

# Rutaceae

## Cítricos

### *Citrus* sp. (Rutaceae)

Leandro Peña, Magdalena Cervera, Carmen Fagoaga, Juan Romero,  
Alida Ballester, Nuria Soler, Elsa Pons, Ana Rodríguez, Joseph E. Pérez,  
José Suárez, Luis Navarro<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

El área de origen de los cítricos es el sudeste asiático, incluyendo el sur de China, la península Indochina, el noreste de la India y Burma. Hoy es comúnmente aceptado que solo el cidro (*Citrus medica*), la mandarina (*C. reticulata*) y el pummelo (*C. grandis*) son especies verdaderas dentro del género *Citrus*, como revelan las pruebas bioquímicas y moleculares, y que otros cítricos importantes como el naranjo dulce, el naranjo amargo, las limas, el limón, el pomelo y una amplia gama de mandarinas son el resultado de la hibridación entre las tres especies ancestrales. Debido a que estos tres genotipos son monoembriónicos y solo se reproducen sexualmente, sucesivos ciclos de hibridación entre ellos habrían dado lugar a la mayor diversidad genética existente dentro del género *Citrus*, de modo que el sudeste de Asia no solo es el centro de origen, sino también el de mayor diversidad de los cítricos. Posteriormente, la aparición de la apomixis facultativa, unida a la selección por el hombre de genotipos específicos, dio origen a la mayoría de tipos cítricos cultivados hoy. Por tanto, a pesar de la amplia diversidad agronómica existente en las variedades cultivadas, la base genética de los cítricos es estrecha.

Recientemente, los análisis de los genomas citoplásmicos y nucleares con marcadores moleculares como microsatélites (SSR), DNA polimórfico amplificado con cebadores al azar (RAPD), polimorfismo por longitud de fragmentos generados por digestión con enzimas de restricción (RFLP), polimorfismo generado por amplificación con cebadores característicos (SCAR) y otros han proporcionado las claves para conocer las relaciones filogenéticas entre los distintos tipos cítricos. Los naranjos dulces serían híbridos de mandarino X pomelo, los

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Apartado Oficial 46113-Moncada. Valencia. España.

<sup>1</sup> Autor de correspondencia: Leandro Peña. E-mail: lpenya@ivia.es

naranjos amargos procederían de pumelo X mandarino, los limones tendrían su origen en naranjo amargo X cidro, y las limas tendrían también al cidro como parental. Los pomelos se originaron muy recientemente, en Barbados alrededor de 1750, como resultado de una hibridación natural entre pummelo y naranjo dulce (rev. en Nicolosi, 2007). Sin embargo, por razones prácticas se distinguen ocho grandes grupos agronómicos con sus correspondientes "especies" dentro del género *Citrus*: cidros (*C. medica* L.), pumelos (*C. grandis* [L.] Osb.), naranjos dulces (*C. sinensis* [L.] Osb.), naranjos amargos (*C. aurantium* L.), limones (*C. limon* [L.] Burm. f.), limas (*C. aurantifolia* [Christm.] Swing. y *C. latifolia* Tan.), pomelos (*C. paradisi* Macf.) y mandarinos (*C. reticulata* Blanco, *C. deliciosa* Ten. [común], *C. unshiu* [Mak.] Marc. [satsuma], *C. clementina* Hort. ex Tan. [clementina]), entre otras.

El género *Citrus* es con mucho el más importante de la familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantoideae*, pero hay otros dos géneros con un papel relevante en citricultura que son *Fortunella*, que produce fruta comestible llamada kumquat, y *Poncirus*, vulgarmente llamado naranjo trifoliado, usado exclusivamente como portainjertos. El origen de ambos géneros es probablemente el centro de China.

Debido a su carácter apomíctico, los cítricos se propagaron mayoritariamente a partir de semillas durante siglos. Aunque antiguas referencias chinas mencionan la práctica del injerto de mandarinos sobre *Poncirus trifoliata*, este solo se hizo habitual en citricultura a partir de mediados del siglo XIX, después de que una epidemia del omiceto *Phytophthora* afectase de forma importante a los árboles de naranjo dulce cultivados entonces en Europa. Hoy, los cítricos cultivados se componen de dos genotipos diferentes: la variedad adulta, que produce la fruta, injertada sobre el portainjertos, juvenil y altamente apomíctico.

Todos los cítricos son perennifolios y no muestran latencia invernal. La única excepción es el afín *Poncirus trifoliata* que es caducifolio, mostrando caída de hojas y latencia de las yemas en invierno. Los cítricos muestran un patrón de crecimiento simpodial, basado en ciclos de crecimiento. Los brotes desarrollan varias yemas en las axilas de cada hoja y también una espina. La presencia de espinas se considera generalmente un carácter juvenil, pero hay genotipos que presentan espinas siendo adultos (ejemplo: algunas variedades de limón), y genotipos que no presentan espinas en su fase juvenil (ejemplo: mandarino Cleopatra). Las hojas son unifoliadas con peciolo más o menos alados. *Poncirus* tiene las hojas trifoliadas. La forma de la hoja alargada y el peciolo prominente se consideran también caracteres juveniles.

La diferenciación floral se induce por fotoperiodo en áreas subtropicales cuando el día se acorta durante los meses invernales. Las bajas temperaturas también son importantes para la inducción floral. En zonas tropicales, el estrés

por sequía representa la señal más importante de inducción floral. La floración se produce comúnmente en primavera. En *Poncirus*, la inducción floral se produce al final del verano. En *Citrus*, el desarrollo vegetativo y el reproductivo están íntimamente relacionados, distinguiéndose cuatro tipos de brotes: vegetativos, florales, mixtos y de flores solitarias. *Poncirus* y *Fortunella* también florecen en primavera pero antes y después que *Citrus*, respectivamente.

El fruto de los cítricos es una baya denominada hesperidio, que se genera como consecuencia del crecimiento y desarrollo del ovario. Consiste en partes carnosas separadas por segmentos que se encuentran englobadas por una piel fácilmente separable. Está compuesto de dos regiones: el pericarpio, que constituye la piel, y el endocarpio o pulpa. El pericarpio está compuesto por una piel externa coloreada llamada flavedo, y una piel interna, generalmente blanca, llamada albedo.

Los frutos cítricos no son climatéricos. Durante la maduración el flavedo verde, fotosintéticamente activo, transforma los cloroplastos en cromoplastos ricos en carotenoides. La maduración de la pulpa se caracteriza por un descenso en la acidez y un aumento en el contenido de azúcares, el cociente entre ambos compuestos define el llamado índice de madurez.

Los cítricos son los árboles frutales de mayor importancia económica en el mundo, con una producción que excedió los 105 millones de toneladas en 2005 en una superficie superior a los 7,6 millones de ha (FAO, 2006). Se cultiva en más de 130 países en zonas tropicales y subtropicales (hasta 40° de latitud a ambos lados del ecuador) en las que se dan condiciones edafoclimáticas favorables. Los mayores productores son Brasil, Estados Unidos, China, España, México, India, Irán, Italia, Egipto, Argentina, Turquía, Japón, Pakistán, Sudáfrica, Grecia, Tailandia, Marruecos, Israel, Indonesia, Corea del Sur y Australia, de mayor a menor. Los cinco primeros países representan aproximadamente el 55% de la citricultura mundial.

Los naranjos dulces constituyen el 55% de la producción, que se dedica sobre todo a consumo en fresco y a zumo. Brasil y Estados Unidos producen cerca del 45% del total mundial; de este porcentaje, el 60% se dedica a zumo. Las mandarinas, incluidas satsumas y clementinas, se consumen en fresco y representan el 20% del total cítrico, siendo China el primer productor, seguido de España y Japón. Los limones y las limas se consumen mayoritariamente procesados o mezclados con otros alimentos. México es el primer productor y exportador de limas; Argentina, de limones. El primer productor de pomelo es Estados Unidos; solo Florida y Texas producen el 25% del pomelo mundial. Se consume en fresco y procesado (más del 40%).

La producción de otros frutos cítricos es mucho menor que la de los cuatro grupos mencionados, inferior a unos pocos cientos de toneladas en el caso de

limelos, cidros y kumquats, comercializados sobre todo en mercados locales de Asia. La fruta procesada tiene otros usos aparte de su consumo en forma de zumo, como gajos enlatados en el caso de la satsuma o mermelada de naranja amarga. Las flores se utilizan para extraer aceites esenciales muy apreciados en perfumería. Los aceites esenciales del pericarpio, sobre todo monoterpenos, tienen múltiples usos industriales como aditivos alimentarios para proporcionar aroma, en perfumes, en productos de limpieza del hogar, como disolventes en pinturas, etc. Los productos de desecho del procesado del fruto para jugos se utilizan como pienso. En países de Europa y en Estados Unidos hay también un uso creciente de árboles cítricos como ornamentales.

Es bien conocido que los frutos cítricos presentan compuestos con importantes efectos beneficios para la salud humana, como vitamina C, carotenoides (provitamina A), ácido fólico, flavonoides, aceites esenciales/monoterpenos, limonoides y otros.

## PLAGAS Y ENFERMEDADES

En citricultura se utilizan muy diversos genotipos cítricos que se cultivan en muy distintas condiciones edafoclimáticas. Esto implica que los árboles se encuentran sometidos a diferentes tipos de estrés abióticos y bióticos que limitan de manera importante tanto la calidad como la producción, y en ciertos casos el uso de determinados portainjertos y variedades. Los principales estreses abióticos se derivan del uso de suelos ácidos, alcalinos y salinos; de las inundaciones y de las sequías; de las heladas, y de las elevadas temperaturas.

Los cítricos se ven afectados tanto por plagas como por enfermedades causadas por nemátodos, hongos, omicetos, bacterias, espiroplasmas, fitoplasmas, virus, viroides y por enfermedades de etiología desconocida.

Algunas de estas enfermedades afectan a la mayoría de áreas citrícolas, como las causadas por el oomiceto *Phytophthora* sp. o por el virus de la tristeza de los cítricos, también conocido como citrus tristeza virus (CTV), que impiden el uso de determinados excelentes portainjertos y restringen la producción y la calidad de la fruta en ciertos países. Otras, como la cancrrosis, causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, afecta a la mayoría de variedades importantes; se encuentra ampliamente expandida y actualmente constituye una seria amenaza para las citriculturas de Florida y de la mayoría de países suramericanos. Otras enfermedades se encuentran localizadas en áreas geográficas específicas, como las producidas por la bacteria *Xylella fastidiosa* o por el virus *Citrus sudden death associated virus* en São Paulo (Brasil). Finalmente, hay enfermedades que han sido localmente importantes y que en tiempos recientes se han propagado por otras zonas citrícolas, como el caso del Huangong-bling, causado por la bacteria *Candidatus Liberobacter asiaticum*, que afecta a

todas las variedades. Esta bacteria ha impedido el desarrollo de una industria cítrica en países del sudeste asiático; actualmente está matando a miles de árboles en Florida y Brasil. En el caso de las tres bacterias mencionadas, existen medios eficaces de control. Al mismo tiempo que la citricultura se ve amenazada por importantes estreses, los mercados demandan fruta y zumo de mayor calidad. En esta situación, la mejora genética de los cítricos constituye una prioridad.

## **FITOMEJORAMIENTO**

### **NECESIDADES DE MEJORA GENÉTICA**

Los objetivos de los programas de mejora de portainjertos son resistencia a CTV y a *Phytophthora* sp., mayor tolerancia al frío en áreas como Japón, Florida y Nueva Zelanda, capacidad semienanizante, mayor tolerancia a suelos calcáreos y salinos en zonas con aguas de poca calidad y resistencia a nemátodos, especialmente en Florida. Los programas de mejora de variedades están enfocados a la obtención de resistencia a las plagas y enfermedades más importantes, y a la mejora de la calidad de la fruta. Para el mercado de productos frescos, los objetivos fundamentales incluyen la mejora del tamaño para cada variedad, facilidad de pelado, ausencia de semillas, color y aroma atractivos, contenido de ácidos y azúcar compensado, extensión de los periodos de madurez y recolección para disponer de fruta durante todo el año, y mejora de los sistemas de almacenamiento y transporte. Cuando la fruta se va a usar para producción de zumos, resultan esenciales el incremento del contenido de zumo de la fruta, un buen color y la ausencia de amargor.

### **LIMITACIONES BIOLÓGICAS PARA LA MEJORA GENÉTICA**

La mejora genética de los cítricos mediante cruzamientos tiene importantes limitaciones debido a que estos se caracterizan por su biología reproductiva compleja. La mayoría de las especies de cítricos presentan apomixis facultativa, es decir, sus semillas producen embriones nucelares idénticos a la planta madre que limitan el desarrollo del embrión zigótico. Aunque esta característica constituye la base del sistema de la propagación de portainjertos, la apomixis hace muy difícil la recuperación de progenie sexual para la selección de los caracteres deseados. Muchos genotipos de interés presentan esterilidad parcial o total de polen u óvulos; por tanto, no se pueden utilizar como parentales en programas de mejora. Por ejemplo, la mayoría de los naranjos Navel presentan esterilidad masculina, mientras que las mandarinas Satsuma y los naranjos Navel presentan esterilidad femenina.

Hay muchos casos de autoincompatibilidad y de incompatibilidad entre ciertos genotipos. Clementinas, pomelos y ciertas variedades importantes de limonero son autoincompatibles, y muchos híbridos, entre genotipos autoincompatibles, son también incompatibles. Los periodos juveniles suelen ser muy largos, de manera que pueden necesitar unos ocho años para empezar a florecer y fructificar en zonas subtropicales y varios años más para tener características completamente adultas. Son sumamente heterocigóticos; lo que hace que se produzca una gran segregación de caracteres en la progenie, reduciendo las posibilidades de recuperación de genotipos con los caracteres deseados. Se desconoce el modo de herencia de la mayoría de caracteres de interés agrónomico; además, muchos de los relacionados con la calidad de la fruta y la época de maduración se heredan de forma cuantitativa.

El tamaño de los árboles es grande, lo que dificulta la disponibilidad de mucha progenie por razones de espacio. Todo ello ha impedido un poco el desarrollo de nuevos genotipos cítricos de amplia relevancia mediante el uso de métodos de mejora clásica. Además, no existen fuentes de resistencia genética en el germoplasma cítrico frente a los patógenos más importantes, como *Candidatus Liberobacter asiaticum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. citri y *Xylella fastidiosa*.

## MEJORA GENÉTICA EN CÍTRICOS

En principio, los objetivos de mejora de los cítricos son diferentes en función de si se aplican a la obtención de nuevos portainjertos o variedades. Los cítricos, básicamente naranjos dulces, se cultivaban sobre sus propias raíces hasta mediados del siglo XIX, cuando una epidemia de *Phytophthora* sp. empezó a afectarlos gravemente, en primer lugar en Azores (1840) y posteriormente en Francia y España. En esos tiempos ya se injertaban los naranjos sobre diferentes portainjertos, como cidro, limonero, naranjo amargo y otros genotipos de naranjo dulce en ciertas zonas de España a pequeña escala. La llegada de *Phytophthora* sp. hizo que solo sobrevivieran aquellos árboles injertados sobre naranjo amargo. Desde entonces, los cítricos se empezaron a cultivar injertados sobre este portainjerto y esto se convirtió en una práctica universal. Se trata de un genotipo no solo resistente a *Phytophthora* sp., sino que además proporciona excelentes atributos agronómicos, en particular buenas cosechas, calidad, rusticidad, y alta tolerancia a suelos calcáreos y salinos. Sin embargo, entre 1910 y 1930 los árboles injertados sobre naranjo amargo empezaron a decaer por causa de una enfermedad identificada más tarde como tristeza, producida por CTV. Desde entonces, distintos genotipos cítricos y especies afines se han utilizado como portainjertos, dependiendo de los requerimientos de cada área cítrica, pero muy pocos son resultado de programas de mejora.

Las primeras hibridaciones artificiales de cítricos las realizaron Swingle y Webber en Florida en 1893 con la intención de incorporar resistencia a en-

fermedades, pero una helada acabó con la mayoría de los híbridos. Por eso, decidieron incorporar *Poncirus trifoliata*, que es muy tolerante a frío, como parental en su programa de mejora de variedades, pero ninguno de los híbridos obtenidos combinó mayor tolerancia a frío y fruta de buena calidad. Inesperadamente, se obtuvieron los excelentes portainjertos híbridos citrangeres Troyer y Carrizo (naranja dulce X *Poncirus trifoliata*), resistentes a CTV y a *Phytophthora* sp., y que hoy se usan ampliamente en países como España y Estados Unidos. Otro híbrido generado en ese programa es el citrumelo Swingle (pomelo X *Poncirus trifoliata*), obtenido en 1907 pero comercializado a partir de 1974. Se usa como portainjertos, sobre todo en Florida y Sudáfrica. El resto de portainjertos importantes son híbridos naturales o especies originarios del sudeste asiático, como la lima Rangpur, naranja amargo, mandarinos Sunki y Cleopatra, limones rugoso y Volkameriano, *C. macrophylla* y *Poncirus trifoliata*.

Lo mismo ocurre en el caso de la mejora genética de variedades. La mayoría de estas se ha conseguido por selección de mutaciones espontáneas detectadas en el campo por el hombre o por el cultivo de semillas y la germinación de plantas de interés de manera fortuita, bien en la antigüedad en el sudeste asiático o después del siglo XVI en las áreas cítricas más importantes. En el caso de los naranjos dulces, tanto los tipos Valencia, para zumo, como los Navel, para consumir frescos, proceden de mutantes seleccionados por el hombre, que han dado origen mediante mutación a un gran número de variedades de excelente calidad que constituyen hoy la base del cultivo del naranja dulce en el mundo. Se piensa que la Valencia se originó en Azores o Portugal al comienzo del siglo XVI a partir de un naranja de muy buena calidad traído de China, mientras que la Navel se habría originado en Salvador de Bahia (Brasil) a partir de la variedad Selecta, alcanzando amplia difusión a finales del siglo XIX cuando fue introducida en Estados Unidos y llamada Washington Navel.

Los mandarinos, tanto híbridos naturales como seleccionados por el hombre, se han cultivado en China y en el sudeste de Asia desde tiempos remotos. Los tipos más importantes son posiblemente las satsumas, cultivadas en China y Japón, y las clementinas, cultivadas sobre todo en España y Marruecos. Se cree que la satsuma se originó como un híbrido natural en la isla de Kyushu (Japón) en los siglos XV-XVI. Actualmente existe infinidad de variedades de diferente tamaño y época de maduración, todas ellas generadas como mutantes naturales a partir de variedades preexistentes. Las clementinas aparecieron como un híbrido natural, posiblemente de mandarino X naranja dulce o amargo, en el jardín de un orfanato cerca de Orán (Argelia) y fueron descubiertas por el padre Clement Rodier. Fueron introducidas en España en 1925 y desde entonces se han generado varias decenas de mutantes con fruta de distinto tamaño, forma, color y época de maduración, que constituyen la base de la citricultura española actual. Otro mandarino híbrido natural es el Ponkan, que se cultiva mucho en Asia y Brasil. De él se han generado mutantes nucelares de relativa

importancia, como Dancy en Florida, o Ellendale e Imperial en Australia, todos ellos en el siglo XIX. Murcott es muy probablemente un tangor (mandarino X naranjo dulce) de parentales desconocidos, ampliamente cultivado en Florida, Brasil, Argentina y Japón. Otro tangor natural de importancia es Ortanique, descubierto en Jamaica alrededor de 1920. Un híbrido natural reciente es Afourer o Nadorcott (probablemente Murcott X clementino), encontrado en Marruecos, que se considera la nueva variedad de mandarina híbrida más prometedora.

Todas las variedades importantes de lima y limón son híbridos y mutantes naturales seleccionados por el hombre hace muchos siglos en el sudeste asiático o, en algún caso, a partir del siglo XIX en áreas citrícolas importantes. El pomelo es el único tipo cítrico de origen reciente y desarrollo bien documentado. Se describió por primera vez en Barbados en 1750 y se originó de un cruzamiento natural de pummelo X naranjo dulce, seguido de varios nuevos cruces con pummelo.

A lo largo del siglo XX, se han realizado programas de mejora genética mediante cruzamientos en la mayoría de países citrícolas, pero ninguna de las variedades relevantes en la actualidad procede de dichos programas. En Florida, los cruzamientos de pomelo X mandarino dieron lugar a los tangelos Orlando y Minneola. Las hibridaciones de clementino X estos tangelos originaron variedades de importancia relativa como la Nova. En California, Frost realizó cruzamientos interesantes entre mandarinos de 1914 a 1916, que dieron como resultado el híbrido Kinnow (mandarino King X mandarino Común), muy popular en Pakistán e India. Furr obtuvo en California en 1974 el híbrido Fortune, resultante del cruzamiento de clementino X mandarino Dancy, que ha sido el híbrido tardío más importante en España durante las dos últimas décadas del siglo XX. Kiyomi es un tangor obtenido en Japón y el cruzamiento Ponkan X Kiyomi ha dado origen recientemente al Shiranui, probablemente el éxito más importante de cualquier programa de mejora genética de cítricos desarrollado en Japón.

La inducción artificial de cambios genéticos con técnicas de irradiación se inició en Estados Unidos en 1935, mediante el tratamiento de semillas con rayos X. Los mayores éxitos de los programas de irradiación los obtuvo Henz en Texas, a partir de yemas y semillas de pomelo irradiadas, que dieron lugar a nuevas variedades pigmentadas que constituyen la base del cultivo de pomelo actualmente. Star Ruby se produjo a partir de semillas irradiadas de la variedad Hudson en 1959, y Rio Red fue seleccionada como mutante de yema de un árbol obtenido a partir de irradiación de varetas de una plántula de Ruby Red. Más recientemente, se ha utilizado la irradiación de yemas para obtener híbridos de mandarino sin semillas, de los cuales resultan muy prometedores Orri, generado a partir del híbrido israelí Orah, y Tango, generado a partir de Afourer.

## SISTEMAS IN VITRO

Comparados con otros árboles frutales, los cítricos, sus géneros afines y sus híbridos responden muy bien al cultivo de tejidos in vitro. Se han establecido procedimientos eficaces para la regeneración de plantas enteras a partir de protoplastos, suspensiones celulares, callos embriogénicos, tejidos y órganos. El cultivo in vitro se ha utilizado para diferentes propósitos, entre estos la obtención de plantas libres de patógenos (Navarro et ál., 1975; Navarro, 1992), la manipulación de la ploidía (Ollitrault et ál., 1998), la generación de nuevos híbridos y cíbridos somáticos (Grosser y Gmitter, 2005), y la transformación genética (Peña et ál., 2004a).

Algunos de los métodos utilizados para la obtención de cítricos libres de patógenos, como la recuperación de plantas nucelares o la termoterapia, presentan limitaciones importantes. La embrionía nucelar es muy eficaz para la eliminación de virus y agentes relacionados, pero el paso por semilla hace que las plantas recuperadas posean características juveniles; por ejemplo, vigor excesivo, desarrollo de espinas y, sobre todo, incapacidad para florecer y fructificar. El largo periodo juvenil de la mayoría de genotipos cítricos, unido a que a veces las plantas nucelares no son idénticas a las plantas madre, supone serios obstáculos para su utilización rutinaria. La termoterapia da buenos resultados en plantas adultas idénticas a la original, pero no es efectiva para la eliminación de viroides.

### Microinjertación

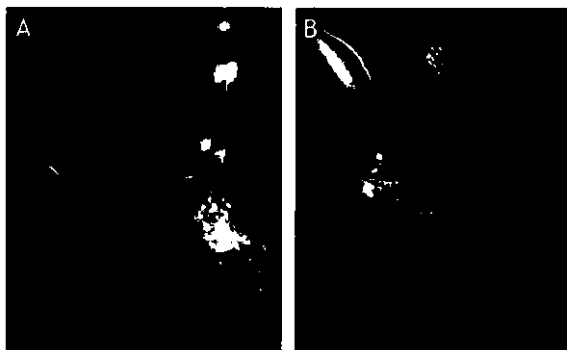
El microinjerto de ápices caulinares in vitro es una estrategia eficaz para la eliminación de patógenos de cítricos, incluidos viroides. Consiste en la excisión de un fragmento del ápice caulinar de la planta infectada y el injerto de unos 0,1 - 0,2 mm que contienen el meristemo apical y dos o tres primordios foliares sobre una plántula juvenil cultivada in vitro, utilizada como portainjertos (Navarro, 1992; Navarro et ál., 1975). Con esta técnica se obtienen plantas adultas, idénticas a la original. Hasta hoy, el microinjerto ha sido la técnica más utilizada en programas de saneamiento de cítricos en el mundo. Además, tomando como base el microinjerto, se ha desarrollado un procedimiento de cuarentena mediante cultivo in vitro para la introducción segura de nuevos genotipos, procedentes de áreas cítrícolas potencialmente afectadas por enfermedades, a otras libres de dichas enfermedades (Navarro, 1992).

### Protoplastos

Los protoplastos son células vegetales a las que se ha eliminado la pared mediante tratamientos enzimáticos. El naranjo dulce fue la primera especie arbórea de la que se consiguió la regeneración de plantas enteras a partir de

protoplastos (Vardi et ál., 1982; Kobayashi et ál., 1983). Desde entonces, se ha demostrado la totipotencia de los protoplastos en numerosas especies de cítricos y para muchas finalidades relacionadas con su mejora genética (Grosser y Gmitter, 2005). Mediante cultivo in vitro de óvulos, se obtiene fácilmente callo de origen nucelar –por tanto somático– que se utiliza como material de partida eficaz para la generación de protoplastos en la mayoría de genotipos cítricos poliembriónicos. Estos regeneran plantas enteras mediante embriogénesis somática a través de las fases de formación de callo, embrión y plántula.

La posibilidad de aislar y cultivar protoplastos de numerosos cítricos ha permitido el desarrollo de la biotecnología de hibridación somática. Consiste en la fusión de protoplastos de dos especies diferentes, siendo un parental donante de protoplastos originados a partir de suspensiones celulares o callo embriogénico y el otro parental donante de protoplastos derivados de hoja. La fusión se induce bien mediante adición de polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo, bien mediante pulsos eléctricos o bien mediante la combinación de ambos métodos. Después de la fusión, el parental embriogénico proporciona al híbrido la capacidad de regenerar plantas a partir de callo y la consiguiente embriogénesis somática (figura 1 A).



**Figura 1.** Regeneración de plantas enteras de cítricos mediante embriogénesis somática y organogénesis. A. Embrión somático en estado cotiledonar desarrollándose a partir de callo de origen nucelar. B. Organogénesis directa de brotes a partir del extremo cortado de un segmento internodal.

En cítricos, se ha conseguido también la regeneración de plantas enteras mediante organogénesis, a través del cultivo in vitro de diferentes tejidos, como segmentos de hoja, de epicotilo, de entrenudo, de raíz, etc., aunque los explantes derivados de epicótilo y de entrenudo han sido los más utilizados (figura 1 B). Los primeros trabajos mostraron la regeneración eficaz de plantas a partir de callo formado en los explantes primarios; para lograrlo es esencial la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo. La adición de la citoquinina bencilaminopurina (BAP) a bajas concentraciones resultó muy importante para la obtención de organogénesis secundaria a partir del callo

desorganizado, mientras que la adición de auxinas tuvo un papel marginal en esta respuesta. Cuando se usó BAP por encima de 5 mg/l se inhibió la formación de brotes y se favoreció la formación de callo. En ausencia de BAP, se promovió la regeneración directa a partir de los explantes (García-Luis et ál., 1999). La capacidad organogénica de segmentos de epicótilo y entrenudo cultivados *in vitro*, de la mayoría de genotipos cítricos, ha sido fundamental para el desarrollo de la biotecnología de transformación genética.

### **Mejora genética asistida por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y por marcadores moleculares**

Los cítricos son diploides con un número de cromosomas  $n = 9$  y un tamaño del genoma aproximado de 0,9 pg (~380 Mb). En algunos casos, y bajo determinadas condiciones, se pueden generar tetraploides espontáneos que resultan de la duplicación cromosómica en células nucleares, capaces de regenerar embriones y plantas enteras. La posibilidad y la frecuencia de que esto ocurra depende en gran medida del genotipo y de las condiciones ambientales. La tetraploidía se puede inducir también mediante tratamientos *in vitro* con colchicina de callo nucelar y de ápices caulinares en el caso de genotipos monoembriónicos; por ejemplo, clementinos. Aunque se ha propuesto el uso de genotipos tetraploides como portainjertos, dado su porte en general pequeño, el uso más extendido hoy son los parentales en cruzamientos con genotipos diploides a fin de generar nuevas variedades triploides. La mayoría de los cítricos triploides son estériles; producen fruta sin semilla. Una variedad triploide natural es la lima Tahití, de importancia creciente para la citricultura mexicana. La ausencia de semillas en la fruta es muy difícil de obtener mediante programas de mejora clásica.

La producción de híbridos triploides es la estrategia más prometedora para conseguir este propósito. La producción de híbridos sexuales triploides ( $3n = 27$ ) se viene documentando desde el comienzo de los años sesenta hasta la actualidad mediante cruzamientos  $2n \times 4n$ ,  $4n \times 2n$  y  $2n \times 2n$  (Ollitrault et ál., 1998). Recientemente, los embriones triploides se generan por fertilización de un gameto femenino diploide no reducido ( $2n$ ) con un gameto masculino haploide normal ( $n$ ). Las semillas con embriones triploides se encuentran generalmente poco desarrolladas o abortadas debido a un balance de ploidía embrión/endospermo anormal, por lo que resulta muy difícil recuperar plantas a partir de ellas. Además, el análisis de la ploidía en grandes poblaciones de híbridos mediante métodos histocitológicos resulta muy laborioso. El desarrollo de procedimientos de cultivo *in vitro* de embriones y pequeñas semillas, combinado con los análisis de ploidía rápidos, a partir de pequeña cantidad de muestra vegetal mediante citometría de flujo, ha hecho posible que los sistemas de producción de híbridos triploides sean muy eficaces y permitan obtener miles de plantas por año (Navarro et ál., 2003). Recientemente, se han registrado varios mandarinos híbridos triploides muy prometedores en Estados Unidos e Italia.

## **Hibridación somática**

Otra tecnología interesante para generar parentales tetraploides es la hibridación somática, que permite incorporar los genomas de ambos parentales en el híbrido, sin que haya recombinación, de modo que se evita en parte el problema de la elevada heterozigosidad inherente a los cítricos. La hibridación somática puede utilizarse también para la producción de triploides a partir de fusiones haploide + diploide. Otra posibilidad es la generación de cíbridos, es decir, nuevos híbridos diploides que combinan el genoma nuclear de un parental y el genoma citoplásmico del otro, o de ambos parentales (Grosser y Gmitter, 2005). En Florida hay un importante programa de mejora genética de cítricos mediante hibridación somática, con muchos híbridos que se están evaluando ya en campo para utilizarlos como potenciales portainjertos o como parentales en cruzamientos dirigidos a la obtención de mandarinos híbridos triploides (Grosser y Gmitter, 2005).

## **Variación somaclonal**

Grosser et ál. (2002) investigan el fenómeno de la variación somaclonal como método alternativo para la mejora de naranjo dulce. La variación somaclonal se define como la variación genética que se induce durante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Esta variación suele ser generalmente pequeña pero puede resultar en plantas con características agronómicas diferentes a las de la planta madre original; por tanto puede dar lugar a nuevo germoplasma mejorado. En Florida se evalúan actualmente en campo varias selecciones de naranjo dulce Valencia, obtenidas a partir de protoplastos y a través del pase por las fases de callo, embrión y plántula. Algunas de estas parecen tener fruta del mismo color y calidad que la Valencia original, pero maduran un poco antes o después que la variedad estándar.

## **Marcadores moleculares**

El desarrollo de determinadas técnicas moleculares ha permitido realizar mapas de ligamiento del genoma de los cítricos y se dispone de marcadores de DNA asociados a algunos caracteres de interés, que pueden ser útiles para realizar una selección temprana de la progenie con los caracteres deseados en programas de mejora clásica. Se han realizado mapas utilizando isoenzimas, microsatélites (SSR), DNA polimórfico amplificado con cebadores al azar (RAPD), generados por digestión con enzimas de restricción (RFLP), amplificado (AFLP), generado por amplificación con cebadores característicos (SCAR), y amplificado y digerido (CAP). Más recientemente se han desarrollado otros marcadores como genes candidatos de resistencia (RGC) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). De cualquier modo, el número de marcadores asociados a genes de interés es aún escaso en cítricos. Es previsible que el rápido desa-

rollo de la genómica permita disponer de muchos más marcadores ligados a caracteres de interés a mediano plazo. La clonación de genes de interés, a partir de los mapas existentes, solo se ha abordado en el caso del gen de resistencia a CTV de *Poncirus trifoliata*. Este es un proyecto que se encuentra en marcha desde hace varios años en Estados Unidos, pero aún no se ha clonado el gen (Yang et ál., 2003).

### Posibilidades de la mejora transgénica de cítricos

A pesar de los esfuerzos realizados en los programas de mejora genética tradicional a lo largo de más de un siglo, la citricultura actual está basada en un pequeño grupo de variedades de excelente calidad que se injertan sobre una gama no demasiado amplia de portainjertos más o menos adaptados a los estreses bióticos y abióticos que afectan particularmente a cada zona cítrica. La gran mayoría de estos excelentes genotipos se han producido al azar, es decir, se han conseguido a partir de la selección de mutaciones espontáneas detectadas en el campo por los agricultores o a partir del cultivo de semillas y la germinación de plantas de interés de manera fortuita. Además, los programas de mejora se ven muy limitados por la compleja biología reproductiva de los cítricos. En este contexto, la transformación genética ofrece enormes posibilidades para la mejora, ya que permite introducir caracteres únicos en genotipos élite sin alterar su fondo genético. El transgén de interés podría proceder de otro cítrico o afín, de otra planta no relacionada, o incluso de otro organismo; por ejemplo, una bacteria, un insecto o un virus, ampliando las posibilidades de mejora. Además, permitiría superar la elevada heterozigosis y las barreras de incompatibilidad asociadas a los programas de hibridación en cítricos.

Los primeros trabajos en transformación genética de cítricos utilizaron protoplastos como material vegetal de partida, pero sus resultados fueron muy limitados ya que se obtenían muy pocas plantas transgénicas vía embriogénesis somática. En 1994, Kobayashi et ál., publicaron la transformación genética de segmentos de epicotilo de *Poncirus trifoliata* con *Agrobacterium tumefaciens* y regeneración organogénica de plantas enteras, que constituyó el primer éxito sobre el tema al obtener eficacias de producción de planta transgénica superiores al 50% (brotes transgénicos X 100 por número total de explantes inoculados). Sin embargo, al tratar de adaptar su protocolo a especies del género *Citrus*, las eficacias de transformación eran mucho menores, fundamentalmente debido a las dificultades de los vectores utilizados para transformar células de *Citrus*, a la baja frecuencia de regeneración de brotes a partir de los sucesos transgénicos evitando al mismo tiempo la regeneración de escapes (brotes no transgénicos) y a las dificultades para enraizar las plantas transgénicas regeneradas.

En nuestro laboratorio, la identificación de una cepa adecuada de *Agrobacterium tumefaciens* (Cervera et ál., 1998a; Ghorbel et ál., 2001a), la carac-

erización del tipo de células que resultan más aptas para la transformación (Peña et ál., 1997; Cervera et ál., 1998b), el desarrollo de medios de cultivo que favorecen la aptitud celular (Peña et ál., 2004b), el desarrollo de sistemas de regeneración y selección eficaces (Ghorbel et ál., 1999; Domínguez et ál., 2004), la utilización del microinjerto (Peña et ál., 1995ab), la utilización de material vegetal de partida de una edad adecuada y en un estado fisiológico óptimo (Cervera et ál., 1998c; Ghorbel et ál., 2000) y la utilización de genes marcadores de selección e informadores apropiados nos ha llevado a ser capaces de transformar un gran número de especies de cítricos, entre las que están naranjo dulce, naranjo amargo, citrange, lima mexicana, limón, mandarino Cleopatra, clementino y *Citrus macrophylla*. Este procedimiento ha sido adaptado por otros grupos de Estados Unidos, Italia, Australia, Argentina, Brasil, Israel, etc., a la transformación de otros genotipos cítricos como pomelo, lima Rangpur y diferentes variedades de naranjo dulce.

En la figura 2 se esquematiza el procedimiento general. Básicamente, consiste en la utilización como explantes de segmentos de epicótilo de plantas cultivadas in vitro o de segmentos internodales de varetas de plantas cultivadas en el invernadero. Desechamos las hojas y las espinas, esterilizamos las varetas con lejía diluida y las lavamos con agua. Entonces, en condiciones asépticas, se cortan las varetas en segmentos transversales de nudos y entrenudos. Los nudos se desechan y los entrenudos (1 cm) se utilizan como explantes. Los segmentos de epicótilo se utilizan igualmente en segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud. Se sumergen en un cultivo líquido de *Agrobacterium tumefaciens* desarmada EHA 105 portando en un plásmido de transformación los genes que queremos introducir en las células vegetales más los genes marcadores que nos ayudarán a identificar y seleccionar los sucesos transgénicos. Después de 15 minutos, los explantes se sacan del cultivo bacteriano y se pasan a un medio de cocultivo rico en auxinas, donde permanecen durante tres días.

Posteriormente, los explantes se pasan a otro medio de cultivo al que se añade un antibiótico para evitar la proliferación de *Agrobacterium*; el antibiótico de selección suele ser la kanamicina y fitohormonas (BAP y, en algunos casos, también una auxina, a distintas concentraciones según el genotipo) que favorecen la regeneración de plantas a partir de las células transformadas de los explantes, y se mantienen de dos a cuatro semanas a 24 - 26 °C y en oscuridad. Una vez desarrollado el callo a partir de las células del cámbium en los extremos de los explantes, estos se pasan a 24 - 26°C, 16/8h fotoperiodo y 45  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Además del gen de interés y del gen de selección (el gen de la neomicina fosfotransferasa II confiere resistencia a kanamicina a las células transformadas), introducimos un tercer gen, informador o delator, que nos permite identificar fácilmente las células transformadas y las plantas que se regeneran a partir de ellas. Posiblemente, el gen informador que nos ha resultado más útil ha sido el gen de fluorescencia verde de la medusa *Aequorea victoria* (*gfp*) que una vez

introducido en las células hace que estas emitan fluorescencia verde cuando se observan bajo luz azul (figura 3 A). Con la introducción por *Agrobacterium* de estos genes marcadores junto al gen de interés se favorece la regeneración únicamente de plantas transformadas.

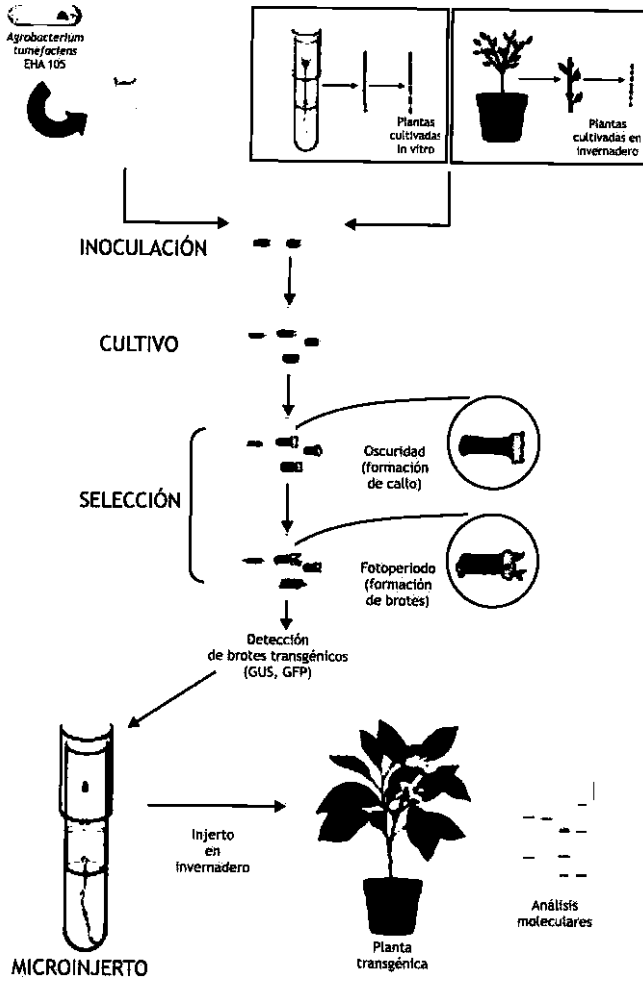
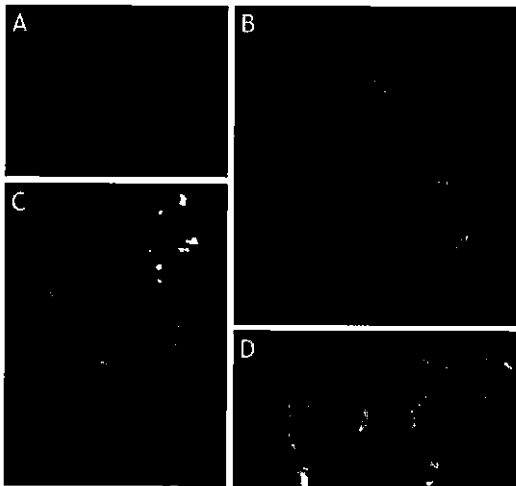


Figura 2. Procedimiento de transformación genética de cítricos. Como material vegetal de partida se utilizan segmentos de epicótilo de plantas cultivadas in vitro o de segmentos internodales de varetas de plantas cultivadas en el invernadero. En condiciones asépticas, los explantes (1 cm de longitud) se sumergen en un cultivo líquido de *Agrobacterium tumefaciens* desarmada EHA 105 portando en un plásmido de transformación los genes que queremos introducir en las células vegetales más los genes marcadores que nos ayudarán a identificar y seleccionar los sucesos transgénicos.

En nuestra experiencia, los cítricos transgénicos enraízan *in vitro* con dificultad. Por tanto, hemos desarrollado una modificación de la técnica de microinjerto para obtener plantas transgénicas rápida y eficazmente, evitando la necesidad de enraízarlas. En nuestro caso, lo que se injerta *in vitro* son brotes mucho más grandes que los ápices que se microinjertan para la eliminación de patógenos. De este modo, los brotes transgénicos se injertan en un portainjertos vigoroso que suele ser citrange Carrizo de unas dos semanas, obtenido a partir de la germinación de una semilla en un medio de cultivo apropiado. Los injertos se mantienen en tubo de ensayo durante varias semanas. Tras prender el injerto y desarrollar la planta transgénica varias hojas nuevas, se injerta de nuevo, esta vez en el invernadero, en otro portainjertos vigoroso, de manera que a los pocos meses (4 a 6) de realizada la infección de los explantes por *Agrobacterium* se pueden conseguir plantas de unos 20 cm de longitud. Mediante técnicas moleculares, confirmamos la presencia del gen de interés (Southern blot) y su expresión (Northern blot, Western blot, ELISA, etc.) en las plantas transgénicas regeneradas.



**Figura 3.** Incorporación de transgenes delatores y de posible interés agrícola en el genoma de los cítricos. **A.** Regeneración de un brote GFP-positivo a partir de un explante. El brote emite fluorescencia verde al observarlo bajo luz azul. **B.** Naranja dulce transgénico que florece y fructifica después de un año de realizada la transformación, confirmando su carácter adulto. **C.** Sobreexpresión del gen *APETALA1* de *Arabidopsis* en una planta transgénica de citrange Carrizo. La planta transgénica (derecha) florece después de menos de un año de cultivo mientras que la planta control (izquierda) sigue manteniendo su naturaleza juvenil durante al menos cinco años más. **D.** Resistencia frente a CTV en una planta transgénica de lima mexicana que sobreexpresa el gen *p25* de la cápsida mayoritaria del virus (derecha) y que ha sido inoculada mediante injerto. La planta control (izquierda) inoculada de igual modo muestra los síntomas característicos producidos por el virus en este huésped.

Dado que el largo periodo juvenil de los cítricos es un obstáculo para su mejora genética, nuestro siguiente objetivo fue transformar directamente cítricos adultos, para evaluar en unos pocos meses el efecto sobre la fruta del carácter introducido vía transgénica. Mediante la utilización de segmentos de entrenudo de varetas procedentes del injerto de yemas adultas sobre portainjertos juveniles, se consiguió la revigorización del material de partida y, con ello, la transformación y regeneración eficaz de plantas que florecieron entre 1 y 2 años después de la infección con *Agrobacterium* (Cervera et ál., 1998c; Cervera et ál., 2005) (figura 3 B). Era la primera vez que se transformaba material adulto de una especie leñosa. Otra estrategia complementaria para conseguir el mismo objetivo consistió en la incorporación en plantas juveniles de los genes *LEAFY* (*LFY*) y *APETALA1* (*AP1*) de identidad de meristemo floral de *Arabidopsis thaliana*. La incorporación de estos genes en cítricos juveniles hizo que florecieran también entre uno y dos años después de realizar la transformación. La progenie de esas plantas florece y fructifica 6 a 8 meses después de sembrar las semillas en el caso de plantas transgénicas *AP1* (Peña et ál., 2001) (figura 3 C).

Hemos introducido, en plantas de naranjo dulce Pineapple, un gen aislado de tomate que produce una proteína antifúngica para tratar de hacerlas más tolerantes a *Phytophthora* (Fagoaga et ál., 2001); hemos introducido genes implicados en el metabolismo de giberelinas en citrange Carrizo con la intención de tratar de modular el tamaño de las plantas (Fagoaga et ál., 2007); y estamos introduciendo genes de CTV en lima mexicana, naranjo dulce y en naranjo amargo para investigar la biología del virus y sus interacciones con la planta huésped, con la finalidad última de obtener resistencia a CTV (Ghorbel et ál., 2000, 2001b; Domínguez et ál., 2000, 2002ab; Fagoaga et ál., 2005, 2006) (figura 3 D). Estas investigaciones están en diferentes fases de desarrollo.

Otros autores han utilizado callo embriogénico como material vegetal de partida y *A. tumefaciens* o biobalística como sistemas de transformación. También se ha vuelto a la utilización de protoplastos y su transformación mediante PEG o electroporación, siempre apoyada por la selección de los sucesos transgénicos con el marcador *gfp*. Tanto en estos casos como cuando se han utilizado segmentos de epicotilo como explante, las plantas transgénicas regeneradas eran juveniles. Con todo, y con ello, se ha introducido el gen de una ribonucleasa bajo el control de un promotor específico de tapetum en mandarino Ponkan y naranjo Valencia para hacer a las plantas transgénicas androestériles (Li et ál., 2002, 2003), se ha incorporado el gen *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) en *Poncirus trifoliata* para inducir floración rápida (Endo et ál., 2005), y se ha introducido el gen precursor del péptido antimicrobiano atacina A (*attA*) en naranjo Hamlin para tratar de conseguir mayor tolerancia a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Boscariol et ál., 2006), entre otros trabajos de incorporación de transgenes de posible interés agronómico en cítricos.

## PERSPECTIVAS DE LA MEJORA GENÉTICA DE CÍTRICOS VÍA TRANSGÉNICA

Frente a tecnologías de mejora ampliamente aceptadas en citricultura, como la irradiación de yemas o la modificación de la ploidía, la transformación genética de plantas en general presenta serios problemas de aceptación por la sociedad en estos momentos, principalmente en Europa y Japón. Esta es la principal limitación que afronta la transgenia a corto plazo como posible herramienta de mejora de los cítricos. Sin embargo, importantes áreas cítricas se encuentran seriamente amenazadas por enfermedades como el Huangongbling o la cancrrosis, para las que no existen medios eficaces de control ni fuentes de resistencia genética identificadas dentro del género *Citrus*. Posiblemente, la transformación genética supone la única opción para obtener resistencia activa, duradera y eficaz en relación con estas enfermedades. Ya se está trabajando en esta dirección en universidades, empresas e institutos públicos americanos utilizando muy diversas estrategias. Asimismo, laboratorios de diferentes países siguen tratando de conseguir genotipos cítricos resistentes a CTV y a otros patógenos.

Además, debido al interés de los mercados por fruta y zumo de cada vez mayor calidad, es previsible que se trabaje más activamente en el uso de la transgenia para ampliar los conocimientos sobre el metabolismo de carotenoides, monoterpenos aromáticos y otros aceites esenciales, limonoides y flavonoides, así como sobre la maduración y los determinantes del balance azúcar/acidez en la fruta, para afrontar en el futuro la modulación de color, aroma, contenido de azúcar y acidez, incrementar el contenido vitamínico y de compuestos saludables, reducir el amargor, etc. También se abordará la generación de fruta sin semillas vía transgénica. Para perseguir estos objetivos con posibilidades de éxito es esencial extender los procedimientos de transformación a otros genotipos cítricos de interés, incrementar las eficacias de transformación de material adulto y desarrollar estrategias que permitan incorporar simultánea o consecutivamente diferentes transgenes y mayores fragmentos de DNA, que los transgenes se expresen de manera más específica y controlada, tratando de evitar en la medida de lo posible el efecto posición y el silenciamiento génico no deseado y, desde el punto de vista de bioseguridad/percepción pública, no utilizar o eliminar los genes marcadores una vez han cumplido su función selectiva durante la fase de cultivo *in vitro*.

Con todo ello, será posible ampliar extraordinariamente nuestros conocimientos sobre la biología de los cítricos y sus interacciones con el medio para generar una amplia gama de nuevos genotipos modificados específicamente en los caracteres de interés que se desean mejorar y hacerlos disponibles para su comercialización cuando esta nueva biotecnología sea aceptada por la sociedad.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a J. A. Pina, C. Ortega y A. Navarro su excelente ayuda técnica. Estas investigaciones fueron financiadas por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC-CICYT), el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) y por la Generalitat Valenciana; actualmente son financiadas por los proyectos de investigación.

## REFERENCIAS

- Boscariol, R. L., Monteiro, M., Takahashi, E. K., Chabregas, S. M., Vieira, M. L. C., Vieira, L. G. E., Pereira, L. F. P., Mourao Filho, F. A. A., Cardoso, S. C., Christiano, R. S. C., Bergamin Filho, A., Barbosa, J. M., Azevedo, F. A., Mendes, B. M. J. (2006). Attacin A gene from *Triclopusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* "Hamlin". *Journal American Society Horticultural Science*, 131:530-536.
- Cervera, M., López, M. M., Navarro, L., Peña, L. (1998a). Virulence and super-virulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52:67-78.
- Cervera, M., Pina, J. A., Juárez, J., Navarro, L., Peña, L. (1998b). *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports*, 16:271-278.
- Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J. A., Durán-Vila, N., Navarro, L., Peña, L. (1998c). Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Research*, 7:51-59.
- Domínguez, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L. (2000). Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*, 19:427-433.
- Domínguez, A., Hermoso de Mendoza, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L. (2002a). Pathogen-derived resistance to citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* [Christ.] Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding*, 10:1-10.
- Domínguez, A., Fagoaga, C., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L. (2002b). Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high frequency recovery of plants with silenced transgenes. *Molecular Genetics and Genomics*, 267:544-556.
- Domínguez, A., Cervera, M., Pérez, R., Romero, J., Fagoaga, C., Cubero, J., López, M. M., Juárez, J., Navarro, L., Peña, L. (2004). Characterisation

of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Molecular Breeding*, 14:171-183.

- Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Kobayashi, Y., Araki, T., Omura, M. (2005). Ectopic expression of an *FT* homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research*, 14:703-712.
- 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 overexpressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding*, 7:175-181.
- Fagoaga, C., López, C., Moreno, P., Navarro L., Flores, R., Peña, L. (2005). Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus-specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18:435-445.
- Fagoaga, C., López, C., Hermoso de Mendoza, A., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L. (2006). Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology*, 60:155-167.
- Fagoaga, C., Tadeo, F. R., Iglesias, D., Huerta, L., Lliso, I., Vidal, A. M., Talón, M., Navarro, L., García-Martínez, J. L., Peña, L. (2007). Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture. *Journal of experimental Botany*, 58(6):1407-1420.
- FAO (2006). <http://faostat.fao.org/default.aspx>
- García-Luis, A., Bordón, Y., Moreira-Dias, J. M., Molina, R. V. and Guardiola, J. L. (1999). Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. *Annals of Botany*, 84:715-723.
- Ghorbel, R., Juárez, J., Navarro, L., Peña, L. (1999). Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 99:350-358.
- Ghorbel, R., Domínguez, A., Navarro, L., Peña, L. (2000). High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Tree Physiology*, 20:1183-1189.

- Ghorbel, R., LaMalfa, S., López, M. M., Petit, A., Navarro, L., Peña, L. (2001a). Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a super-transformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in citrus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58:103-110.
- Ghorbel, R., López, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L. (2001b). Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology*, 2:27-36.
- Grosser, J. W., Chandler, J. L., Goodrich, R. M. (2002). Somaclonal variation for sweet orange improvement. In: Donadio, L. C., Stuchi, E. S. (eds.). *Proceeding of the 7<sup>th</sup> International Citrus Seminar- Improvement*, Bebedouro, SP, Brazil, pp. 35-43.
- Grosser, J. W., Gmitter, F. G., Jr. (2005). Applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41:220-225.
- Kaneyoshi, J., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Shigemoto, N., Doi, Y. (1994). A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange. *Plant Cell Reports*, 13:541-545.
- Kobayashi, S., Uchimiya, H., Ikeda, I. (1983). Plant regeneration from Trovita orange protoplasts. *Japanese Journal of Breeding*, 33:119-122.
- Li, D.D., Shi, W., Deng, X. X. (2002). *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Reports*, 21:153-156.
- Li, D. D., Shi, W., Deng, X. X. (2003). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing the pTA29-barnase gene. *Tree Physiology*, 23:1209-1215. 379-385.
- Navarro, L., Roistacher, C. N., Murashige, T. (1975). Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. *Journal American Society Horticultural Science*, 100:471-479.
- Navarro, L. (1992). Citrus shoot tip grafting in vitro. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (pp. 328-338), Vol. 18. Berlin: Springer-Verlag.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Pina, J. A. (2003). Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from  $2n \times 2n$  and  $2n \times 4n$  crosses by embryo rescue and flow cytometry. In: Vasil, I. K. (ed.). *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 541-544.

- Nicolosi, E. (2007). Taxonomy and Origin. In: Khan, I. (ed.). *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. Wallington, UK: CABI Publishing, CAB International, in press.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Sudahono, Mademba-Sy, F., Vanel, F., Luro, F., Aubert, B. (1998). Biotechnology for triploid mandarin breeding. *Fruits*, 53:307-317.
- Peña, L., Cervera, M., Juárez, J., Ortega, C., Pina, J. A., Durán-Vila, N., Navarro, L. (1995a). High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Science*, 104:183-191.
- Peña, L., Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J. A., Durán-Vila, N., Navarro, L. (1995b). *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 14:616-619.
- Peña, L., Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J. A., Navarro, L. (1997). Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports*, 16:731-737.
- Peña, L., Martín-Trillo, M., Juárez, J., Pina, J.A., Navarro, L., Martínez-Zapater, J. M. (2001). Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* and *APETA-LA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology*, 19:263-267.
- Peña, L., Cervera, M., Fagoaga, C., Pérez, R., Romero, J., Juárez, J., Pina, J. A., Navarro, L. (2004a). *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. In: Curtis, I.S. (ed.). *Transgenic Crops of the World-Essential Protocols* (pp. 145-157). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Peña, L., Pérez, R., Cervera, M., Juárez, J. A., Navarro, L. (2004b). Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. *Annals of Botany*, 94:67-74.
- Vardi, A., Spiegel-Roy, P., Galun, E. (1982). Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theoretical and Applied Genetics*, 62:171-176.
- Yang, Z.-N., Ye, X.-R., Molina, J., Roose, M. L., Mirkov, T. E. (2003). Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the *Citrus tristeza virus* resistance gene (*ctv*) locus in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Plant Physiology*, 131:482-492.