








IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE PORTAINJERTOS TETRAPLOIDES DE CÍTRICOS POR MEDIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO Y ANÁLISIS DE COLORIMETRÍA DE HOJAS

Identification and selection of tetraploid citrus rootstocks by flow cytometry and leaf colorimetry analysis

Miguel F. Garavello^{1*}, José M. Recalde¹, Fernando Bello¹, Florencia Galdeano² & Paula Alayón Luaces³

Resumen: La citricultura en Argentina ocupa un lugar destacado a nivel mundial, con una producción concentrada principalmente en las regiones del noroeste argentino (NOA) y noreste argentino (NEA). El cultivo moderno de cítricos requiere el uso de portainjertos como herramienta esencial para mejorar la uniformidad, la productividad y la resistencia frente a condiciones adversas. Este estudio se centró en la identificación y selección de portainjertos tetraploides espontáneos a partir de cinco genotipos: 'Trifolio Concordia' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]; 'Rubidoux' (*P. trifoliata*); 'X639' (*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka × *P. trifoliata*); 'Citrange Troyer' [*C. sinensis* (L.) Osbeck × *P. trifoliata*]; y 'Citrumelo Swingle' (*Citrus paradisi* Macfad. × *P. trifoliata*). A partir de la evaluación morfológica y la citometría de flujo, se confirmaron 13 plantas tetraploides entre 37 candidatos seleccionados. Los porcentajes variaron entre el 66,7% en 'Rubidoux' y el 12,5% en 'Citrumelo Swingle'. La citometría demostró alta eficiencia en la detección, mientras que la colorimetría foliar permitió diferenciar diploides y tetraploides con variaciones destacadas en 'X639' ($L^* = 5.1$; $a^* = -3.5$; $b^* = 7.6$). Estos hallazgos brindan herramientas clave para optimizar la selección de portainjertos en la citricultura moderna.

Palabras clave: *Citrus*, contenido de ADN, cromas, poliploides.

Summary: Argentina is a major citrus-producing country on the global scale, with cultivation primarily concentrated in the Argentina Northwest (NOA) and Northeast (NEA) regions. Modern citrus production relies on the use of rootstocks as a critical tool to improve tree uniformity, yield, and resilience under adverse biotic and abiotic conditions. This study focused on identifying and selecting spontaneous tetraploid individuals among five rootstock genotypes 'Trifolio Concordia' [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], 'Rubidoux' (*P. trifoliata*), 'X639' [*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka × *P. trifoliata*], 'Citrange Troyer' [*C. sinensis* (L.) Osbeck × *P. trifoliata*] y 'Citrumelo Swingle' (*Citrus paradisi* Macfad. × *P. trifoliata*). Through preliminary morphological screening and subsequent flow cytometry analysis, thirteen tetraploid individuals were confirmed among thirty-seven candidates. Tetraploid frequencies ranged from 66.7% in 'Rubidoux' to 12.5% in 'Citrumelo Swingle'. Flow cytometry demonstrated high efficacy for ploidy determination, while leaf colorimetry effectively discriminated between diploid and tetraploid plants, with the most pronounced differences observed in 'X639' ($L^* = 5.1$; $a^* = -3.5$; $b^* = 7.6$). These findings provide a solid basis for future research and applications in the citrus industry.

Key words: Chroma, *Citrus*, dna content, polyploids.

¹ Estación Experimental Agropecuaria Concordia, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Yuquerí CC34, Concordia (E3200QK), Entre Ríos, Argentina. *E-mail: garavello.miguel@inta.gob.ar; bello.fernando@inta.gob.ar

² Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET), Sargento Cabral 2131 (3400), Corrientes, Argentina. E-mail: galdeanoflorencia@gmail.com

³ Cátedra de Fruticultura, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste. Juan Bautista Cabral 2131 (3400), Corrientes, Argentina. E-mail: palayonluaces@yahoo.com

Introducción

La actividad citrícola en Argentina se desarrolla en un contexto global, posicionándose como el octavo productor mundial durante el ciclo 2022/2023. Se destinaron 142.101 hectáreas al cultivo de cítricos, concentradas mayormente en las regiones del NOA (Jujuy, Salta, Tucumán y Catamarca) y el NEA (Buenos Aires, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Misiones). La región del NOA concentró el 67,85% de la producción total de cítricos en el país, mientras que el resto de las provincias, agrupadas como NEA, representaron el 33,64% del volumen total. Si se analiza únicamente el grupo de cítricos dulces, conformado por naranjas y mandarinas, la región NEA concentra aproximadamente el 77% de dicha producción, lo que refleja su predominio en estas especies. En contraste, el NOA se destaca en la producción de limón, con un aporte superior al 90% del total nacional (FEDERCITRUS, 2024).

La citricultura global ha experimentado una merma sostenida en rendimiento y calidad de fruto, atribuible a múltiples estreses bióticos y abióticos. Entre los desafíos abióticos más críticos se encuentran la escasez hídrica, la salinización del suelo, las temperaturas extremas y la carencia de nutrientes esenciales. Paralelamente, el sector sufre la incidencia de virus como la tristeza, la exocortis y la xiloporosis, así como de bacterias responsables del HLB de los cítricos o Huanglongbing (Bowman *et al.*, 2020; Gora *et al.*, 2022; Arjona-López *et al.*, 2023).

En este contexto, la elección de portainjertos adecuados resulta determinante ante el comportamiento de la plantación ante estos factores adversos; influyendo también en la modulación de la cubierta vegetal, en la producción, la calidad de la pulpa y el contenido antioxidante de los cultivares; además, facilitan sistemas de alta densidad (Castle, 2010; Cuenca *et al.*, 2018; Caruso *et al.*, 2020; García-Muñoz *et al.*, 2021; Gora *et al.*, 2022).

La mayoría de los cítricos son predominantemente diploides ($2x$), presentando un número de cromosomas de $2n=2x=18$. No obstante, también se encuentran

plantas poliploides, como los triploides ($2n=3x=27$) y tetraploides ($2n=4x=36$) (Cameron *et al.*, 1968; Lee, 1988; Aleza *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2013; Gora *et al.*, 2023).

Se considera a la poliploidización como una de las fuerzas evolutivas en plantas causante de la diferenciación y diversificación (Otto *et al.*, 2000; Gallais, 2003; Peer *et al.*, 2017). En los cítricos son dos los mecanismos responsables de la formación de poliploides naturales: somático y sexual. Los poliploides somáticos se generan mediante la duplicación espontánea del número de cromosomas en las células de la nucela de genotipos apomíticos; mientras que, la poliploidización sexual es originada por la formación de gametos no reducidos (Frost *et al.*, 1968; Aleza *et al.*, 2011). Sin embargo, en laboratorio también se ha inducido la formación de poliploides mediante tratamientos con agentes químicos antimitóticos (Aleza *et al.*, 2009a; Ollitrault *et al.*, 2020) o por hibridación somática (Ollitrault *et al.*, 1996a; Grosser *et al.*, 2000, 2011; Dambier *et al.*, 2011).

La propagación de portainjertos cítricos se realiza mayoritariamente por semillas, ya que estos poseen semillas poliembriónicas que tienen la capacidad de generar embriones somáticos; siendo la cantidad de embriones somáticos dependientes del genotipo (Khan *et al.*, 1988; Kishore *et al.*, 2012; Cegelski *et al.*, 2021). Asimismo, se ha observado en semillas poliembriónicas la generación espontánea de tetraploides que varía acorde al genotipo y al ambiente (Barrett *et al.*, 1978; Carvalho *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2016).

Sumado a lo anterior, se ha estudiado que las plantas cítricas tetraploides son más tolerantes al estrés abiótico como ser sequía, salinidad, congelación y a la deficiencia de nutrientes (Saleh *et al.*, 2008; Podda *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2016a, b). A su vez, distintos estudios han demostrado la existencia de diferencias morfológicas y anatómicas entre plantas de portainjertos $2x$ y $4x$. Por ejemplo, se ha descrito mayor pubescencia y grosor de hojas en plantas $4x$ que en plantas $2x$ (Romero-Aranda *et al.*, 1997). Otros estudios informaron hojas más anchas, de mayor espesor, de color más oscuras y con estomas más grandes, pétalos más anchos y largos, cálices grandes,

pistilos y ovarios más gruesos en tetraploides en comparación con sus respectivos diploides (Barrett *et al.*, 1978; Oiyama *et al.*, 1986; Gora *et al.*, 2022). También se ha observado que el aumento en el nivel de ploidía incrementa el tamaño de las células y genera hojas con ápices menos puntiagudos (Sanford, 1983).

Para la identificación de individuos poliploides se pueden utilizar métodos directos o indirectos. Los métodos indirectos se basan en el examen de las características morfológicas y fisiológicas, y si bien es un método rápido y sencillo para la detección de poliploides, generalmente es inexacto (Gora *et al.*, 2022). También se han complementado con análisis morfométricos de la lámina (Barrett *et al.*, 1978; Guerra *et al.*, 2014) y evaluación de la intensidad de color a través de análisis digital de imágenes (Guerra *et al.*, 2014). Acorde a nuestro conocimiento, hasta el momento no se ha descrito el uso del croma como herramienta de identificación de plantas candidatas a tetraploides.

Entre los métodos directos, destaca la citometría de flujo, que se desarrolló originalmente como una técnica rápida para el análisis de células sanguíneas (Dolezel *et al.*, 1994; Galbraith, 2010). Esta técnica se utiliza ampliamente tanto en la investigación básica como en la aplicada. Su principio fundamental consiste en analizar la fluorescencia y las propiedades de dispersión de la luz de una solución de partículas individuales (células, núcleos, cromosomas, entre otros) mientras estas atraviesan un canal estrecho y preciso. Dado que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN presente en las células (Heslop-Harrison *et al.*, 1996) permite medir la fluorescencia de un gran número de núcleos en cuestión de segundos. Además, se trata de una técnica excepcionalmente sencilla y sensible, que ofrece una mayor precisión estadística en comparación con los métodos convencionales, convirtiéndose así en una herramienta de alto rendimiento para el análisis de un gran número de plantas en poco tiempo (Dolezel *et al.*, 2007; Sliwinska, 2018). Actualmente es considerada una herramienta fundamental en los programas de mejora genética para determinar el nivel de ploidía de las plantas

(Ollitrault *et al.*, 1996b; Ollitrault *et al.*, 1999; Aleza *et al.*, 2009b, 2012b; Aleza *et al.*, 2012a) y también se ha utilizado para determinar el tamaño del genoma en cítricos (Ollitrault *et al.*, 1992).

La diferenciación entre genotipos diploides y tetraploides en cítricos, particularmente en términos de coloración foliar, ha sido evaluada subjetivamente en estudios previos (Jaskani *et al.*, 2002; Guerra *et al.*, 2014). La colorimetría se define como la disciplina científica dedicada a la cuantificación del color y su objetivo principal radica en reemplazar apreciaciones subjetivas, con un sistema numérico objetivo (Clydesdale *et al.*, 1978; Gilchrist *et al.*, 2000). Los colorímetros son dispositivos electrónicos específicos que miden el color y lo expresan como coordenadas numéricas (Gardner, 2007).

Hasta el momento en Argentina no se han identificado y seleccionado portainjertos tetraploides para estudiar su comportamiento en las regiones cítricas del país. La aplicación de metodología indirecta para la selección y posterior confirmación mediante citometría de flujo permitirá contar en forma simple y eficiente con portainjertos tetraploides que podrán ser evaluados en los diferentes ambientes donde se desarrolla la actividad cítrica. La determinación de color de las hojas posibilitaría obtener mediciones que se pueden comparar entre distintos genotipos y niveles de ploidía para una caracterización objetiva. El objetivo principal de este trabajo fue identificar y seleccionar tetraploides espontáneos de cinco portainjertos cítricos utilizando citometría de flujo y análisis de colorimetría de hojas.

Materiales y Métodos

Material vegetal

El material vegetal con que se realizó el presente estudio provino de plantas de la colección de cítricos de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Concordia del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (31°22'27,5"S, 58°07'1,9"W, 48 m s.n.m.). La región de Concordia presenta un clima templado cálido (subtropical) sin estación seca, con una temperatura media anual de 18,7 °C (25,3 °C en enero y 12,5 °C en julio). Las

medias de las temperaturas extremas anuales alcanzan 39,0 °C en las máximas y -2,7 °C en las mínimas, mientras que los registros absolutos llegaron a 41,4 °C (2006 y 2013) y -5,1 °C (1996). El período libre de heladas dura unos 10 meses, con un promedio de 8,6 heladas por año. Las precipitaciones promedian 1372,9 mm (mediana 1292,6 mm), con valores extremos de 2193,2 mm en 2002 y 786,4 mm en 2008, y aunque existen ligeros déficits hídricos en diciembre, enero y febrero, no se registra una estación ni meses secos (Ramos *et al.*, 2018). Se utilizaron cinco portainjertos, los de mayor uso en la región de la costa del río Uruguay ‘Trifolio Concordia’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]; ‘Rubidoux’ (*P. trifoliata*); ‘X639’ [*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka × *P. trifoliata*.]; ‘Citrango Troyer’ [*C. sinensis* (L.) Osbeck × *P. trifoliata*] y ‘Citrumelo Swingle’ (*Citrus paradisi* Macfad. × *P. trifoliata*).

Obtención e identificación de tetraploides

Se recolectaron frutos en estado de madurez fisiológica, de los cuales se extrajeron semillas correspondientes a los portainjertos seleccionados, conforme a los lineamientos establecidos en la cartilla del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay (González *et al.*, 2013). Posteriormente, se sembraron entre 200 y 250 semillas por portainjerto en almáciguas ubicadas dentro de un invernadero tipo túnel, bajo condiciones ambientales no controladas, características de la región sur de Uruguay. Estas condiciones generales incluyen temperaturas moderadas y buena luminosidad durante la primavera, lo que favorece el desarrollo inicial de las plántulas. El sustrato que se utilizó para la siembra fue a base de turba y perlita, nombre comercial “KEKKILÄ Profesional”. Cuando los plantines desarrollaron entre tres y cuatro hojas verdaderas, se procedió a la identificación de posibles candidatos tetraploides, siguiendo los parámetros morfológicos establecidos por Oiyama & Okudai (1986) y Gora *et al.* (2022), los cuales se basan en la forma, color y grosor de los folíolos. Luego fueron etiquetados individualmente y trasplantados a una bandeja acorde al genotipo de procedencia. Los cuidados culturales aplicados desde la siembra correspondieron a las prácticas habituales

para la obtención de plantines de portainjertos cítricos en la región, sin haberse documentado parámetros específicos durante el manejo.

Análisis del nivel de ploidía

Para establecer el nivel de ploidía de los individuos seleccionados a partir de los parámetros morfológicos antes mencionados, se determinó el contenido relativo de ADN utilizando la técnica de citometría de flujo. Para el estudio se utilizó un citómetro de flujo marca CyFlow Space (Sysmex, Münster, Alemania), perteneciente al Instituto de Botánica del Nordeste, IBONE (UNNE-CONICET). Para la preparación de las muestras se utilizó el kit de extracción y tinción CyStain UV Precise P® (Sysmex), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Aproximadamente 0,5 cm² de tejido foliar fresco fue colocado en una caja de Petri junto con una cantidad similar de tejido foliar utilizado como patrón de referencia. Luego se adicionó 0,5 ml del buffer de extracción y se trituró finamente el material con una hoja de afeitar. Pasado un minuto de incubación, la muestra fue filtrada a través de una malla de 50 µm y se adicionó 1,5 ml de buffer de tinción con DAPI (4'-6-diamino-2 felindol). Esta mezcla fue incubada durante aproximadamente un minuto y luego analizada a través del citómetro de flujo con el detector (láser UV) operando a 350 nm. El nivel de ploidía de cada planta fue estimado con relación al pico de ADN de la planta utilizada como patrón de referencia. Los histogramas se analizaron utilizando el software Flomax 2.10 (Sysmex). Para confirmar la existencia de diferencias de ploidía entre las muestras de los genotipos seleccionados 4x, se realizaron mediciones comparativas con núcleos aislados del tejido foliar del genotipo control.

Determinación de color de hojas

Para determinar el color en las hojas se utilizó un colorímetro CR400 (Konica Minolta Inc., Japón). Se midió la coloración en el sistema CIELab (L*, a* y b*) con iluminante C, un observador estándar de 2° y apertura de 8 mm. Se realizaron tres medidas en el haz del folíolo terminal, en tres hojas completamente desarrolladas de cada individuo seleccionado. Se obtuvieron los valores de L*a*b*, donde:

L* El eje vertical representa la luminosidad; 100 representa una muestra de blanco perfecto y 0 un negro perfecto.

a* El eje en el plano normal a L* representa la cualidad de rojo a verde del color. Los valores positivos denotan tonalidades rojas y los valores negativos denotan tonalidades verdes.

b* El eje normal tanto a L*, como a a*, representa la cualidad de amarillo a azul del color. Los valores positivos denotan tonalidades amarillas y los valores negativos denotan tonalidades azules (Gilchrist *et al.*, 2000).

Con los valores obtenidos, se calcularon el “tono” (h) y el “croma” (C). El tono se define como la cualidad de la percepción visual que permite identificar una superficie como similar a uno, o a una combinación de dos, de los colores fundamentales percibidos: rojo, anaranjado, amarillo, verde, azul y púrpura. Por otro lado, el croma se define como el contenido de color de una superficie, evaluado en proporción a su luminosidad.

Las expresiones matemáticas utilizadas fueron las siguientes:

Croma:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

Tono:

$$h_{ab}^* = \arctan(b^*|a^*)$$

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones y

para el análisis de las variables (croma y tono) se comprobaron los supuestos de normalidad y se realizaron los análisis de varianza y prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando el software Navure® (Navure, 2023).

Resultados y discusión

Identificación y selección de tetraploides

La identificación mediante caracteres morfológicos permitió individualizar plantas candidatas a tetraploides entre aquellas obtenidas en el almácigo, correspondientes a los diferentes genotipos de portainjertos en estudio (Tabla 1). Los tetraploides son la clase más común dentro de los euploides (Comai, 2005), y su aparición es relativamente frecuente en diversos genotipos de cítricos y especies afines con semillas poliembriónicas (Ollitrault *et al.*, 2008). De acuerdo con lo señalado por diversos autores (Barrett *et al.*, 1978; Sanford, 1983; Oiyama *et al.*, 1986; Gora *et al.*, 2022), se observaron diferencias en la morfología foliar en los parámetros mencionados en los plantines seleccionados en comparación con el resto del grupo correspondiente a cada genotipo. Se individualizó una cantidad variable de plantas según el genotipo (Tabla 1). El uso de este método resultó ser rápido y simple para disminuir el número de plantines a verificar el nivel de ploidía, acorde a lo indicado por Gora *et al.* (2022). Sin embargo, a pesar de las diferencias morfológicas el

Tabla 1. Cantidad de plantines analizados por portainjerto y porcentaje de plantines tetraploides identificados.

Genotipos	Nro. de plantines candidatos a 4x	Nro. de plantines 4x	Porcentaje de plantines 4x
'X639' [<i>Citrus reshni</i> Hort. ex Tanaka × <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.]	5	2	40,00%
'Citrumelo Swingle' (<i>Citrus paradisi</i> Macfad. × <i>P. trifoliata</i>)	8	1	12,50%
'Citrange Troyer' [<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck × <i>P. trifoliata</i>]	10	4	40,00%
'Trifolio Concordia' (<i>Poncirus trifoliata</i>)	8	2	25,00%
'Rubidoux' (<i>Poncirus trifoliata</i>)	6	4	66,70%

empleo de la citometría de flujo fue necesario para la confirmación del nivel de ploidía de los plantines candidatos.

En coincidencia con trabajos previos, la preparación de las muestras para análisis mediante citometría de flujo fue simple, demandó escaso tiempo para su preparación y medición. Asimismo, requirió de muy poco tejido vegetal para el análisis, permitiendo la supervivencia de las plantas seleccionadas lo cual coincide con las apreciaciones de numerosos autores (Seker *et al.*, 2003; Dolezel *et al.*, 2007; Aleza *et al.*, 2009a; Ferrante *et al.*, 2010; Aleza *et al.*, 2011; Sliwinska, 2018).

En lo que respecta a los resultados obtenidos mediante citometría, se hace referencia a la «ploidía del ADN». En este enfoque, se conoce la ploidía de un genoma de planta de referencia, y a partir de ello, se infiere la ploidía de especies desconocidas al comparar el contenido de ADN (Bourge *et al.*, 2018).

En primera instancia se obtuvo el histograma del genotipo diploide (control), el cual mostró un pico de fluorescencia dominante (Fig. 1A) cuyo valor de fluorescencia se estableció como referencia para identificar a los genotipos tetraploides.

De las progenies obtenidas se seleccionó un total de treinta y siete individuos distribuidos entre los diferentes genotipos de la siguiente manera: ocho de ‘Trifolio Concordia’, diez de ‘Citrange Troyer’, cinco de ‘X639’, seis de ‘Rubidoux’, ocho de ‘Citrumelo Swingle’ (Tabla 1).

Los histogramas obtenidos de las plantas candidatas (seis de Trifolio Concordia, seis de ‘Citrange Troyer’, tres de X639, dos de ‘Rubidoux’ y siete de ‘Citrumelo Swingle’) mostraron un pico con un valor de fluorescencia similar al del control. La totalidad de los histogramas obtenidos para estas plantas candidatas presentaron un pico similar al presentado en la Fig. 1B.

Trece de las 37 plantas analizadas evidenciaron un pico con un valor de fluorescencia duplicado en comparación con el control diploide, mostrando un histograma similar al de la Fig. 1C. Estos histogramas correspondieron a dos plantas de ‘Trifolio Concordia’, cuatro para ‘Citrange Troyer’, dos para ‘X639’, cuatro para ‘Rubidoux’ y uno para ‘Citrumelo Swingle’.

La Fig. 2 muestra ejemplos seleccionados de comparación de valores de picos fluorescencia del control diploide (2C) con los valores de picos de fluorescencia obtenidos (4C) de los genotipos tetraploides seleccionados de ‘Rubidoux’, ‘X369’ y ‘Citrumelo Swingle’. Esto indica que la relación entre los picos de fluorescencia corresponde a plantas tetraploides, coincidiendo con lo observado por varios autores en otras angiospermas (Schepper *et al.*, 2001; Aleza *et al.*, 2009a; Dewitte *et al.*, 2009; Dutt *et al.*, 2010; Aleza *et al.*, 2011; Guerra *et al.*, 2016).

Los porcentajes de plantas tetraploides encontradas en este estudio (Tabla 1) mostraron un valor máximo del 66,7% para ‘Rubidoux’ y un mínimo del 12,5% para

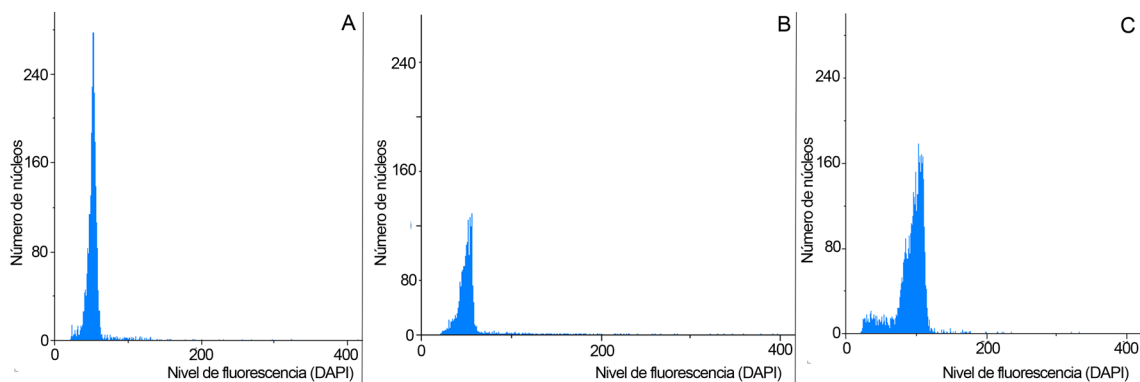


Fig. 1. Histogramas del nivel de ploidía por citometría de flujo en muestras foliares de ‘Rubidoux’. A: Hoja control de planta diploide ‘Rubidoux’. B: Hoja diploide de planta candidata ‘Rubidoux’. C: Hoja tetraploide de planta candidata ‘Rubidoux’.

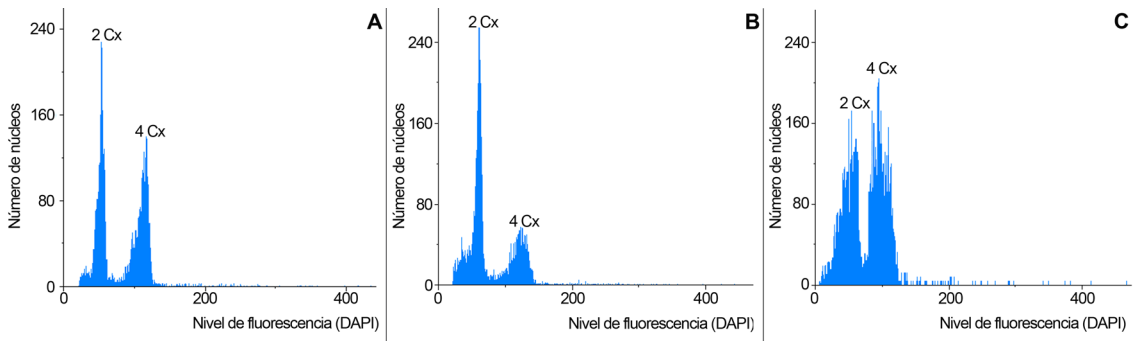


Fig. 2. Histogramas de citometría de flujo de muestras foliares, mostrando relación entre la planta de control diploide (2C) y la planta tetraploide (4C). A: 'Rubidoux'. B: 'X639'. C: 'Citrumelo Swingle'.

'Citrumelo Swingle'. Varios estudios han reportado variabilidad en la tasa de ocurrencia de tetraploides, variando entre 1% al 5,6% dependiendo del genotipo (Cameron *et al.*, 1968; Barrett *et al.*, 1978; Ollitrault *et al.*, 2008). Algunos autores (Cameron & Frost, 1968) reportaron que el 2,5% de 3.600 progenies nucelares, provenientes de diversos cultivares de cítricos, presentaban tetraploidía. Barrett & Hutchison (1978) observaron que las plántulas tetraploides surgieron con una frecuencia del 3% en el portainjerto citrange 'Troyer' y del 2,5% en el 'Carrizo'. Según el informe de Guerra *et al.* (2016), las tasas de ocurrencia de tetraploides en semillas provenientes de plantas que crecían en condiciones ambientales de campo fueron del 1,72% en 'Trifolio', 1,04% en 'Citrumelo Swingle' y 1,45% en 'Troyer'. En comparación, la ocurrencia de tetraploides en semillas obtenidas de plantas cultivadas en condiciones de invernadero fue del 3,17% en 'Trifolio', 1,49% en 'Citrumelo Swingle' y 1,49% en 'Troyer'. El uso combinado de una primera selección por características fenotípicas, seguido del uso de la citometría de flujo evidenció alta eficiencia para la identificación de plantas tetraploides en las poblaciones de los genotipos analizados.

Determinación de color de las hojas

En lo que respecta al color, se observó que las plantas diploides se diferenciaron significativamente en todos los parámetros de color evaluados (L^* , a^* , b^* , C y h) en comparación con sus contrapartes tetraploides (Tabla 2). Entre los genotipos evaluados, el

mayor contraste en los valores se observó en el genotipo 'X639', con diferencias de 5,1 para L^* , -3,5 para a^* , y 7,6 para b^* . Por otro lado, las diferencias más pequeñas se encontraron en el genotipo 'Citrumelo Swingle', con diferencias de 1,4 para L^* , -1,8 para a^* , y 2,8 para b^* .

En cuanto a los valores de croma y tonalidad, presentaron el mismo comportamiento, mostrando la mayor diferencia en el genotipo 'X639' y la menor en 'Citrumelo Swingle'. Asimismo, se observó que los valores de croma para el mismo genotipo exhiben valores diferentes entre el diploide y el tetraploide, siendo estos últimos los que presentaron valores más bajos, lo que se asocia a colores menos saturados. En cuanto al tono, también se han detectado diferencias entre los genotipos, evidenciando que la proporción de colores que lo definen varía entre genotipos diploides y tetraploides.

Los resultados de este estudio confirman lo indicado por Latado *et al.* (2007), de que las hojas de las plantas tetraploides presentan un color más intenso (entendiendo intenso como más oscuro), lo que coincide con lo observado en este trabajo donde los cítricos tetraploides muestran un mayor valor en los parámetros a^* (lo que significa menos componente verde y más grisáceo), menores valores de b^* , de L^* (luminosidad) y de C* (croma) que las plantas diploides. La evaluación subjetiva realizada por Guerra *et al.* (2014) señaló que los tetraploides exhiben tonalidad verde oscuro, mientras que los diploides presentan un tono verde estándar. De manera similar,

Tabla 2. Resultados por genotipo y nivel de ploidía para los parámetros estadísticos de color: promedio y desviación estándar de los valores L* (luminosidad), a* (cualidad del color en el eje rojo-verde), b* (cualidad del color en el eje amarillo-azul), C* (croma) y h (tono). Los datos están particionados por genotipo. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Genotipos	Ploidía	L*	a*	b*	C*	h
'X639' [<i>Citrus reshni</i> Hort. ex Tanaka × <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.]	2x	38,4±1,1 (a)	-13,5±0,7 (b)	20,2±1,2 (a)	24,3 ± 1,4 (a)	123,65 ± 0,8 (b)
	4x	33,3±0,8 (b)	-10,0±0,9 (a)	12,6±1,2 (b)	16,1 ± 1,5 (b)	128,4 ± 0,8 (a)
'Citrumelo Swingle' (<i>Citrus paradisi</i> Macfad. × <i>P. trifoliata</i>)	2x	33,6±0,6 (a)	-10,9±0,6 (b)	14,5±1,1 (a)	18,1 ± 1,2 (a)	126,8 ± 1,0 (b)
	4x	32,2±0,4 (b)	-9,1±0,6 (a)	11,7±0,6 (b)	14,9 ± 0,9 (b)	127,7 ± 0,6 (a)
'Citrange Troyer' [<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck × <i>P. trifoliata</i>]	2x	34,6±0,9 (a)	-12,5±1,1 (b)	16,6±2 (a)	20,8 ± 2,2 (a)	127,1 ± 1,1 (b)
	4x	32,2±1,2 (b)	-9,4±1 (a)	11,8±1,5 (b)	15,0 ± 1,3 (b)	128,45 ± 1,0 (a)
'Trifolio Concordia' (<i>Poncirus trifoliata</i>)	2x	36,9±2 (a)	-11,5±1,1 (b)	17,2±2,6 (a)	20,7 ± 2,8 (a)	123,9 ± 1,4 (b)
	4x	33,6±0,8 (b)	-9,7±1,1 (a)	12,6±1,4 (b)	15,9 ± 1,7 (b)	127,6 ± 0,53 (a)
'Rubidoux' (<i>Poncirus trifoliata</i>)	2x	36,1±0,2 (a)	-11,8±0,3 (b)	16,6±0,5 (a)	20,4± 0,5 (a)	125,4 ± 0,7 (b)
	4x	32,6±1,9 (b)	-9,9±2,1 (a)	12,2±2,7 (b)	15,67 ± 3,4 (b)	129,02 ± 0,8 (a)

Allario *et al.* (2011) reportaron que las hojas de las plantas tetraploides de lima ‘Cravo’ (*C. limonia* Osb.) exhibían un color más intenso en comparación con las diploides.

Conclusiones

La combinación de métodos morfológicos, citometría de flujo y análisis de colorimetría de hojas utilizados en este trabajo permitió una detección eficiente de plantas tetraploides dentro de las poblaciones estudiadas. La citometría de flujo demostró ser una herramienta precisa y rápida para confirmar el nivel de ploidía, mientras que la colorimetría aportó información valiosa sobre las diferencias visuales entre diploides y tetraploides, proporcionando una potencial alternativa objetiva a la preselección tradicionalmente subjetiva. La aplicación de estos métodos en programas de mejora genética permitirá la selección de portainjertos más adaptados a diferentes condiciones ambientales, contribuyendo al desarrollo sostenible de la citricultura en Argentina y otras regiones productoras.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a Laura Eyman y Nanci Almirón por su valiosa colaboración en la preparación de muestras y la determinación de color con el colorímetro Minolta. Agradecemos a la Cátedra de Fruticultura de la FCA por su apoyo en el diseño experimental y el análisis de datos. Extendemos nuestro reconocimiento al personal de Citometría del IBONE por su predisposición y amabilidad durante el análisis de las muestras. Finalmente, agradecemos a la Ingeniera Agrónoma Julia Figueroa por sus valiosos aportes que hicieron posible la concreción de este proyecto. Este trabajo fue financiado por los proyectos 2019-PE-E6-I125: Preservación, caracterización y uso de variabilidad genética, mejoramiento genético y herramientas de biotecnología y 2023-PE-L01-I051: Fortalecimiento y modernización de la cadena cítrica nacional con enfoque en la sustentabilidad y competitividad en un marco

de cambio climático, ambos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; y por el proyecto PI 22-A002 SGCyT-UNNE (Res. N° 931/22 C.S.): Investigaciones agronómicas para la diversificación de frutales: una necesidad del NEA, correspondiente al período del 01/01/2023 al 31/12/2026.

Bibliografía

- ALEZA, P., JUÁREZ, J., OLLITRAULT, P. & NAVARRO, L. (2009a). Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant Cell Reports* 28: 1837-1846. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0783-2>
- ALEZA, P., JUÁREZ, J., HERNÁNDEZ, M., PINA, J.A., OLLITRAULT, P. & NAVARRO, L. (2009b). Recovery and characterization of a *Citrus clementina* Hort. ex Tan. “Clemenules” haploid plant selected to establish the reference whole *Citrus* genome sequence. *BMC Plant Biology* 9: 110. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-110>
- ALEZA, P., FROELICHER, Y., SCHWARZ, S., AGUSTÍ, M., HERNÁNDEZ, M. (2011). Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Annals of Botany* 108: 37-50. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr099>
- ALEZA, P., JUÁREZ, J., CUENCA, J., OLLITRAULT, P. & NAVARRO, L. (2012a). Extensive citrus triploid hybrid production by $2x \times 4x$ sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Reports* 31: 1723-1735. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1286-0>
- ALEZA, P., JUÁREZ, J., HERNÁNDEZ, M., OLLITRAULT, P. & NAVARRO, L. (2012b). Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on $4x \times 2x$ sexual hybridisations. *Tree Genetics & Genomes* 8: 1293-1306. <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0515-6>
- ALLARIO, T., BRUMOS, J., COLMENERO-FLORES, J. M., TADEO & F., FROELICHER, Y. (2011). Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany* 62: 2507-2519. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq467>
- ARJONA-LÓPEZ, J. M., APARICIO-DURÁN, L., GMITTER, F. G., ROMERO-RODRÍGUEZ, E., GROSSER, J. W., HERVALEJO, A. & ARENAS-ARENAS, F. J. (2023).

- Physiological influence of water stress conditions on novel hlb-tolerant citrus rootstocks. *Agronomy* 13: 1-10. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010063>
- Barrett, H. C. & Hutchison, D. J. (1978). Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*. *Economic Botany* 32: 27-45. <https://doi.org/10.1007/BF02906727>
- BOURGE, M., BROWN, S. C. & SILJAK-YAKOVLEV, S. (2018). Flow cytometry as tool in plant sciences, with emphasis on genome size and ploidy level assessment. *Genetics & Applications* 2: 1. <https://doi.org/10.31383/ga.vol2iss2pp1-12>
- BOWMAN, K. D. & JOUBERT, J. (2020). Citrus rootstocks. In *The Genus Citrus*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00006-1>
- CAMERON, J. W. & FROST, H. B. (1968). Genetic, breeding and nucellar embryony. En REUTHER, W., WEBBER, H. J. & L. D. BATCHELOR (eds.), *The citrus industry*. University of California, Berkeley.
- CARUSO, M., CONTINELLA, A., MODICA, G., PANNITTERI, C. & RUSSO, R. (2020). Rootstocks influence yield precocity, productivity, and pre-harvest fruit drop of mandared pigmented mandarin. *Agronomy* 10: 1-12. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091305>
- CARVALHO, S. A. & SILVA, L. F. C. (2013). Monitoring the viability of citrus rootstocks seeds stored under refrigeration. *Revista Brasileira de Fruticultura* 35: 238-245. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000100027>
- CASTLE, W. S. (2010). A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. *HortScience* 45: 11-15. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.1.11>
- CEGELSKI, L. E., BELTRÁN, V. M., GAIAD, J. E., & ALAYÓN LUACES, P. (2021). Evaluación de parámetros para la propagación de tres nuevos portainjertos híbridos de cítricos con potencial uso comercial. *Bonplandia* 30: 191-202. <https://doi.org/10.30972/bon.3025105>
- CLYDESDALE, F. M. & AHMED, E. M. (1978). Colorimetry-methodology and applications*. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 10: 243-301. <https://doi.org/10.1080/10408397809527252>
- COMAI, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6: 836-846. <https://doi.org/10.1038/nrg1711>
- CUENCA, J., GARCIA-LOR, A., NAVARRO, L. & ALEZA, P. (2018). Citrus Genetics and Breeding. En AL-KHAYRI, J., JAIN, S. & D. JOHNSON (eds.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*, pp. 403-436. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7_11
- DAMBIER, D., BENYAHIA, H., PENSABENE-BELLAVIA, G., AKA KAÇAR, Y., FROELICHER, Y. (2011). Somatic hybridization for citrus rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant Cell Reports* 30: 883-900. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-1000-z>
- DEWITTE, A., EECKHAUT, T. VAN HUYLENBROECK, J. & VAN BOCKSTAELE, E. (2009). Occurrence of viable unreduced pollen in a *Begonia* collection. *Euphytica* 168: 81-94. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9891-x>
- DOLEZEL, J., DOLEŽELOVÁ, M. & NOVÁK, F. J. (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum* 36: 351-357. <https://doi.org/10.1007/BF02920930>
- DOLEZEL, J., GREILHUBER, J. & SUDA, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233-2244. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>
- DUTT, M., VASCONCELLOS, M., SONG, K. J., GMITTER, F. G. & GROSSER, J. W. (2010). *In vitro* production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. *Euphytica* 173: 235-242. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0098-y>
- FEDERCITRUS. (2024). La actividad citrícola. Federación Argentina del Citrus. www.federcitrus.org
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0093-3>
- FROST, H. B. & SOOST, R. K. (1968). Seed reproduction: development of gametes and embryos. En REUTHER, W., L. D. BATCHELOR & H. J. WEBBER (eds.), *Citrus Industry: Anatomy, Physiology, Genetics and Reproduction*, pp. 290-324. University of California.
- GALBRAITH, D. W. (2010). Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting in plants: the past, present, and future. *Biomédica* 30: 65-70. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v30i0.824>
- GALLAIS, A. (2003). Quantitative genetics and breeding methods in autopolyploids plants. INRA, París.
- GARCÍA-MUÑOZ, M. C., HENAO-ROJAS, J. C., MORENO-RODRÍGUEZ, J. M., BOTINA-AZAIN, B. L. & ROMERO-BARRERA, Y. (2021). Effect of rootstock and environmental factors on fruit quality of Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) grown in tropical regions.

- Journal of Food Composition and Analysis, 103 (July). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104081>
- GARDNER, J. L. (2007). Comparison of calibration methods for tristimulus colorimeters. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* 112: 129. <https://doi.org/10.6028/jres.112.010>
- GILCHRIST, A. & NOBBS, J. (2000). Colorimetry , Theory. En LINDON, J., HOLMES, J. & G. TRANTER, (eds.), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (First, Issue January 2000), pp. 337-343. UK Academic Press.
- GONZÁLEZ, M., GHELFI, J., RIVAS, F. & BERTALMIO, A. (2013). Protocolo de producción de semilla certificada de portainjertos de citrus. Cartilla N° 20: 1-3. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/3822/1/Cartilla-20.pdf>
- GORA, J. S., RAM, C., POONIA, P. K., CHOUDHARY, M. & HALDHAR, S. M. (2022). Polyploid rootstocks in citrus for mitigation of biotic and abiotic stresses: A review. *Journal of Agriculture and Ecology* 13: 1-19. <https://doi.org/10.53911/JAE.2022.13101>
- GORA, J. S., KUMAR, R., KUMAR, P., RAM, C., BERWAL, M. K. & HALDHAR, S. M. (2023). Citrus rootstocks for higher fruit yield production. En SINGH, S. B., HALDHAR, S. M., DILIP SINGH, R. K., THAOCHAN, N. & A. A. MURKUTE, (eds.), *Citrus Crop Production and Management in NEH Region*, pp. 132-145. Scientific Publishers, Jodhpur (India).
- GROSSER, J. W., OLLITRAULT, P. & OLIVARES-FUSTER, O. (2000). Invited review: Somatic hybridization in *Citrus*: An effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36: 434-449. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0080-9>
- GROSSER, J. W., GMITTER, F. G. & GMITTER JR. F. G. (2011). Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 104: 343-357. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9823-4>
- GUERRA, D., WITTMANN, M. T. S., SCHWARZ, S. F., SOUZA, P. V. D., GONZATTO, M. P. & WEILER, R. L. (2014). Comparison between diploid and tetraploid citrus rootstocks: morphological characterization and growth evaluation. *Bragantia* 73: 1-7. <https://doi.org/10.1590/brag.2014.007>
- GUERRA, D., SCHIFINO-WITTMANN, M. T., SCHWARZ, S. F., WEILER, R. L., DAHMER, N. & DE SOUZA, P. V. D. (2016). Tetraploidization in citrus rootstocks: Effect of genetic constitution and environment in chromosome duplication. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 16: 35-41. <https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n1a6>
- HESLOP-HARRISON, J. S. & SCHWARZACHER, T. (1996). Flow cytometry and chromosome sorting. En FUKUI, K. & S. NAKAYAMA (eds.), *Plant Chromosomes: Laboratory Methods*, pp. 85-108. CRC Press, Boca Raton.
- HUSSAIN, S., CURK, F., OLLITRAULT, P., MORILLON, R. & LURO, F. (2011). Facultative apomixis and chromosome doubling are sources of heterogeneity in citrus rootstock trials: Impact on clementine production and breeding selection. *Scientia Horticulturae* 130: 815-819. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.009>
- HUSSAIN, S., CURK, F., ANJUM, M. A., PAILLY, O. & TISON, G. (2013). Performance evaluation of common clementine on various citrus rootstocks. *Scientia Horticulturae* 150: 278-282. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.010>
- JASKANI, M. J., KHAN, M. M. & KHAN, I. A. (2002). Growth, morphology and fruit comparison of diploid and tetraploid Kinnow mandarin. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 39: 126-128.
- KHAN, I. A., & ROOSE, M. L. (1988). Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliate orange. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113: 105-110. <https://doi.org/10.21273/JASHS.113.1.105>
- KISHORE, K., MONIKA, D., RINCHEN, L. B. & PANDEY, B. (2012). Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus. *Scientia Horticulturae* 138: 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.01.035>
- LATADO, R. R., CRISTOFANI-YALY, M., CARVALHO, C. R. & MACHADO, M. A. (2007). Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento in vitro com colchicina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 1429-1435. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2007001000009>
- LEE, L. S. (1988). *Citrus* polyploidy - origins and potential for cultivar improvement. *Australian Journal of Agricultural Research* 39: 735-747. <https://doi.org/10.1071/AR9880735>
- OIYAMA, I. & OKUDAI, N. (1986). Production of colchicine-induced autotetraploid plants through micrografting in monoembryonic citrus cultivars. *Japanese Journal of Breeding* 36: 371-376. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.36.371>
- OLLITRAULT, P. & MICHAUX-FERRIÈRE, N. (1992). Application of flow cytometry for citrus genetic and breeding. *International Citrus Congress*. 7: 20.

- OLLITRAULT, P., DAMBIER, D., SUDAHONO, L. F. (1996a). Somatic hybridisation in citrus: some new hybrid and alloplasmic plants. En Proceedings International Society Citriculture. Volume 2. s.l.: s.n., 907-912. International *Citrus* Congress. 8, Sun City, Afrique du Sud, 12 Mai 1996/17 Mai 1996.
- OLLITRAULT, P., DAMBIER, D., JACQUEMOND, C., ALLENT, V. & LURO, F. (1996b). *In vitro* rescue and selection of spontaneous triploids by flow cytometry for easy peeler citrus breeding. Proceedings International Society Citriculture 2: 254-258.
- OLLITRAULT, P., DAMBIER, D. S., MADEMBA-SY, F., VANEL, F., LURO, F. & AUBERT, B. (1999). Biotechnology for triploid mandarin breeding. 5th World Congress of the International Society of *Citrus* Nurserymen. Proceedings of the Congress, p. 337.
- OLLITRAULT, P., DAMBIER, D., LURO, F. & FROELICHER, Y. (2008). Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. En JANICK, J. (ed.), Plant Breeding Reviews, pp. 323-352. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470380130.ch7> completar editores
- OLLITRAULT, P., GERMANÀ, M. A., FROELICHER, Y., CUENCA, J., ALEZA, P., MORILLON, R.; GROSSER, J. D.; GUO, W. (2020). Ploidy manipulation for *Citrus* breeding, genetics, and genomics. En GENTILE, A., LA MALFA, S. & Z. DENG (eds.). The *Citrus* Genome, pp. 75-105. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15308-3_6
- OTTO, S. P. & WHITTON, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. Annual Review of Genetics 34: 401-437. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.401>
- PEER, Y.V.D., MIZRACHI, E., MARCHAL, K., VAN DE PEER, Y., MIZRACHI, E. & MARCHAL, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. Nature Reviews Genetics 18: 411-424. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26>
- PODDA, A., CHECCUCCI, G., MOUHAYA, W., CENTENO, D. & ROFIDAL, V. (2013). Salt-stress induced changes in the leaf proteome of diploid and tetraploid mandarins with contrasting Na⁺ and Cl⁻ accumulation behaviour. Journal of Plant Physiology 170: 1101-1112. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.03.006>
- RAMOS, S., DE RUYVER, R., GATTINONI, N., GARÍN, R. & GARRÁN, S. (2018). Estación agrometeorológica del INTA Concordia. Serie de extensión.
- ROMERO-ARANDA, R., BONDADA, B. R., SYVERTSEN, J. P. & GROSER, J. W. (1997). Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid *Citrus*. Annals of Botany 79: 153-160. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0326>
- RUIZ, M., QUIÑONES, A., MARTÍNEZ-ALCÁNTARA, B., ALEZA, P., MORILLON, R. (2016a). Tetraploidy enhances boron-excess tolerance in Carrizo Citrange (*Citrus sinensis* L. Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.). Frontiers in Plant Science 7(May): 1-16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00701>
- RUIZ, M., QUIÑONES, A., MARTÍNEZ-ALCÁNTARA, B., ALEZA, P. & MORILLON, R. (2016b). Effects of salinity on diploid (2x) and doubled diploid (4x) *Citrus macrophylla* genotypes. Scientia Horticulturae 207: 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.007>
- SALEH, B., ALLARIO, T., DAMBIER, D., OLLITRAULT, P. & MORILLON, R. (2008). Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. Comptes Rendus Biologies 331: 703-710. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.06.007>
- SANFORD, J. C. (1983). Ploidy manipulations. En MOORE, J. N. & J. JANICK (eds.), Methods in Fruit Breeding (1st ed.), pp. 100-123. Purdue University Press.
- SCHEPPER, S. DE, LEUS, L., MERTENS, M., BOCKSTAELE, E. VAN & MELLE, B. (2001). Flow Cytometric analysis of ploidy in *Rhododendron* (subgenus *Tsutsusi*). HortScience 36: 125-127.
- SEKER, M., TUZCU, O. & OLLITRAULT, P. (2003). Comparison of nuclear DNA content of citrus rootstock populations by flow cytometry analysis. Plant Breeding 122: 169-172. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00821.x>
- SLIWINSKA, E. (2018). Flow cytometry- a modern method for exploring genome size and nuclear DNA synthesis in horticultural and medicinal plant species. Folia Horticulturae 30: 103-128. <https://doi.org/10.2478/fhort-2018-0011>