yuma'.

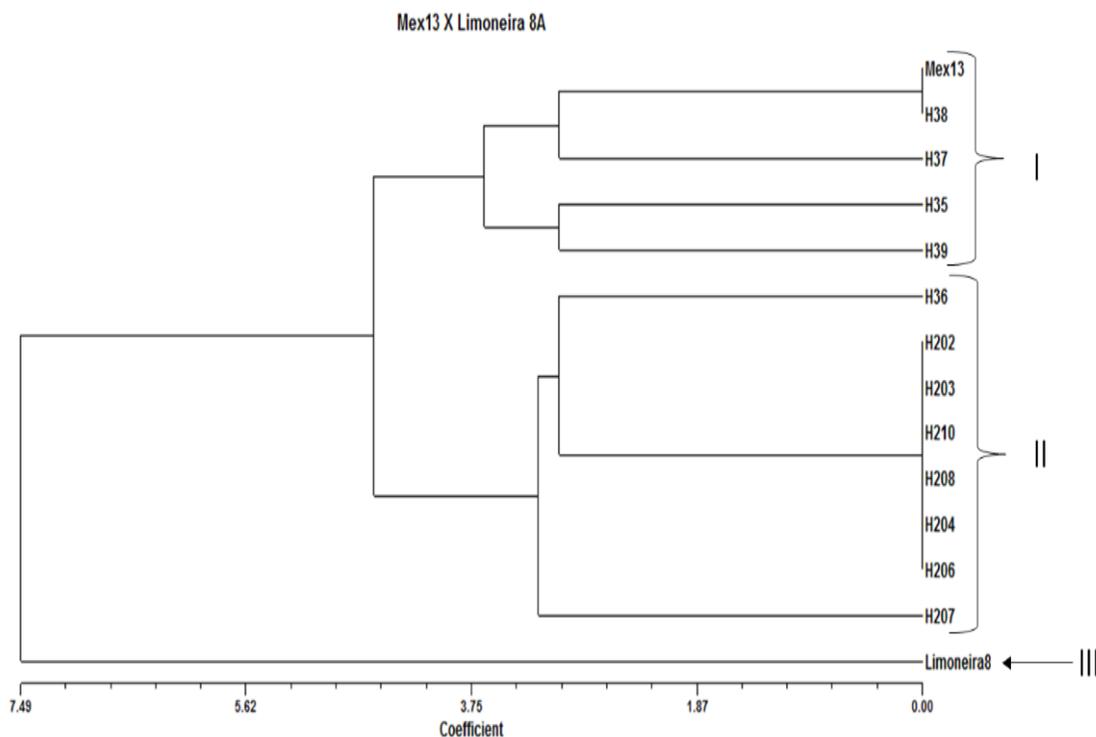


Figura 17. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'Limoneira 8a' construido con el método UPGMA

En la Figura 18 se presenta el dendrograma construido con los perfiles de SSR de los 19 individuos y sus progenitores, de la cruce de 'Mex13' X 'Rosenberg'. Se observan cuatro grupos. El primero lo formó el progenitor femenino 'Mex13'. En el segundo se encuentran los híbridos H40, H43, H44, H48, H51 y el progenitor masculino 'Rosenberg'. Estos presentaron valores altos de similaridad con el progenitor masculino pues mostraron mayor número de marcadores moleculares detectados con los cuatro iniciadores. En este mismo grupo se encuentran los individuos H41, H42, H55, H53, H54, H50, H52, H46, H47, H49, identificados por tres de los iniciadores como plantas híbridas. El tercer grupo lo formó el híbrido H45. Identificado por tres de los híbridos. Y en el último grupo se encuentran los individuos H196, H209 y H198 también identificados con tres de los iniciadores como plantas híbridas. Algunas de las características morfológicas que comparten

los individuos son: presencia de alas angostas, de forma oboval-obdelta, presencia y ausencia de antocianinas en hojas.

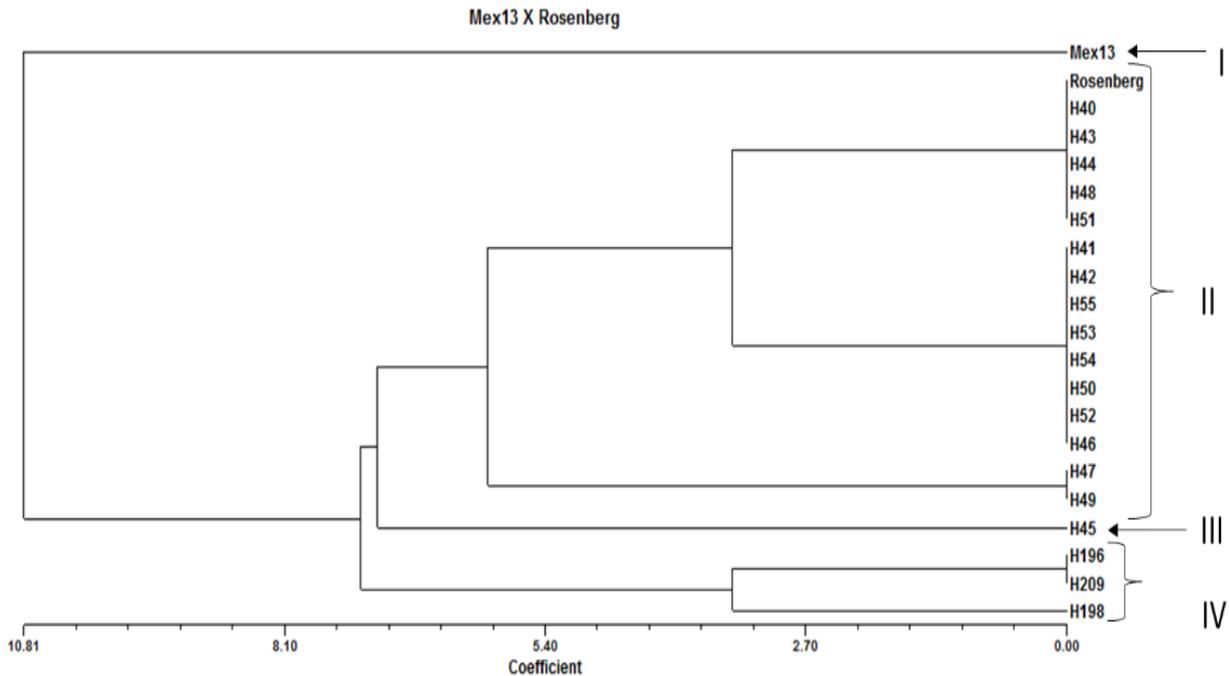


Figura 18. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'Rosenberg' construido con el método UPGMA

En la Figura 19 se muestra el dendrograma construido con los perfiles de SSR de la cruce de 'Rosenberg' x 'Colimex' en el que se pueden apreciar dos grupos. El primer grupo lo formó el progenitor femenino 'Rosenberg', los individuos H23, H26, idénticos a 'Rosenberg', por lo tanto son de origen nuclear, los individuos H34, H22, H30, H31, H32, H29, H24, H27, H21, H28 y H33 identificados como plantas híbridas con uno y dos de los iniciadores, El segundo grupo lo formó el progenitor masculino 'Colimex' y el híbrido H25 quien presentó similitud genética a dicho progenitor e identificado por tres de los iniciadores. Algunos de los caracteres morfológicos que comparten los individuos son: ausencia de alas y antocianinas en hojas.

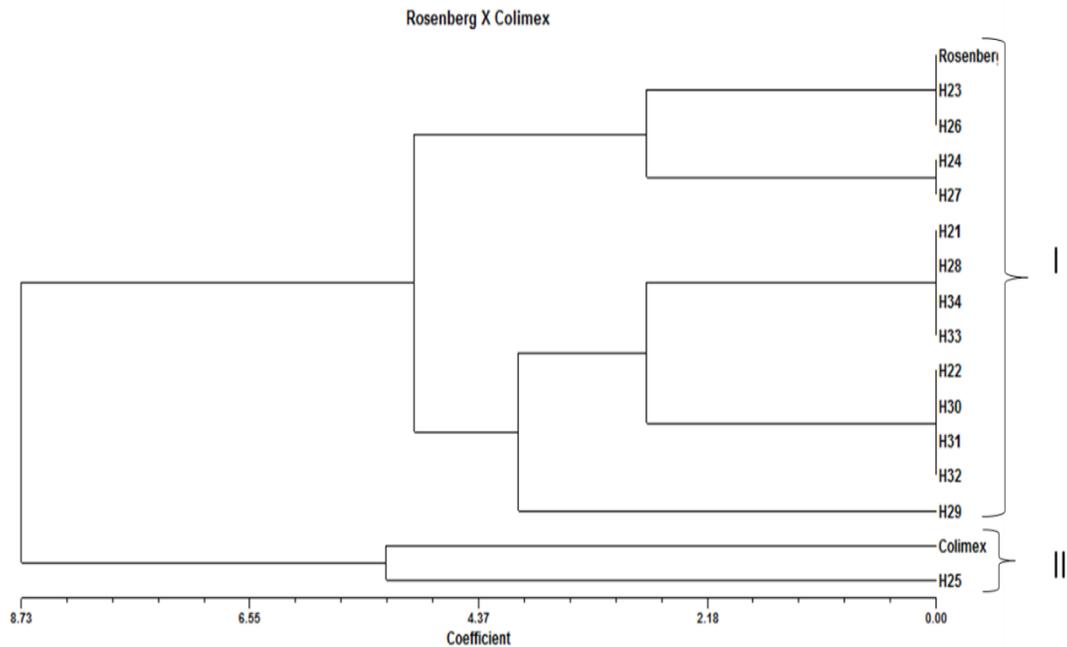


Figura 19. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Rosenberg' x 'Colimex' construido con el método UPGMA

La Figura 20 muestra el dendrograma construido con los perfiles de SSR de la cruce 'Rosenberg' x 'Mex20'. En el dendrograma se presentan los dos grupos en los que fueron separados los individuos. En el primer grupo se encuentra el progenitor femenino 'Rosenberg'. El segundo grupo se formó por los individuos H73, H75, H76, H77, H82, H199, H78, H81, H205, H79, H80, H74, y el progenitor masculino 'Mex20', quienes presentaron similitud genética con este progenitor, e identificados como híbridos por dos y tres de los iniciadores. Algunos caracteres morfológicos que comparten los individuos son: presencia de alas angostas y forma obcordiforme, ausencia de antocianinas en hojas y porte del árbol de apariencia tanto de 'Colimex' como de citranges.

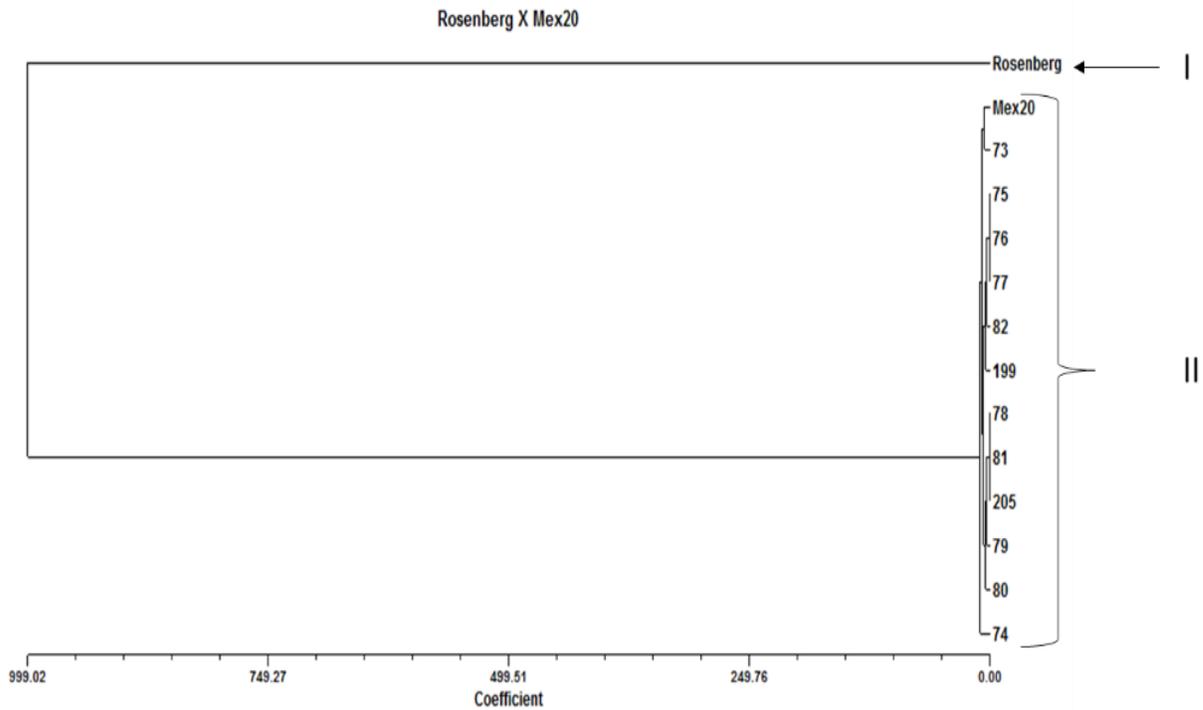


Figura 20. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Rosenberg' x 'Mex20' construido con el método UPGMA

La Figura 21 muestra el dendrograma construido con los perfiles de SSR de la cruce 'Rosenberg' x 'Mex13'. En el dendrograma los 7 individuos fueron separados en dos grupos. El primer grupo lo formó el progenitor femenino 'Rosenberg', los individuos H84, H85, H87, H89, quienes presentaron similitud genética con dicho progenitor, por lo que se identificaron como plantas nucelares. En este mismo grupo se agruparon los individuos H86 y H88, identificados como híbridos por uno de los iniciadores. Y el segundo grupo lo formó el progenitor masculino 'Mex13' y el híbrido H200, identificado con dos de los iniciadores. Algunos de los caracteres morfológicos que comparten los individuos son: ausencia de alas y antocianinas en hojas.

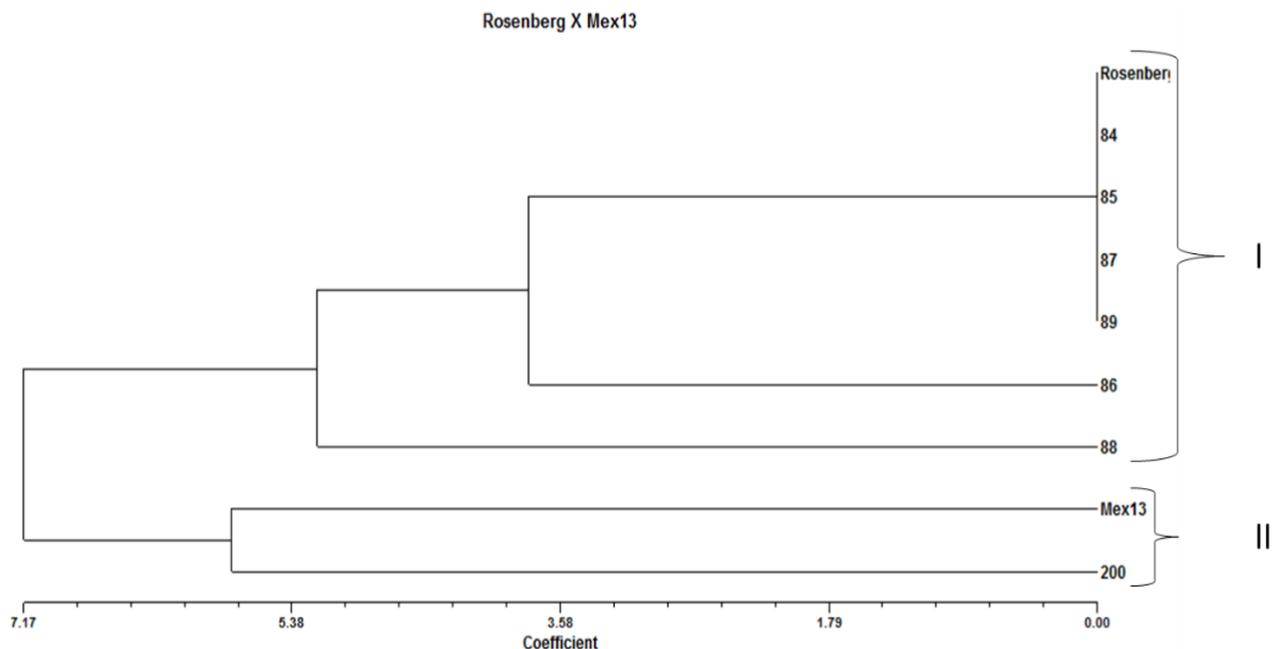


Figura 21. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Rosenberg' x 'Mex13' construido con el método UPGMA.

En la Figura 22 se observan los perfiles de SSR con los que se construyó el dendrograma en el que fueron separados los 17 individuos. Se pueden observar dos grupos. En el primero se encuentra el progenitor femenino "Colimex", los individuos H164, H149, H150, H151, H167, H165, H169, H166, H162, H161, H168, H159, H158, H157 y H156. Estos se ubicaron entre ambos progenitores lo que significa que comparten varios marcadores genéticos que fueron detectados por uno de los iniciadores. El segundo grupo esta formado por el progenitor masculino 'C-32' y los, híbridos H160, H163, quienes presentan similitud genetica con dicho progenitor y fueron identificados por los cuatro iniciadores probados. Algunos de los caracteres morfológicos, que presentaron los individuos son los mismos que en la cruce 'Colimex' x Citrange 'Yuma'. Según Onamu, *et al.* (2012) algunos investigadores han reportado baja correlación entre marcadores morfológicos y moleculares para varios cultivos (Karuri *et al.*, 2010; Koehler-Santos *et al.*, 2003; Ferriol *et al.*, 2004), y al respecto sugieren que eso puede

deberse a la naturaleza independiente de las variaciones morfológicas y moleculares.

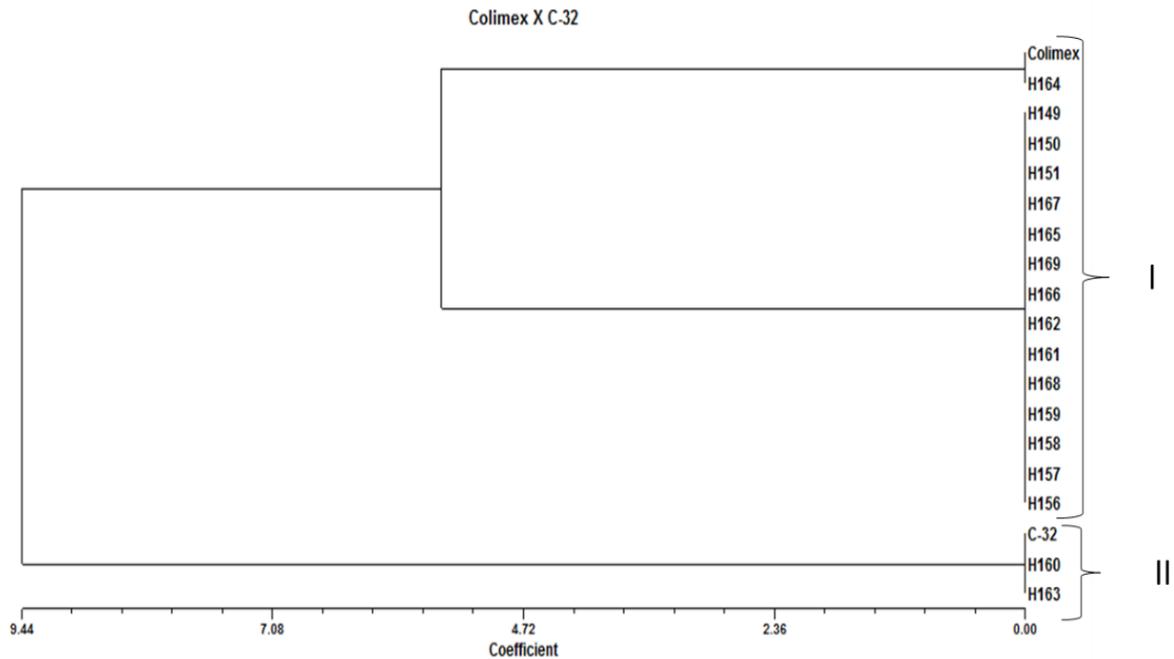


Figura 22. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Colimex' x 'C-32' construido con el método UPGMA

Los SSR son marcadores codominantes y multialélicos que suelen mostrar altos niveles de polimorfismo y que tienen un alto grado de fiabilidad y reproducibilidad (Morgante y Olivieri, 1993). Estos marcadores son los más poderosos para comprender los patrones detallados de la composición de parentesco y discriminación individual en los clones, por lo que son ampliamente utilizados para la identificación del cultivares y mapas genéticos (Tautz, 1989; Nassar y Collevatti, 2005). En el caso de una cruce entre padres homocigotos o estrechamente relacionados este tipo de marcadores pueden discriminar inequívocamente la descendencia cigótica de nucelar (Nageswara *et al.*, 2008).

Según Kumar *et al.* (2011), existe una variedad de técnicas con marcadores moleculares que se han desarrollado durante las últimas décadas y su aplicación

ha revolucionado el mejoramiento molecular de plantas. Estas técnicas permiten el análisis de la variación en el nivel genómico y la detección de la variación genética. Por lo tanto, la información obtenida desde el nivel molecular podría utilizarse para evaluar las relaciones genéticas entre los grupos principales de germoplasma.

De acuerdo con Belaj *et al.* (2003) una mejor comprensión de la efectividad de los diferentes marcadores moleculares se considera un paso prioritario hacia cualquier clasificación y caracterización de germoplasma y un requisito previo para los programas de mejoramiento más eficaz. Estos mismos autores reportan el mayor nivel de polimorfismo con análisis SSR. El alto nivel de polimorfismo asociado con estos marcadores, se debe al mecanismo único responsable de generar diversidad alélica que surge a través de la replicación de deslizamiento. Su naturaleza co-dominante también permite la detección de un alto número de alelos por locus y contribuye a mayores niveles de heterocigosidad esperada. Sin embargo, este resultado también depende de la especie en estudio.

Todas las técnicas de marcadores generan un alto grado de similitud en términos de topología del dendrograma, aunque con diferencias en el posicionamiento de algunas especies. La razón podría ser la naturaleza de marcadores, técnicas y nivel de polimorfismos detectados entre las especies estudiadas (Belaj *et al.* (2003).

4.3 Caracterización morfológica de híbridos de limón mexicano

En la figura 23, se muestran algunos de los caracteres morfológicos obtenidos en hojas de los diferentes híbridos de limón mexicano. Se pueden observar hojas unifoliadas, con presencia y ausencia de peciolo y con formas oval, oboval y lanceoladas (Figura 23a y b). En la figura 20c, se observan hojas unifoliadas, bifoliadas y trifoliadas, con formas desde elípticas, ovals y obovals con presencia de alas en el peciolo con forma obdelta.

5-8cm y ancho de lámina foliar de 3-5cm, forma elíptica, margen de lámina foliar dentado, ápice de la hoja obtusa y ausencia de antocianinas.

El grupo dos y cuatro, se distingue por tener área foliar de 16 cm² inserción brevipetiolada, longitud de lámina foliar de 5-8cm, ancho de 3-5cm, forma de lámina foliar elíptica, margen dentado, ápice de la hoja obtusa, presencia de alas, ancho de ala angosta, forma del ala obcordiforme, ausencia de antocianinas y con porte del árbol de apariencia tanto de 'Colimex' como de citrangeres. En este mismo grupo se encuentra el 'Híbrido Somático 11'.

En el grupo tres se encuentran, 'Colimex', 'Mex13', 'Mex20', 'Limequat', Citrange 'Yuma' y 'C-Swingle'. Los híbridos dentro de este grupo presentan área foliar de 12 cm² inserción de lámina foliar brevipetiolada con longitud de 5-8cm, ancho de lámina foliar de 3-5cm, forma de lámina foliar elíptica-oval, margen dentado, ápice de la hoja agudo-obtuso, presencia de alas, ancho de alas angosta, forma del ala oboval-obdelta, presencia y ausencia de antocianinas y porte del árbol parecido a los citrangeres. Las plantas de cítricos generalmente presentan hojas unifoliadas, alternas, la forma varía de ovadas a lanceoladas y el tamaño de 4 a 10 cm de largo y pueden poseer pecíolos alados más o menos amplios (Nageswara *et al.*, 2008).

En general los cuatro grupos comparten caracteres morfológicos, aunque no está claro cómo se heredan algunas de esas características, un ejemplo de eso puede ser la presencia de alas en el peciolo y de antocianinas en brotes vegetativos tiernos. Al parecer en las cruces se están segregando y recombinando los genes que controlan dichas características y de las cuales se han generado esas combinaciones.

Estos eventos pueden ser explicados posiblemente por el hecho de que tanto el limón mexicano como el limón italiano son híbridos naturales originados por un cruzamiento ancestral entre *C. medica* L. con *C. micranta*, pero que por el

fenómeno de la apomixis se ha mantenido su condición heterocigótica para muchos de sus locus. Por lo tanto cuando se cruzan se crean nuevas combinaciones genéticas donde segregan y se recombinan de manera aleatoria sus alelos y generan una gran diversidad de fenotipos. Cabe la posibilidad de que al recombinarse los genomas se generen combinaciones nuevas y se desarrollen fenotipos que no se asemejen a los progenitores de la cruce, sobre todo si se están expresando genes recesivos. Existe una gran cantidad de variación entre las especies y cultivares de cítricos como resultado de una frecuente mutación de yemas, hibridación interespecífica e intergenérica, apomixis y larga historia de cultivo (Shahsavari *et al.*, 2007). El uso de caracteres morfológicos puede ser útil, pero a menudo insuficiente en la diferenciación de los cultivares estrechamente relacionados. Por otro lado, ciertas variantes morfológicas diferentes pueden estar estrechamente relacionados filogenéticamente (Shahsavari *et al.*, 2007). Además los rasgos morfológicos son altamente influenciados por el entorno (Fang *et al.*, 1998).

Los individuos que se analizaron en este estudio comparten características de (*C. limon* L. Burm.), (*C. sinensis* L. Osbeck), (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle), *C. paradisi*, *C. amblycarpa*, *Poncirus trifoliata* y *Fortunella japonica*. Según Ollitrault y Navarro (2012), las especies cultivadas como la naranja agria (*C. aurantium* L.), naranja dulce, pomelo, limón y limón mexicano aparecieron por recombinación entre los taxones básicos. Son llamadas típicamente "especies falsas" asociadas con la propagación clonal (ya sea por semillas apomícticas o por injerto), donde la diversificación varietal fenotípica se produjo por una acumulación de variación de un prototipo híbrido ancestral, sin recombinación sexual. Dentro de estas especies hay una desconexión total entre la diversidad fenotípica y molecular. La importancia pomológica intraespecífica y diversidad fenológica se puede explicar por la selección humana de mutaciones de yemas favorables (Ollitrault y Navarro, 2012).

Las relaciones genéticas entre *C. medica*, *C. aurantifolia* y *C. limón* están claramente establecidas. Datos de cloroplastos y nucleares indican que los acervos genéticos de *C. reticulata* y *C. maxima* contribuyeron a la génesis del limón. Nicolosi *et al.* (2000) propusieron que esta especie fue resultado de una hibridación directa entre *C. aurantium* y *C. medica* y esta hipótesis es previamente reportada y apoyada por otros autores (Federici *et al.*, 1998; Gulsen y Roose, 2001; Barkley *et al.*, 2006; Fanciullino *et al.*, 2007; Pessina *et al.*, 2011; Ollitrault *et al.*, 2012; Garcia-Lor *et al.*, 2013). (Curk *et al.*, 2015) reportaron que 'Eureka', Lisboa y limones dulces, también llamado limones amarillos, tienen un genoma mitocondrial tipo pomelo, idéntico a la de la naranja agria. También identificaron a la naranja amarga como progenitor directo de este grupo de limones de acuerdo a los análisis con SSR. Los resultados obtenidos por estos autores concuerdan con la hipótesis de Nicolosi *et al.* (2000), que define a los limones como híbridos directos entre naranja agria (como progenitor femenino) y cidra, confirmado también por otros estudios moleculares (Gulsen y Roose, 2001; Ollitrault *et al.*, 2012; García-Lor *et al.*, 2013).

El origen de *C. aurantifolia* ha sido motivo de controversia, pero los datos moleculares (Federici *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000; Fanciullino *et al.*, 2007) apoyan la hipótesis de Torres *et al.* (1978) que es un híbrido entre *C. medica* y una especie de Papeda. Curk *et al.* (2015), reportan que limón mexicano surgió de por hibridación entre *C. micrantha* y cidra, y esto concuerda con reportes hechos por Scora (1975), Nicolosi *et al.* (2000), Ollitrault *et al.* (2012) y García-Lor *et al.* (2013).

Debido a su alta heterocigosidad presente en todos los genotipos que fueron utilizados como progenitores, se obtuvo una gran diversidad morfológica en la progenie. Resaltan las cruzas que se hicieron de limón mexicano 4x con limón italiano 2x, pues de estas se generaron individuos que se asemejan más al genotipo mexicano que al italiano debido a que el limón mexicano contribuyó con un doble juego del genoma. En las cruzas de limón mexicano 2x con citranges 2x, los híbridos expresan una gran dominancia del fenotipo de citrange, mostrando

hojas trifoliadas y una estructura del árbol muy semejante al citrange. Caso contrario ocurrió en las cruces que se hicieron de limón mexicano 4x con citrange 2x, pues en estas la dominancia del citrange se redujo significativamente y el híbrido prácticamente perdió el carácter trifoliado y la estructura de las ramas ya no son tan semejantes al citrange. La hibridación sexual para crear nuevos genotipos de cítricos, da como resultado una variación sustancial en los caracteres en la progenie ya que las variantes que producen son derivadas sexualmente y esto se debe a su alta naturaleza heterocigota (Gmitter *et al.*, 2009). Según Herrero *et al.* (1996) las limas y limones muestran un alto porcentaje de heterocigosidad. La hibridación parece ser una fuente importante de variación en estas variedades. Las especies de cítricos son conocidos por hibridar entre sí sin mucha dificultad (Iwamasa *et al.*, 1988) y numerosos casos de híbridos naturales se han reportado (Swingle, 1943).

La comprensión de la taxonomía, las relaciones filogenéticas, y la variabilidad genética de los cítricos es fundamental para determinar el origen, la evolución y las relaciones genéticas, la caracterización de germoplasma, el control de la erosión genética, el diseño de estrategias de muestreo o colecciones, el establecimiento de programas de mejoramiento, y el registro de nuevos cultivares (Herrero *et al.*, 1996).

Barrett y Rhodes (1976) llevaron a cabo un estudio filogenético integral donde evaluaron 146 características morfológicas y bioquímicas de árbol, hoja, flor y fruto. Estos investigadores sugirieron que había tres especies ancestrales verdaderas de cítricos, la toronja (*C. maxima* (Burm.) Merrill), mandarina (*C. reticulata* Blanco), y la cidra (*C. medica* L.). Scora (1975) también vio estas tres especies como los únicos cítricos verdaderos y todas las demás especies como introgresiones de estas formas ancestrales. Más recientemente, la filogenia y el origen genético de las especies importantes de los cítricos se ha investigado con el uso de marcadores moleculares (Nicolosi *et al.*, 2000; Moore, 2001; Barkley *et al.*, 2006).

De acuerdo a los análisis realizados sobre el origen de las especies secundarias con isoenzimas (Herrero *et al.*, 1997; Ollitrault *et al.*, 2003) (. Federici *et al.*, 1998), RFLP, RAPD, SCAR (Nicolosi *et al.*, 2000), AFLP y STMS (Luro *et al.*, 2001; Barkley *et al.*, 2006) se apoyan las siguientes conclusiones (Nicolosi, 2007). *C. sinensis* y *C. aurantium* están cerca de *C. reticulata* pero es evidente que contienen fragmentos de introgresión del genoma nuclear de *C. maxima*. La mayor proporción de *C. reticulata* indican que no son híbridos directos pero probablemente retrocruzamiento de primera o segunda generación con el acervo genético *C. reticulata*. El análisis de genoma de cloroplastos (Green *et al.*, 1986; Nicolosi *et al.*, 2000) muestra que *C. maxima* era el progenitor femenino durante la hibridación con *C. reticulata*. *C. paradisi* está cerca de *C. maxima*, pero alelos del acervo genético de *C. reticulata* también se comparten con *C. sinensis*.

El conjunto de caracteres que definen las especies secundarias (naranjas dulces y amargas, pomelo, limón y lima) se basa en estructuras genómicas complejas de origen interespecífica con alta heterocigosidad que se estabilizan por propagación vegetativa (apomixis y, más recientemente, esquejes o injertos) (Ollitrault *et al.*, 2003). La falta de suficientes descripciones, muestras y hábitats originales ha hecho que sea difícil identificar a los antepasados de los cítricos. Una multitud de híbridos interespecíficos naturales y variedades cultivadas, incluyendo mutantes espontáneos, oscurece aún más la historia de los cítricos (Gmitter *et al.*, 2008).

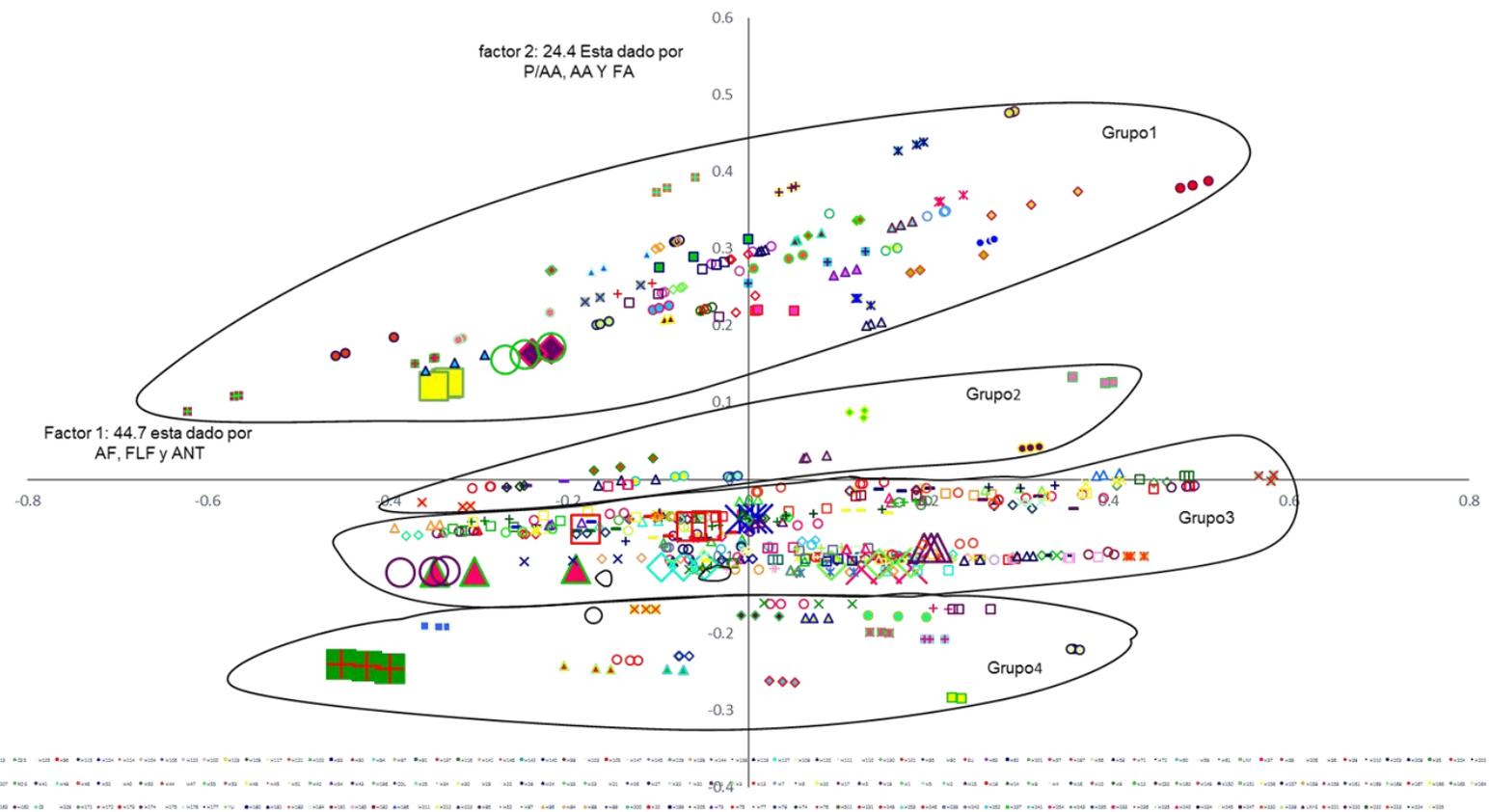


Figura 24. Dispersión de los progenitores e híbridos sobre el plano de los dos primeros factores. AF-área foliar, FLF- forma de lámina foliar, ANT-antocianinas, P/AA-presencia-ausencia de alas, AA-anchura del ala y FA-forma del ala

V CONCLUSIONES

Se identificaron plantas híbridas de limón mexicano con limones italianos citranges e híbridos somáticos entre citranges y naranjo dulce

Los cuatro iniciadores permitieron la identificación de plantas híbridas

El mayor número de plantas híbridas se identificaron con los iniciadores TAA45 y cAGG9

La citometría de flujo permitió la identificación de 182 plantas híbridas triploides de limón mexicano.

Las combinaciones que mas híbridos triploides generaron fueron las cruzas 4x x 2x.

Los caracteres morfológicos permitieron la identificación y caracterización de plantas híbridas de limón mexicano.

Los 203 individuos analizados, comparten caracteres morfológicos con sus progenitores.

Los caracteres morfológicos identificados frecuentemente en los individuos fueron alas angostas y de forma oboval-obdelta, ausencia de antocianinas en hojas y estructura del árbol similar a los citranges.

Los marcadores genéticos denominados microsatélites (SSR), la citometría de flujo y algunos marcadores morfológicos fueron útiles para la identificación y selección temprana de plantas híbridas en una población progenie originada por hibridación sexual entre genotipos diploides y tetraploides de limón mexicano con limones italianos, citranges e híbridos somáticos, asistida por el rescate y

germinación *in vitro* de embriones inmaduros. Estas herramientas permiten eliminar en etapas tempranas las plantas de origen nucelar y con ello ahorrar tiempo y recursos de investigación en el programa de mejoramiento genético

Con la caracterización morfológica de hoja y de la estructura de los árboles se logró detectar plantas expresando caracteres presentes en los progenitores, pero además se pudo detectar fenotipos expresando nuevas combinaciones genéticas. Algunas plantas expresaron fenotipos de bajo vigor y capacidad de sobrevivencia que murieron en campo o sobreviven con aspecto decadente. En algunas combinaciones se detectaron plantas tolerantes a la enfermedad conocida como antracnosis que provoca fuertes pérdidas de producción en los periodos de invierno. También se detectaron plantas precoces y de porte enano.

La información generada por esta investigación ayudará a practicar la selección de genotipos híbridos con potencial de explotación comercial o para usarse como progenitor en una segunda generación de hibridación por retrocruza.

VI. LITERATURA CITADA

- Acquaah, G. 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. 584 p. Blackwell publishing. Malden, MA. USA.
- Adams S., R. Vinkenoog, M. Spielman, H. G. Dickinson, R. J. Scott. 2000. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. Development 127:2493–2502
- Albach R. F., G. H. Redman. 1969. Composition and inheritance of flavanones in Citrus fruit. Phytochemistry 8:127-143.
- Aleza P., J. Juárez, J. Cuenca, P. Ollitrault, and L. Navarro. 2010. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x 3 2x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. Plant Cell Rep 29:1023-1034.
- Aleza P., J. Juárez, M. Hernández, P. Ollitrault, L. Navarro. 2012. Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on 4x2x sexual hybridisations. Tree Genetics & Genomes. 8:1293-1306.
- Arumuganathan K. and E. D. Earle. 1991a. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Molecular Biology Reporter 9, 229-233.
- Arumuganathan K. and E. D. Earle. 1991b. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Molecular Biology Reporter 9: 210-220.
- Ashari S., D. Aspinall, M. Sedgley. 1988. Discrimination of zygotic and nucellar seedlings of five polyembryonic citrus rootstocks by isozyme analysis and seedling morphology. J Hort Sci 63:695-703.

- Azofeifa-Delgado A. 2006. Marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-242. 2006.
- Bajaj, Y. P. S. 1994. Plant protoplast and genetic engineering. In: Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agricultura and forestry*, Vol. 29. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Bar-Joseph M., R. F. Lee. 1989. Citrus tristeza virus. AAB descriptions of plant viruses No 353. *Assoc Appl Biol, Welles-bourne, Warwick*, 7 pp.
- Barkley N. A., M. L. Roose, R. R. Krueger, C. T. Federici. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* 112, 1519-1531.
- Barrett H. C., A. M. Rhodes. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationship in cultivated citrus and its close relatives. *Syst. Bot.* 1, 105-136.
- Barzegar A., H. H. Sohi, H. Rahimian. 2006. Characterization of Citrus tristeza virus isolates in northern Iran. *J Gen Plant Pathol* 72:46-51.
- Bastianel M. S., F. Schwarz, H. D., Colleta-Filho, L. L. Lin, M. A. Machado, O. C. Koller. 1998. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Genet Mol Biol* 21:123-127.
- Bastianel M., M. Cristofani-Yaly. A. C. de Oliveira, J. Freitas-Astúa, A. A. F. Garcia, M. D. Vilela de Resende, V. Rodrigues. and Machado M. A. 2009. Quantitative trait loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco X *C. sinensis* L. Osbeck). *Euphytica* 169:101-111.
- Bauer, M. J. 2006. The interploidy hybridization barrier in *Zea mays* L. University of Missouri-Columbia, Ph.D. dissertation.
- Bayer R. J., D. J. Mabberley, C. Morton, C. H. Miller, I. K. Sharma, B. E. Pfeil, S. Rich, R. Hitchcock, and S. Sykes. 2009. A molecular phylogeny of the orange subfamily

(Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *American Journal of Botany* 96:668-685.

Beattie G. A. C., P. Holford, D. J. Mabberley, A. M. Haigh, and P. Broadbent. 2008. On the origins of Citrus, Huanglongbing, *Diaphorina citri* and *Trioza erytreae*, pp. 25-57. In: *Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing*. USDA, University of Florida. December 2008. Orlando FL.

Belaj A., Z. Satovic, G. Cipriani, L. Baldoni, R. Testolin, L. Rallo, I. Trujillo. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor. Appl. Genet.* 107, 736-744.

Beuselinck P. R., Steiner, J.J., Rim, Y. W. 2003. Morphological comparison of progeny derived from 4x-2x and 4x-4x hybridization of *Lotus glaber* Mill. and *L. corniculatus* L. *Crop Sci* 43:1741-1746.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331

Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology.* 88: 7-37.

Brink, R. A. y Cooper, D.C. 1947. The endosperm in seed development. *Bot. Rev.* 13: 423-541.

Cameron, J. W., Soost, R. K. 1980. Mono and poly embryony among tetraploid Citrus hybrids. *HortSci* 15:730-731.

Cameron, J. W. y Soost, R. K. 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REuther, W., L. D. Batchelor and H. J. Webber (Eds.) *the Citrus Industry* Vol. 1, Univ. Calif., Div. Of Agric. Sci. Berkeley. 325-370.

- Cameron, J. W. y Burnett R. H. 1978. Use of sexual tetraploids seed parent for production of triploids citrus hybrids. HortScience. 13: 167-169.
- Cameron, J. W. y Soost R. K. 1969. Characters of new populations of citrus polyploids and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny. Proc. First int. Citrus Symposium. 1: 199-205.
- Cao, Q. Q., Meng, H. J., Wen, X. P., Yi, H. L., Deng, X. X. 2007. Genetic diversity of male sterile and low fertility germplasm of Citrus revealed using SSR markers. Chin J Agr Biotec 4:99-104.
- Carlson, P. S., Smith, H. H., Dearing, R. D. 1972. Parasexual interspecific planthybridization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2292-2294.
- Chen, R. Z, Li, G. G. y Zhang, L. Y. 1991. Callus induction and triploid plant regeneration from endosperm of 'Hongjiang' sweet orange. Acta Bot. Sinica 33: 848-854.
- Cheng, A. X., Xia, G. M., Zhi, D. Y., Chen, H. M. 2004. Intermediate fertile *Triticum aestivum* (+) *Agropyron elongatum* somatic hybrids are generated by low doses of UV irradiation. Cell Research 14: 86-91.
- Corazza-Nunes, M. J., Machado, M. A., Nunes, W. M. C., Cristofani, M. N., Targon, M. L. P. 2002. Assesment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradise* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm) Merr.) using RAPD and SSR markers. Euphytica 126:169-176.
- Cristofani, M., Machado, M. A. 1998. Utilização de marcadores moleculares na identificação de plântulas zigóticas e nucelares em sementeira de limão 'Cravo'. Laranja 19:147-158.
- Cristofani, M., Machado, M. A., Targon, M. P. L. N. y Takita, M. A. 2002. Tristeza tolerance by improvement methods. In 7th International citrus seminar: Improvement. (Eds) Donadio, L., C. y Sanches-Stuchi, E. Citrus Experimental station of Bevedoro, SF Brazil. Pages 71-73.

- Cuenca, J., Aleza, P., Juárez, J., Pina., J. A., Navarro, L. 2010. 'Safor' mandarin: a new citrus midlate triploid hybrid. HortScience 45: 977-980.
- Curk, F., Garcia-Lor, A., Snoussi-Trifa, H., Froelicher, Y., Ancillo, G., Navarro, L. y Ollitrault, P. 2015. New Insights on Limes and Lemons Origin from Nuclear and Cytoplasmic Markers Genotyping and Targeted Nuclear Gene Sequencing. Proc. XIIIth Intl. Citrus Congress Eds.: B. Sabater-Muñoz *et al.* Acta Hort. 1065, ISHS 2015
- Carputo, D. L., Frusciante, S. J., Peloquin. 2003. The role of 2n gametes and endosperm balance number in the origin and evolution of polyploids in the tuber-bearing solanums, Genetics 163:287-294.
- Da Craça, J. V. 2008. Biology, History and World Status of Huanglongbing. Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Hermosillo, Sonora.
- Da Graca, J. V. 2010. Etiology, history and world situation of citrus huanglongbing. 2º Taller Internacional sobre el huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México.
- Deng, X. X., Liu, G. B. y Zhang, W. C. 1985. Studies on the chromosome variation in the callus of Citrus (in Chinese). China Citrus 3: 4-6.
- Deng, X. X., Grosser, J.W. y F.G. Gmitter, Jr. 1992. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of Fortunella crassifolia cultivar 'Meiwa' with Citrus sinensis cultivar 'Valencia'. Sci. Hort. 49:55-62.
- Doyle, J. J. y Doyle. J. L. 1987. Arapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., Caskey, C. T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am J Hum Genet 49:746-756.

- Esen, A. y Soost, R. K. 1971. Unexpected triploids in Citrus: their origin, identification, and possible use. *J. Hered.* 62: 329-333.
- Esen, A., Soost, R. K., Geraci, G. 1978. Seed set, size, and development after 4x x 2x and 4x x 4x crosses in citrus. *Euphytica* 27: 283-294.
- Esen, A. y soost, R. K. 1972. Tetraploids progenies from 2x x 4x crosses in citrus and their origin. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 410-414.
- Esen, A., Soost, R. K. 1977. Adventive embryogenesis in Citrus and its relation to pollination and fertilization. *Am J Bot* 64:607-614.
- Fanciullino, A. L., Dhuique-Mayer, C., Luro, F., Morillon, R. y Ollitrault, P. 2007. Carotenoid Biosynthetic Pathway in the Citrus Genus: Number of Copies and Phylogenetic Diversity of Seven Genes. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 7405-7417.
- Fang, D. Q., Roose. M. L. 1997. Identification of closely related Citrus cultivars with inter-simple sequence repeat marker. *Theor Appl Genet* 95:408-417.
- Fang, D. Q., Federici, C. T. y Roose, M. L. 1998. A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics*, 150: 883-890.
- Fatta Del Bosco, S, Matranga, G., Geraci, G. 1992. Micro and macro-sporogenesis of two triploid hybrids of citrus. *Proceedings of 7th International Citrus Congress. International Society of Citriculture, Acireale, Italy* 1: 122-124.
- Federici, C. T., Fang, D. Q., Scora, R. W., Roose, M. L. 1998. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 96, 812-822.

- Ferrante, S. P., Lucretti, S., Reale, S., De Patrizio, A., Abbate, L., Tusa, N., Scarano, M. T. 2010. Assessment of the origin of new citrus tetraploid hybrids ($2n = 4x$) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. *Euphytica* 173:223-233.
- Ferriol M, B Pico, D Fernandez, F Nuez (2004) Molecular diversity of germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers. *Crop Sci.* 44:653-664.
- Froelicher, Y., Mouhaya, W., Bassene, J-B, Constantino, G., Kamiri, M., Luro, F., Morillon, R. y Pllitault, P. 2011. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics and Genomes* 7(1):49-61.
- Frost, H. B., Soost, R. K. 1967. Seed reproduction: Development of gametes and embryos, 290-324 p. In: Reuther W, Batchelor LD, Webber HJ (Eds.). *The Citrus Industry*. University of California Press, Berkeley, USA.
- Frost, H. B. 1948. Genetics and breeding. In: W Reuther, HJ Webber, LD Batchelor, eds. *The Citrus Industry*, Vol. 1. University of California Press, Berkeley, USA, 817-914.
- Garcia, R., Asin, M. J., Forner, J., Carbonell, E. A. 1999. Genetic analysis of apomixes in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor Appl Genet* 99:511-518.
- Garcia-Lor, A., Curk, F., Morillon, R., Snoussi, H., Ancillo, G., Luro, F., Navarro, L., Ollitault, P. 2013. A nuclear phylogenetic analysis; SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the "true Citrus fruit trees" group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *Ann Bot* 111:1-19.
- García-Lor, A., Ancillo, G., Navarro, L., Ollitault, P. 2013a. Citrus (Rutaceae) SNP markers based on Competitive Allele-Specific PCR; transferability across the Aurantioideae subfamily Applications in Plant Sciences 1(4): doi:10.3732/apps.1200406.
- Geraci, G. 1978. Percentage of triploid offspring of cross-pollinated diploid polyembryonic citrus. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 57-58.

- Geraci, G., Depasgual, F. y Tusa, N. 1977. Percentages of spontaneous triploids in progenies of diploid lemons and mandarins. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2: 596-597
- Gmitter, F. G. Jr., Soneji, J. R., Nageswara, Rao, M., Huang, S. 2008. Citrus. In: Janick J, Paull RE (eds) *The encyclopedia of fruits and nuts*. CABI, Wallingford, UK.
- Gmitter, F. G., Ling, X. B. y Deng, X. X. 1990. Induction of triploid Citrus plants from endosperm calli in vitro. *Theor. Appl. Genet.* 80: 785-790.
- Gmitter, F. G. Jr., Ling, X. B., Deng, X. X. 1991. Colchicine-induced polyploidy in Citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Science* 74(1): 135-141.
- Gmitter, F. G., Jr., Soneji, J. R. y Rao, M. N. 2009. Citrus breeding, p. 105-132. In: Jain, S.M. and P.M. Priyadarshan (eds.). *Breeding plantation tree crops: Temperate species*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Green, R. M., Vardi, A., Galun, E., 1986. The plastome of Citrus cultivars ad species and comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.* 72, 170- 177.
- Grosser, J. W., Gmitter, F. G. Jr. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Reviews* 8: 339-374.
- Grosser, J. W., Ollitrault, P. y Olivares-Fuster, O. 2000. Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 36: 434-449.
- Grosser, J. W. y Gmitter, F. G. 2005. SIVB Congress Symposium Proceedings "Thinking outside the cell": applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. *In vitro cell Dev. Biol. Plant* 41: 220-225.
- Grosser, J. W. y F.G. Gmitter, Jr. 2009. In-vitro breeding provides new and unique opportunities for conventional breeding. *Acta Hort.* 829:65-72.

- Grosser, J. W., Deng, X.X. y Goodrich, R. M. 2007. Somaclonal variation in sweet orange: practical applications for variety improvement and possible causes. In: I.H. Kahn (Ed.), Citrus genetics, breeding and biotechnology, CAB International, pp. 219-234.
- Grosser, J. W., Gmitter, F. G. Jr. 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 104, 343-357.
- Gulsen, O., Roose, M. L. 2001. Lemons diversity and relationships with selected citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 12, 6309-6317.
- Guo, W. W., Deng, X. X. 2000. Citrus cybrids and their cytoplasmic genetic recombination. *Acta Hort Sin.* 27 (Suppl.), 487-491.
- Halbert, S. E. y Manjunath, K. L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Fla. Entomol.* 87: 330-353.
- Hammatt, N., Lister, A., Blackhall, N. W., Gartland, G., Ghose, T. K., Gilmour, D.M., Power, J. B., Davey, M. R., Cocking, E. C. 1990. Selection of plant heterokaryons from diverse origins by flow cytometry. *Protoplasma* 154: 34-44.
- Hearn, C. J. 1973. Recently released cultivars and the development of new hybrids of Citrus fruits in Florida. First Meeting of the International Society of Citriculture, Murcia-Spain, 81-85 p.
- Hearn, C. J. 1984. Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. *Journal of the American Society for horticultural Science.* P.270.
- Hensz, R. A. 1971. 'Star Ruby', a new deep-red-fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society* 25: 54-58.

- Hernandez, N. G. A. 2013. Prevalencia de *Toxoptera citricida* y tasa de adquisición del Citrus tristeza virus en la península de Yucatan. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 83 p.
- Herrero, R., Asins, M. J., Carbonell, E. A., Navarro, L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor Appl Genet* 92:599-609.
- Herrero, R., Asins, M. J., Carbonell, A. E. y Navarro, L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 92:599-609.
- Herrero, R., Asins, M. J., Carbonell, E. A., Navarro, L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 92, 599-609.
- Hirai, M., Kozaki, I., Kajiura, I. 1986. The rate of spontaneous inbreeding of trifoliolate orange and some characteristics of the inbred seedlings. *Jpn J Breed* 36:138-146.
- Hwang, A. S. 1991. The polyembryony and identification of zygotic seedlings of lemon. *J Agr Res China* 40:225-232.
- Hwang, A. S., Yeuh, C. S. 1989. Studies on polyembryony and improvement of breeding efficiency of oranges. *Tai Agr Res Ins Spe Pub* 27:28-38.
- IPGRI. 2000 Descriptores para los cítricos *Citrus* spp. Instituto Nacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, p 75.
- Iwamasa, M., Nito, N., Ling, J. T. 1988. Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily Aurantioidea. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1, 123-130.
- Jacob, H. J., Lindpaintner, K., Kusumir, E. L., Bunkery, K., Mao, I. P., Gantenv, D., Dzau, J., Lander, E. S. 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67:213-224.

- Jaskani, M. J., Khan, I. A., Khan, M., M. 2005. Fruit set, seed development and embryo germination in interploidy crosses of citrus. *Sci Hort* 107:51-57.
- Jauhar, P. P. 2006. Modern Biotechnology as an Integral Supplement to Conventional Plant Breeding: The Prospects and Challenges. *Crop Science* 46:1841-1859.
- Jenny, C., Tomekpe, K., Bakry, F., Escalant, J. V. 2003. Conventional breeding of bananas. In: Jacome L, Lepoivre P, Martin D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (eds) *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France, pp 199-208.
- Jin-Hu, Wu. y Pauline Mooney. 2002. Autotetraploid tanger plant regeneration from in vitro Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 99-104.
- Johnston, S. A., den Nijs, T. P. M., Peloquin, S. T. y Hanneman, R. E. Jr. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor. Appl. Genet.* 57: 5-9.
- Karuri, H W, E M Ateka, R Amata, A B Nyende, A W T Muigai, E Mwasame, S T Gichuki (2010) Evaluating diversity among Kenyan sweet potato genotypes using morphological and SSR markers. *Int. J. Agric. Biol.* 12:33-38.
- Kepiro, J. L. y Roose, M. L. 2010. AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes* 6:1-11.
- Khan, I. A, Roose, M. L. 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange. *J Amer Soc Hort Sci* 113:105-110.

- Khan, I., A. y Grosser, J. W. 2004. Regeneration and characterization of somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* (sweet orange) and *Citrus micrantha*, a progenitor species of lime. *Euphytica* 137: 271-278.
- Kijas, J. M. H., Thomas, M. R., Fowler, J. C. S., Roose, M. L. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theor Appl Genet* 94: 701-706.
- Kobayashi, S., Ohgawara, T., Saito, W., Nakamura, Y. y Omura, M. 1997. Production of triploid somatic hybrids in Citrus. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 66: 453-458.
- Kobayashi, S., Leda, .I., Nakantani, M. 1979. Studies on the nucellar embryogenesis in Citrus II. Formation of the primordium cell of the nucellar embryo in the ovule of the flower bud, and its meristematic activity. *J Jpn Soc Hort Sci* 48:179-185.
- Koltunow, A. M., Brennan, P., Bond, J. E. y Barker, S. J. 1998. Evaluation of genes to reduce seed size in Arabidopsis and tobacco and their application to Citrus. *Mol. Breed.* 4: 235-251.
- Koehler-Santos, P., Dornelles, A. L., de Freitas L. B. 2003. Characterization of mandarin citrus germplasm from southern Brazil by morphological and molecular analysis. *Pesq. Agropec. Bras.* 38:797-806
- Krug, C. A. y Bacchi, O. 1943. Triploid varieties of Citrus. *J. Hered.* 34: 277-283.
- Kumar, M. B., Chai, L., Hamdy, M. A., Zhang, X. y Deng, X-X. 2011. Comparative analysis of genetic diversity in Citrus germplasm collection using AFLP, SSAP, SAMPL and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 129:798-803.
- Leblanc, O., Grimanelli, D., González-de León, Savidan, Y. 1995. Detection of the apomictic mode of reproduction in maize- *Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *Theor Appl Genet* 90:1198–1203.

- Lin, B. Y. 1975. Parent effects on gene expression in maize endosperm development. Madison Wis. Dissertation. University of Wisconsin-Madison. Wisconsin.
- Lindsay, G. C., Hopping, M. E., Binding, H., Burge, G., K. 1995. Graft chimeras and somatic hybrids for new cultivars. *New Zealand Journal of Botany* 33: 79-92.
- Litt, M. y Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 397-401.
- Liu, Y. Z., y Deng X. X. 2007. Citrus Breeding and Genetics in China. *The Asian And Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology* 1(1):23-28.
- Luro, F., Rist, D. y Ollitrault, P. 2001. Evaluation of genetic relationships in Citrus genus by means of sequence tagged microsatellites. *Acta Hort.* 546: 237-242.
- Manjunath, K. L., Halbert, S. E., Ramadugu, C., Webb, S. y Lee, R. F. 2008. Detection of Candidatus *Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* and Its Importance in the Management of Citrus Huanglongbing in Florida. *The American Phytopathological Society.* 98: 387 - 396.
- Martinez, O., E., del C. 2010. Poliembrionia e identificación de embriones cigóticos y nucelares de mango (*Mangifera indica* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 146 p.
- Medina-Urrutia, V. M., Robles-González, M. M., Becerra-Rodríguez, S., Orozco-Romero, J., Orozco-Santos, M., Garza-López, J. G., Ovando-Cruz, M. E., Chávez-Contreras, X., y Felix-Castro, F. A. 2001. El cultivo del limón Mexicano. INIFAP-CIRPAC-Tecomán. Libro Técnico # 1, 189 páginas.
- Mei-lian, T., Jian-kun, S., Xiu-xin, D. 2007 Production of two mandarin trifoliolate orange hybrid populations via embryo rescue with verification by SSR analysis. *Euphytica* 157:155-160.

- Mendis, M. H., Power, J. B., Davey, M. R. 1991. Somatic hybrids of the forage legumes *Medicago sativa* L. and *M. falcata* L. *Journal of Experimental Botany* 42: 1565-1574.
- Moore, G. A., Castle, W. S. 1988. Morphological and isozymic analysis of open-pollinated *Citrus* rootstock populations. *J Hered* 79:59-63.
- Moore, G. A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet.* 17, 536-540.
- Moore, G. A., Jacono, C. C., Neidigh, J. L., Lawrence S. D. y Cline, K. 1992. Microsatellite markers in *Citrus*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128, 584-590.
- Moreno, P., Ambros, S., biach-Marti, M. R., Guerri, J. y Pena, L. 2008, "Plant diseases that changed the world - *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry", *Molecular Plant Pathology*, vol. 9, no. 2, pp. 251-268.
- Morgante, M., Olivieri, A. M. 1993. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. *Plant J* 3:175-182.
- Muralidharan, K., y Wakeland, E. K. 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *Biotechniques* 14: 362-390.
- Nageswara, M. R., Soneji, J. R., Chen, C., Huang, S., Gmitter F. G. Jr. 2008. Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers *Tree Genetics & Genomes* 4:113-124.
- Nassar, N. M. A., Collevatti, R. G. 2005. Microsatellite markers confirm high apomixis level in cassava bred clones. *Hereditas* 142:33-37.
- Navarro, L., Olivares-Fuster, O., Juárez, J., Aleza, P., Piña, J. A., Cerrera, Fagoaga, M., Pérez C. R. M. y Peña, L. 2002. *Citrus* improvement in Spain through triploid

breeding, somatic hybridization and genetic transformation. In 7th International citrus seminar: Improvement. (Eds) L. C. Donadio and E. Sanches-Stuchi. Citrus Experimental station of Bevedoro, SF Brazil. Pages 57-70.

Navarro, L., Juarez, J., Aleza, P., Cuenca, J., Julve, J. M., Piña, J. A. y Olivares-Fuster, O. 2006. Selección de nuevos mandarinos triploides. Agraria Comunitat Valenciana. 2ª época, año 2, 7:3-26.

Nikolaeva, O. V., Karasev, A. V., Powell, C. A, Gumpf, O. J., Garnsey, S. M., y Lee, R. F. 1996. Mapping of epitopes of citrus tristeza virus specific Monoclonal Antibodies Using Bacterially Expressed Coat protein Fragments. *Phytopathology*, 86, 974-979.

Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., Malfa, S. I., Continella, G., Tribulato, E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoret Appl Genet* 100:1155-1166.

Nicolosi, E. 2007. Origin and taxonomy. In: IA Khan, ed. *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI: Wallingford, UK.

Novelli, V. M., Cristofani, M., Souza, A. A., Machado, M. A. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology* 29, 90-96.

Ohgawara, T., Kobayashi, S., Ohgawara, E., Uchimaya, H., Ishi, S. 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 1-4.

Oiyama, I., Kobayashi, S. 1990. Polyembryony in undeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with a citrus tetraploid. *HortScience* 25: 1276-1277.

Oiyama, I. 1991. Use of pollen from somatic hybrid between Citrus and Poncirus in the production of triploids. *HortScience*: 1082.

- Oliveira, A. C., Garcia, A. N., Cristofani, M., Machado, M. A. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica* 128:397-403.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F., Froelicher, Y. 2008. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breeding Rev* 20:323-354.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Vanel, F., Froelicher, Y: 2000, Creation of triploid Citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. *Proceedings of First International Citrus Biotechnology Symposium. Acta Horticulturae* 535:191-198.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F., Froelicher Y. y Bruyère, S. 2002. Triploid easy peeler breeding with help of biotechnologies. In 7th International Citrus Seminar: Improvement. (Eds) L. C. Donadio and E. Sanches-Stuchi. Citrus Experimental station of Bevedoro, SF Brazil. Pages 44-45.
- Ollitrault, P., y Michaux-Ferriere, N. 1992. Application of flow cytometry for citrus genetic and breeding. In *Proceedings of VII International Citrus Congress, International Society of Citriculture, Acireale, Italy, 1*, pp. 193-198.
- Ollitrault, P. y Navarro, L. 2012. Citrus. In: M.L. Badenes and D. Byrne (Eds.). *Fruit Breeding*. p. 623-661. Springer New York.
- Ollitrault, P., Jacquemond, C., Dubois, C. y Luro, F. 2003. Citrus. In *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Hamon, Seguin, Perrier and Glaszmannn (eds). Science Publishers Inc., pp. 193-217.
- Ollitrault, P., Navarro, L. 2012. Citrus. In: ML Badenes, DH Byrne, eds. Springer US, 623-662.
- Ollitrault, P., Terol, J., Chen, C., Federici, C. T., Lotfy, S., Hippolyte, I., Ollitrault, F., Bérard, A., Chauveau, A., Costantino, G., Kacar, Y., Mu, L., Cuenca, J., Garcia-Lor, A., Froelicher, Y., Aleza, P., Boland, A., Billot, C., Navarro, L., Luro, F., Roose, M.L., Gmitter, F.G., Talon, M. y Brunel, D. 2012. A reference genetic map of C.

clementina; citrus evolution inferences from comparative mapping. BMC Genomics.

Olsen, R. T., Ranney, T.G. 2006. Fertility and inheritance of variegated and purple foliage across a polyploidy series in *Hypericum androsaemum* L. J Am Soc Hort Sci 131:725-730.

Onamu, R., Legaria, S. J. P., Sahagún, J. C., Rodríguez, de la O J. L. y Pérez, N. J. 2012. Análisis de marcadores morfológicos y moleculares en papa (*Solanum tuberosum* L.). Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (4): 267-277.

Orozco-Santos, M. 1994. La tristeza de los cítricos enfermedad potencialmente peligrosa para la citricultura mexicana. SARH-INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Tecomán. Folleto Técnico # 1.

Orozco-Santos, M. y Timmer, L. W. 2005. Antracnosis del limón mexicano: situación actual y manejo integrado en el trópico seco de México. Memorias del V Congreso Argentino de Citricultura 2005. Concordia, Entre Ríos, Argentina. p. 27.

Parida, S., K., Kalia, S., K., Sunita, K., Dalal, V., Hemaprabha, G., Selvi, A., Pandit, A., Singh, A., Gaikwad, K., Sharma, T.,R., Srivastava, P.,S., Singh, N.,K., Mohapatra, T. 2009. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. Theor Appl Genet 118:327-338.

Park, S. M., Wakana, A., Hiramatsu, M., Uresino, K. 2002. A tetraploid hybrid plant from 4x x 2x crosses in *Vitis* and its origin. Euphytica 126:345-353.

Pensabene, G. B. 2009. Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura Española. Tesis de Doctor en Ciencias. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA. p. 226.

Pérez-Tornero, O. y Porras I. 2008. Assessment of polyembryony in lemon: rescue and in vitro culture of immature embryos. Plant Cell Tiss Organ Cult 93:173-180.

- Pessina, D., Gentili, R., Barcacciab, G., Nicoléb, S., Rossic, G., Barbestia, S., Sgorbatia, S. 2011. DNA content, morphometric and molecular marker analyses of Citrus limonimeditica, C. limon and C. medica for the determination of their variability and genetic relationships within the genus Citrus. *Sci. Hort.* 129, 663-673.
- Pieringer, A. P., Edwards, G. J. 1967. Identification of nucellar and zygotic citrus seedlings by infrared spectroscopy. *J Am Soc Hort Sci* 86:226-234.
- Pillay, M., Ogundiwin, E., Tenkouano, A., Dolezel, J. 2006. Ploidy and genome composition of Musa germplasm at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA). *Afri J Biotech* 5:1224-1232.
- Rallo, P.; Belaj, A.; de la Rosa, R.; Trujillo, I. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo_junio_2000/almazara/almazara1.htm.
- Rao, M. N., Soneji, J. R., Chen, C., Huang, S., Gmitter, F. G. 2008. Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like Citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Gen and Genom* 4:113-124.
- Recupero, R. G., Russo, G. y Recupero, S. 2005. New Promising Citrus Triploid Hybrids Selected from Crosses between Monoembryonic Diploid Female and Tetraploid Male Parents. *HortScience* 40:516-520.
- Robles, G. M. M., Carrillo, M. S.H., Manzanilla, R. M. A. y Medina, U. V. M. 2014. Mejoramiento Genético de Limón Mexicano. En M.O. Santos, M.M.Robles, J.J. Velázquez, M.A. Manzanilla, M.J. Bermudez. (Ed). *El limón mexicano* (pp. 33-80) Tecomán, Colima, México: Prometeo editores.
- Robles-González M. M., J. J. Velázquez-Monreal, M. Á. Manzanilla-Ramirez, M. Orozco-Santos, V. M. Medina-Urrutia, J. I. López-Arroyo y R. Flores-Virgen. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19(1) 15-31. ISSN Impreso: 1027-152X; ISSN Electrónico: 2007-4034.

- Robles-García, P. L. 2005. Programa Nacional de Certificación de Material Propagativo de Cítricos en México. III Simposio Internacional Citricota CONALIM-COEPLIM. Memoria Científica. Tecomán, Colima, México Pag. 96-102.
- Rocha-Peña, M. A., Lee, R. F., Lastra, R., Niblett, C. L., Ochoa-Corona, F. M., Garnsey S. N. y Yokomi, R. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threat to citrus production in the Caribbean and central and North America. *Plant Disease*. 79 (5): 437-444.
- Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.10e. Exeter Ltd., Setauket.
- Roose, M. L., Traugh, S. N. 1988. Identification and performance of Citrus trees on nucellar and zygotic rootstocks. *J Am Soc Hort Sci* 113:100-105.
- Roose, M. L., Williams, T. E. 2007. Mutation Breeding. In: IA Khan. *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI: Wallingford, UK.
- Roose, M.L., Williams, T.E., Cameron, J.W. and Soost, R.K. 2000. 'Gold Nugget' mandarin, seedless, late maturing hybrid. *Hort. Sci.* 35, 1176-1178.
- Ruiz, C., Breto, M. P. y Asíns, M. J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112: 89-94.
- Russo, G., Recupero, S., Puglisi, A. y Recupero, G. R. 2004. New triploid citrus hybrids by Italian genetic improvement. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 66(3), 14-18.
- Scarano, M. T., Abbate, L., Ferrante, S., Lucretti, S., Tusa, N. 2002. ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Rep* 20:1162-1166. doi:10.1007/s00299-002-0450-3.

- Scora, R. W. 1975. On the history and origin of Citrus. Bull. Torr. Bot. Club 102, 369-375.
- Scott, R. J., Spielman, M., Bailey, J. y Dickinson, H. G. 1998. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. Development 125: 3329-3341.
- Sehgal, D., Raina, S., N. 2008. DNA markers and germplasm resource diagnostics: new perspectives in crop improvement and conservation strategies. In: Arya ID, Arya S (eds) Utilization of biotechnology in plant sciences. Microsoft Printech (I) Pvt. Ltd, Dehradun, pp 39-54.
- Shahsavari, A. R., Izadpanah, K., Tafazoli, E., Sayed Tabatabaei, B. E. 2007. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Scientia Horticulturae 112: 310-314.
- Shareefa, M., Singh, A. K., Manish, S., Dubey, A. K. 2009. Differentiation of nucellar and zygotic seedlings in citrus using ISSR markers. Indian J of Agr Sci 79:884-889.
- Shi-Ping, Z., Jian-Kun, S., Zhi-Yong, H., TAN, B., Zong-Zhou, X., Hua-Lin, Y., Xiu-Singh, S. y Rajam, V. M. 2009. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. Physiol. Mol. Biol. Plants, 15(1).
- Siap-sagarpa. 2013. Producción agrícola: Cíclicos y perenes 2012. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA - Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. México. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 Actualizado: octubre 07 /2013.
- Siragusa, M., Depascuale, F., Abbate, L. y Tusa, N. 2006. Identification of sour orange accessions and evaluation of their genetic variability by molecular marker analyses. HortScience 41(1): 84-89.
- Soares-Filho, W. Dos, S., Lee, L. M., Da Cunha Sobrinho, A. P. 1995. Influence of pollinators on polyembryony in Citrus. Acta Hort 403:256-265.

- Soost R. K., Cameron, J. W. 1975. Citrus. in: moore j.n., janick j. (eds.), *Advances in Fruit Breeding*. West Lafayette, Indiana, Purdue University Press: 507-540.
- Soost, R. K., Roose, M. 1996. Citrus. In: Jules J, Moore JN (eds) *Fruit breeding: tree and tropical fruits*, vol 1. John Wiley & Sons Inc., New York, pp 257-323.
- Soost, R. K., Williams, T. E., Torres, A. M. 1980. Identification of nucellar and zygotic seedlings of Citrus with leaf isozymes. *HortSci* 15:728-729.
- Soost, R., K. y Cameron, J. W. 1985. "Melogold" a triploid pummelo-grapefruit hybrid. 20: 1134-1135.
- Soost, R., K. y Cameron, J. W. 1980. Oroblanco, a triploid pummelo grapefruit hybrid. *HortScience*. 15: 667-669.
- Spiegel-Roy, P., Bardi, A., Shani, A. 1977. Peroxidase isozymes as a tool for early separation of nucellar and zygotic citrus seedlings. Second Meeting of the International Society of Citriculture, Vol. 2, Florida-USA, 619-624 p.
- Spooner, D., Van Treuren, R. y de Vicente, M. C. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Stanley, W. L., Jurd, L. 1971. Citrus coumarins. *J Agr Food Chem* 19:1106-1110.
- Starrantino, A. 1999. Tacle, a new triploid clementine x Tarocco hybrid. *Rivista di Frutticoltura ed ortofl oricoltura* 61(1): 45-47.
- Starrantino, A. y Recupero, G. 1982. Citrus hybrids obtained in vitro from 2x females by 4x males. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 31-32.

- Starrantino, A., Raciti, M., Antonelli, N. M. y Tromontano, E. 1992. Genetic manipulation of citrus by using the biolistic process. Proceeding of the International Societe of Citriculture. p. 199-201. Acireali, Italy.
- Swingle, W.T., 1943. The botany of citrus and its wild relatives in the orange subfamily. In: Webber, H.J., Batchelor, D.L. (Eds.), The Citrus Industry, vol. 1. University of California, Berkeley, pp. 128-474.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res* 17:6463-6471.
- Tokunaga, T., Nii, M., Tsumura, T. y Yamao, M. 2005. Production of triploids and breeding seedless cultivar 'Tokushima 3X No.1' from Tetraploid x diploid crosses in sudachi (*Citrus sudachi* Shirai). *Horticultural Research Japan* 4: 11-15.
- Torres, A. M., Soost, R. K., Diederhufen, U. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. *Am. J. Bot.* 65, 869-881.
- Trujillo-Arriaga, J. 2010a. Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. 2º Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México.
- Trujillo-Arriaga, J. 2010b. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Oficio B00.01,01,01.03.-02788. Circular No. 056. 16 de abril de 2010.
- Tusa N, Abbate, L., Ferrante, S., Lucretti, S., Scarano, M. T. 2002. Identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus interplod crosses by means of isozymes, flow cytometry and ISSR-PCR. *Cel and Mol Bio Letters* 7:703-708.
- Tusa, N., Grosser, J. W., Gmitter, F.G. 1990. Plant regeneration of 'Valencia' sweet orange, 'Femminello' lemon and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. *J Am Soc Hortic Sci* 115(6):1043-1046.

- Tusa, N., Fatta del Bosco, S., Nardi, L. y Lucretti, S. 1996. Obtaining triploid plants by crossing citrus lemon cv. 'Femminello' 2N x 4N allotetraploid somatic hybrids. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 133-136.
- Van, H. J., Leus, L., Van, B. E. 2005. Interploidy crosses in Roses: use of triploids. *Acta Hort* 690:109-112.
- Vardi, A., Spiegel-Roy, P. y Elchanati, A. 1993. Mandarin tree named Mor. US patent PP8, 378.
- Varshney, R. K., Graner, A., Sorrells, M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23:48-55.
- Varshney, R. K., Thudi, M., Aggarwa, I. R., Börner, A. 2007. Genic molecular markers in plants: development and applications. In: Varshney RK, Tuberosa R (eds) *Genomicsassisted crop improvement: genomics approaches and platforms*, vol 1. Springer, Dordrecht, pp 13-29.
- Valadez E. y G. Kahl. 2000. *Huellas de ADN en genomas de plantas*. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Viloria, Z. y Grosser, J. W. 2005. Acid citrus fruit improvement via interploidy hybridization using allotetraploid somatic hybrid and autotetraploid breeding parents. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 392-402.
- Vinkenoog, R., Bushell, C., Spielman, M., Adams, S., Dickinson, H. G., Scott. R. J. 2003. Genomic imprinting and endosperm development in flowering plants. *Mol Biotechnol* 25(2):149–184

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Tv-d, L., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407-4414.
- Wang, T. Y. y Chang, C. J. 1978. Triploid Citrus plantlet from endosperm culture. *Sci. Sinica* 21: 463-467.
- Weinbaum, S. A., Cohen, E., Spiegel-Roy, P. 1982. Rapid screening of 'Satsuma' mandarin progeny to distinguish nucellar and zygotic seedlings. *Hort Sci* 17:239-240.
- Whiteside, J. O; Garnsey, S. M. y Timmer, L. W. 1998. Compendium of citrus disease. The American Phytopathological Society. Paul Minnesota. USA.
- Williams, T. E., Roose, M. L. 2004. 'TDE2' Mandarin hybrid (Shasta Gold® Mandarin), 'TDE3' Mandarin hybrid (Tahoe Gold® Mandarin) and 'TDE4' Mandarin hybrid (Yosemite Gold® Mandarin): Three New Mid and Late-Season Triploid Seedless Mandarin Hybrids from California. In: Proceedings of 10th International Citrus Congress. International Society of Citriculture. Agadir, Marruecos, 1:394-398.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Kenneth, J. L., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
- Xiao-Yong, Xu., Zhi-Yong, Hu., Jun-Feng, Li., Ji-Hong, Liu., Xiu-Xin, Deng. 2007. Asymmetric somatic hybridization between UV-irradiated Citrus unshiu and C. sinensis: regeneration and characterization of hybrid shoots. *Plant Cell Rep* 26:1263-1273.
- Yan, G., Ferguson, A. R., McNeilage, M. A., Murray, B. G. 1997. Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in Actinidia. *Euphytica* 96:267-272.
- Yildiz, E, Kaplankiran, M., Demirkeseer T., Uzun, H. A., Toplu, C. 2013. Identification of Zygotic and Nucellar Individuals Produced from Several Citrus Crosses Using SSRs Markers. *Not Bot Horti Agrobo*, 41(2):478-484.

- Yun, J.U., Yang, H. B., Jung, Y. H., Yun, S. H., Kim, K. S., Kim, C. S., Song, K. J. 2007. Identification of zygotic and nucellar mandarin seedlings using randomly amplified polymorphic DNA. *Hort Environ Bio* 48:171-175.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 11:1-16.
- Zhou, S., Ramana, M. S., Visser, R. G. F., Van Tuyl, J. M. 2008. Genome composition of triploid lily cultivars derived from sexual polyploidization of Longiflorum 9 Asiatic hybrids (*Lilium*). *Euphytica* 160:207-215.