

Artículo de revisión

Mejoramiento genético de los cítricos: millones de años de evolución**Citrus Breeding: million years of evolution**R.L. Gómez¹; L.S. Sendín¹; V.A. Ledesma¹; L.A. Romero¹; M.P. Filippone^{2*}

¹ Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. William Cross 3150, Las Talitas (T4101XAC), Tucumán, Argentina.

² Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, Av. Independencia 1800, San Miguel de Tucumán (4000), Argentina. *E-mail: paulafilippone2018@gmail.com

Resumen

Los cítricos son uno de los cultivos frutales más extendidos a nivel mundial. Constituyen un grupo muy complejo de genotipos con una gran diversidad fenotípica. Originarios del sudeste asiático, los ancestros más antiguos datan de aproximadamente 20 millones de años. Desde entonces, el mejoramiento genético de los cítricos se ha producido gracias a una serie de eventos, muchos desconocidos, caracterizados primariamente por la hibridación, mutación y selección con participación de la naturaleza y del hombre. Los primeros programas sistemáticos de mejora dieron comienzo en Florida, EE.UU., en 1893, al que le sucedieron numerosos programas en todo el mundo. El mejoramiento de los cítricos constituye una tarea larga y compleja, que ha evolucionado desde la simple selección de los genotipos sobresalientes obtenidos mediante métodos clásicos, hasta llegar a las nuevas aproximaciones biotecnológicas. Es así que, por medio de la biología molecular, la genómica, y la ingeniería genética, se han podido superar varias de las limitaciones asociadas a la compleja biología de los cítricos y obtener importantes progresos tanto en el conocimiento como en el mejoramiento. En este trabajo se presenta una revisión sobre la evolución del mejoramiento de los cítricos y una breve descripción de las diferentes técnicas empleadas y de los resultados obtenidos.

Palabras claves: Citricultura; Híbridos; Variedades cítricas; Portainjertos; Ingeniería genética.

Abstract

Citrus fruits are one of the most widespread fruit crops worldwide. They constitute a very complex group of genotypes with a great phenotypic diversity. Originally from southeast Asia, the oldest ancestors date back approximately 20 million years. Since then, the genetic improvement of citrus fruit has taken place due to a series of events, many unknown, characterized primarily by hybridization, mutation and natural and human selection. The first systematic improvement programs began in 1893 in Florida, USA, followed by numerous programs around the world. Citrus breeding is a long and complex task which has evolved from the simple selection of outstanding genotypes obtained by using classic methods to new biotechnological approaches. Thus, through the use of molecular biology, genomics and genetic engineering, it has been possible to overcome several limitations associated with the complex biology of citrus and gain significant progress regarding citrus fruit characteristics and improvement. This paper reviews citrus breeding evolution and summarizes different approaches used and the results obtained.

Keywords: Citriculture; Hybrids; Citrus varieties; Rootstocks; Genetic engineering.

Desde oriente al resto del mundo

La historia ubica el origen de los cítricos hace 20 millones de años (Figura 1), mucho antes de la aparición de los seres humanos (Medina, 2015). Desde entonces hasta la actualidad han sufrido numerosas modificaciones, ya que los cítricos que hoy conocemos distan mucho de sus ancestros. En la antigüedad los mismos no formaban parte de la dieta de la humanidad debido a su extrema acidez, pero sí se utilizaban las flores y los aceites

esenciales de los frutos. El hombre comenzó a seleccionarlos y a domesticarlos para incorporarlos como alimento recién desde hace 6.000 a 10.000 años. La cita más antigua que menciona a los cítricos con esa finalidad es el libro chino de *Yu Gong*, escrito hace 4000 años.

Existen varias hipótesis con respecto al centro de origen de los cítricos, coincidiendo todas ellas en que se corresponde con las regiones tropicales

Recibido: 25/06/2020; Aceptado: 15/10/2020.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

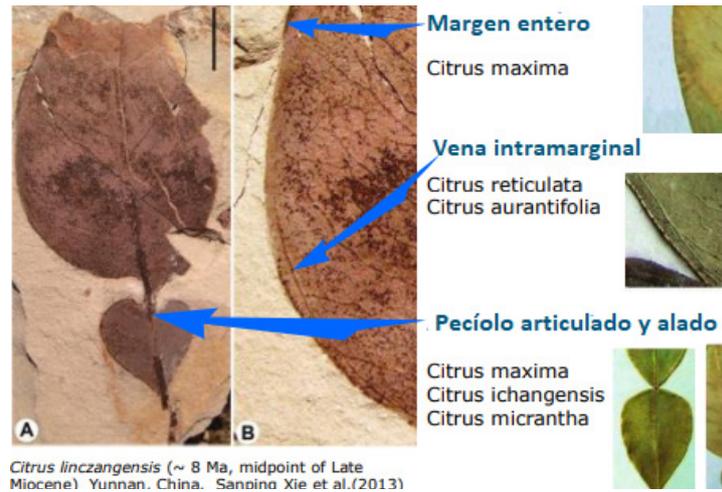


Figura 1. El cítrico fósil más antiguo. *Citrus linczangensis* sp. n., una nueva especie fue descrita en base a restos fósiles encontrados en la ciudad de Lincang, provincia de Yunnan, China. Los estudios determinaron que los restos encontrados serían del Mioceno, último periodo de la era Cenozoica, el cual se inició hace 23 millones de años y terminó hace 5 millones de años. El espécimen fósil encontrado compartiría características anatómicas comunes con especies del género *Citrus* actuales como por ejemplo la morfología de las hojas compuestas unifolioladas, un pecíolo articulado y de alas anchas, y los bordes de las hojas completos con nervaduras intramarginales basales (Extraído de Xie *et al.*, 2013).

y subtropicales del Sureste Asiático y del Archipiélago Malayo. Sin embargo hay controversias a la hora de definir el centro de origen con una mayor precisión. Así, por ejemplo, Tanaka (1954) propuso que el centro de origen primario sería el noroeste de India y Burma, mientras que China sería un centro de distribución secundario, contrario a la propuesta de Calabrese (1992) quien señaló a China como centro principal. Tampoco se conoce con exactitud la forma en la que se distribuyeron al resto del mundo. Una hipótesis de su recorrido es que desde Asia fueron llevados al norte de África y al sudeste de Europa. Desde allí arribaron a América con las expediciones de Cristóbal Colón. Luego fueron introducidos y distribuidos por los misioneros católicos, inicialmente en el Caribe y Brasil, y luego al resto del continente (Gmitter y Hu, 1990).

Los cítricos se cultivan en casi todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo dentro de la franja comprendida entre los 40° de latitud N y S. Con una producción mundial que supera los 100 millones de toneladas por año, se constituyen como el principal cultivo frutal. A pesar de que se cultivan en más de 130 países, cerca del 70 % de la producción se concentra solo en cinco (China, Brasil, Estados Unidos, India y México) lo que pone en evidencia claros contrastes en la escala productiva. Argentina ocupa el octavo lugar a nivel mundial, con una producción total aproximada de 3,2 millones de t en una superficie de 135.500 hectáreas, siendo la actividad cítrica una de las

más importantes dentro de la fruticultura a nivel nacional (Federcitrus, 2018).

Una familia compleja

Los cítricos pertenecen a la familia de las *Rutáceas* y subfamilia *Aurantioideae*, y bajo esta denominación se incluyen a los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella*. El género *Citrus* es el más importante de los tres, y dentro del mismo se distinguen el subgénero *Papeda* y *Eucitrus*, al que pertenecen los genotipos cultivados para consumo (Swingle y Reece, 1967). Dentro del género *Citrus* se incluyen numerosas especies cuya clasificación taxonómica no está del todo esclarecida. En base a diferentes estudios, se consideran sólo cuatro especies puras o básicas: *C. reticulata* (mandarina), *C. maxima* (pomelo), *C. medica* (cidro) y *C. micrantha* (micranta), entre las cuales existe una alta compatibilidad sexual que ha permitido el cruzamiento espontáneo entre ellas, contribuyendo a un alto nivel de hibridación, a la complejidad del grupo, y a una difícil clasificación taxonómica (Figura 2) (Curk *et al.*, 2016). A pesar de esta elevada diversidad, sólo algunas especies se utilizan como variedades comerciales; evidencia de ello es el hecho que la naranja dulce representa cerca del 70% de la producción mundial de cítricos. La mayoría de los genotipos comerciales que se conocen en la actualidad (por ejemplo, *C. sinensis*, *C. paradisi* y *C. limon*) no constituyen especies biológicamente definidas ya que muchos cultivares dentro de

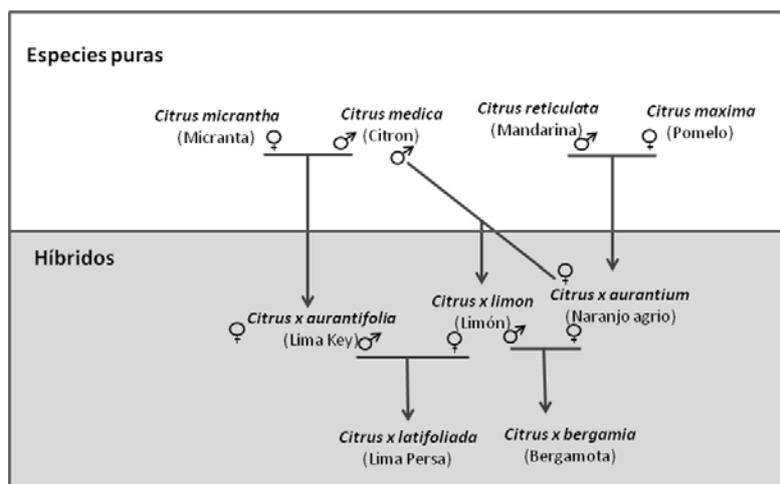


Figura 2. Relaciones filogenéticas de los principales genotipos cítricos actuales. El uso de marcadores moleculares y la secuenciación del genoma han contribuido a identificar las especies cítricas originales “puras” del género *Citrus*: *C. medica* (cítron), *C. maxima* (pomelo), *C. reticulata* (mandarina) y *Citrus micrantha* (micranta), de los cuales derivan los cítricos cultivados. El esquema muestra los híbridos cítricos que derivan de cruzamientos simples entre dos genotipos originales. Existen otros genotipos que derivan de procesos más complejos que incluyen más de dos parentales y retrocruzamientos, como en el caso de las mandarinas actuales y la naranja dulce (*C. sinensis*), las que derivaron de múltiples cruzamientos e introgresiones de *C. máxima*. Adaptación de Curk *et al.*, 2016.

cada grupo se originaron a partir de mutaciones somáticas. Las mismas se fueron seleccionando a lo largo de miles de años y estabilizándose por propagación clonal mediante semillas apomícticas, un fenómeno muy frecuente en muchos genotipos cítricos (Gmitter, 1995). Así, por ejemplo, la historia registra descubrimientos casuales como el de la mandarina clementina (*Citrus Clementina* Hort. Ex Tan.), una hibridación natural descubierta por el francés Clement Rodier a comienzos del siglo XX. Posteriormente, en 1953, a partir de una mutación espontánea ocurrida en un árbol de *C. clementina* en el pueblo de Nules (Castellón), surgieron las clemenules, una de las variedades de mandarina más consumidas en España (Cubillo, 2013). La diversificación de la naranja dulce también es consecuencia de la ocurrencia de mutaciones de brotes somáticos (Aubert, 2001). Breto *et al.* (2001) propusieron que este fenómeno, que es muy frecuente en los cítricos, podría ser debido a los elementos transponibles.

Además de las mutaciones y cruzamientos espontáneos ocurridos en la naturaleza, otros genotipos son el resultado de cruzamientos dirigidos, los cuales según datan los registros escritos, se iniciaron en China hace más de 4.000 años, donde decidieron mejorar a los cítricos ya que eran extremadamente ácidos, pequeños y llenos de semillas. Comenzaron a combinar genotipos hasta obtener frutos más dulces y menos ácidos, similares a los actuales. Así, por ejemplo, el cruzamiento de una mandarina (*C. reticulata*) y un pomelo ancestral

(*C. maxima*) dio lugar a un fruto comestible, un híbrido con baja acidez que se volvió a cruzar varias veces. Recientemente se identificó un locus (localización específica de una secuencia de ADN dentro de un cromosoma) que estaría involucrado en la disminución de la acidez, ubicado en el cromosoma 8 (0,3-2,2 Mb) de todas las variedades de las mandarinas y naranjas dulces actuales de baja acidez, el cual habría sido introgresado del pomelo (Wu *et al.*, 2018).

El origen, evolución, genealogía y domesticación de los cítricos, siempre ha sido motivo de estudio y aún existen muchos interrogantes. Recientemente, un equipo de investigadores pertenecientes al Centro de Genómica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (España), junto al “Department of Energy Joint Genome Institute” (DOE JGI) (EE.UU.), obtuvieron resultados que desafían los actuales principios taxonómicos y filogenéticos, apuntando hacia una reformulación del género *Citrus* (Wu *et al.*, 2018). Dichos investigadores realizaron un estudio comparativo del genoma de 58 genotipos representantes de todos los grupos de cítricos, y determinaron que los genotipos actuales descienden de diez especies naturales procedentes de un área cercana al Himalaya, delimitada por el este de la India, el norte de Myanmar y el oeste de Yunnan. El estudio sugiere que estos genotipos ancestrales sufrieron un evento de especiación durante el Mioceno tardío, hace unos 8 millones de años, lo que coincidió con un cambio climático que transformó las con-

diciones del monzón húmedo a un clima más seco, a lo que se sumó un complejo proceso de “domesticación” por parte del ser humano, dando origen a la diversidad de los genotipos cítricos actuales.

Si bien la evolución de los cítricos ha sido continua a lo largo de miles de años por intervención de la naturaleza y del hombre, la investigación y el mejoramiento sistemático se inició con las Leyes de Gregor Mendel (Austria, 1822-1868) y Charles Darwin (Reino Unido, 1809-1882), las cuales sentaron las bases del mejoramiento genético como una disciplina científica, con fundamentos sólidos, enfocados en técnicas clásicas de botánica y citogenética. A partir de allí se han generado algunos resultados exitosos, aunque en general fueron muy lentos (Talón y Gmitter, 2008; Wood y Corley, 2008). Los grandes avances en genética, biología molecular y biotecnología de las últimas décadas han impartido otra dinámica al mejoramiento de los cítricos, acelerando los procesos de mejoramiento y permitiendo superar limitaciones asociadas a la propia biología del grupo, que no podrían haberse logrado sólo con las técnicas convencionales.

Objetivos de mejoramiento

Una planta cítrica destinada a la producción comercial está constituida por dos partes genéticamente diferentes, la “copa o variedad” y el “pie o portainjerto”, conjunto que se denomina “combinación cítrica”. El portainjerto aporta el sistema radicular a la variedad de la copa elegida, siendo el responsable de la absorción de agua y elementos nutritivos; pero además puede tener influencia en diferentes características de una variedad,

como por ejemplo, en el vigor y tamaño de la planta, tolerancia al frío, adaptación a ciertas condiciones de suelo (tales como salinidad o acidez), tolerancia a enfermedades o plagas, productividad y calidad interna y externa de la fruta, etc. (Agustí, 2003). Si bien no existe el portainjerto ideal para una situación particular, la elección del mismo se hace teniendo en cuenta la mayoría de los factores limitantes del cultivo en una determinada zona y al objetivo específico de la producción (fruta fresca o industria). Es por ello que los programas de mejoramiento de cítricos estarán focalizados a la mejora del pie o la variedad de copa, o de ambos, dependiendo de las necesidades de cada región. En la Figura 3 se mencionan algunos de los objetivos más comúnmente perseguidos en el mejoramiento de los cítricos.

Tecnologías de mejoramiento genético utilizadas en cítricos

La evolución del mejoramiento de los cítricos responde a la conjunción de las características propias del cultivo y a la evolución de las tecnologías de mejoramiento genético vegetal. Las técnicas de mejoramiento utilizadas en cítricos se pueden dividir en dos grupos: convencionales y biotecnológicas.

Técnicas convencionales

Las técnicas conocidas como convencionales o tradicionales de mejoramiento, se basan en los recursos genéticos que se encuentran en el grupo a mejorar, e incluyen la selección de genotipos superiores o modificación de genomas mediante

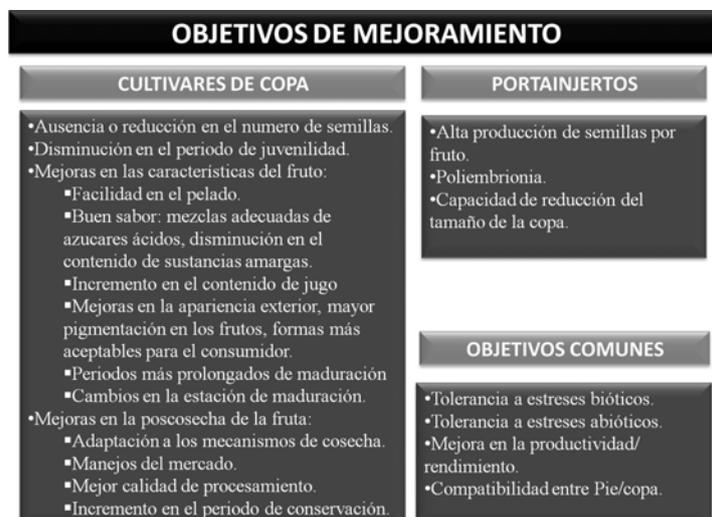


Figura 3. Objetivos de mejoramiento en cítricos.

hibridación sexual o mutaciones (naturales o inducidas).

La hibridación sexual entre individuos diploides combinados con la selección artificial, ha sido utilizada tradicionalmente en los programas de mejora de cítricos y aún se continúan utilizando; sin embargo, el número de genotipos de interés obtenidos ha sido limitado (Gmitter y Hu, 1990), sumado a que es un proceso costoso y lento, que puede llevar entre 20 y 30 años. Este resultado es atribuible, en parte, a factores que son comunes a las especies leñosas y a características específicas relacionadas con la biología reproductiva de las especies del género *Citrus* y de los géneros relacionados, tales como: el elevado nivel de heterocigosis que presentan la mayoría de las especies (Herrero *et al.*, 1996), lo que produce una gran segregación de caracteres en la descendencia; esterilidad del polen y frecuentes casos de inter y auto-incompatibilidad sexual (Cameron y Frost, 1968). Adicionalmente, la alta frecuencia de partenocarpia, donde la fecundación de los óvulos no ocurre y las semillas no se desarrollan debido a que las mismas quedan reducidas a pequeños rudimentos seminales (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996); el largo periodo de juvenilidad (entre 5 y 21 años) (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996), por lo que la evaluación de los híbridos resultantes requiere muchos años y es muy costosa (Wood y Corley, 2008); y la apomixis parcial que produce semillas con embriones nucelares idénticos a la planta madre, sin que exista fecundación, limitando el desarrollo del embrión zigótico y dificultando la recuperación de la progenie sexual (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Por último, el gran tamaño de los árboles dificulta la disponibilidad de una progenie numerosa, y hace necesario disponer de grandes espacios (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). A pesar de estas limitaciones, a lo largo de la historia se obtuvieron cultivares de copa y portainjerto de gran importancia comercial mediante esta técnica, como los tangelos (mandarina X híbridos de pomelo) Minneola, Orlando, Pearl, Sampson; los tangores (mandarina X híbridos de naranja dulce) Murcott, Temple, King y algunos portainjertos como citrumelo Swingle (pomelo X híbrido de naranjo trifoliados) (Wood y Corley, 2008) y citrumelo 79AC y 75AB (Cleopatra X Citrumelo Swingle) (Stein y Foguet, 2015).

En el género *Citrus* y géneros relacionados, el número de cromosomas gaméticos es $n=9$, y los individuos diploides son los más habituales, sin em-

bargo, se producen de forma espontánea variantes euploides, especialmente triploides ($2n=3x=27$) y tetraploides ($2n=4x=36$). En general los genotipos poliploides presentan características morfológicas de interés comercial como por ejemplo, frutos sin semillas u órganos de mayor tamaño. En la meiosis de las plantas triploides se producen gametos con distintas dotaciones cromosómicas que reducen la viabilidad de los mismos y los frutos no tienen semillas (Esen *et al.*, 1978). Los genotipos triploides se pueden obtener por hibridación entre una madre tetraploide y el padre diploide, aunque este tipo de cruce produce sólo unos pocos híbridos y muchos embriones nucelares, debido al alto nivel poliembriónico de la madre tetraploide. Desde la década de 1970 se sabía que también se pueden obtener de la cruce de genotipos diploides cigóticos como madre y los genotipos tetraploides como padres ($2x \times 4x$), sin embargo, estas estrategias no pudieron aplicarse en programas de mejora hasta que se desarrollaron técnicas biotecnológicas como el rescate y cultivo de embriones *in vitro*, análisis del nivel de ploidía mediante citometría de flujo y obtención de nuevos parentales tetraploides (Aleza *et al.*, 2010).

Por otro lado, una gran parte de genotipos de copa o portainjertos que se utilizan al presente se originaron por la aparición espontánea de plantas sobresalientes o de mutaciones espontáneas en el campo, un proceso que se denomina selección clonal. Este es un evento relativamente frecuente en los cítricos, lo que indica una cierta inestabilidad genética de los mismos. La selección de estas mutaciones es el método más antiguo y ha permitido la obtención de los cultivares más ampliamente empleados en las principales zonas productoras del mundo (Gmitter *et al.*, 1992). Las especies en las que se ha logrado el mayor número de variedades clonales son las naranjas del grupo Navel y mandarinas del grupo de los Clementinos y Satsumas (Bono *et al.*, 1996). Sin embargo, la identificación de este tipo de material exige una gran capacidad de observación de los mejoradores y requiere una evaluación crítica del comportamiento de los árboles, de la calidad de la fruta, de los beneficios económicos y de "marketing", lo que implica mucho tiempo y dinero, dificultando su utilización.

La generación de mutaciones también se puede inducir en forma artificial, mediante la cual se modifican al azar uno o pocos caracteres de un genotipo, sin cambiar de forma significativa su fondo

genético. Los rayos gamma han sido el agente mutagénico más utilizado en cítricos y han permitido la obtención de distintas variedades de frutos sin semillas y de gran aceptación comercial, como la mandarina “Mor” o la variedad Nusselin, entre otras (Roose y Williams, 2007; Navarro, 2011). Otros rasgos inducidos por mutagénesis incluyen el tamaño de la planta, el tiempo de floración, la maduración y coloración de la fruta, la autocompatibilidad y la resistencia a patógenos (Predieri, 2001). Sin embargo, esta técnica conlleva la desventaja que las mutaciones son al azar y hay que evaluar muchos individuos, durante muchos años, hasta lograr la estabilización de la mutación, ya que en muchos casos ocurre reversión al genotipo original (Navarro, 2011).

Técnicas biotecnológicas

En las últimas décadas, el mejoramiento de los cítricos ha tomado otro impulso con el surgimiento de nuevas técnicas biotecnológicas que han permitido sortear muchos de los problemas asociados con la biología reproductiva de estos cultivos, incrementando la eficiencia y disminuyendo los tiempos de obtención de genotipos mejorados.

El desarrollo de métodos que permiten la manipulación del ADN, junto a las posibilidades que ofrece el cultivo de tejidos *in vitro*, han creado grandes expectativas para la mejora de plantas leñosas. La manipulación de la ploidía, el aprovechamiento de la variación somaclonal, el rescate de embriones, la fusión de protoplastos o la transformación genética, suponen grandes avances en la mejora de los cítricos (Mohan *et al.*, 1997).

A continuación, se detallan las herramientas biotecnológicas más utilizadas para la mejora genética en cítricos:

Manipulación de la ploidía: la biotecnología ha facilitado la obtención de genotipos cítricos poliploides (Gmitter *et al.*, 1992) mediante por ejemplo el cultivo de tejidos *in vitro* en un medio adicionado con antimitóticos como colchicina (Soost y Cameron, 1969). Otras estrategias utilizadas son el cultivo de endospermo (Wang y Chang, 1978) y el rescate de embriones triploides a partir de semillas abortadas de frutos originados de hibridaciones sexuales ($2x \times 4x$) (Aleza *et al.*, 2010). La creación de nuevos parentales tetraploides resulta de mucho interés, ya que ha permitido la obtención de nuevas combinaciones de híbridos triploides que no se podían obtener décadas atrás. Por

ejemplo, mediante citometría de flujo se pueden identificar plántulas tetraploides originadas por la duplicación espontánea del número de cromosomas (embrionía adventicia) que se producen en las células de la nucela de genotipos apomícticos (poliembriónicos). En las semillas de los genotipos no apomícticos (monoembriónicos) que contienen únicamente un embrión de origen sexual, no se produce la duplicación espontánea del número de cromosomas por lo que es necesario la utilización de otras tecnologías, como por ejemplo el tratamiento de los ápices con antimitóticos, los cuales se injertan por micropropagación y posteriormente se seleccionan los tetraploides mediante citometría de flujo (Aleza *et al.*, 2010).

Variación somaclonal: consiste en la variación genética o epigenética heredable que aparece en las células vegetales sometidas a cultivo *in vitro* (Díaz *et al.*, 2004). Este proceso puede incluir cambios en el ADN tanto a nivel nuclear como citoplasmático (Larkin y Scowcroft, 1981). Los cambios producidos por la variación somaclonal en general son indeseables o suceden sin manifestarse en cambios morfológicos evidentes. Sin embargo, la aparición ocasional de caracteres no encontrados en las poblaciones naturales y que representan una ventaja desde el punto de vista agronómico, permiten utilizar este fenómeno en programas de mejora genética (Dewald y Moore, 1987). Esta técnica es muy utilizada para generar clones mejorados como por ejemplo en *Citrus sinensis*, especialmente para la obtención de los cultivares Hamlin y Valencia, dos de los genotipos de naranja más cultivados en Florida, EE.UU. (Grosser *et al.*, 2007a).

Selección asistida por marcadores moleculares: es un método de mejora que se basa en la identificación de regiones del ADN asociadas a un locus que codifica para una determinada característica de interés agronómico. La identificación de estos marcadores permite realizar una selección temprana de la progenie a fin de abordar la mejora de una forma más rápida, eficaz y dirigida. Las isoenzimas, RFLP (siglas en inglés de “Restriction Fragment Length Polymorphism”), RAPD (siglas en inglés de “Random Amplification of Polymorphic DNA”), AFLP (siglas en inglés de “Amplified Fragment Length Polymorphism”) o los Microsatélites-SSR (siglas en inglés de “Simple Sequence Repeat”), son algunas de las técnicas más empleadas. En cítricos se han desarrollado en los últimos años un elevado número de marcadores micros-

télites que actualmente permiten la elaboración de mapas genéticos más precisos (Fang *et al.*, 2018). Sin embargo, aún resulta escaso el número de marcadores asociados a caracteres de interés. Se conocen algunos marcadores asociados a genes de resistencia al virus de tristeza de los cítricos identificados en el genoma de *Poncirus trifoliata* (Fang *et al.*, 1998). También se han identificados marcadores relacionados con genes que controlan la cantidad de ácido cítrico en los frutos (Fang *et al.*, 1998), la embrionía nucelar (Smith *et al.*, 2019), la tolerancia a nemátodos (Ling *et al.*, 2000) y la tolerancia a salinidad (Tozlu *et al.*, 1999). Algunas características genéticas de los cítricos, como el bajo número de cromosomas y el reducido tamaño de su genoma [$1C = 0,62 \text{ pg}$] (Guerra, 1984), así como el elevado nivel de polimorfismo y la posibilidad de generar híbridos fértiles intraespecíficos e intergenéricos, favorecen la construcción de mapas genéticos de ligamiento. Hasta la fecha se han publicado numerosos mapas genéticos de cítricos correspondientes a especies de interés para la citricultura, ya sea por su aplicación como portainjerto (*C. aurantium*, *C. volkameriana*, *P. trifoliata*), o por la producción de fruta para consumo en fresco (*C. sinensis*, *C. clementina*). Disponer de mapas genéticos para las diferentes especies del género *Citrus* permite la comparación de sus genomas, abriendo nuevas líneas de investigación en el campo de la genómica comparativa, la mejora genética asistida por marcadores moleculares, o el desarrollo de estrategias de clonación posicional, entre otras (Chen *et al.*, 2008).

Hibridación somática mediante fusión de protoplastos: esta alternativa de mejoramiento genético se ha utilizado en cítricos para sortear los problemas de la incompatibilidad sexual, esterilidad del polen y la poliembrionía. La técnica se basa en el aislamiento y posterior unión de dos protoplastos de células no sexuales provenientes de dos parentales, para formar una única célula híbrida, denominada heterocarionte (célula que contiene núcleos genéticamente diferentes), a partir de la

cual se puede regenerar una planta completa con técnicas de cultivo *in vitro* (Figura 4). Los híbridos resultantes contienen la combinación de los genomas nuclear, cloroplástico y mitocondrial de ambos parentales, y pueden expresar los caracteres de ambos; sin embargo, muchas veces hay una expresión parcial o combinada de los dos genomas (Grosser y Gmitter, 1990). De esta manera, se han generado híbridos somáticos alotetraploides interespecíficos e intergenéricos de cultivares de copa o portainjertos que pueden utilizarse en programas de mejoramiento (Grosser *et al.*, 1996). Por ejemplo, se han generado híbridos somáticos resistentes a nemátodos utilizando suspensiones de cultivos de mandarina y pomelo (Grosser *et al.*, 2007b); plantas tolerantes a la cancrrosis y a la clorosis variegada de los cítricos (CVC) mediante la utilización de protoplastos de hojas de la variedad Hamlin de naranja con la mandarina montenegrina (Pavan *et al.*, 2007).

Transformación genética: en general se entiende por transformación genética de plantas a la transferencia de genes foráneos al interior del genoma vegetal. La transgénesis, reportada en la década de 1980, es una de las herramientas más versátiles y poderosas, ya que permite introducir características nuevas a un cultivo “élite” sin modificar la integridad o fondo genético del mismo (Peña, 2000). Por otro lado, la transgénesis no sólo puede ser útil para la mejora genética de las plantas, sino también para investigar los mecanismos que controlan su desarrollo y sus respuestas a factores bióticos y abióticos.

La transformación de cítricos se ha efectuado a partir de varios tipos de explantos como epicótilo (Moore *et al.*, 1992), segmentos de tallo nodal e internodal (Kaneyoshi *et al.*, 1994), células embriogénicas (Yao *et al.*, 1996), callos (Hidaka *et al.*, 1990) y protoplastos (Fleming *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha reportado que el explanto que mejor responde es el epicótilo (Moore *et al.*, 1992) y, por lo tanto, es el más utilizado en experimentos de transformación de cítricos en la actualidad.

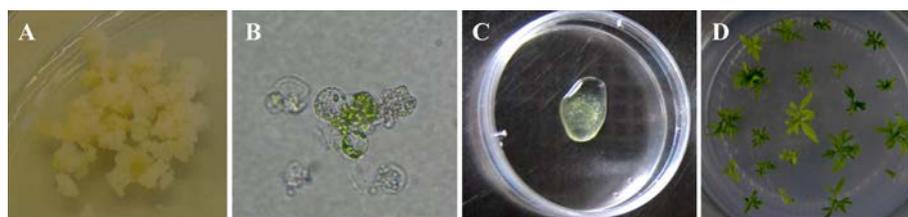


Figura 4. Etapas de la fusión de protoplastos. A. Callos embriogénicos de citrus. B. Protoplastos fusionados. C. Microcolonias derivadas de protoplastos fusionados. D. Brotes regenerados a partir de los embriones somáticos obtenidos a partir de productos de la fusión de protoplastos.

Entre las técnicas de transformación que se han utilizado en cítricos se incluyen la absorción químicamente asistida de ADN foráneo en protoplastos (Fleming *et al.*, 2000) y el bombardeo de callos o segmentos de epicótilo con partículas recubiertas de ADN (Yao *et al.*, 1996). El primer trabajo publicado sobre transformación directa de cítricos fue en 1989, en el que se describió la obtención de dos líneas de callos transgénicas a partir del tratamiento con polietilenglicol (PEG) de protoplastos de *C. sinensis* cv. Trovita (Kobayashi y Uchimiya, 1989). En 1990 se consiguió la regeneración de plantas transgénicas de limón Rugoso (*C. Jambhiri Lush.*) utilizando la misma técnica de transformación, pero combinada con un proceso embrionario de regeneración (Vardi *et al.*, 1990). Sin embargo, el método de transformación en el cual interviene el sistema biológico basado en el plásmido Ti (del inglés “Tumor inducing”) de *Agrobacterium tumefaciens* (*At*) ha demostrado ser el más exitoso en cítricos (Bond y Roose, 1998; Domínguez *et al.*, 2000). Este sistema se basa en la capacidad de la bacteria para transferir e integrar información genética en el genoma de la planta. Si bien este método es el más utilizado, existen determinados factores a tener en cuenta para su éxito, ya que la eficiencia de transformación puede variar entre un 0 y 45 %. Este parámetro dependerá de diversos factores como es el genotipo cítrico, ya que algunos son considerados recalcitrantes, es decir, con nula o baja respuesta a la regeneración *in vitro* y/o transformación (Costa *et al.*, 2002), la concentración del inóculo de *At* y condiciones de co-cultivo (Bond y Roose, 1998; Domínguez *et al.*, 2000). Además, se debe tener en cuenta que una vez que se ha integrado el ADN foráneo en el genoma de la planta, la célula transformada debe

ser capaz de regenerar una planta completa (Figura 5), y el transgen debe ser expresado en forma estable durante un largo periodo de tiempo para poder validar la tecnología de transformación.

Los avances en transgénesis en cítricos logrados hasta el presente, permitieron la obtención de genotipos mejorados mediante la introducción de diferentes genes capaces de conferir características de interés agronómico en una gran diversidad de genotipos cítricos. En la Figura 6 se destacan los logros de mayor relevancia.

Edición de genoma: la técnica más reciente en mejoramiento genético es la edición del genoma mediante la tecnología conocida como CRISPR/Cas9, la cual permite “editar” o “corregir” el genoma de cualquier célula. CRISPR es la abreviatura en inglés de “Clustered Regularly Intpaced Short Palindromic Repeats”. El sistema CRISPR-Cas9 deriva del mecanismo de defensa empleado por algunas bacterias para eliminar virus. Dicho sistema consta de un complejo formado por una proteína Cas unida al ARN producido a partir de las secuencias CRISPR. Cuando se hace uso biotecnológico de este mecanismo se utilizan ARNs conocidos como ARNs guías, complementarios a la región del ADN que se quiere modificar. Dichos ARNs se asocian con la enzima Cas9, e hibridan con la secuencia complementaria del genoma, dirigiendo a la endonucleasa Cas9 a cortar el ADN en una región específica. En la segunda etapa se activan al menos dos mecanismos naturales de reparación del ADN. En el mecanismo más comúnmente denominado “Non-homologous end joining” (NHEJ) se generan en la secuencia específica del ADN donde se unió el ARN guía, los denominados *indels* mediante la inserción o deleción de algunas pocas bases. Esto conlleva a la pérdida

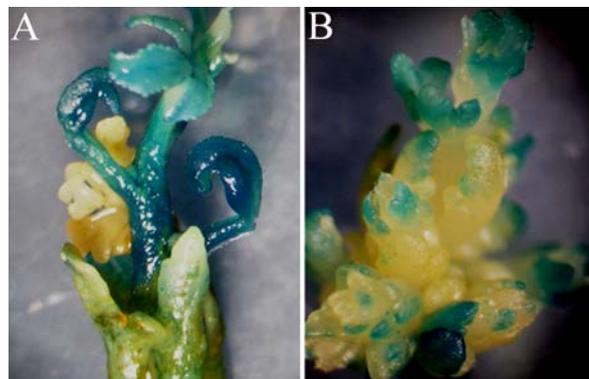


Figura 5. Regeneración de brotes transgénicos de citrange troyer. Para la detección de brotes regenerados a partir de células transformadas, se utilizan “genes reporteros” que se incorporan en la construcción génica acompañando al gen de interés, como el gen *gus* que codifica para la Beta-glucuronidasa. Las células transformadas se tiñen de azul debido al producto que se forma por acción de la enzima en contacto con el cromógeno X-Gluc. En A se observa un brote azul completamente transformado, y en B brotes quiméricos, es decir que poseen células transformadas y no transformadas.

Especie cítrica	Gen introducido	Característica otorgada	Referencia
<i>Citrus sinensis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	<i>LEAFY/APETALA1</i>	Reducción en el periodo de juvenilidad	Peña <i>et al.</i> , 2001
<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>	<i>HAL2</i>	Tolerancia a salinidad	Cervera <i>et al.</i> , 2000
<i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf	Betaina aldehído deshidrogenasa	Tolerancia a salinidad	Fu <i>et al.</i> , 2011
Citrango carrizo	Proteína antiapoptótica P35	Tolerancia a salinidad, sequía y frío	Orbovic <i>et al.</i> , 2017
Swingle citrumeño	Genes de síntesis de prolina (gen P5CSF129A)	Tolerancia a sequía	Molinari <i>et al.</i> , 2004
<i>C. Paradisi</i> Macf.	Genes de síntesis de carotenoides	Aumento en niveles de carotenos	Costa <i>et al.</i> , 2002
<i>C. aurantifolia</i>	Gen síntesis de antocianinas de uvras	Acumulación de bioflavonoides	Dutt <i>et al.</i> , (2016)
<i>C. sinensis</i>	CitMTSE1 (enzima D-limoneno sintasa)	Resistencia a <i>Penicillium digitatum</i>	Rodríguez <i>et al.</i> , 2015
<i>C. sinensis</i>	PR-5 de tomate	Resistencia a <i>Phytophthora citrophthora</i>	Fagoaga <i>et al.</i> , 2001
<i>C. limonia</i>	bacterio-opsin	Resistencia a <i>Phytophthora nicotianae</i>	Azevedo <i>et al.</i> , 2006
<i>C. Paradisi</i> Macf.	Péptido antimicrobiano attacina E	Resistencia a <i>Elsinoe fawcettii</i>	Mondal <i>et al.</i> , 2012
<i>C. aurantifolia</i> y <i>C. paradisi</i>	Proteína principal de la cápside del CTV	Resistencia al virus de la tristeza de los cítricos (CTV)	Domínguez <i>et al.</i> , 2002
<i>C. sinensis</i> y <i>C. aurantifolia</i>	Proteína de cápside viral Hairpin (<i>hrp</i>)	Resistencia al Virus de la psorosis (CPSV)	Reyes <i>et al.</i> , 2011; De Francesco <i>et al.</i> , 2016
<i>C. sinensis</i>	Péptido antimicrobiano sarcotoxina IA	Resistencia a <i>Xanthomonas citri</i> subs. <i>citri</i> (<i>Xcc</i>)	Kobayashi <i>et al.</i> , 2017
<i>C. sinensis</i>	Péptido antimicrobiano attacina A	Resistencia a <i>Xcc</i>	Boscariol <i>et al.</i> , 2006
<i>C. sinensis</i> cv. Hamlin	Hairpin (<i>hrpN</i>)	Resistencia a <i>Xcc</i>	Barbosa-Mendes <i>et al.</i> , 2009
<i>C. sinensis</i> y <i>Citrus</i> sp. W. Murcott	<i>Xa21</i> de arroz	Resistencia a <i>Xcc</i>	Omar <i>et al.</i> , 2018
<i>C. sinensis</i>	<i>pthA</i> de <i>Xcc</i>	Resistencia a <i>Xcc</i>	Yang <i>et al.</i> , 2011
<i>C. sinensis</i> cv. Pineapple	<i>Bs2</i> de pimiento	Resistencia a <i>Xcc</i>	Sendin <i>et al.</i> , 2017
<i>C. sinensis</i> cv Hamlin y <i>C. sinensis</i> cv. Pineapple	<i>rpff</i>	Resistencia a <i>Xylella fastidiosa</i>	Caserta <i>et al.</i> , 2017

Figura 6. Cítricos transgénicos obtenidos mediante transformación genética.

de la función original del ADN cortado. Un segundo mecanismo dependiente de recombinación de secuencias homólogas, permite la incorporación de una secuencia concreta (de interés) exactamente en el sitio original de corte (Belhaj *et al.*, 2015).

Con la tecnología CRISPR/Cas9 se inauguró una nueva era de la ingeniería genética en la que se podrá regular la expresión génica, etiquetar sitios específicos del genoma en células vivas, identificar y modificar funciones de genes y corregir genes defectuosos o incluso introducir modificaciones epigenéticas en cualquier célula de una manera fácil, rápida, barata y altamente precisa.

Actualmente ya se han obtenido genotipos cítricos “editados”. Así, por ejemplo, Jia *et al.*, (2017a) modificaron el gen *CsLOB1* responsable de la susceptibilidad a la cancrrosis o su secuencia promotora (Jia *et al.*, 2016) en pomelo Duncan,

obteniéndose líneas editadas con tolerancia a cancrrosis en sus etapas iniciales de crecimiento. La edición del mismo gen en *Citrus sinensis* también arrojó resultados promisorios (Peng *et al.*, 2017). Además, la edición del factor de transcripción *CsWRKY22* en *C. sinensis* llevó a una disminución de la susceptibilidad en plantas infectadas con *Xanthomonas citri* (Wang *et al.*, 2019). Aunque la edición de genoma en cítricos está en sus etapas iniciales, posee ciertas limitaciones asociadas por ejemplo a la poliploidia ya que se ha demostrado que la eficiencia de edición de genes es generalmente menor en esta condición. Por otro lado, alelos múltiples deberían editarse simultáneamente (Peng *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). Por lo tanto, es necesario mayor experimentación y conocimiento para obtener mayores beneficios de esta tecnología.

Huanglongbing (HLB), el gran desafío para los mejoradores del nuevo siglo

El Huanglongbing o HLB, nombre derivado del chino mandarín que significa “dragón amarillo”, es considerada la mayor crisis fitosanitaria que ha tenido la citricultura a lo largo de su historia (Bové, 2006). Esta enfermedad es producida por tres especies de bacterias gram-negativas restringidas al floema: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) (Bové, 2006) y *Candidatus Liberibacter americanus* (CLAm) (Teixeira *et al.*, 2005) que son transmitidas por el psílido vector *Diaphorina citri* (Hall *et al.*, 2013); y *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) (Jagoueix *et al.*, 1994) que es transmitida por el insecto *Trioza eritreae* (McClellan y Oberholzer, 1965). Además, estas bacterias pueden transmitirse también por injerto (Bové, 2006).

El HLB es una enfermedad emergente, que fue descrita por primera vez en 1919 en el sudeste de China (Reinking, 1919) y luego de un largo confinamiento en esa región, pudo superar océanos y miles de kilómetros de tierra firme y llegar al continente americano donde se reportó su aparición por primera vez en Brasil en el 2004, y en menos de una década se extendió al resto del continente afectando hoy a más de 40 países (Bové, 2006; Gottwald y Graham, 2014). Actualmente también se define como una enfermedad cuarentenaria, ya que hay zonas productoras en donde aún no ha sido detectada, así como en ciertos países de Europa. El control del HLB es sólo preventivo y está basado en el control del insecto vector y en la erradicación de las fuentes de inóculo. Esto último se debe a que todavía no se conoce ninguna fuente de germoplasma resistente a la enfermedad (da Graça *et al.*, 2016). Los mecanismos de dispersión y supervivencia de este microorganismo son tan eficaces que le han permitido producir graves perjuicios a la totalidad de las especies comerciales de cítricos cultivadas en el mundo. En países como Brasil y en EE.UU. los daños han sido muy grandes, por ejemplo, en Florida en 10 años la producción ha disminuido a más de la mitad (Neupane *et al.*, 2016). En Argentina en el año 2012 se detectaron árboles infectados aislados en Misiones, los cuales fueron erradicados. Posteriormente en 2017, se registraron casos positivos en el arbolado urbano de las provincias de Formosa, Chaco y Santiago del Estero (www.clarin.com/rural/agricultura/senasa_0_ByE-PYYQW.html), y en el año 2018 se detectaron en lotes productivos del departamento

Federación (provincia de Entre Ríos), el cual es clave en la producción de cítricos de esa provincia (<http://acnoa.com.ar/situacion-actual-del-hlb-en-argentina/>).

La situación de la industria frente a la enfermedad es muy crítica, especialmente debido a la falta de resistencia y la inexistencia de un tratamiento convencional efectivo, por lo que las mayores expectativas para controlar la enfermedad, están puestas en la biotecnología. Actualmente un elevado porcentaje de las actividades y presupuestos de las diferentes instituciones de investigación y programas de mejoramiento de los principales países citrícolas del mundo, están destinados a combatir la enfermedad. Se han evaluado diferentes estrategias, pero una de las principales es la búsqueda y/o generación de germoplasma resistente. Aunque se han detectado varios genotipos con cierta tolerancia a la enfermedad (Albrecht y Bowman, 2011; Miles *et al.*, 2017), hasta el momento no existe un genotipo comercial que sea resistente (da Graça *et al.*, 2016). Para identificar genes que podrían estar involucrados en la tolerancia al HLB y que puedan ser utilizados en estrategias de mejora, se han realizado numerosos estudios de expresión génica en plantas cítricas infectadas con HLB (Kim *et al.*, 2009; Aritua *et al.*, 2013; Zhong *et al.*, 2015), así como también estudios comparativos entre genotipos susceptibles y aquellos con cierta tolerancia a la enfermedad (Wang *et al.*, 2016).

La transgénesis se ha utilizado para la obtención de plantas resistentes al HLB y una de las estrategias más evaluadas fue la introducción de genes que codifican para péptidos antimicrobianos. Así por ejemplo, Zou *et al.* (2017) transformaron plantas de *C. sinensis* con el gen cecropin B bajo el control de un promotor de expresión específico de floema, donde la bacteria se multiplica, obteniéndose plantas menos susceptibles a la enfermedad. Resultados similares obtuvieron Hao *et al.* (2016), quienes transformaron con un gen sintético que codifica para una tionina modificada, y por Felipe *et al.* (2013) y Rocha *et al.* (2019), con el gen de la *attacina A* (*attA*), un péptido antimicrobiano de *Drosophila melanogaster*. Otra aproximación utilizada fue la transformación con genes que codifican para componentes del mecanismo de defensa de la planta, de tal forma que la sobreexpresión constitutiva o inducible, produzca el incremento de la resistencia sistémica. Tal es el caso del gen *NPRI* (del inglés, “Non-expressor of Pathogenesis Related 1”). Existen varios reportes de plantas

cítricas transgénicas con NPR1 que han mostrado menor susceptibilidad al HLB (Dutt *et al.*, 2015; Robertson *et al.*, 2018).

Finalmente, ya se ha incursionado en la edición de genoma o tecnología CRISPR/Cas9 (Jia *et al.*, 2017a, b) pero aún no se han reportado resultados contundentes, fundamentalmente debido a que para esta tecnología es necesario conocer con anterioridad el gen que se desea “editar”, y en el caso de HLB aún queda mucho por “descubrir” acerca de los mecanismos que intervienen en la virulencia de la bacteria responsable.

Los cítricos transgénicos y la percepción pública

Los avances en la tecnología de mejoramiento han permitido alcanzar objetivos que en algunos casos resultaban inimaginables. La transgénesis, en particular, ha permitido intercambiar genes entre organismos de diferentes reinos, además en forma relativamente sencilla y rápida. Hoy existen innumerables evidencias que muestran los beneficios de los organismos genéticamente modificados (OGM) en diferentes aspectos: económicos, sociales, ambientales, etc. Sin embargo, existe una percepción negativa sobre los OGM por parte de la sociedad en general. Las razones a este rechazo son múltiples, como ser factores psicológicos inherentes al ser humano, la acción de influenciadores, las tendencias en la sociedad moderna, siendo muchas de ellas infundadas y el resultado de conceptos erróneos (Durán, 2004).

En muchos cultivos, la percepción pública ha sido una de las razones que ha frenado en alguna medida la velocidad de mejoramiento. En el caso específico del HLB por ejemplo, en donde las soluciones tardan en llegar y la biotecnología parece ser la única esperanza, los científicos necesitan saber si los productores adoptarán estas tecnologías y si los consumidores las consumirán. Un estudio reciente, llevado a cabo por la Universidad de Michigan y financiado por el Departamento de Agricultura de EE.UU., proporciona algunas respuestas (Ruth *et al.*, 2018). En base a encuestas realizadas a consumidores de EE.UU., los investigadores encontraron que aproximadamente el 50 % se mostraron a favor de los transgénicos, mientras que el 14 % tenía percepciones negativas de los mismos. En general, las opiniones negativas surgen desde el desconocimiento del tema, las cuales dan sustento a lo que se conoce como

“teoría del espiral del silencio” (Noelle-Neumann, 1974), una hipótesis sobre la formación de la opinión pública que afirma en parte que “las personas que expresan sus opiniones en público alientan a expresarse a aquellos con opiniones similares, mientras que silencian a quienes sostienen puntos de vista opuestos”. En otro estudio realizado por Fernbach *et al.* (2019), determinaron que un 90 % de los encuestados (población adulta de EE.UU., Francia y Alemania), se mostró con cierta disconformidad ante el uso de los OGM. El resultado más sobresaliente de este estudio reveló que “cuanto más firme es la posición de las personas en contra de los alimentos modificados genéticamente, menor es su conocimiento real”, lo que se conoce como “psicología del extremismo”, conclusiones que fueron compartidas por el Dr. M. Sánchez de ChileBio en un estudio realizado sobre consumidores de ese país (<https://www.chilebio.cl/2019/02/22/los-transgenicos-pueden-salvar-a-los-citricos-de-florida-lo-aceptaran-los-consumidores/>). Este comportamiento también fue extensivo hacia otros temas científicos, por lo que los investigadores coinciden en que “es responsabilidad de los científicos participar de estos temas para evitar que personas que no tienen antecedentes científicos llenen el vacío” (Fernbach *et al.*, 2019; Taylor *et al.*, 2019).

Protección de la propiedad de los genotipos cítricos mejorados: situación en Argentina

Al obtener un nuevo genotipo por alguna estrategia de mejoramiento, existe una legislación que le confiere al obtentor de una variedad vegetal “un título/derecho de propiedad”, como reconocimiento a su actividad fitomejoradora. El marco legal en la República Argentina está regulado por la Ley de Semillas y Creaciones Fitogenéticas N° 20.247, la cual fue reglamentada en el año 1991 por el Decreto N° 2183/91, y la Ley N° 24.376 que establece la adhesión de Argentina al Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales–UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales). Desde el año 1994, la República Argentina es integrante de la UPOV, la cual depende del OMPI (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual). La Ley N° 20.247 protege la propiedad de obtentor de una variedad, pero para poder comercializarla, se debe registrar la variedad en el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares (RNCP) y en el Registro

Nacional de Cultivares (RNC) (Labarta, 2004).

El derecho de obtentor tiene tres excepciones: la de consumo, la de uso propio del agricultor en su propia explotación, y la del fitomejorador que, según establece el Artículo 43 de la Ley N° 20.247, lo habilita a utilizar libremente una variedad protegida para crear y comercializar una nueva variedad (Artículo 43: “La propiedad de una variedad no impide su utilización como fuente de variación o como aporte de características deseables en trabajos de mejoramiento vegetal. Para tales fines no será necesario el conocimiento ni la autorización del obtentor”). Esta última también se contempla en la legislación de la Comunidad Europea (Reglamento CE 2100/94), a excepción del caso de que la nueva variedad sea esencialmente “derivada de la variedad original”, en donde sí se necesita la autorización del obtentor de esta última para la comercialización. Se considera que una variedad es “derivada” de la original cuando se diferencia solamente en el carácter introducido. Por lo tanto, si bien una sola variación del fenotipo alcanza para otorgar el título de propiedad de la variedad vegetal, habrá una necesidad de retribuir al obtentor inicial por la investigación y desarrollo de la variedad vegetal inicial (Art. 14, inc. 5, b, del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales). En este sentido, y teniendo en cuenta las modificaciones asociadas a la tecnología de mejoramiento utilizada, este sería el caso de las variedades generadas por transgénesis, edición de genoma y mutagénesis; no así en el caso de los procedimientos que involucran una hibridación (sexual o somática), en donde el nuevo genotipo difiere sustancialmente de los originales (Navarro, 2011). Estas consideraciones son importantes a la hora de elegir los genotipos iniciales en un programa de mejoramiento, en especial cuando los fines son de comercialización.

En un futuro muy cercano habrá que definir el marco regulatorio para la próxima generación de vegetales modificados por edición de genomas para los cuales aún no existen definiciones precisas sobre como considerarlos. Por ejemplo, las agencias reguladoras europeas consideran que los productos editados deberían tratarse como los OGM, mientras que la USDA (siglas en inglés de “United States Department of Agriculture”), considera que los cultivos editados pueden considerarse como productos de mutagénesis biológica, como la mutagénesis química y de radiación utilizada en el fitomejoramiento convencional (Fritsche *et al.*,

2018). Por lo tanto, este tema deberá analizarse cuidadosamente para proceder en forma correcta.

Programas de mejoramiento genético de cítricos en el mundo

Las actividades de mejoramiento genético de una manera sistemática mediante la hibridación dirigida y la selección clonal datan de fines de 1800 con el trabajo de los pioneros Swingle y Webber en Florida, EE.UU. (Traub y Robinson, 1937; Cooper *et al.*, 1962). Luego esta actividad se extendió entre los principales países productores como Japón (1909), y un poco más tarde, entre 1920 y 1930, a otros países como España, Italia e Israel (Traub y Robinson, 1937), a medida que paralelamente se comenzaron a organizar programas de mejoramiento, principalmente por iniciativas de los gobiernos. En las últimas tres décadas hubo una proliferación de nuevos programas de mejoramiento en todo el mundo, destacándose una mayor inversión de fondos privados en programas públicos de mejoramiento, así como un número creciente de programas privados. Después de más de un siglo, muchos programas de mejoramiento todavía utilizan enfoques clásicos como la evaluación fenotípica de un gran número de descendientes y la selección clonal (Carusso *et al.*, 2020), a pesar de las falencias que conllevan las observaciones empíricas, especialmente cuando se trata de características fuertemente influenciadas por el ambiente.

Actualmente, casi todos los países productores poseen programas de mejoramiento con distintos grados de complejidad, integrando en mayor o menor medida los enfoques clásicos, la biología molecular, la genética, la genómica, metabolómica, etc.

El programa de mejoramiento más antiguo le corresponde a Estados Unidos, el cual se inició en el año 1893 en Florida por iniciativa de la USDA (Cooper *et al.*, 1962), y que aún sigue vigente. Luego, en 1907 en la Universidad de California se creó el “Citrus Experiment Station” en Riverside, y posteriormente en la Universidad de Florida se creó el “Citrus Research and Education Center” (CREC; <https://crec.ifas.ufl.edu>), el cual inició su programa de mejoramiento de cítricos en la década de 1920. El CREC, actualmente posee uno de los programas de mejoramiento más grandes. El enfoque más importante del programa es la resistencia a enfermedades (virosis, nemátodos y HLB), y la

calidad de la fruta, especialmente en naranjas de ombligo, mandarinas y pomelos.

En China, primer productor mundial, el mejoramiento de los cítricos enmarcado dentro de un programa comenzó en la década de 1960, aunque luego sufrió una disminución en sus actividades en las décadas de 1980 y 1990. El programa de mejoramiento de China fue posteriormente activado, y en el año 2003 el gobierno realizó una fuerte inversión en la creación del Centro de Mejoramiento de Cítricos en la Universidad Agrícola de Huazhong y un Centro de Mejora de Cítricos en el Instituto de Investigación de Cítricos de la actual Universidad del Suroeste, una de las más antiguas instituciones de educación superior en China. Dentro de los principales objetivos de mejoramiento se incluyen la extensión de las temporadas de cosecha, la obtención de variedades sin semillas, y la calidad de la fruta tanto en color como en sabor, principalmente de mandarina, naranja y pomelo. El programa de mejoramiento de China utiliza técnicas convencionales, en especial la selección de mutantes, en fuerte combinación con numerosas herramientas biotecnológicas tanto para mejoramiento como para investigación en genética (Deng, 2008).

En España, el inicio de las actividades formales de mejoramiento genético, se iniciaron como consecuencia de la fuerte incidencia del virus de la tristeza de los cítricos que ocasionó importantes pérdidas económicas en la década de los 60 (Navarro y Ballester, 1976). La comunidad valenciana lidera la producción de naranjas (59 %) y mandarinas (73,3 %), mientras que la Comunidad de Murcia la de limones (55 %). En el año 1975 se creó el Programa de Mejora Sanitaria de Cítricos, el cual involucra tres programas coordinados: Saneamiento, Cuarentena y Certificación. Los objetivos del programa eran obtener y proveer plantas sanas a través de un sistema de certificación y el mantenimiento en un banco de germoplasma de cítricos. Cada programa es responsabilidad de una institución pública diferente: el Programa de Saneamiento se desarrolla en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) en donde también se encuentra el Banco de Germoplasma de Cítricos (BGCI); el Programa de Cuarentena se desarrolla en la Unidad de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura y Recursos Marinos (MARM); y el de Certificación se lleva a cabo de forma compartida entre la Oficina Española de Variedades Vegetales (OEVV) del MARM

y los servicios competentes de las Comunidades Autónomas. En Murcia, el Grupo de Citricultura del IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario) viene desarrollando un “Programa de Mejora Genética del Limonero”, con el objetivo de obtener clones tardíos de la variedad “Fino” mediante cruzamientos.

Cabe aclarar la importancia que tiene la conservación de germoplasma, especialmente en un cultivo como los cítricos cuya producción se basa en unas pocas variedades seleccionadas de alto rendimiento, y en donde existe una riquísima fuente de germoplasma “no utilizado”, y que muchos genotipos son abandonados y se pierden. Actualmente, el BGCI del IVIA consta de 694 genotipos y tres colecciones: la de campo, la de invernadero y una colección de callos embriogénicos crioconservados (Ancillo y Medina, 2017).

En Brasil, las instituciones que llevan a cabo el mejoramiento de cítricos son varias, tales como el Centro de Citricultura Sylvio Moreira- Instituto Agrônomico de Campinas (CCSM-IAC); Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), Centro de Energía Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (CENA-USP), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), e Instituto Agrônomico do Paraná (IAPAR), Instituto Agrônomico, en Cordeirópolis (São Pablo), y en EMBRAPA, en Cruz das Almas (BA). La introducción de germoplasma exótico está estrictamente regulado por EMBRAPA (EMBRAPA, 2016) o por el Instituto Agrônomico de Campinas (Dudienas *et al.*, 2017). El programa de mejoramiento genético de EMBRAPA data desde 1970 (EMBRAPA, 2015) e involucra la evaluación de germoplasma y la evaluación agronómica de nuevos híbridos para portainjertos. La colección de germoplasma se inició en la década de los treinta y cuenta con más de 1.700 accesiones que representan todas las especies y variedades de cítricos. Se considera la colección de genotipos cítricos más grande del mundo (Carvalho *et al.*, 2019).

En India, el mejoramiento del cultivo en forma organizada comenzó con la creación del Consejo de Investigación Agrícola (ICAR) en el año 1929. Antes de eso el trabajo estaba en manos de productores locales que seleccionaban genotipos destacados, o se introducía germoplasma exótico. Desde 1929 hasta 1997, con la ayuda del ICAR, se crearon varias estaciones de experimentación agrícola en diferentes zonas del país, destinadas a

atender problemáticas locales. En India existe una red interactiva de institutos de investigación de la que también forman parte numerosas universidades, no sólo dedicados al mejoramiento de cítricos, sino también de otra gran cantidad de frutas, hortalizas y flores. Este país es un centro de diversidad genética muy importante de numerosos cultivos. Esta base genética local, junto a la introducción de material genético exótico, ha permitido la generación de numerosos nuevos cultivares de diferentes cultivos comerciales que se producen en ese país. El “Centro Nacional de Investigaciones en Citrus” localizado en Nagpur en el estado de Maharashtra, famoso por las mandarinas “orange” (*Citrus reticulata*), fue creado en 1985 para mantener una riquísima colección de germoplasma de India (Hasan y Suresh, 2008).

Italia comenzó las actividades de mejoramiento en la década de 1940. En 1978 comenzaron un importante programa para la generación de triploides. Actualmente hay una fuerte interacción del “Consejo de Investigación Agrícola” (CREA) y el sector privado de productores que acelera la evaluación del germoplasma y la llegada al sector productivo. En el CREA se realiza la generación y evaluación de germoplasma, mutaciones, saneamiento e introducción de material exótico, mientras que en el sector privado se realizan las evaluaciones en campo, análisis económico y llegada a la producción comercial. A diferencia de lo que ocurre en otros países, en Italia el mejoramiento de los cítricos está fuertemente financiado por fondos privados (Caruso *et al.*, 2016).

En Japón, el “Instituto Nacional de Ciencia de la Fruta” inició un fuerte Programa de Mejoramiento de Cítricos en el año 1909 (Nesumi y Matsumoto, 2003), fundamentalmente en base a las actividades de selección de mutaciones espontáneas, como ocurrió en el resto de los países en esa época (Nishiura, 1964). La hibridación se fue incorporando lentamente, lográndose varios genotipos comerciales como el tangor “Kiyomi”, un híbrido de mandarina “Miyagawa-wase” y naranja “Trovita”, el primer cultivar de tangor que se lanzó en Japón, con excelente calidad alimenticia, sabor, alto contenido de jugo y semillas monoembrionarias (Nishiura *et al.*, 1983). Desde la segunda mitad de la década de 1990, se lanzaron nuevos cultivares enriquecidos en componentes funcionales, incluidos los carotenoides como la β -criptoxantina y/o polimetoxiflavonoides, como la variedad de naranja “Kankitsu Chukanbohon Nou 6 gou”. La

mandarina satsuma se adapta al clima japonés y se ha cultivado extensivamente durante más de 100 años en Japón, la cual tiene un lugar privilegiado en los programas de mejora, y cuyos principales objetivos son la calidad de la fruta, la producción estable y resistencia al estrés biótico (Oruma y Shimada, 2016).

En Argentina existen dos instituciones que llevan a cabo el mejoramiento de los cítricos. El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC). El INTA, mediante el Programa Nacional de Frutales, investiga en mejoramiento genético y trabaja con los productores para asegurar calidad y eficiencia. En la provincia de Tucumán, noroeste del país, en la Estación Experimental de Famaillá, desde 1970 se trabaja en la obtención de variedades mejoradas, como así también en la sanidad en cultivo y poscosecha (INTA informa, 2016a). Cuenta con una colección de germoplasma propio y exótico, introducido desde diferentes partes del mundo. Por otro lado, en el noreste del país destacado por la producción de dulces (naranjas, mandarinas y pomelos), el INTA Concordia en la provincia de Entre Ríos, trabaja en el desarrollo integral de la cadena productiva, desde la producción de germoplasma, semillas y yemas de plantas madres saneadas, como así también en el desarrollo de técnicas de manejo, sanidad, comercialización, etc. (INTA informa, 2016b). Esta institución cuenta con el “Programa de Mejoramiento Genético y Sanitario de Cítricos” desde 1984, y el “Centro Único de Introducción y Saneamiento (CUIS)”, el cual contiene el Banco de Germoplasma y de variedades comerciales saneadas y en aislamiento que cuenta con más de 220 genotipos cítricos comerciales con identidad genética y sanidad controlada. También se realiza la introducción, injerto por micropropagación, diagnóstico y mantenimiento en condiciones de seguridad de variedades cítricas, que luego son certificadas por el Instituto Nacional de Semillas (INASE) y el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y multiplicadas en viveros (INTA informa, 2016a). Esa unidad del INTA mantiene una colección de casi 1.000 variedades cítricas en campo y tiene ensayos con tecnologías innovadoras como plantaciones en alta densidad, fertirrigación y técnicas de manejo para disminuir el uso de plaguicidas (INTA informa, 2016a). Los laboratorios de Protección Vegetal y Biotecnología (Registro RNCFS 5983/AI) y

el CUIS de INTA Concordia, son responsables de la introducción y mantenimiento de variedades en proceso de saneamiento, variedades saneadas (original y réplica) y de los análisis de enfermedades acorde a lo dispuesto por la Resolución 149/98 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, denominada “Normas para la producción, comercialización e introducción de plantas cítricas de vivero y sus partes”. El CUIS provee varetas yemas para formar los lotes de preincremento en el Centro Proveedor de Material Certificado “El Alambrado”, el cual provee de material de incremento y comercial a viveristas para producir plantas cítricas certificadas, de acuerdo a lo requerido por el Programa Nacional de Certificación de Cítricos (Plata Tamayo *et al.*, 2015).

La EEAOC en la provincia de Tucumán, es otra de las instituciones que trabajan en el mejoramiento de los cítricos. La EEAOC, ente autárquico del Ministerio de Desarrollo Productivo del Gobierno de Tucumán, inició un Programa de Mejoramiento Genético de Portainjertos en el año 1960, el cual se encuentra vigente (<http://www.eeaoc.org.ar/proyectos/133/Programa-Citrus.html>). El objetivo del programa es desarrollar genotipos de portainjertos específicos para la industria limonera local, con resistencia o tolerancia a enfermedades, adaptación a las condiciones ecológicas, y que favorezcan una calidad de fruta que responda a las exigencias del mercado nacional e internacional. En el período comprendido entre 1960 y 1995 se realizaron 128 cruzamientos, empleando 99 progenitores femeninos y 40 masculinos, y 1859 híbridos fueron evaluados en campo. Como resultado de estos trabajos, en el año 2006 se inscribieron en el INASE y se liberaron al cultivo comercial tres portainjertos: Citrandarin 61 AA 3, Citrumelo 75 AB, 79 AC (Cleopatra x Citrumelo Swingle), 81 G 220 y 81 G 513, estos últimos, producto de un cruzamiento de Volkameriano x Cleopatra (Stein y Foguet, 2015). En las primeras décadas del siglo XX, la EEAOC introdujo numerosas especies y variedades cítricas que fueron las bases de su colección de germoplasma cítrico ubicado en el predio experimental en la sede central y que cuenta con aproximadamente 700 genotipos. Al igual que INTA, la EEAOC también cuenta con un Centro de Saneamiento habilitado por el INASE desde octubre del año 2004, el cual realiza el saneamiento, diagnóstico de virosis y provisión de semillas y yemas certificadas a los productores locales (Figuroa *et al.*, 2019).

Consideraciones finales

La evolución que han tenido los cítricos a lo largo de su historia es sorprendente. El mejoramiento de este cultivo, como de las especies leñosas en particular, exige un esfuerzo y riesgos extras, considerando que los resultados de innovaciones no son de visibilidad inmediata. Gracias a las nuevas tecnologías, esta espera e incertidumbres han disminuido, aunque también han surgido otros nuevos obstáculos por sortear. Entre ellos se pueden mencionar los asociados al ya inminente cambio climático que genera un panorama desconocido e incierto en cuanto al escenario en el que se deberá desarrollar el cultivo, así como también la percepción pública, el marco regulatorio y, muchas veces los precios bajos y costos elevados que han puesto en crisis a la industria a nivel mundial. Es por ello la importancia de la implementación de tecnologías que permitan incrementar la eficiencia productiva del cultivo y que aseguren su continuidad, no sólo por el valor nutricional e industrial del producto, sino también por la importancia social, ya que la citricultura moviliza una gran cantidad de actividades paralelas que son el sustento de muchas economías regionales y nacionales.

Agradecimientos

Agradecemos a la Estación Experimental Agro-industrial Obispo Colombres (EEAOC), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), y especialmente a la Dra. Alicia Mamani (FAZ-UNT) por su desinteresada colaboración en la revisión del artículo.

Referencias bibliográficas

- Agustí M. (2003). Citricultura, 2nd ed. Editions Mundi Prensa, España.
- Albrecht U., Bowman K.D. (2011). Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. Hortscience 46: 16-22.
- Aleza P., Juárez J., Cuenca J., Ollitrault P., Navarro L. (2010). Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2X x 2X sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. Plant Cell Reports 29: 1023-1034.
- Ancillo G., Medina A. (2017). Monografías botánicas. Jardín Botánico de la Universitat de València Vol2: Los cítricos. Edición: Universitat de València E. G. En: https://issuu.com/jardibotanicdeluniversitatdevalenc/docs/001-152_lo_citricos_b, consulta mayo

- 2020.
- Aritua V., Achor D., Gmitter F.G., Albrigo G., Wang N. (2013). Transcriptional and microscopic analyses of citrus stem and root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. PLoS ONE 8: e73742.
- Aubert B. (2001). Genèse et développement de la culture des agrumes et patrimoine génétique méditerranéens de l'histoire naturelle des orangers. Dans la réédition de l'Histoire Naturelle des Orangers- Risseau et Poiteau, tome 2. Connaissance et mémoires éditeur, Francia.
- Azevedo F., Mourão Filho F., Mendes B., Almeida W., Schinor E., Pio R., Barbosa J., Guidetti-Gonzalez S., Carrer H., Lam E. (2006). Genetic transformation of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) with the bO (bacterio-opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. Plant Molecular Biology Reporter 24 (2): 185-196.
- Barbosa-Mendes J.M., Filho F. de A.A.M., Filho A.B., Harakava R., Beer S.V., Mendes B.M.J. (2009). Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with hrpN gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. Scientia Horticulturae 122: 109-115.
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Patron N.J., Nekrasov V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. Current Opinion in Biotechnology 32: 76-84.
- Bond J.E., Roose M.L. (1998). *Agrobacterium* mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. Plant Cell Reports 18: 229-234.
- Bono R., Soler J., Fernández de Córdova L. (1996). "Clemepons" and "Loretina", two early clementine mandarin mutations of potential interest. Proceeding of the International Society of Citriculture 1: 174-176.
- Boscardioli R., Monteiro M., Takahashi E., Chabregas S., Vieira M., Vieira L., Pereira L.F., Mourão Filho F. de A., Cardoso S., Christiano R., Filho A., Barbosa J., Azevedo F., Mendes B. (2006). Attacin A Gene from *Tricloplusia ni* Reduces Susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in Transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. Journal of the American Society for Horticultural Science 131: 530-536.
- Bové J.M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology 88: 7-37.
- Bretó M.P., Ruiz C., Pina J.A., Asins M.J. (2001). The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. Molecular Phylogenetics and Evolution 21: 285-293.
- Calabrese F. (1992). The history of citrus in the Mediterranean countries and Europe. Proceeding of the International Society of Citriculture 1: 35-38.
- Cameron J.W., Frost H.B. (1968). Genetics, breeding, and nucellar embryony. The citrus industry. University of California Division of Agricultural Sciences, California, EEUU 2: 325-370.
- Caruso M., Ferlito F., Licciardello C., Allegra M., Strano M., Silvestro D., Russo M., Pietro P., Caruso P., Las Casas G., Torrisi B., Rocuzzo G., Recupero G., Russo G. (2016). Pomological diversity of the Italian blood orange germplasm. Scientia Horticulturae 213: 331-339.
- Caruso M., Smith M.W., Froelicher Y., Russo G., Gmitter F. (2020). Traditional breeding En: The Genus Citrus. Talon M., Caruso M., Gmitter Jr. F.G. Elsevier Inc. Países Bajos. Pp. 129-148.
- Carvalho S.A., Girardi E.A., Mourão Filho F.A., Soranz Ferrarezi R., Della Coletta Filho H. (2019). Advances in citrus propagation in Brazil. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal 41 (6): e-422.
- Caserta R., Souza-Neto R.R., Takita M.A., Lindow S.E., De Souza A.A. (2017). Ectopic Expression of *Xylella fastidiosa* rpFF Conferring Production of Diffusible Signal Factor in Transgenic Tobacco and Citrus Alters Pathogen Behavior and Reduces Disease Severity. Molecular Plant-Microbe Interactions 30 (11): 866-875.
- Cervera M., Ortega C., Navarro A., Navarro L., Peña L. (2000). Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene HAL2 from yeast. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 75: 26-30.
- Chen C., Bowman K.D., Choi Y.A., Dang P.M., Rao M.N., Huang S., Soneji J.R., McCollum T.G., Gmitter F.G. (2008). EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Tree Genetics and Genomes 4: 1-10.
- Cooper W.C., Reese P.C., Furr J.R. (1962). Citrus breeding in Florida- Past, present and future. Proceeding of the Florida State Horticultural Society 75: 5-13.
- Costa M.G.C., Otoni W.C., Moore G.A. (2002). An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. Plant Cell Reports 21: 365-373.
- Cubillo M.T. (2013). Genómica en cítricos. Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos, (Ejemplar dedicado a: XII Congreso Internacional de Cítricos) 415: 19-22.
- Curk F., Ollitrault F., Garcia-Lor A., Luro F., Navarro L., Ollitrault P. (2016). Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. Annals of Botany 117 (4): 565-583.
- Da Graça J.V., Douhan G.W., Halbert S.E., Keremane M.L., Lee R.F., Vidalakis G., Zhao H. (2016). Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. Journal of Integrative Plant Biology 58 (4): 373-387.
- De Francesco A., Costa N., García M.L. (2017). Citrus psorosis virus coat protein-derived hairpin con-

- struct confers stable transgenic resistance in citrus against psorosis A and B syndromes. *Transgenic Research* 26: 225-235.
- Deng X.X. (2008). Citrus breeding and genetic improvement programme in China. *Acta Horticulturae* 773: 17-23.
- Dewald S.G., Moore G.A. (1987). Somaclonal Variation as a Tool for the Improvement of Perennial Fruit Crops. *Fruit Varieties Journal* 41: 54-57.
- Díaz M., Echenique V., Schrauf G., Cardone S., Polci P., Lutz E., Spangenberg G. (2004). Biotechnology and genetic improvement of forage species. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 33: 74-104.
- Domínguez A., De Mendoza A.H., Guerri J., Cambra M., Navarro L., Moreno P., Peña L. (2002). Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus arrurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* 10: 1-10.
- Dominguez A., Guerri J., Cambra M., Navarro L., Moreno P., Pena L. (2000). Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 19: 427-433.
- Dudienas C., Pierry Uzzo R., Negri B. (2017). QUARENTENÁRIO IAC. En: <http://www.iac.sp.gov.br/areasdespesquisa/quarentenario/quarentena.php>. Consulta: Mayo 2020.
- Duran V. (2004). Biotecnología en la mira: el problema de la percepción. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Sección 7- Capítulo 3*. Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski L. (Eds.). INTA, Argentina. Pp. 639-647.
- Dutt M., Barthe G., Irey M., Grosser J. (2015). Transgenic Citrus Expressing an Arabidopsis NPR1 Gene Exhibit Enhanced Resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *PloS one* 10: e0137134.
- Dutt M., Stanton D., Grosser J.W. (2016). Ornamentus: Development of Genetically Modified Anthocyanin-expressing Citrus with Both Ornamental and Fresh Fruit Potential. *Journal of the American Society Horticultural Science* 141 (1): 54-61.
- EMBRAPA (2015). Raíz y fruto-Informativo de Embrapa Mandioca e Fruticultura-Ano27-Nº74. Brasil.
- EMBRAPA (2016). EMBRAPA Recursos genéticos e biotecnología. Carta de Serviços/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 41p. 2016. <https://www.embrapa.br/documents/1355163/9962516/Carta-Servicos-Cenargen-2016-final.pdf/f277bd-79-0a84-4966-ad35-83954fcdc7dd>. Consulta: mayo 2020
- Esen A., Soost R.K., Geraci G. (1978). Seed set, size and development after 4x - 2x and 4x - 4x crosses in Citrus. *Euphytica* 27: 283-293
- Fagoaga C., Rodrigo I., Conejero V., Hinarejos C., Tuset J.J., Arnau J., Pina J.A., Navarro L., Peña L. (2001). Increased tolerance to Phytophthora citrophthora in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding* 7:175-185.
- Fang D.Q., Federici C.T., 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.
- Fang Q., Wang L., Yu, H., Jiang X., Deng X., Xu Q. (2018). Development of Species-Specific InDel Markers in Citrus. *Plant Molecular Biology Reporter* 36: 653-662.
- Federicitrus (2018). Federación Argentina de Citrus. En: *La Actividad Citrícola Argentina Nº18*, <https://www.federicitrus.org/wp-content/uploads/2018/05/Actividad-Citricola-2018.pdf>. Consulta: Mayo 2020.
- Felipe R., Mourão Filho F., Lopes S., Mendes B., Behling M., Pereira Junior E. (2013). Reaction of sweet orange cultivars expressing the *attacin* A gene to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 48: 1440-1448.
- Fernbach P.M., Light N., Scott S.E., Inbar Y., Rozin P. (2019). Extreme opponents of genetically modified foods know the least but think they know the most. *Nature Human Behaviour* 3: 251-256.
- Figueroa J., Palacios M.F., Foguet L., Villafañe L., Stein B. (2019). El centro de saneamiento de Citrus de la EEAOC. *Revista industrial y agrícola de Tucumán* ISSN: 0370-5404/ 1851-3018. Libro de resúmenes del IX Congreso Argentino de Citricultura, junio 2019. Suplemento RIAT 96 (1): 25-210.
- Fleming G., Olivares-Fuster O., Del-Bosco S., Grosser J. (2000). An Alternative Method for the Genetic Transformation of Sweet Orange. *In Vitro Cellular Developmental Biology.-Plant* 36: 450-455.
- Fritsche S., Poovaiah C., MacRae E., Thorlby G.A. (2018). New Zealand perspective on the application and regulation of gene editing. *Frontiers in Plant Science* 9: 1323.
- Fu X., Khan E.U., Hu S., Fan Q., Liu J. (2011). Overexpression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Atriplex hortensis* enhances salt tolerance in the transgenic trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Environmental and Experimental Botany* 74: 106-113.
- Gmitter F.G., Hu X. (1990). The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary citrus species (*Rutaceae*). *Economic Botany* 44: 267-277.
- Gmitter F.G., Grosser J.W., Moore G.A. (1992). Citrus. En: *Biotechnology of perenne fruit crops*. Hammerschlang F.A., Litz R.E. (Eds.). Wallingford, Oxon: CAB. Reino Unido. Pp: 335-369.
- Gmitter F.G. (2015). Origin, evolution and breeding of the grapefruit. En *Plant Breeding Reviews*. De J. Janick, (Ed.), vol.13, JohnWiley & Sons. EEUU. Pp. 345-363.
- Gottwald T., Graham J.H. (2014). Citrus diseases

- with global ramifications including citrus canker and huanglongbing. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutrition and Natural Resources 9: 16.
- Grosser J.W., Gmitter F.G. (1990). Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Reviews* 8: 339-374.
- Grosser J., Mourao-Fo F., Gmitter F., Louzada E., Jiang J., Baergen K., Quiros A., Cabasson C., Schell J., Chandler J. (1996). Allotetraploid hybrids between *Citrus* and seven related genera produced by somatic hybridization. *Theoretical Applied Genetics* 92: 577-582.
- Grosser J.W., Deng X.X., Goodrich R.M. (2007a). Somaclonal variation in sweet orange: practical applications for variety improvement and possible causes. En: *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. Kahn I.H. (Ed.). CAB International. Suiza. Pp. 219-234.
- Grosser J.W., Chandler J.L., Duncan L.W. (2007b). Production of mandarin+pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Horticulturae* 113 (1): 33-36.
- Guerra M.S. (1984). Cytogenetics of rutaceae. II. Nuclear DNA content. *Caryologia* 37 (3): 219-226.
- Hall D.G., Richardson M.L., Ammar E.D., Halbert S.E. (2013). Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglong-bing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 146 (2): 207-223.
- Hasan M.A., Suresh C.P. (2008). Fruit research and development in India. *Journal of the Agroforestry and Environment*. 2 (2): 213-216.
- Herrero R., Asins M.J., Pina J.A., Carbonell E.A., Navarro L. (1996). Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae - II: genetic relationships among genera and species. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1327-1334.
- Hidaka T., Omura M., Ugaki M., Tomiyama M., Kato A., Ohshima M., Motoyoshi F. (1990). *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. *Japanese Journal of Breeding* 40:199-207.
- INTA Informa. (2016a). Cítricos argentinos. ISSN: 2362-5287 (2016). Ministerio de Agroindustria. <http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2012/07/Especial-INTA-Informa-165-Citricultura-2.pdf>, consulta: mayo 2020.
- INTA Informa, (2016b). Anuario Frutales 2016 –Economías regionales, refugio de la citricultura Argentina. INTA Informa. -Pag 9. Compiladora: Ing. Agr. María Fernanda Rivadeneira. En: https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta_concordia_anuario_frutales_2016.pdf, consulta mayo 2020.
- Jagoueix S., Bove J.M., Garnier M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (3): 379-386.
- Jia H., Zhang Y., Orbovic V., Xu J., White F., Jones J.B. Wang N. (2017a). Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal* 15: 817-823.
- Jia H., Xu J., Orbović V., Zhang Y., Wang N. (2017b). Editing Citrus Genome via SaCas9/sgRNA System. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-9.
- Kaneyoshi J., Kobayashi S., Nakamura Y., Shigemoto N., Doi Y. (1994). A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Plant Cell Reports* 13: 541-545.
- Kim J.S., Sagaram U.S., Burns J.K., Li J.L., Wang N. (2009). Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99: 50-57.
- Kobayashi A.K., Vieira L.G.E., Bessalho Filho J.C., Pereira L.F.P., Molinari H.B.C., Marques V.V. (2017). Enhanced resistance to citrus canker in transgenic sweet orange expressing the sarcotoxin IA gene. *European Journal of Plant Pathology* 149: 865-873.
- Labarta M. (2004). Protección de Variedades Vegetales: Situación en Argentina y en la UPOV. <http://www.latranqueraweb.com.ar/web/archivos/menu/Marcelo+LABARTA.pdf>, consulta mayo 2020.
- Larkin P.J., Scowcroft W.R. (1981). Somaclonal Variation-A Novel Source of Variability from Cell-Cultures for Plant Improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197-214.
- Ling P., Duncan L.W., Deng Z., Dunn D., Hu X., Huang S., Gmitter F. (2000). Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1010-1017.
- McClellan A.P.D., Oberholzer P.C.J. (1965). Citrus psylla, a vector of greening disease of sweet orange. *South African Journal Agricultural Science* 8: 297-298.
- Medina J. (2015). Cultivo de los cítricos. Conference Paper- Julio 2015. Mexico.
- Miles G.P., Stover E., Ramadugu C., Keremane M.L., Lee R.F. (2017). Apparent tolerance to Huanglongbing in *Citrus* and *Citrus*-related germplasm. *HortScience* 52: 31-39.
- Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T.G., Yano M., Bhatia C.R., Sasaki T. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87-103.
- Molinari H.B.C., Marur C.J., Bessalho J.C., Kobayashi A.K., Pileggi M., Leite R.P., Pereira L.F.P., Vierira L.G.E. (2004). Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science* 167: 1375-1381.
- Mondal S.N., Dutt M., Grosser J.W., Dewdney M.M.

- (2012). Transgenic citrus expressing the antimicrobial gene *Attacin E* (*attE*) reduces the susceptibility of 'Duncan' grapefruit to the citrus scab caused by *El-sinoë fawcettii*. *European Journal of Plant Pathology* 133 (2): 391-404.
- Moore G.A., Jacono C.C., Neidigh J.L., Lawrence S.D., Cline K. (1992). *Agrobacterium*-mediated transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 11: 238-242.
- Navarro L., Ballester J.F. (1976). Presencia de la virosis vein enation-woody gall en los agrios españoles. *Levante Agrícola* 175: 5-7. Consulta: Mayo 2020.
- Navarro L. (2011). Mejora genética de los cítricos, métodos de obtención y leyes de protección de nuevas variedades. *Vida rural*. Pp. 58-66. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Vrural/Vrural_2011_328_58_66.pdf, consulta mayo 2020.
- Nesumi H., Matsumoto R. (2003). Improvement of citrus scion cultivars by cross breeding in Japan. *Proceeding of the International Society of Citriculture, IX Congress*. 3-7 de diciembre de 2000. Orlando, EEUU. Pp. 46-47.
- Neupane D., Moss C.B., van Bruggen A. (2016). Estimating citrus production loss due to citrus huanglongbing in Florida, Southern Agricultural Economics Association Annual Meeting (San Antonio, TX), EEUU. 6-9.
- Nishiura M. (1964). Citrus breeding in Japan. *Florida State Horticultural Society*. EEUU.
- Nishiura M., Shichijo T., Ueno I., Iwamasa M., Kihara T., Yamada Y., Yoshida T., Iwasaki T. (1983). "Kiyomi: A new variety of citrus". *Bulletin of Fruit Tree Research Station B* (in Japanese). Ministry of Agriculture and Forestry Japan 10:1-9.
- Noelle-Neumann E. (1974). The Spiral of Silence, A Theory of Public Opinion. *Journal of Communication* 24 (2): 43-51.
- Omura M., Shimada T. (2016). Citrus breeding, genetics and genomics in Japan. *Breeding Science* 66 (1): 3-17.
- Omar A.A., Murata M.M., El-Shamy H.A., Graham J., Grosser J. (2018). Enhanced resistance to citrus canker in transgenic mandarin expressing *Xa21* from rice. *Transgenic Research* 27: 179-191.
- Orbovic V., Fields J.S., Syvertsen J.P. (2017). Transgenic citrus plants's expressing the p35 anti-apoptotic gene have altered response to abiotic stress. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 58: 303-309.
- Pavan A., Calixto M.C., Cardoso S.C., Mendes B.M., Bergamin Filho A., Spotti Lopes J.R., de Carvalho C.R., Alves Mourão Filho F.A. (2007). Evaluation of 'Hamlin' sweet orange+'Montenegrina' mandarin somatic hybrid for tolerance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xylella fastidiosa*. *Scientia Horticulturae* 113 (2): 278-285.
- Peng A., Chen S., Lei T., Xu L., He Y., Wu L., Yao L., Zou X. (2017). Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnology Journal* 15: 1509-1519.
- Peña L. (2000). *Biología vegetal: Transformación genética de plantas*. En: *Fundamentos de fisiología vegetal*. MGH I (Ed.). Universidad de Barcelona. España. Pp. 465-480.
- Plata Tamayo M.I., Costa N.B., Garavello M.F. (2015). Inta.gob.ar/documentos/interrelacion-del-programa-de-mejoramiento-genetico-y-sanitario-de-citricos-del-instituto-nacional-de-tecnologia-agropecuaria-con-el-programa-nacional-de-certificacion-de-citricos. Artículo de divulgación. Consulta: Mayo 2020.
- Predieri S. (2001). Induced mutation and tissue culture in fruits. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 64 (3): 185-210.
- Reinking O.A. (1919). Diseases of economic plants in southern China. *Philippine Agricultural Scientist* 8: 109-135.
- Reyes C.A., De Francesco A., Peña E.J., Costa N., Plata M.I., Sendin L., Castagnaro A.P., García M.L. (2011). Resistance to Citrus psorosis virus in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein-RNA silencing. *Journal of Biotechnology* 151: 151-158.
- Robertson C.J., Zhang X., Gowda S., Orbovic V., Dawson W.O., Mou Z. (2018). Overexpression of the Arabidopsis NPR1 protein in citrus confers tolerance to Huanglongbing. *Journal of the Citrus Pathology* 5: 38911.
- Rocha Tavano E., Erpen L., Aluisi B., Harakava R., Lopes J.R., Vieira M., Piedade S., Mendes B., Mourao Filho A. (2019). Sweet orange genetic transformation with the *attacin A* gene under the control of phloem-specific promoters and inoculation with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *The Journal Horticultural Science and Biotechnology* 94: 210-219.
- Rodríguez A., Shimada T., Cervera M., Redondo A., Alquézar B., Rodrigo M.J., Zacarías L., Palou L., López M.M., Peña L. (2015). Resistance to pathogens in terpene down-regulated orange fruits inversely correlates with the accumulation of D-limonene in peel oil glands. *Plant Signaling & Behavior* 10 (6): e1028704.
- Roose M.L., Williams T.E. (2007). *Mutation Breeding*. En: *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. Khan I.A (Ed.). Cambridge. EEUU. Pp 345-352.
- Ruth T.K., Rumble J.N., Lamm A.J., Irani T., Ellis J.D. (2018). Are American's attitudes toward GM science really negative? An academic examination of attitudes and willingness to expose attitudes. *Science Communication* 41 (1): 113-131.
- Sendin L.N., Orce I.G., Gómez R.L., Enrique R., Grellet Bournonville C.F., Noguera A.S., Vojnov A.A., Marano M.R., Castagnaro A.P., Filippone M.P. (2017). Inducible expression of *Bs2 R* gene from *Capsicum*

- chacoense* in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) confers enhanced resistance to citrus canker disease. *Plant Molecular Biology* 93: 607-621.
- Smith M.W., Webb M., Gultzow D.L., Newman T.K., Innes D., Dillon N., Owen-Turner J., Xu Q. (2019). Application of a MITE Citrus apomixis marker in the Australian rootstock breeding program. *Acta Horticulturae* 1230: 1-6.
- Soost R.K., Cameron J.W. (1969). Tree and fruit characters of Citrus triploid from tetraploid by diploid crosses. *Hilgardia* 39 (20): 569-579.
- Spiegel-Roy P., Goldschmidt E. (1996). *Biology of horticultural crops: biology of citrus*. Cambridge, Reino Unido.
- Stein B., Foguet J.L. (2015). Características generales de algunos nuevos portainjertos cítricos para limoneros difundidos por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes. *Gacetilla Agroindustrial de la EEAOC* 80: 1-12.
- Swingle W.T., Reece P.C. (1967) The botany of Citrus and its wild relatives. En: *The Citrus Industry* Reuther W., Webber H.J., Batchelor L.D., (Eds.). University of California, Berkeley. EEUU. 1: 190-430.
- Talon M., Gmitter F.J. (2008). Citrus Genomics. *International Journal of Plant Genomics* Vol 2008, Article ID528361, 17pag.
- Tanaka T. (1954). *Species problems in citrus*. Japanese Society for the Promotion of Science, Ueno, Japón.
- Teixeira D.C., Ayres J., Kitajima E.W., Danet L., Jagoueix-Eveillard S., Saillard C., Bové J.M. (2005). First report of a huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, "*Candidatus liberibacter americanus*", with the disease. *Plant Disease* 89 (1): 107.
- Tozlu I., Guy C.L., Moore G.A. (1999). QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC1 progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and non-saline environments. *Genome* 42: 692-705.
- Traub H.P., Robinson T.R. (1937). Improvement of subtropical fruit crops: citrus. En: *U. S. Dept. Agr. Yearbook, 1937*. EEUU. Pp. 749-826.
- Vardi A., Bleichman S., Aviv D. (1990). Genetic Transformation of citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. *Plant Science* 69: 199-206.
- Wang D., Chang C.J. (1978). Triploid citrus plantlet from endosperm culture. *Scientia Sinica* 21: 822-827.
- Wang Y., Zhou L., Yu X., Stover E., Luo F. Duan Y. (2016). Transcriptome Profiling of Huanglongbing (HLB) Tolerant and Susceptible Citrus Plants Reveals the Role of Basal Resistance in HLB Tolerance. *Frontiers in Plant Science* 7: 933.
- Wang L., Chen S., Peng A., Xie Z., He Y., Zou X. (2019). CRISPR/Cas9-mediated editing of CsWRKY22 reduces susceptibility to *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* in Wanjincheng orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Plant Biotechnology Reports* 13: 501-510.
- Wood B., Corley H. (2008). *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. En: Cambridge University Press. Khan I.A. (Ed.) Wallingford Reino Unido. Pp. 380.
- Wu G., Terol J., Ibanez V., Pérez-Román E., Borredá C., Domingo C., Tadeo F.R., Carbonell-Caballero J., Alonso R., Curk F., Du D., Ollitrault P., Roose M.L., Dopazo J., Gmitter F.G., Rokhsar D.S., Talon M. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature* 554: 311-316.
- Xie S., Manchester S.R., Liu K., Wang Y., Sun B. (2013). *Citrus linczangensis* sp. n., a leaf fossil of rutaceae from the late Miocene of Yunnan, China. *International Journal in Plant Science* 174 (8): 1201-1207.
- Yang L., Hu C., Li N., Zhang J., Yan J., Deng Z. (2011) Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with pthA-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. *Plant Molecular Biology* 75: 11-23.
- Yao J.L., Wu J.H., Gleave A.P., Morris B.A.M. (1996). Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. *Plant Science* 113 (2): 175-183.
- Zhang Y., Malzahn A.A., Sretenovic S., Qi Y. (2019). The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science. *Nature Plants* 5: 778-794.
- Zhong Y., Cheng C., Jiang N., Jiang B., Zhang Y., Wu B., Hu M.I., Zeng J.W., Yan H.X., Yi G.Y., Zhong G. (2015). Comparative transcriptome and iTRAQ proteome analyses of citrus root responses to *Candidatus liberibacter asiaticus* infection. *PLoS ONE* 10: e0126973.
- Zou X., Jiang X., Xu L. (2017). Transgenic citrus expressing synthesized cecropin B genes in the phloem exhibits decreased susceptibility to Huanglongbing. *Plant Molecular Biology* 93 (4-5): 341-353.