



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Biotechnology Applied to the Genetic Improvement of Citrus Rootstocks. Development of a Protocol for Micropropagation and Adventitious Regeneration for Use in Generating Salt Tolerant Mutant Lines

Biología Aplicada a la Mejora Genética de Patrones de Cítricos. Puesta a Punto de un Protocolo de Micropropagación y Regeneración Adventicia para su Utilización en la Generación de Líneas Mutantes Tolerantes a la Salinidad

**D. Carlos Ignacio Tallón Vila
2015**



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Biología Aplicada a la Mejora Genética de Patrones de Cítricos. Puesta a Punto de un Protocolo de Micropropagación y Regeneración Adventicia para su Utilización en la Generación de Líneas Mutantes Tolerantes a la Salinidad

**D. Carlos Ignacio Tallón Vila
2015**



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Biotecnología aplicada a la mejora genética de patrones de cítricos. Puesta a punto de un protocolo de micropropagación y regeneración adventicia para su utilización en la generación de líneas mutantes tolerantes a la salinidad.

D. Carlos Ignacio Tallón Vila

2015



Biotecnología aplicada a la mejora genética de patrones de cítricos. Puesta a punto de un protocolo de micropropagación y regeneración adventicia para su utilización en la generación de líneas mutantes tolerantes a la salinidad.

TESIS DOCTORAL

CARLOS IGNACIO TALLÓN VILA

DIRECTORA

DRA. OLAYA PÉREZ TORNERO

2015



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. OLAYA PÉREZ TORNERO, Doctora investigadora perteneciente al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) del Departamento de Citricultura
AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Biotecnología aplicada a la mejora genética de patrones de cítricos. Puesta a punto de un protocolo de micropropagación y regeneración adventicia para su utilización en la generación de líneas mutantes tolerantes a la salinidad", realizada por D. Carlos Ignacio Tallón Vila, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 9 de Noviembre de 2015

Fdo. Dra. OLAYA PÉREZ TORNERO

Nunca vayas por el camino
trazado porque conduce hacia
donde otros han ido ya.

Sir Alexander Graham Bell

AGRADECIMIENTOS

El proceso ha sido muy largo desde que entré el primer día en el IMIDA hasta que al fin conseguí depositar mi tesis doctoral. Han sido años de todos los colores, desde el verde más claro al más oscuro, con un sinfín de momentos tantos buenos como malos, donde siempre me he sentido acompañado y apoyado por la infinidad de gente buena que ha compartido mi camino. He de reconocer que soy una persona muy afortunada.

Dicen que es de buen hijo ser agradecido, por lo quiero aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que han pasado alguna vez por mi lado, el haber estado ahí, los que han estado, los que están y los que están por los pelos.

En primer lugar, quería agradecer a mi directora la Dra. Olaya Pérez Tornero su inestimable ayuda en la elaboración de esta tesis doctoral, por sus consejos, correcciones y ánimos cuando los he necesitado y, sobre todo, por haberme dado la oportunidad de cumplir mi sueño. Gracias de todo corazón, sin ti no lo habría logrado.

También quiero agradecer a IMIDA por apostar por la investigación y el desarrollo científico y financiar estos proyectos predoctorales que nos permiten crecer y evolucionar como Región. No solo como institución, si no también como colectivo humano que tan bien me ha tratado, desde los conserjes hasta el director.

Dar las gracias también a todo el personal del Centro de Hemodonación de la ciudad de Murcia y en especial al Dr. José Rivera por permitirme utilizar sus instalaciones para la realización de nuestros experimentos de mutagénesis.

También quiero agradecer a la Dra. María Ángeles Pedreño todo lo que ha hecho por mí. Me acogiste en tu grupo y me trataste siempre con mucho cariño y ese afecto te puedo asegurar que es recíproco. Es de recibo reconocer toda la ayuda que me has brindado, todos los papeles que te he hecho mover y ¡¡siempre corriendo!!

A mis compañeros en mi periplo por la Universidad, por su alegría continua. A Edu, Carlos, Laura, Pepe, María del Mar, Lorena, Ana,... y en especial a Sarai, cuantas manzanas y latas de atún habrán caído, ¿eh? Muchas gracias a tod@s, ¡el laboratorio de peroxidases era siempre la fiesta de la ciencia!

A todos mis COMPAÑEROS Y SIN EMBARGO AMIGOS del departamento de citricultura del IMIDA, a Juan, Robles, Vicente, Isa, Eva, Silvia, Bea, Ana, Montse, Ignacio, Pablo, Fina, Manolo y en especial a Fernando y Manu, por las eternas horas de laboratorio y de cabina. Ni el mismísimo José Luis López Vázquez pudo echar más horas que nosotros ¿eh, compañero? Y tú Manu, mucho ánimo, si yo lo he conseguido, ¡tú también!

A mis compañeros del IMIDA no citrícolas, que también han sido muchos. Las chicas de horticultura (a todas sin excepción), los chicos de biotecnología y sus mallas fantásticas de gusanos de seda, a David y Domingo y su Bituminaria, a la gente de cultivo de tejidos y fruticultura, compañeras de cabina, María, Marga y un enorme etcétera de gente que podía pasar por allí. ¡¡Aquello parecía a veces el camarote de los hermanos Marx!! Vuestra compañía hacía que el ruido de las turbinas fuera menos ruido. También quería agradecer a mis compañeros predoctorales que entraron el mismo día que yo, Paula, Goyo y Almudena, parece que al final ¡¡conseguimos sacarlo!!

A mis compañeros no científicos, por estar a mi lado y hacerme como soy. Muchas gracias.

Pero si hay alguien en este mundo a la que de verdad quisiera incluir en este agradecimiento es mi compañera Mónica. Si alguien ha soportado todos los vaivenes emocionales de estos últimos años y me ha apoyado incondicionalmente, ha sido ella. Sin ella no solo no hubiera terminado esta tesis si no que no sería la persona que soy. ¡¡Muchas gracias Mónica!!

Resumen.

Los cítricos son uno de los principales cultivos a nivel mundial, pero su producción se ve reducida por diferentes tipos de estrés. Entre ellos, la salinidad es el que probablemente causa un mayor impacto, principalmente en zonas áridas y semiáridas que son las zonas principales de producción de cítricos.

La mejora de patrones de cítricos mediante métodos tradicionales se encuentra limitada por factores relacionados con su biología reproductiva. Como alternativa, el desarrollo de herramientas biotecnológicas como la mutagénesis, en combinación con el cultivo de tejidos, deberían ser consideradas como valiosas estrategias para abordar la mejora genética de estas especies.

En el presente trabajo, se ha desarrollado por primera vez un protocolo simple y eficaz de micropropagación, a partir de material adulto, de tres importantes patrones de cítricos. Si bien existen diferencias debidas al genotipo, fueron indispensables, para la multiplicación de los explantos, medios con alta concentración salina, como DKW o MS, y diferentes combinaciones de BA y GA o BA y AD. Durante la fase de enraizamiento, la adición de auxinas ha sido esencial, si bien mientras que en *Macrophylla*, los mejores resultados se obtuvieron con combinaciones de IBA e IAA, en Naranja amarga y Cleopatra, se obtuvieron con IBA y NAA. La aclimatación de los explantos fue casi del 100% para todos los patrones estudiados. Este protocolo podría ser usado para la producción de plantas de patrones de cítricos certificadas y como fuente de material aséptico y genéticamente homogéneo para estudios de comportamiento frente a diferentes estreses y para su uso en programas de mejora genética mediante mutagénesis o transformación.

La evaluación del comportamiento de los cultivos en campo bajo condiciones salinas es realmente complicada debido a la variabilidad de la salinidad y a la importante interacción que se produce con otros factores ambientales. El cultivo de tejidos ofrece una alternativa eficaz para el estudio de los mecanismos implicados en la tolerancia a la salinidad, ya que proporciona una respuesta relativamente rápida en un ambiente controlado. Se analizó la respuesta a la salinidad de explantos de *Macrophylla* en proliferación o en enraizamiento. La tasa de crecimiento de los explantos disminuyó con el aumento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo en los dos tipos de explantos. A nivel fisiológico, la concentración total de clorofila disminuyó de manera significativa con la sal, y este efecto fue más significativo en los explantos enraizados. Para contrarrestar el daño por la sales, los explantos respondieron mediante la síntesis y acumulación de sustancias osmoprotectoras como prolina y glicina betaína. La concentración de Na⁺ y Cl⁻ en los explantos de *Macrophylla* aumentó de manera significativa con la salinidad, pero los niveles fueron más altos en los explantos en proliferación. Los resultados obtenidos sugieren que los importantes daños sufridos en los explantos se deben principalmente a la toxicidad celular de los iones salinos, principalmente al Cl⁻.

Se ha desarrollado un sistema eficiente de organogénesis *in vitro*, para explantos nodales adultos de *Macrophylla* y Naranja amarga, que podría ser utilizado para la introducción de variación genética a través de transformación o mutagénesis. El protocolo fue optimizado variando la concentración de los reguladores del crecimiento, las condiciones de incubación, el medio basal y el tipo de explanto usado. La adición de BA (2-3 mg/l) y el periodo de inducción en oscuridad (3-4 semanas) fueron indispensables para la regeneración de los explantos y el tipo de explanto o el medio basal tuvieron una gran influencia. Los mejores resultados fueron obtenidos con segmentos nodales, frente al uso de segmentos internodales, y la eficiencia organogénica fue superior cuando se utilizaron explantos de la zona apical del brote.

Abstract.

Citrus fruits are regarded as the major culture around the world, but citrus production is limited by abiotic stress. Among them, salinity is probably the most impacting adverse condition, mainly in arid and semiarid regions, where citrus are produced.

The improvement of *Citrus* rootstock via conventional breeding strategies is normally hampered by several factors related to their reproductive biology, such as large tree size, polyembryony, high level of heterozygosity, and long juvenile period. As alternatives, biotechnological techniques, such as plant tissue culture in combination with mutagenesis, should be looked on as valuable strategies for improvement of *Citrus* rootstocks.

In the present work, has been developed a simple and useful methods of micropropagation from mature plants of alemow, Sour orange and Cleopatra mandarin, by optimization of culture medium (nutrients salts and growth regulators), since introduction of plant material, multiplication and rooting *in vitro* to acclimatization *ex vitro*. In general, although differences due to the genotype were observed, in all rootstocks, best results in micropropagation phase were obtained in DKW-based culture medium in combination with BA and GA. In the rooting stage, IBA and IAA combinations for alemow, and NAA and IBA for Cleopatra mandarin or Sour orange produced highest rooting percentages. Success during acclimatization was close to 100 % for all rootstocks. These micropropagated explants could be used for the production of certified citrus rootstocks plants and as an ideal source of aseptic and homogeneous material for different transformation or mutagenesis experiments, and the protocol of micropropagation described in this study can be easily applied for the effective propagation of genetically modified plants.

Evaluating field performance crops under saline conditions is notoriously difficult because of the variability of salinity within fields and the enormous potential for interactions with other environmental factors. *In vitro* tissue culture is a simple system that offers a suitable alternative to studying physiological mechanisms of tolerance to salinity, since it provides relatively fast responses, a short generation time and a controlled environment. In the present study, the possible use of *in vitro* culture to evaluate the growth and physiological responses to salt-induced stress in cultivated explants of alemow was analyzed. All growth parameters were decreased significantly by these NaCl treatments. At physiological level, in both type of explants, a reduction in chlorophyll contents was observed. For osmotic adjustment, high concentrations of compatible solutes (proline and quaternary ammonium compounds QAC) were accumulated in tissues. The Na⁺ and Cl⁻ concentrations in the explants increased significantly with the salinity level, but Cl⁻ levels were higher, so we suggest that the important deleterious effects in the *in vitro* explants of *Citrus macrophylla* grown at increasing NaCl concentrations were due mainly to toxic effects of saline ions, particularly Cl⁻, at the cellular level. There is evidence that *in vitro* nodal segments of *Citrus macrophylla* respond to salinity in a similar way to the whole plant, so this technique could be used for pre-selection and evaluation of salt tolerance.

An efficient system of regeneration via organogenesis is the first step in the successful introduction of genetic variation by mutagenesis or genetic transformation. In the present study, we have evaluated the effect of the composition of culture media, incubation conditions, and explant type and origin, on *in vitro* organogenesis of two citrus rootstocks, alemow and sour orange, using mature tissues taken from *in vitro*-proliferated shoots. Explants from two citrus rootstocks showed similar responses on the regeneration medium. Best results were obtained when explants from apical shoots were used and

cultured in darkness in DKW basal medium in combination with BA. This regeneration protocol could be integrated in a *Citrus* rootstocks salinity breeding program.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. LOS CÍTRICOS..... | 2 |
| 1.1. Importancia de cultivo de cítricos..... | 3 |
| 1.2. Limitaciones de la producción de cítricos. Influencia del patrón..... | 5 |
| 1.3. Características de los portainjertos utilizados en la tesis doctoral..... | 8 |
| 1.3.1. <i>Citrus macrophylla</i> (Wester) (Macrophylla)..... | 9 |
| 1.3.2. <i>C. aurantium</i> (L.) (Naranja amarga)..... | 10 |
| 1.3.3. <i>C. reshni</i> (Hort ex Tanaka) (Cleopatra)..... | 11 |
| 2. SALINIDAD..... | 13 |
| 2.1. Salinidad en los cítricos..... | 16 |
| 3. MEJORA GENÉTICA..... | 18 |
| 3.1. Problemática de la mejora de los cítricos..... | 18 |
| 3.2. Mutagénesis inducida..... | 20 |
| 3.2.1. Mutagénesis química..... | 21 |
| 3.2.2. Mutagénesis física..... | 21 |
| 3.3. Mejora genética de patrones de cítricos..... | 24 |
| 3.4. Alternativas biotecnológicas para la mejora de los cítricos..... | 25 |
| 3.4.1. Micropropagación..... | 26 |
| 3.4.1.a. Micropropagación en cítricos..... | 26 |
| 3.4.1.b. Salinidad <i>in vitro</i> | 29 |
| 3.4.2. Regeneración adventicia..... | 21 |
| 3.4.1.a. Regeneración adventicia en cítricos..... | 34 |
| 3.4.3. Mutagénesis <i>in vitro</i> | 36 |
| OBJETIVOS..... | 39 |
| CONCLUSIONES..... | 42 |
| ARTÍCULOS..... | 47 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 87 |

INTRODUCCIÓN

1. LOS CÍTRICOS.

Los cítricos pertenecen a la familia Rutaceae, subfamilia Aurantioideae. Son árboles de hoja perenne con orígenes tropicales y subtropicales. Los frutos tienen forma de baya en hesperidio, procedentes de un ovario multicarpelar, la pulpa contiene vesículas de zumo y la corteza es coriácea con alta densidad de glándulas de aceites esenciales.

La ordenación de la subfamilia *Aurantioideae* resulta compleja debido a la gran capacidad de hibridación que poseen los cítricos, incluso entre diferentes géneros, tienen una elevada tasa de mutaciones espontáneas y, como consecuencia de la apomixis, las variaciones genéticas tienden a perpetuarse (Davies y Albrigo, 1994). Los tres géneros de cítricos cultivados en la actualidad son:

- 1) *Fortunella* (kumquat),
- 2) *Poncirus*, formado por especies de hoja trifoliada caduca, de gran resistencia al frío y utilizados como portainjertos.
- 3) *Citrus*, que incluye las especies más importantes desde el punto de vista agronómico como las naranjas dulces (*C. sinensis* [L.] Osb.), mandarinas (*C. reticulata* Blanco y *C. unshiu* Marc.), pomelos (*C. paradisi* Macf.), limones (*C. limon* Burm. f.) y limas (*C. aurantifolia* L.).

La sistemática del género *Citrus* también es controvertida ya que según Swingle y Reece (1967) este género está formado por 16 especies mientras que según Tanaka (1977) comprende 162 especies. Análisis filogenéticos realizados por Scora (1975) y Barret y Rhodes (1976), indican que únicamente hay tres especies verdaderas dentro de los cítricos cultivados: *C. medica* L. (citrón), *C. reticulata* Blanco (mandarina) and *C. maxima* (Burm.) Merr. (pumelo) y estudios moleculares más recientes han confirmado el papel central de estas tres especies (Nicolisi y col., 2000; Froelicher y col., 2011). El resto de especies de cítricos como *C. aurantium* L. (Naranja amarga), *C. limon* (L.) Burm.f. (limón), *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. (lima), *C. sinensis* (L.) Osb. (naranja) y *C. paradisi* Macfad. (pomelo), se consideran especies secundarias que han derivado de hibridaciones de estas especies verdaderas.

La gran mayoría de las especies de los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus* son diploides, con un número básico de cromosomas $x = 9$ ($2x = 2n = 18$), excepto *Fortunella hindsii* que es tetraploide ($4x = 2n = 36$). El tamaño estimado del genoma de

cítricos es de 382 Mb (Arumuganathan y Earle, 1991), inferior al de arroz (419 Mb) (Goff y col., 2002) y unas tres veces superior al tamaño del genoma de *Arabidopsis* (125 Mb) (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático, incluyendo desde Arabia oriental hasta Filipinas y desde el Himalaya hacia el sur, hasta Indonesia ó Australia. Dentro de esta gran región, el noreste de la India, el norte de Birmania y la provincia de Yunnan (en el centro-sur de China), se consideran los tres centros de origen más importantes (Gmitter y Hu, 1990). Actualmente el cultivo de los cítricos se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales comprendidas entre las latitudes 44° N y 41° S (Agustí, 2003).

1.1 Importancia del cultivo de los cítricos.

Los cítricos, incluyendo naranjas, mandarinas, limones, limas y pomelos, se cultivan en más de un centenar de países, en una superficie total de 9.7 mill. Has y alcanzan una producción de 135.7 mill. Tm, cifra muy superior a la de otras frutas como plátanos (5.1 mill. Has y 106.7 mill. Tm) o uvas (7.2 mill. Has y 77.2 mill. Tm) (FAO, 2013).

España, con una producción de en torno a 6.4 millones de toneladas, ocupa el sexto lugar en la producción mundial de cítricos, precedido de China, Brasil, India, EEUU y México (Fig. 1). La producción de naranjas es la mayoritaria a nivel mundial (57.7%), seguida de la de mandarinas (23.2%), limones (12.3%) y pomelos (6.8%) (FAO, 2013). España es el país con el mayor volumen de exportación de cítricos del mundo, para su consumo en fresco, con más de 3.4 mill. Tm, siendo el primer exportador mundial de naranjas, mandarinas y limones (FAO, 2009) y su mercado más importante es la UE, principalmente Alemania y Francia, países a los que destina más del 50% de la exportación (Magrama, 2014). A pesar de que en los últimos años ha aumentado la competencia internacional en el sector de la citricultura, España se mantiene como el primer país exportador de fruta fresca y esta posición de liderazgo se debe en gran medida a la dinámica varietal que ha permitido ofrecer en los mercados internacionales las mejores variedades existentes en cada momento (Navarro y col., 2006).

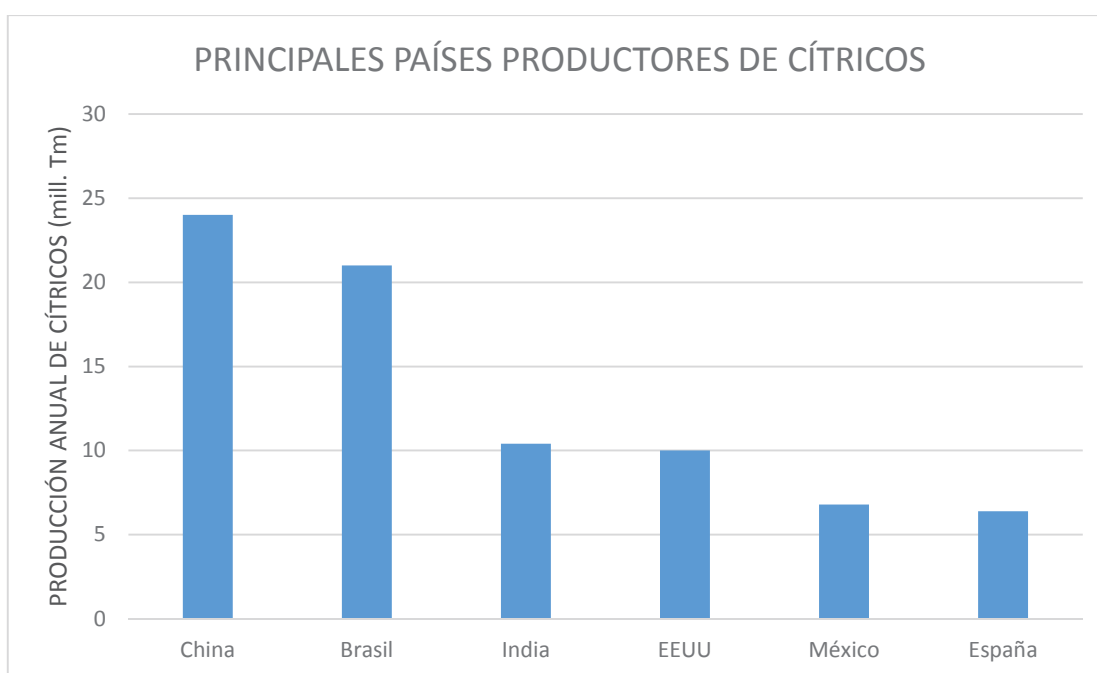


Figura 1. Principales productores mundiales de cítricos (FAO, 2013)

Los cítricos de mayor producción en España son las naranjas (53.3%), seguidas de las mandarinas (33.2%) y los limones (12.3%). La Comunidad Valenciana lidera la producción de naranjas (59%) y mandarinas (73.3%), mientras que la Comunidad de Murcia lidera la producción de limones (55%) (Magrama, 2014). Esta producción supone para España, además de un gran beneficio social, una parte importante de su PIB. De la adecuación al mercado y de la calidad de esta producción depende, en cierta manera, este beneficio económico y social.

En los últimos años la producción cítrica española está siendo sometida a una fuerte competencia por parte de otros países mediterráneos y sudamericanos. Hoy día, los distintos sectores cítricos están de acuerdo en que, para aumentar la competitividad de nuestros cítricos, es absolutamente imprescindible ofrecer productos de una elevada calidad, ya que los consumidores de los países europeos como Alemania, Francia, Italia y Reino Unido, principales destinatarios de nuestras exportaciones (FEPEX, 2014), muestran unas exigencias cada vez más importantes en relación con la calidad de la producción. Así, la obtención de patrones capaces de tolerar estreses tanto bióticos como abióticos y que confieran a las variedades alta calidad comercial y elevada producción, de manera que se satisfagan las exigencias del mercado, constituyen los principales objetivos esenciales ligados a la mejora genética vegetal de los cítricos (Agustí, 2003).

1.2. Limitaciones de la producción de cítricos. Influencia del patrón.

Los cítricos están sometidos a distintos estreses tanto de tipo abiótico, como sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas, como de tipo biótico, donde se incluyen plagas y enfermedades, provocadas principalmente por hongos, bacterias y virus. Algunas enfermedades a las que son susceptibles los cítricos han tenido gran repercusión en las distintas zonas citrícolas como son la gomosis producida por el hongo *Phytophthora sp.* ó el virus de la tristeza de los cítricos (CTV). La aparición de estas enfermedades repercutió seriamente en la citricultura mundial. En el caso de la gomosis, esta enfermedad estuvo a punto de hacer desaparecer el cultivo y sólo se consiguió controlar con el uso de patrones como el Naranja amargo (*Citrus aurantium*) que sustituyeron a los pies francos utilizados hasta ese momento (Giner, 1893; Rullán, 1896). Sin embargo, con el uso de este patrón se crearon las condiciones idóneas para la aparición de epidemias sucesivas de tristeza, que fue el resultado directo de la interacción del virus de la tristeza de los cítricos con las distintas variedades injertadas sobre este patrón. El resultado de esta enfermedad, en los años 30, fue dramático para la industria citrícola e incluyó la pérdida a nivel mundial de casi 100 millones de árboles injertados sobre Naranja amargo y la necesidad de utilizar nuevos portainjertos tolerantes a la tristeza para reconstruir la citricultura en los países afectados (Moreno y col., 2008).

En España, la tristeza causó la muerte de más de 50 millones de árboles de naranja dulce, mandarino y pomelo injertados sobre Naranja amargo. Sólo se consiguió controlar la enfermedad mediante la utilización de patrones alternativos a Naranja amargo que resultaron tolerantes a la enfermedad, fundamentalmente los citranges ‘Troyer’ y ‘Carrizo’, así como el mandarino Cleopatra (Forner, 1985). Esta cualidad de resultar tolerantes a CTV, convirtieron a los citranges en los principales patrones utilizados en la citricultura española. En la actualidad CTV se encuentra presente con incidencia desigual en casi todas las zonas citrícolas del mundo. Es prácticamente endémico en Asia, Australia, África del Sur y gran parte de Sudamérica, mientras que tiene una incidencia mínima en los países del Mediterráneo (Cambra y Moreno, 2000; Moreno y col., 2008).

En la actualidad, el cultivo franco de cítricos es inexistente debido a la sensibilidad de las distintas variedades de cítricos a las enfermedades, condiciones ambientales, etc.

La elección del patrón es fundamental porque:

- 1) Permite la adaptación de la variedad a las condiciones particulares del suelo confiriendo tolerancia a factores desfavorables como caliza, sequía y salinidad.
- 2) Confiere tolerancia ó resistencia a ciertas enfermedades.
- 3) Proporciona cierto control sobre la calidad y cantidad de la cosecha, pudiendo adelantar o retrasar la producción y confiere mayor uniformidad de la plantación.

Además, el patrón influye en muchas de las características de una variedad como el vigor, el desarrollo y el tamaño del árbol, la cosecha y el tamaño y calidad del fruto (Agustí, 2003).

Los portainjertos de cítricos normalmente no se corresponden con la misma especie del injerto, sino que pueden ser otra especie, híbridos o pertenecer a otro género botánico.

El patrón perfecto y universal no existe y el éxito en la elección de un determinado patrón viene determinado principalmente por las condiciones edafoclimáticas de cada zona y por la variedad a injertar (Agustí, 2003). Así, en países como Brasil se utilizan *Poncirus trifoliata* y *C. jambhiri*, en Sudáfrica el híbrido Citrumelo CPB 4475, citrango y *C. jambhiri*, en Australia *P. trifoliata*, citrango ‘Troyer’ y ‘Carrizo’, y en países como China, Japón o Argentina, el principal patrón es *P. trifoliata* (Agustí, 2003). En España, los principales patrones de cítricos utilizados son citrango ‘Carrizo’, *C. macrophylla* y mandarino Cleopatra. En la Región de Murcia, debido a las características edafoclimáticas de la zona, con bajas precipitaciones y práctica ausencia de heladas, convierten a *Macrophylla* en el principal patrón utilizado en la citricultura murciana (Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente, 2013), seguido por citrango ‘Carrizo’, mandarino Cleopatra y Naranja amarga (Fig. 2).

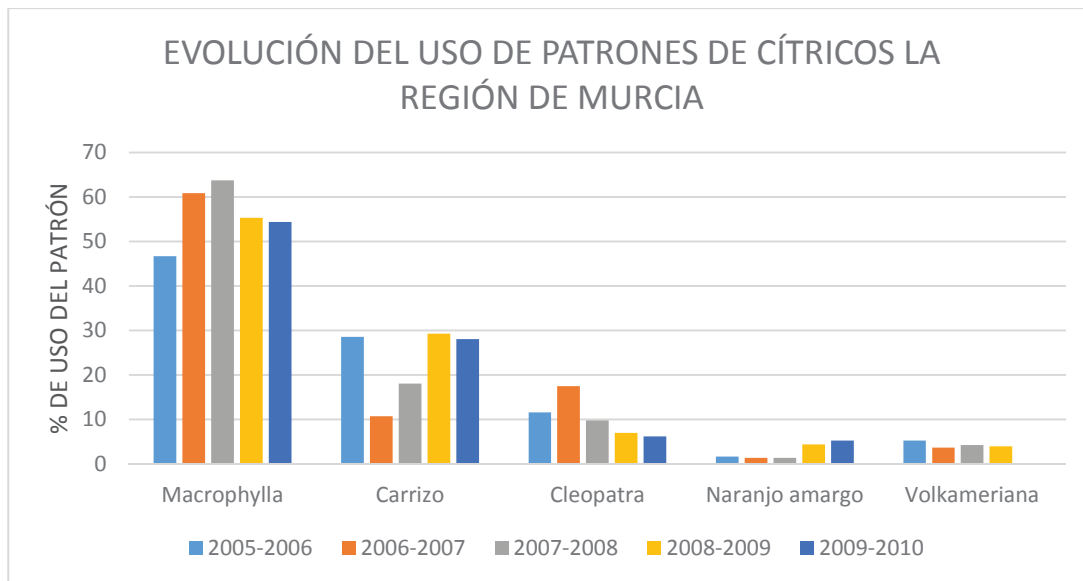


Figura 2. Evolución en el uso de patrones en la citricultura murciana. Elaboración propia a partir de datos proporcionados por la Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente de la Región de Murcia.

Por otro lado, en el cultivo de limonero, los principales patrones utilizados en la Región de Murcia en el período 2005-2010 son *Citrus macrophylla* y *C. aurantium* con un porcentaje de 88.15 % y 9.1 %, respectivamente (Fig. 3), mientras que en los casos donde los altos niveles salinos impiden la utilización de estos patrones, se utiliza como patrón el mandarino Cleopatra debido a la gran tolerancia que presenta este patrón frente a la salinidad. El empleo de otros patrones como *C. volkameriana* y citrange ‘Carrizo’ es prácticamente testimonial, suponiendo en conjunto con Cleopatra un total de menos del 3% entre estos tres patrones (Fig. 3).

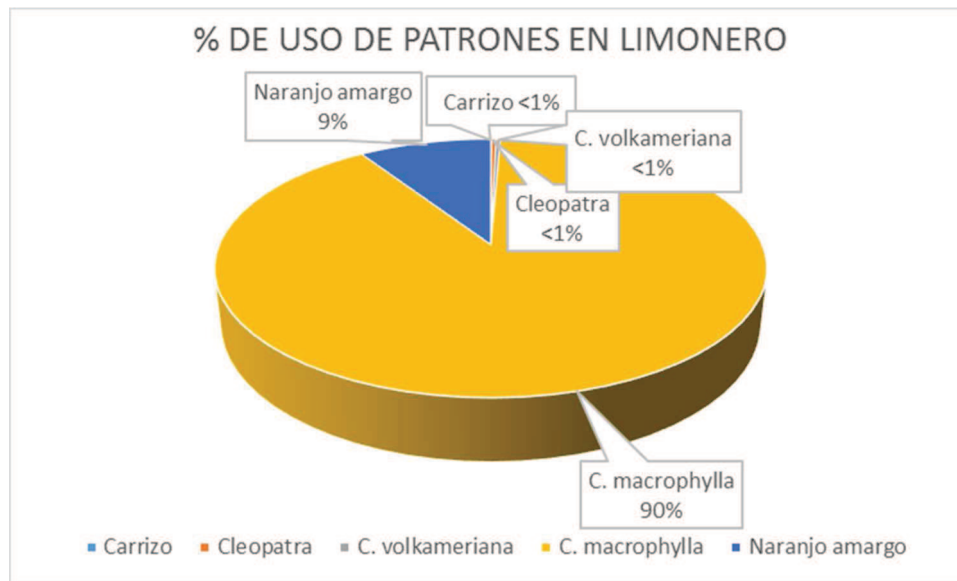


Figura 3. Porcentaje de uso de patrones en el cultivo de limonero en Murcia durante el período 2005-2010. Elaboración propia a partir de datos proporcionados por Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente de la Región de Murcia.

Una de las principales exigencias de la citricultura española y mundial es la disponibilidad de nuevos patrones con mejores características de los que se utilizan actualmente (como por ejemplo el citrange ‘Carrizo’ que hoy en día se utiliza en el 61% de las nuevas plantaciones en España). Por un lado existe la exigencia de disponer de patrones con buenas características agronómicas, como por ejemplo Naranja amargo o *C. macrophylla*, y por otro lado la exigencia de que los nuevos patrones sean resistentes a las enfermedades más comunes como el *Poncirus trifoliata* que es resistente al virus de la tristeza.

1.3. Características de los portainjertos utilizados en la tesis doctoral

A continuación se describen de manera breve algunos de los principales patrones utilizados en la citricultura murciana y española y que han sido objeto de estudio en esta tesis doctoral: *Citrus macrophylla*, *C. aurantium* y *C. reshni*.

1.3.1. *Citrus macrophylla* (Wester) (Macrophylla)

C. macrophylla es una especie híbrida, posiblemente de *C. celebica* y *C. grandis*, nativa de Filipinas (Fig. 4). Morfológica y genéticamente es muy similar a limones y limas. A pesar de que este patrón resulta sensible al Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV), su combinación con limonero sí resulta tolerante, por lo que en la actualidad es el principal patrón utilizado en los viveros de la Región de Murcia, tanto para el cultivo del limón como de otros cítricos (Fig. 2 y 3), ya que este patrón incrementa la productividad y el rendimiento de los cultivos de limón y además, producen limones con bajos niveles de acidez (Pérez-Pérez y col., 2005). Sobre la variedad induce mucho vigor, una rápida entrada en producción, una productividad muy alta y una marcada precocidad de sus frutos, aspectos muy importantes económicamente.



Figura 4. Árbol de *Citrus macrophylla*.

Los árboles se desarrollan bien en suelos calcáreos y arenosos que tengan pH elevado. Este patrón tiene un sistema radicular denso y profundo que confiere cierta tolerancia frente a la sequía y salinidad, pero resulta muy sensible a las heladas y a la asfixia radicular, razones por las cuales se adapta perfectamente a la Región de Murcia, donde las heladas son muy escasas. Respecto a las enfermedades, este patrón resulta

tolerante a exocortis y resistente a *Phytophthora sp.*, aunque resulta sensible a *Xiloporosis sp.* y nemátodos (Agustí, 2003).

1.3.2. *C. aurantium* (L.) (Naranja amargo)

El Naranja amargo (Fig. 5), al igual que *C. macrophylla*, a pesar de ser un patrón sensible a CTV, su combinación con limonero si resulta tolerante, razón por la que subsisten plantaciones adultas y se sigue utilizando en la actualidad en este cultivo, siendo el segundo patrón en importancia en el cultivo del limón tras *C. macrophylla* (Fig.2).



Figura 5. Árbol de Naranja amargo.

La masiva utilización de este patrón se debe a las buenas características agronómicas que presenta, ya que resulta muy compatible con las diversas especies comerciales, les confiere una gran productividad y buena calidad de la fruta. De fácil multiplicación en vivero y bastante homogeneidad de las plantas jóvenes, a pesar del grado reducido de poliembrionía de sus semillas. Con la variedad ‘Fino’ tiene buena afinidad, pero entra tarde en producción, por lo que suele combinarse con la variedad ‘Verna’ (Agustí, 2003). En comparación con *Macrophylla* entra en producción más tarde y no es tan productivo, pero la calidad de la fruta es mayor.

Este patrón es resistente a la asfixia radicular y a las heladas y resulta tolerante a la clorosis férrica (Forner-Giner y col., 2010). Con excepción de CTV, este patrón resulta resistente a todas las enfermedades virales y es resistente a hongos como *Phytophthora sp.*

y *Armillaria sp.* (Agustí, 2003). Respecto a la salinidad, se considera más sensible que mandarino Cleopatra y *Citrus macrophylla* (Cerdá y col., 1977; García-Lidón, 1998).

1.3.3. *C. reshni* (Hort ex Tanaka) (Cleopatra)

Genéticamente pertenece al grupo de las mandarinas (Fig. 6). Es el tercer patrón más utilizado en España después de citrange ‘Carrizo’ y *C. macrophylla*. (Agustí, 2003) (Fig. 2).



Figura 6. Árbol de mandarino Cleopatra.

Es un patrón tolerante al virus de la tristeza, exocortis, psoriasis y xiloporosis, aunque sensible a *Armillaria mellea* y presenta tolerancia media a *Phytophthora sp.* (Agustí, 2003). Es un patrón muy sensible al encharcamiento (Arbona y Gómez-Cadenas, 2008), pero al igual que *C. aurantium* resulta tolerante a la clorosis férrica (Forner-Giner, 2010) y es considerado un patrón resistente a la salinidad (López-Climent y col., 2008), por lo que se utiliza en zonas con elevados contenidos de cal o problemas de salinidad (Amorós, 2003).

Su comportamiento en vivero no es bueno, requiriendo hasta dos años de semillero y alargando de este modo el período total de producción de plantones, pero su principal defecto es la irregularidad que induce sobre el desarrollo de los árboles, a los que puede conferir además un vigor reducido. Con todo ello, en general, la entrada en producción de la plantación se demora ligeramente y su producción es más reducida en comparación con otros patrones. A pesar de ello, la producción y la calidad del fruto de

las variedades injertadas sobre él son buenas, aunque el calibre del fruto es pequeño y la piel más fina (Agustí, 2003). No se ha observado incompatibilidad con ninguna variedad comercial (Castle, 1987; Castle y col., 1993).

2. SALINIDAD.

El desarrollo y la productividad de las plantas están fuertemente influenciados por un amplio rango de condiciones ambientales estresantes, que incluyen sequía, salinidad y temperatura. Estos estreses abióticos pueden reducir el rendimiento de los cultivos en más de un 70% (Ashraf, 2004; Agarwal y col., 2006), lo cual supone un serio problema en el suministro de alimentos para una población mundial en continuo crecimiento.

La salinidad es uno de los principales estreses abióticos y provoca efectos adversos sobre el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos, llegando a ser incluso más prevalentes como resultado de la agricultura intensiva (Zhu, 2002). El estrés salino afecta a más de 800 millones de hectáreas en todo el mundo (FAO, 2008), lo que representa más el 6% del área total de la tierra. Principalmente, la salinidad tiene un origen natural por la acumulación de sales presentes en el suelo por la dilución debida al agua de lluvia, aunque una gran extensión de tierras cultivadas están expuestas a los efectos producidos por la salinidad secundaria como consecuencia de la transformación del terreno con fines agrícolas y la irrigación de los cultivos (Munns, 2005).

Las sales presentes en el agua de riego se acumulan a un ritmo más o menos acelerado y determinan la degradación y la pérdida del valor agrícola de los suelos. Este problema es más acuciante en zonas áridas y semiáridas, donde las precipitaciones son insuficientes para lavar las sales solubles aportadas al suelo. La historia de las grandes civilizaciones es, en gran medida, la historia de la agricultura de irrigación, y ésta no puede perdurar ilimitadamente sin un control adecuado del equilibrio entre la salinidad de las aguas de riego, la salinidad nativa del suelo y la capacidad de drenaje del mismo, para permitir que el exceso de sales sea lixiviado de la zona radicular de los cultivos. (Gárate y Bonilla, 2000).

En los últimos años, se están haciendo grandes esfuerzos para lograr variedades tolerantes a la salinidad, aunque estos avances son lentos debido probablemente a la complejidad del estrés salino, como demuestra el hecho de que no se conocen completamente las bases fisiológicas de la tolerancia en las plantas (Munns y Tester, 2008).

El efecto negativo de la salinidad en los cultivos se debe a dos tipos de estrés (Ferguson y Grattan, 2005) (Fig. 7):

- el estrés hídrico, al reducirse la absorción de agua por el efecto osmótico.
- la toxicidad específica o iónica relacionada con la excesiva absorción de sodio y cloruro, que desencadena un desequilibrio nutricional en la planta y provoca estrés oxidativo.

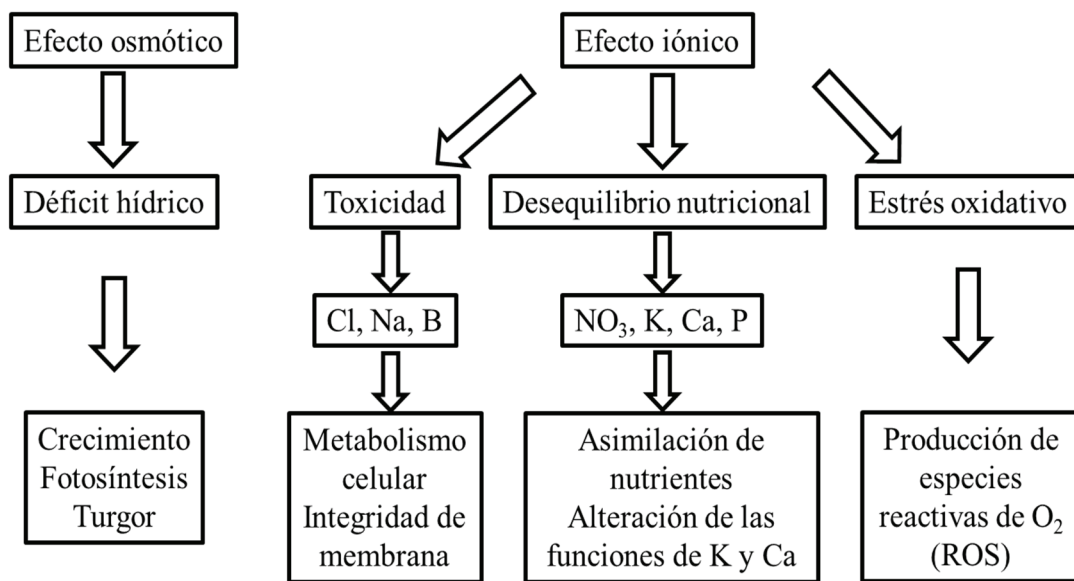


Figura 7. Efectos causados por la salinidad en plantas. Efecto osmótico e iónico.

En el caso del estrés hídrico, se produce una disminución en el potencial hídrico intracelular, reduciéndose el turgor celular, el crecimiento y la fotosíntesis, produciéndose la deshidratación de la planta (Gómez-Cadenas y col., 1998).

En el caso de la toxicidad, la presencia de altas concentraciones de iones salinos, como Cl^- y Na^+ , en las células vegetales conduce a perturbaciones en la cinética del transporte de dichos iones. Como consecuencia de la acumulación de estos iones en el apoplasto, se produce un estrés hiperosmótico, desequilibrio iónico y toxicidad (Niu y col., 1995; Zhu, 2002). En este contexto, los altos niveles salinos restringen la absorción de agua, conduciendo a la pérdida de agua en el interior de la célula, lo cual podría alterar eventualmente el potencial osmótico de las células expuestas a la salinidad (Türkan y Demiral, 2009). Además, se produce un desequilibrio nutricional, induciéndose deficiencias de algunos nutrientes esenciales como K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y NO_3^- (Bañuls y col.,

1990; Zekri y Parson, 1990). En estas condiciones la adquisición y distribución de nutrientes minerales por la planta pueden ser alteradas por la fuerza iónica de la solución del suelo y por la interacción directa de los iones que predominan en el medio con la adquisición y transporte de nutrientes en la planta (Ruiz y col., 1997)

La exposición a estrés salino en las plantas provoca el cierre de estomas, de forma que se restringe la entrada de CO₂ en la hoja, se induce una reducción en el contenido de clorofilas, afecta al transporte electrónico e inhibe la actividad del fotosistema II, reduciendo la tasa fotosintética neta y la acumulación de carbohidratos (Arbona y col., 2005; García-Sánchez y Syversten, 2006), lo cual esté probablemente asociado a la reducción en la difusión del CO₂ en los estomas (Paranychianakis y Chartzoulakis, 2005) como consecuencia de la acumulación de sales en los cloroplastos (Sudhir y Murthy, 2004). Esta reducción en la actividad fotosintética está directamente relacionada con la reducción en el rendimiento de los cultivos (Meloni y col., 2003), aunque el mecanismo por el cual el Cl⁻ inhibe la fotosíntesis no está claro.

Para defenderse de los efectos nocivos de la salinidad, las plantas responden a los estreses abióticos mediante modificaciones celulares, fisiológicas y bioquímicas, desarrollando un arsenal de sofisticados mecanismos de defensa para poder adaptarse a dichas condiciones desfavorables.

Una de estas modificaciones implica la producción y acumulación de pequeñas moléculas orgánicas muy solubles en agua y que no resultan tóxicas a altas concentraciones denominadas solutos compatibles (Chen y Murata, 2011). Entre estas sustancias se encuentran compuestos de amonio cuaternario como la glicina betaína (GB) y aminoácidos como la prolina. La producción de estos osmolitos protectores es una repuesta universal de las plantas sometidas a estrés salino (Zhang y col., 2004; Sahi y col., 2006) y el incremento en su producción ha sido correlacionada con la tolerancia a estrés salino en plantas (Ashraf y Akram, 2009). Estos compuestos juegan un papel esencial en la protección de las estructuras celulares y proteínas indispensables para una actividad fisiológica normal (Serraj y Sinclair, 2002; Ashraf y Foolad, 2007). Estas moléculas actúan sobre el ajuste del potencial osmótico, resultando esenciales para la regulación coordinada entre el volumen citoplasmático y vacuolar que es imprescindible para el mantenimiento del turgor celular en células expuestas a estrés salino (Munns, 2005).

La presencia de sales en la planta provoca un descenso en la tasa fotosintética que provoca la producción de Sustancias reactivas de Oxígeno (ROS) en los cloroplastos

(Meloni y col., 2003). Las ROS son moléculas extremadamente reactivas y pueden interactuar con un gran número de macromoléculas como ADN, proteínas, lípidos y pigmentos, que pueden inducir procesos degradativos en las células vegetales cuando no se mantienen bajo control dichas moléculas (Mittler, 2002). Por lo tanto, un nivel excesivo de ROS es considerado como un indicador de estrés y resulta esencial para las plantas equilibrar la generación y eliminación de estas moléculas (Arbona y col., 2008).

Junto con estas moléculas, existen otros marcadores que indican el grado de daño oxidativo que están sufriendo las plantas, como por ejemplo el malondialdehído (MDA), que es un subproducto de la peroxidación de lípidos en las membranas biológicas (Wong y col., 1987).

2.1. Salinidad en los cítricos.

Los cítricos son cultivados principalmente en climas áridos, donde la salinidad ocurre de manera natural y este fenómeno se encuentra incrementado por el uso de fertilizantes en el agua de riego. En comparación con otros cultivos, los cítricos son considerados como unos de los más sensibles a la salinidad, aunque su capacidad de tolerancia a la salinidad depende en gran medida de la especie y del patrón utilizado (Maas, 1993). Este problema ha sido estudiado desde diversos puntos de vista como el agronómico (Zekri, 1993; Ruíz y col., 1997), bioquímico (Cerezo y col., 1997) y molecular (Gueta-Dahan y col., 1997; Brumós y col., 2009).

La salinidad en cítricos provoca un descenso en el crecimiento vegetativo y afecta a la cantidad y calidad de los frutos, reduciéndose el número de frutos por árbol, peso de los frutos y su diámetro, abscisión prematura del fruto, incremento de la corteza del fruto y reducción en el porcentaje de zumo, factores todos ellos negativos desde el punto de vista comercial (Primo-Millo y col., 2000; García Sánchez y col., 2002; 2003)

Los primeros síntomas debidos a la salinidad se observan directamente en las hojas (fig. 8), donde se produce una progresiva quemadura en los bordes y puntas que terminará con la abscisión foliar. Además, junto con los daños en las hojas, la salinidad produce otros daños en los cítricos como son necrosis de brotes y yemas y, finalmente, la muerte de la planta (Storey y Walker, 1999; Ferguson y Grattan, 2005).



Figura 8. Efecto de la salinidad en hojas de cítricos.

Bajo condiciones de estrés salino, los daños en los cítricos están provocados principalmente por la toxicidad del Cl^- más que a la acumulación del Na^+ (Munns y Tester, 2008; Teakle y Tyerman, 2010) ya que el Na^+ tiene una mayor tendencia que el Cl^- a ser secuestrado en las raíces y otras partes leñosas impidiendo su transporte al resto de la planta (Ferguson y Grattan, 2005). Sin embargo, el Cl^- no encuentra estas limitaciones y accede más fácilmente a las hojas, convirtiéndose en el componente tóxico más significativo de la solución salina (Munns y Tester, 2008). Se ha sugerido que la tolerancia a la salinidad está asociada principalmente a las características del patrón para la reducción de la absorción de cloruro o de su transporte desde la parte radicular a la aérea (Moya y col., 1999; 2003; Levy y Syversten, 2003).

Al igual que la mayoría de las plantas, los cítricos responden fisiológicamente a la salinidad del medio con el incremento en la producción de solutos compatibles como GB (Fu y col., 2011) y prolina (Gómez-Cadenas y col., 1998; Arbona y col., 2003; Chatzissavvidis y col., 2014). Además, este incremento en la producción de prolina también ha sido observado en cítricos en condiciones de inundación del sustrato (Arbona y col., 2008) y sequía (Molinari y col., 2004), por lo que parece ser una respuesta común de los cítricos a factores ambientales adversos. Así mismo, el incremento en el daño producido por la salinidad se refleja en un incremento en los niveles celulares de MDA (Arbona y col., 2008; Hossain y col. 2009).

3. MEJORA GENÉTICA.

La mejora genética vegetal se puede definir como “la ciencia cuyo objetivo es cambiar el genotipo, mejorándolo para un determinado medio y según el aprovechamiento para el que se vaya a destinar de acuerdo con las necesidades del hombre” (Frankel, 1958). Además, es una elección hecha por el hombre de las mejores plantas escogidas dentro de una población en la cual exista variabilidad. En otras palabras, la selección es posible gracias a la existencia de variabilidad o a la capacidad de generar dicha variabilidad.

Así, las tres principales premisas para el planteamiento de cualquier programa de mejora genética vegetal son:

1. La existencia de variabilidad o bien la capacidad para crearla.
2. La capacidad de detectar dicha variabilidad, o lo que es lo mismo, la habilidad del mejorador para observar las diferencias que puedan tener valor económico entre plantas de la misma especie y/o la existencia de técnicas capaces de medirlas.
3. La capacidad de manipular dicha variación para producir un nuevo cultivar estable.

3.1. Problemática de la mejora de los cítricos.

La mejora genética de los cítricos mediante hibridaciones en campo se encuentra muy limitada debido a sus características genéticas y reproductivas, lo que ha dado como resultado solo la selección de unas pocas variedades y patrones de cítricos (Soost y Cameron, 1975; Gmitter y col., 1992).

Entre las principales limitaciones para la mejora de los cítricos podemos citar la esterilidad del óvulo y/o grano de polen, autoincompatibilidad, poliembrionía, alta heterocigosidad y un largo período de juvenilidad (Gmitter y col., 1992).

Debido a su naturaleza heterocigótica, la hibridación sexual para crear nuevos genotipos resulta en una substancial variación de los caracteres en la progenie reduciendo las posibilidades de recuperación de genotipos con los caracteres deseados (Herrero y col., 1996; Soost y Roose, 1996).

La poliembrionía o embrionía nucelar (apomixis) es una característica muy extendida en cítricos y es uno de los mayores impedimentos para la recombinación genética (Cameron y Frost, 1968; Soost y Roose, 1996). Todos los cítricos son apomícticos a excepción de cidros, zamboas, clementinos y algunos mandarinos. En estos casos, las semillas producen embriones nucleares, procedentes de células de la nucela del ovario de la flor, idénticos a la planta madre, que limitan el desarrollo del embrión zigótico, haciendo muy difícil la recuperación de progenie sexual para la selección de los caracteres deseados, ya que frecuentemente, los embriones nucleares son más vigorosos que el zigótico que en muchos casos no completa su desarrollo y aborta. La condición de apomixis ofrece ventajas en relación a la propagación a través de semillas y por la fidelidad genética que brinda la reproducción asexual, sin embargo, es un inconveniente a la hora de buscar individuos recombinantes para obtener genotipos de mejor aptitud agronómica (Miles, 2007). La consecuencia es que en la práctica sólo suelen usarse los escasos genotipos monoembriónicos no apomícticos como parentales femeninos.

Por otra parte, muchos genotipos de interés presentan esterilidad parcial o total del polen y/u óvulos (Iwamasa, 1966) con lo que no se pueden utilizar como parentales en programas de mejora. Además, hay muchos casos de autoincompatibilidad y de incompatibilidad entre ciertos genotipos (Soost y Cameron, 1975; Soost y Roose, 1996) lo que también limita enormemente la transmisión de caracteres deseables mediante hibridación sexual.

Los cítricos tienen periodos juveniles muy largos, de manera que necesitan entre 5 y 8 años para empezar a florecer y fructificar en zonas subtropicales como la nuestra (Cervera y col., 1998). Además, el tamaño de los árboles es grande, lo que dificulta la disponibilidad de mucha progenie por razones de espacio y de coste. La duración del periodo juvenil, junto con la gran superficie de cultivo que exigen las nuevas plantas, sólo permiten en la práctica, efectuar selecciones individuales en la F1, impidiendo el desarrollo de programas de mejora más prolongados (Agustí, 2003).

Esta combinación de factores adversos ha dificultado los esfuerzos dedicados a la mejora genética de los cítricos mediante métodos tradicionales, de modo que la gran mayoría de las variedades actualmente existentes en el mundo son el resultado del azar, originadas por mutaciones espontáneas de yemas o semillas apomícticas (Hodgson, 1967) y seleccionadas en campo por el agricultor. Esto era posible hace décadas, cuando los agricultores gestionaban pequeños huertos y, mediante la observación directa, era factible identificar variaciones potencialmente útiles entre sus árboles. Actualmente, los gestores

de las grandes extensiones dedicadas a este cultivo no pueden tener este conocimiento de sus árboles, pasando desapercibidas las posibles variaciones. Así, parece claro que para retener las características esenciales de los cítricos e introducir mejoras significativas es preciso desarrollar otras técnicas de mejora diferentes de la mejora clásica como puede ser la mutagénesis inducida.

3.2. Mutagénesis inducida.

La mutagénesis inducida es una técnica con la cual se pretende variar uno o pocos caracteres de una variedad, sin cambiar de forma significativa su acervo genético, además de generar un amplio rango de variación fenotípica (Spiegel–Roy y Vardi, 1989) y pueden contribuir a la mejora del frutal sin perturbar los requerimientos de la industria ni los de los consumidores. La mutagénesis es una herramienta importante en la mejora de cultivos y está libre de las restricciones impuestas sobre los organismos modificados genéticamente (Parry y col., 2009).

La mejora genética mediante mutagénesis ha resultado muy exitosa en los últimos tiempos, tal y como refleja la Base de datos de variedades mutadas de la FAO/IAEA, que incluye más de 3200 variaciones mutantes oficialmente liberadas, de 214 especies vegetales, en más de 60 países en todo el mundo. De ellas, más de 1000 variedades mutantes pertenecen a cultivos esenciales cultivados en más de 10 millones de hectáreas lo cual indica su importancia (FAO/IAEA, 2015).

Los genotipos que así se generen cumplen una doble función: desde un punto de vista exclusivamente comercial pueden incorporarse directamente como nuevas variedades ó como nuevos patrones con características mejoradas y, desde un punto de vista científico, constituyen un material y una herramienta únicas para el aislamiento y caracterización de genes y secuencias génicas de interés agronómico, tanto de variedades como de patrones.

Las mutaciones se pueden provocar mediante agentes químicos o físicos (Van Harten, 2007). Las alteraciones que causan pueden ir desde cambios puntuales de unos pocos pares de bases, característico de los mutágenos químicos, a grandes deleciones en el ADN, más frecuente empleando mutágenos físicos. Esta variabilidad genética ha sido y está siendo ampliamente empleada en estudios de genómica, desarrollándose líneas de investigación sobre caracteres de interés agronómico en diversos centros de investigación

en el mundo (Kharkmal y Shu, 2009). Dentro de los agentes químicos más empleados se puede mencionar el etilmetanosulfonato (EMS) y como agentes físicos los rayos gamma (Ahloowalia y col., 2004; Liu, y col., 2005; Jain, 2005). Estos agentes mutagénicos son reconocidos por inducir cambios a nivel génico, cromosómico y genómico, tanto en el ADN nuclear como en el cloroplástico (Donini y Sonnino, 1998).

3.2.1. Mutagénesis química.

El agente mutágeno EMS provoca mutaciones puntuales (Luan y col., 2007), con efectos pleiotrópicos, mostrando modificaciones en más de un carácter, quizás en parte porque dichas mutaciones ocurren en diferentes loci (Basu y col., 2008).

La obtención de cultivares de difusión comercial mejorados para caracteres agronómicos ha permitido la implementación de mutaciones con este agente químico dentro de un programa de mejoramiento genético, por ser una herramienta barata y fácilmente accesible (Donini y Sonnino, 1998).

Mediante la exposición al agente mutagénico EMS, Iglesias y col. (2004) obtuvieron nuevas variedades de naranjo ‘Washington navel’ con nuevas características agronómicas mejoradas como mayor número de frutos por árbol, aumento del tamaño de los frutos o incremento en el contenido en ácidos o azúcares. Estos autores, a partir de 20000 óvulos no fertilizados tratados con EMS al 1%, seleccionaron 1300 mutantes, de los cuales sólo 26 individuos mostraron diferencias significativas frente a la variedad salvaje parental ‘Navel’ en alguno de los parámetros analizados.

3.2.2. Mutagénesis física.

Distintas investigaciones en mejora de frutales han mostrado que el uso de mutágenos físicos ha resultado ser una vía más eficiente en la inducción de mutaciones, en comparación con los mutágenos químicos (Broertjes, 1977; Broertjes y Van Harten, 1988). Los mutágenos físicos, específicamente los rayos gamma y los neutrones, son los más empleados por su mayor penetración en frutales (Pinet-Leblay y col., 1992; Fuentes y col., 2004) y los de mayor efectividad (Predieri, 2001). Ambos mutágenos son radiaciones ionizantes que provocan reordenamientos cromosómicos de todo tipo, deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones (Yost y col., 1954).

Generalmente, el tratamiento mutagénico se realiza sobre semillas o yemas axilares de material adulto. La irradiación con rayos gamma se realiza mediante el uso de irradiadores celulares que utilizan como fuente de radiación Co^{60} o Cs^{137} (fig. 9) y ha sido el agente mutante más utilizado en los programas de mejora de cítricos (Roose y Williams, 2007).



Fig. 9 Irradiador celular gamma IBL 437C con fuente de radiación Cs^{137}

Mediante la inducción de mutaciones con rayos gamma se han mejorado muchos caracteres útiles como: tamaño de las plantas, precocidad en la floración, incremento en rendimiento, autocompatibilidad, eliminación de semillas y espinas, resistencia a plagas y enfermedades, y adaptabilidad a distintos tipos de estrés abiótico y, de hecho, el número de cultivares derivados de mutaciones inducidas mediante agentes físicos aumenta constantemente (Maluszinski y col., 1995; Predieri, 2001).

La mutagénesis inducida mediante radiación gamma ha sido utilizada de manera rutinaria en programas de mejora de cítricos en diversos países (Spiegel-Roy y col., 1990; Shanchun y col., 1991; Gonzaga y col., 2011). Esta tecnología ha dado origen a nuevas variedades comerciales donde, entre otras características, se ha modificado el color interno y externo del fruto, el número de semillas por fruto, se han eliminado las espinas o se han obtenido clones resistentes a enfermedades (Vardi y col., 1996, 2008; Gulsen y col., 2007; Sutarto y col., 2009).

La primera variedad de cítricos con interés comercial obtenida mediante el uso de esta tecnología fue el pomelo 'Star Ruby'. Se obtuvo irradiando semillas de pomelo 'Hudson'. Posteriormente se obtuvo otra variedad de pomelo, la 'Rio Red', mediante

irradiación de varetas de ‘Redblush’ (Hensz, 1971). Las características más destacables de estas variedades fueron por un lado su atractivo color rojo y por otro la ausencia de semillas, como consecuencia de la aberración cromosómica producida por la rotura de cromosomas seguida de un apareamiento asimétrico de los extremos truncados (Froneman y col., 1996). Recientemente en California, gracias a los programas basados en la mutagénesis inducida, se han obtenido variedades de mandarinas de interés como la “Tango” (mutante de “Afourer” sin semillas) y la “Mor” (mutante de “Murcott” con número de semillas reducido) (Roose y Williams, 2007). En España, irradiando ápices de la clementina ‘Clemenules’ se ha obtenido la variedad “Nulessin”, un mutante que se caracteriza por una fertilidad reducida lo que origina la reducción del número de semillas por fruto (Asins y col., 2002) y se están evaluando distintos clones mutantes de las variedades de mandarina ‘Murcott’ y ‘Moncada’ obtenidos por irradiación de yemas con Cobalto 60 (Co⁶⁰) (Bermejo y col., 2011). La irradiación de yemas de la variedad de limonero ‘Kutdiken’ produjo plantas mostrando variaciones en el momento de maduración de la fruta, la floración, la brotación y la ausencia de espinas (Gulsen y col., 2007).

3.3. Mejora genética de patrones de cítricos.

Tanto en España como en otros países destacados en el cultivo de los cítricos, los últimos años se han caracterizado por un afán investigador en busca de un patrón que reúna el mayor número posible de ventajas y, por ello, se vienen desarrollando distintos proyectos de mejora genética de patrones. En todo el arco mediterráneo, el principal objetivo de los programas de mejora en patrones es la obtención de portainjertos que combinen tolerancia a estreses bióticos, principalmente CTV y *Phytophthora sp.*, con la tolerancia a estreses abióticos como salinidad y sequía (Dambier y col., 2011). Junto con la tolerancia a estreses, también resultan de gran importancia, desde el punto de vista agronómico, el control del tamaño de los árboles y la influencia sobre la calidad de la fruta de las variedades injertadas (Soost y Roose, 1996).

Como se ha visto anteriormente, el principal problema en los programas de mejora genética de leñosas estriba en que son muy lentos. El estudio de un nuevo patrón lleva consigo el trabajo de más de veinte años y una vez obtenido ese patrón en un país, los trabajos necesarios para estudiar su adaptación a las condiciones de otros países se alargan del orden de diez años más.

Tras muchos años de investigación, un escaso número de patrones tolerantes a la salinidad han sido obtenidos mediante selección y mecanismos convencionales de mejora, debido principalmente a la gran limitación existente en el pool genético y en el largo período de tiempo necesario que requieren esos experimentos. El empleo de herramientas biotecnológicas como la regeneración de plantas *in vitro* a partir de callos que hayan mostrado tolerancia al estrés o mediante mutagénesis para la obtención de patrones tolerantes a la salinidad es un campo que no ha sido explorado suficientemente (Ben-Hayyim y Moore, 2007).

3.4. Alternativas biotecnológicas para la mejora de los cítricos.

Como se ha visto anteriormente, las técnicas tradicionales mediante cruzamientos sexuales no han resultado muy útiles en la mejora genética de la mayoría de los genotipos de cítricos. Aunque las mutaciones espontáneas han proporcionado nuevos genotipos mejorados, la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, podrían ayudar a solventar las barreras provocadas por la complicada biología reproductiva de los cítricos (Gmitter y col., 2009).

El cultivo *in vitro* de plantas ha sido una metodología de gran utilidad para complementar los programas de mejora genética de especies leñosas, ya que una vez generada la variabilidad, debemos ser capaces de regenerar ese genotipo y posteriormente de propagarlo.

3.4.1. Micropropagación.

El desarrollo de un protocolo de cultivo de tejidos es un procedimiento riguroso que implica la optimización de diferentes factores químicos, físicos y ambientales para garantizar el crecimiento de las plantas en unas condiciones que se alejan un tanto de las que imperan en su hábitat natural (Bairu y Kane, 2011). Se denomina micropropagación al crecimiento y multiplicación de plantas en medio sólido o líquido bajo condiciones asépticas y ambiente controlado. El éxito de esta técnica ha permitido producir en masa diferentes especies herbáceas y frutales.

Los métodos de propagación *in vitro* de plantas frente a los métodos tradicionales presentan las siguientes **ventajas**:

1. Los cultivos pueden ser iniciados a partir de porciones pequeñas de plantas, denominadas explantos. Además, se requiere poco espacio para el mantenimiento de los cultivos o para su multiplicación.
2. Los sistemas de propagación son realizados de manera aséptica, por lo que una vez que se inician los cultivos no se tendrían pérdidas debidas a enfermedades y las plantas producidas mediante este sistema de propagación se encuentran libres de patógenos.

3. Las técnicas de micropropagación permiten un ajuste más flexible y exacto de los factores que afectan a la multiplicación como son los niveles de nutrientes y reguladores del crecimiento vegetal y condiciones de humedad, luz y temperatura.
4. El mantenimiento de stocks de plantas requiere menos energía y espacio que el mantenimiento en condiciones *in vivo*. Además, el material vegetal requiere muy poca atención entre los distintos ciclos de subcultivo y no requiere riegos, fertilizaciones y uso de pesticidas y plaguicidas durante esos intervalos. Además, la producción de planta puede ser continua a lo largo de todo el año y es más independiente de los cambios estacionales y meteorológicos.
5. En la naturaleza, las plantas están expuestas a variables biológicas y condiciones climáticas que pueden complicar estudios básicos de fisiología del estrés. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ayudar a superar estas limitaciones (Zhang y col., 1998), permitiendo el crecimiento de plantas genéticamente idénticas bajo condiciones climáticas y nutricionales controladas. Además, este sistema permite realizar estos experimentos en condiciones idénticas a lo largo de todo el año, sin necesidad de utilizar grandes extensiones de terreno o ensayos de rendimiento en campo (Niknam y McComb, 2000).

3.4.1.a. Micropropagación en cítricos.

La importancia de la industria cítrica y la necesidad de selección e introducción de nuevos genotipos mejorados enfatiza el uso de métodos modernos que nos permitan una propagación rápida y eficaz del nuevo material seleccionado mejorado.

Los principales patrones de cítricos comercializados actualmente son propagados mediante semillas poliembriónicas producidas por polinización abierta en campo (Barlass y Skene, 1986). Sin embargo, este método de propagación presenta la desventaja de que las semillas pueden contener embriones tanto nucelares como zigóticos y la uniformidad no es completa (Corazza-Nunes y col., 2002; Grosser y col., 2004). En estos casos, las plántulas zigóticas deben ser identificadas en base a su morfología y deben ser eliminadas con el fin de mantener la uniformidad clonal. La frecuencia de embriones zigóticos detectada varía en el rango de 0 a 76% dependiendo del cultivar y de los factores ambientales (Khan y Roose, 1988) y en los viveros comerciales cerca del 25% de las plántulas son descartadas para excluir a los individuos zigóticos (Hirai y col., 1986). Por

otra parte, en algunos casos, las semillas de patrones de cítricos no están disponibles, mientras que en otros casos, patrones potencialmente interesantes, presentan un bajo nivel de poliembrionía y no producen una adecuada cantidad de plántulas nucelares (Grosser y Chandler, 1986; Hartman y col., 2004), por lo que la capacidad de suministrar una gran cantidad de plántulas resulta frecuentemente un obstáculo (Starrantino y Caruso, 1988). Además, la propagación de patrones de cítricos mediante métodos convencionales se restringe a una época en particular y no garantiza la producción de plantas a lo largo de todo el año.

Así, las técnicas de cultivo de tejidos emergen como una poderosa herramienta para incrementar la disponibilidad de patrones de cítricos (George, 1996). Los individuos obtenidos mediante esta técnica presentan la gran ventaja de mantener la uniformidad genética y preservar sus rasgos específicos, los cuáles influirán en el futuro crecimiento de la variedad injertada (Hartman y col., 2004). Además, la propagación *in vitro* asegura la disponibilidad del material vegetal a lo largo de todo el año (Starrantino y Caruso, 1988).

Diversos trabajos de micropropagación y cultivo de tejidos han sido publicados a partir de explantos de variedades y patrones de cítricos (Begum y col., 2004; Shawkat y Bushra, 2006; Da Silva y col., 2008; Pérez-Tornero y col., 2010), donde las respuestas morfogénicas de los cítricos *in vitro* están fuertemente influenciados por el genotipo, edad y tipo de explanto y composición del medio de cultivo (Carimi y De Pasquale, 2003; Pérez-Tornero y col., 2010).

El medio de cultivo juega un papel muy importante en los protocolos de micropropagación, ya que aporta los nutrientes esenciales para el crecimiento del explanto y los reguladores del crecimiento para su desarrollo y diferenciación.

Normalmente, los medios de cultivo están basados en la formulación del medio MS (El Morsy y Millet, 1996; Marutani-Hert y col., 2011), si bien en diferentes variedades de limón se han obtenido mejores resultados con el uso del medio de cultivo DKW (Pérez-Tornero y col., 2010).

El balance de los reguladores del crecimiento juega un papel esencial en cada una de las etapas del ciclo de micropropagación (Fig. 10). Durante la fase de multiplicación resulta esencial la adición de citoquininas, siendo BA la más usada en estudios de proliferación en cítricos (Carimi y De Pasquale, 2003; Goswami y col., 2013). Además, el uso de otros reguladores como GA₃ por un lado promueve la multiplicación de los nuevos brotes y por otro estimula su elongación (Kotsias y Roussos, 2001).

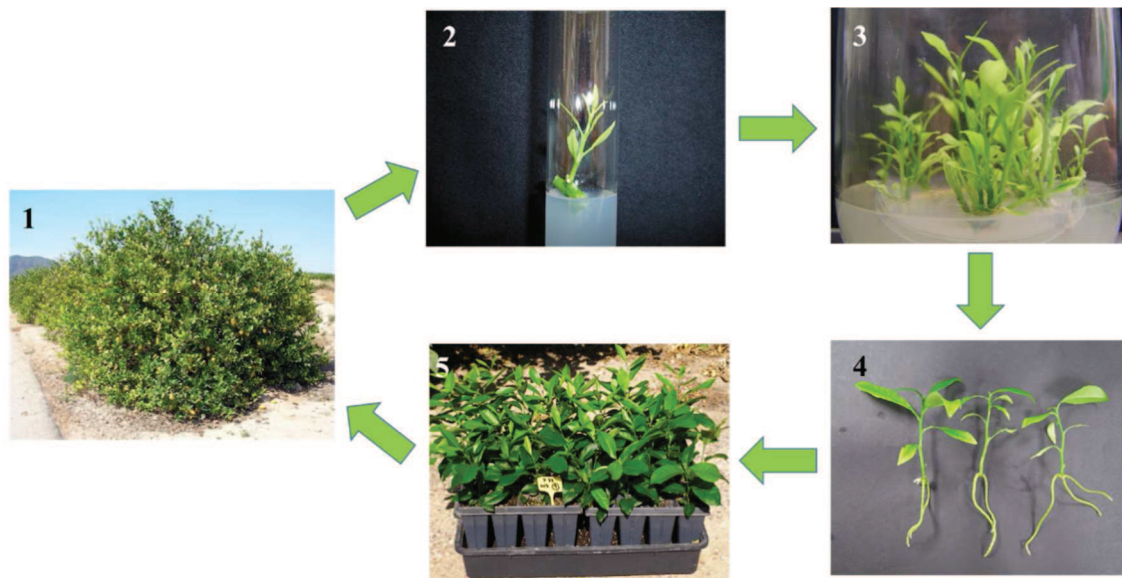


Figura 10. Fases del ciclo de micropropagación a partir de segmentos nodales de material adulto de limonero. (1) Selección de planta madre (2) Introducción del material, (3) Multiplicación de los explantos, (4) Enraizamiento y (5) Aclimatación.

Si durante la fase de proliferación la adición de citoquininas es esencial, durante la fase de enraizamiento las auxinas tienen un papel primordial (Carimi y De Pasquale, 2003). La elección de una auxina, en una concentración específica, va a depender del genotipo (Omura y Hidaka, 1992). Si bien para algunos autores la adición de NAA, en combinación con IBA, resulta fundamental para la diferenciación de las raíces y la elongación de las mismas (Mendes y col., 2011), para otros autores el IBA parece ser más eficaz que NAA en el proceso de rizogénesis (Kotsias y Roussos, 2001).

En cítricos, en términos de altas tasas de proliferación, los mejores resultados normalmente son obtenidos a partir de explantos juveniles procedentes de la germinación de semillas (Perez-Molphe-Balch y Ochoa-Alejo, 1997; Carimi y De Pasquale, 2003). Sin embargo, el material juvenil presenta una serie de inconvenientes agronómicos como la presencia de espinas, excesivo vigor y retraso en la producción de frutos, ya que durante la fase juvenil no se produce la floración (Carimi y De Pasquale, 2003). La transición entre la fase juvenil y adulta puede estar influenciada tanto por el ambiente como por factores genéticos (Hackett, 1985), varía entre especies y normalmente se requiere entre 4 y 7 años para la entrada en producción (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1990), aunque Cervera y col. (1998) mantienen que los naranjos dulces (*C. sinensis*) podrían requerir

más de 20 años para perder sus caracteres juveniles. Estas características resultan indeseables en los programas de mejora y de propagación vegetal y el uso de explantos procedentes de plantas adultas proporciona la posibilidad de subsanar ese problema (Marutani-Hertz y col., 2011).

El uso de explantos procedentes de plantas adultas, en los protocolos de cultivo *in vitro*, no suele ser muy frecuente debido principalmente al alto nivel de contaminación (Drew, 1988), a la reducida o ausente capacidad morfogénica (Bonga, 1982) y a la reducida capacidad de enraizamiento de los explantos regenerados (George 1993). Sin embargo, el cultivo *in vitro* de plantas procedentes de tejidos adultos ha resultado exitoso en diversas especies como *Castanea sativa* y *C. crenata* (Vieitez y col., 1983), *Quercus robur* (Vieitez y col., 1985), *Carica papaya* (Drew, 1988), *Fraxinus ornus* (Arrillaga y col., 1992), *Persea americana* (Barceló-Muñoz y col., 1999) y *Prunus armeniaca* (Pérez-Tornero y Burgos, 2000).

En cítricos, se han desarrollado algunos protocolos de multiplicación de variedades a partir de tejidos adultos (Begum y col., 2004; Rathore y col., 2007; Pérez-Tornero y col., 2010), pero muy pocos protocolos han sido desarrollados a partir de material procedente de plantas adultas en patrones. Montoliu y col. (2010) desarrollaron un protocolo de enraizamiento *in vitro* eficiente para citrange ‘Carrizo’ a partir de plantas crecidas en invernadero de 3 años de edad y Barlass y Skene (1982) regeneraron plántulas a partir de segmentos nodales de plantas adultas de citrange ‘Carrizo’ y lima ‘Rangpur’.

En España, los requerimientos para la producción de plantas certificadas de cítricos mediante técnicas de micropropagación se encuentran reflejadas en el Reglamento Técnico Española para el Control y Certificación de Viveros de Árboles Frutales, que estipula que la introducción de plantas producidas *in vitro* deben ser realizados a partir de plantas adultas certificadas, por lo que el desarrollo de protocolos de multiplicación a partir de explantos procedentes de material adulto es esencial.

3.4.1.b. Salinidad *in vitro*

El cultivo *in vitro* puede ser utilizado como una herramienta útil para estudiar los mecanismos de tolerancia a salinidad (Rus y col., 1999; Carretero y col., 2007). Tales sistemas permiten una respuesta relativamente rápida ya que las plantas cultivadas *in vitro*, incluso en diferentes estados de desarrollo, podrían exhibir su capacidad para

resistir el estrés salino (Gosal y Bajaj, 1984), en un tiempo de generación corto (Lutts y col., 1999), y un medioambiente controlado (Torregrosa y Bouquet, 1993), lo que está especialmente indicado en especies leñosas ya que tienen ciclos reproductivos bastante largos (Zhang y col., 2004).

El comportamiento de especies leñosas tolerantes a salinidad en cultivo *in vitro* ha recibido poca atención. Sin embargo, estos estudios están ganando gran interés debido a los graves problemas encontrados en el cultivo en suelos con alta concentración salina en todo el mundo. Encontramos ejemplos que incluyen chopos (Zhang y col., 2004), eucalipto (Woodward y Bennett, 2005), almendro (Shibli y col., 2003), morera (Vijayan y col., 2003) y uva (Charbaji y Ayyoubi, 2004). Estos autores concluyen en sus trabajos que los estudios de cultivo *in vitro* pueden servir para analizar la respuesta de las plantas a la salinidad y para la selección de individuos tolerantes al estrés salino. Por otra parte, Zhang y col. (2004) observaron que la respuesta *in vitro* de callos de *Populus sp.* a estrés salino era similar a los de la planta completa en condiciones naturales. Estos resultados también fueron observados por Vijayan y col. (2003) en morera, donde encontraron una correlación altamente positiva entre el comportamiento de la planta *in vivo* e *in vitro* en condiciones de salinidad, correlación que fue más pronunciada con el incremento de la concentración salina.

Troncoso y col. (1999) encontraron que la tolerancia a la salinidad en patrones de vid cultivados *in vitro* se debía a su capacidad de acumular sales, al incremento de niveles de K^+ y el mantenimiento de altos niveles de agua. Woodward y Bennett (2005) observaron que, en *Eucalyptus camaldulensis* cultivados *in vitro*, las líneas tolerantes a la salinidad acumulaban mayores niveles de prolina. En este mismo sentido, He y col. (2009) a partir de suspensiones celulares de embriones irradiados de patata (*Solanum tuberosum*), seleccionaron líneas celulares tolerantes a la salinidad con niveles superiores de prolina y mayor actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD). En esta misma especie, Queirós y col. (2007) seleccionaron diversas líneas tolerantes a la salinidad por presentar mayores niveles de peroxidación de lípidos, ácido ascórbico y proteínas insolubles. Estos estudios concluyen que el cultivo *in vitro* puede servir para analizar la respuesta de las plantas a la salinidad y para la selección de individuos tolerantes, ya que los explantos cultivados *in vitro* y sometidos a estrés salino pueden desarrollar algunos desordenes fisiológicos similares a los de las plantas *in vivo* (Vijayan y col., 2003; Woodward y Bennett, 2005).

Los trabajos realizados para la selección de genotipos tolerantes a la salinidad se han llevado a cabo utilizando numerosos sistemas como el cultivo de callos, suspensiones celulares o cultivo de brotes. Los investigadores que han utilizado el cultivo de callos han tenido éxito en distintas especies como tomate (Rus y col., 2000) o arroz (Lutts y col., 1999). Sin embargo, el uso del cultivo *in vitro* de callos presenta algunas desventajas importantes tales como variación somaclonal, el efecto del medio de cultivo y de la fuente del explanto (García-Reina y col., 1988). Además, la regeneración de este material no resulta algunas veces sencillo y las plantas regeneradas no siempre mantienen los niveles de tolerancia a la salinidad mostradas por el material de partida (Flowers y col., 1985; Tal, 1994). Para evitar los problemas que surgen con el cultivo *in vitro* de callos varios autores han utilizado el cultivo *in vitro* de brotes para evaluar la tolerancia a la salinidad (Carretero y col., 2007; Bracci y col., 2008; Montoliu y col., 2009). Además, los brotes en comparación con los cultivos de callo son más fáciles de propagar y el material vegetal seleccionado a partir de cultivos sometidos a estrés salino pueden ser utilizados para establecer plantaciones en suelos salinos (Lokhande y col., 2011). Por otra parte, distintos investigadores indican que el cultivo de brotes es la mejor elección para estudios fisiológicos debido a que la mayoría de las respuestas de las plantas al estrés salino son debidas al funcionamiento integrado de brotes y raíces que excluyen o incluyen los iones tóxicos y que no pueden ser observados en callos ó cultivos celulares (Vijayan y col. 2003).

3.4.2. Regeneración adventicia.

Los sistemas de regeneración adventicia tienen un elevado potencial para la introducción de variación genética por mutagénesis o transformación genética. La regeneración de plantas desde células aisladas es el proceso clave en los trabajos de manipulación genética; al menos que esta parte pueda ser llevada a cabo de manera eficaz, no será posible utilizar métodos somáticos de mejora genética. (García-Luis y col., 2006). Una de las principales limitaciones de estas tecnologías son los bajos porcentajes de regeneración de planta obtenidos (Peña y col., 2004).

La regeneración vegetal engloba el cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos bajo condiciones físicas y químicas definidas. Con excepción de las células madre, las células animales pierden la capacidad de generar otros tipos de células más allá de la

diferenciación. En plantas, sin embargo, las células diferenciadas son capaces de regenerar un organismo completo bajo condiciones apropiadas de cultivo mediante la propiedad de la totipotencia vegetal (Birnbaum y Sánchez-Alvarado, 2008).

La regeneración de plantas *in vitro* puede ocurrir mediante dos vías: organogénesis y embriogénesis somática (Thorpe, 1994). En el proceso de organogénesis, se produce la formación de una estructura unipolar, caulinar ó radicular, cuyo sistema vascular está frecuentemente conectado al explanto original, mientras que en la embriogénesis se produce una estructura bipolar (embrión somático) con un ápice caulinar y un ápice radicular y con un sistema vascular. Estos dos métodos de regeneración pueden ser clasificados en directos o indirectos. Se denomina regeneración directa cuando la formación de la yema o el embrión somático se produce sin la formación previa de callo, a partir de tejidos meristemáticos como el cambium vascular, o regeneración indirecta, cuando el proceso de regeneración del nuevo órgano precede a la formación de callo, que es una masa de células totalmente indiferenciadas del que surgirán las yemas ó embriones adventicios (Phillips, 2004) (fig. 11).

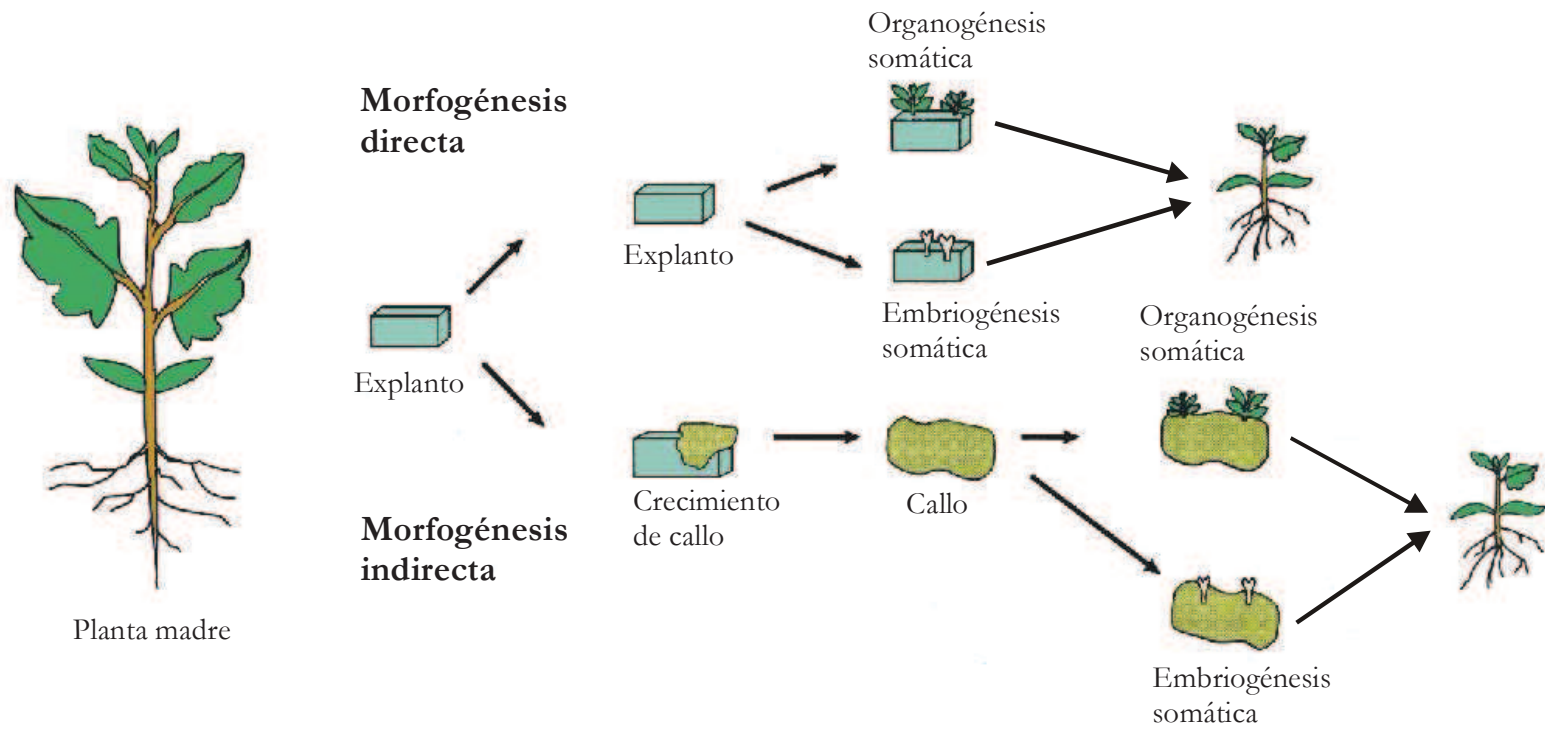


Figura 11 Tipos de regeneración adventicia

En el éxito de este proceso de regeneración mediante organogénesis, resultan esenciales factores intrínsecos del explanto como el genotipo, la edad, su origen y la posición en el medio de cultivo, factores físicos como la temperatura y la relación luz/oscuridad durante la incubación y factores relacionados con el medio de cultivo como su composición nutricional y los reguladores del crecimiento (George y col., 2008). Dentro de este último apartado, las citoquininas suelen ser muy efectivas en la promoción de nuevos órganos y muchos aspectos de la diferenciación celular están controlados por la interacción y la concentración de citoquininas y auxinas (Woodward y Bartel, 2005). El balance de estos reguladores del crecimiento resulta imprescindible para la formación de los meristemas y raíces y dicha relación determinará la formación de una u otra estructura. Esta interacción entre los dos tipos de reguladores suele ser compleja y su ajuste resulta esencial para obtener unos óptimos resultados (Sugiyama, 1999).

3.4.2.a. Regeneración adventicia en cítricos.

La regeneración adventicia de cítricos ha sido objeto de multitud de investigaciones durante los últimos años debido a la importancia económica del género y su utilidad en programas de mejora genética.

Esta tecnología ha sido abordada en varios genotipos y a través de diferentes técnicas *in vitro*, tales como embriogénesis somática desde callos nucelares y cultivo de protoplastos (Revisado en Gosal y col., 1995) e híbridos somáticos (Revisado en Grosser y col., 2000) y más recientemente, el esfuerzo se ha dirigido al desarrollo de diferentes protocolos para la recuperación de plantas a través de organogénesis (Almeida y col., 2003; Cervera y col., 2008).

En el caso de patrones de cítricos, la regeneración *in vitro* mediante organogénesis también ha sido analizada (Germaná y col., 2011; Silva y col. 2010; Marques y col. 2011). Diversos estudios mostraron que la organogénesis de patrones de cítricos está altamente influenciada por el genotipo (Bordón y col., 2000; Moreira-Dias y col., 2000) y las diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en la respuesta organogénica indican que las condiciones para la regeneración, tanto físicas como nutricionales y hormonales, deben ser optimizadas para cada genotipo (Bordón y col., 2000).

La respuesta de los explantos de patrones de cítricos varía considerablemente con la composición del medio de cultivo, donde la adición de reguladores del crecimiento

resulta esencial para una óptima regeneración. El BA es la citoquinina más eficaz y más comúnmente utilizada en la regeneración de patrones de cítricos (Bordón y col. 2000; Germanà y col., 2008). El nivel de citoquinina usada en el medio es crítico para la regeneración de yemas (Moreira-Dias y col. 2000; Cervera y col., 2008). Sin embargo, altas concentraciones pueden resultar tóxicas en la organogénesis de algunos genotipos (Almeida y col., 2002; Molina y col. 2007;).

Dentro de los componentes del medio de cultivo, la composición nutritiva tiene una gran importancia en los protocolos de regeneración. Generalmente, los explantos de cítricos han sido cultivados en medios basados en los nutrientes del MS (Silva y col. 2008; Marques y col. 2011), aunque estudios más recientes, en limón, han observado mejores resultados en con el uso de los nutrientes del medio DKW (Pérez-Tornero y col. 2010).

La orientación de explanto también ha jugado un papel esencial en el diseño de protocolos eficientes de regeneración de patrones de cítricos (Bordon y col., 2000; Moreira-Dias y col., 2000, 2001), obteniéndose los mejores resultados cuando el material vegetal de partida procedía de la parte más cercana al ápice del brote (Bordón y col., 2000), e incluso se ha observado polaridad en el mismo explanto, obteniéndose mayor número de yemas regenerantes en la zona de corte de la parte apical que en la basal del explanto (Costa y col., 2004).

El régimen de incubación en luz/oscuridad ha resultado ser otro factor de gran importancia en la regeneración de los explantos. Si bien para algunos autores, la incubación de los explantos directamente a la luz pareció ser estimuladora de la regeneración (Ghorbel y col., 1998), para otros resultó ser inhibitoria, mostrando mejores resultados en cuanto a porcentajes de regeneración con la incubación durante distintos períodos de tiempo en oscuridad (Marques y col., 2011; Schinor y col., 2011).

En general, en cítricos, los explantos más utilizados como fuente de material vegetal en trabajos de regeneración proceden de semillas germinadas *in vitro* (Zou y col. 2008; Dutt y col. 2010) y de plantas juveniles de invernadero (Tong y col. 2009; Silva y col. 2010) Los explantos derivados de plantas adultas no son utilizados normalmente en cultivo *in vitro* debido a su baja capacidad organogénica, relacionada con la represión progresiva ó inactivación de genes durante el desarrollo vegetal, que va disminuyendo durante la transición de juvenil a fase adulta (von Aderkas y Bonga, 2000), los importantes problemas de contaminación, y la baja capacidad de enraizamiento de los brotes regenerados (Almeida y col., 2003; Cervera y col., 2008; Mendes y col. 2010). El desarrollo de protocolos de organogénesis partiendo de explantos adultos permitiría

obtener plantas sin características juveniles que podrían estar listas para su selección en campo en un período de tiempo más corto (Cervera y col. 1998, Kobayashi y col. 2003). Además, la disponibilidad de protocolos de regeneración a partir de explantos adultos cobra mayor importancia cuando se trabaja con variedades sin semillas como por ejemplo las naranjas 'Navel' ó distintos híbridos de mandarina autoincompatibles que no producen semillas como 'Fortune', 'Ortanique' ó 'Nova'. Actualmente solo se disponen de protocolos de regeneración de planta adulta de cítricos de unas pocas variedades de naranjo dulce o mandarino (Cervera y col. 2008; Oliveira y col. 2010; Bassan y col. 2011; Curtis and Mirkov 2012).

3.4.3. Mutagénesis *in vitro*.

Los protocolos de mutagénesis mediante radiación gamma en combinación con el cultivo de tejidos ha mostrado ser una herramienta efectiva para la inducción de variación genética en distintos cultivos con el objetivo de incrementar la capacidad de éstos de tolerar estreses de tipo biótico y abiótico (Maluszynski, 2000). Gracias a esta combinación han sido desarrolladas nuevas variedades que presentan un incremento en la resistencia a enfermedades, salinidad o altas y bajas temperaturas (Jain y col., 1998). Esta herramienta es una excelente alternativa para la mejora de variedades que presentan una buena combinación de características, pero con la necesidad de incorporar un nuevo carácter (Micke y col., 1987; Predieri, 2001).

Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales puede ayudar a mejorar de forma efectiva la inducción de mutaciones en varios aspectos. Ofrece la posibilidad de elegir el material vegetal para el tratamiento (yemas axilares, órganos, tejidos y células), lo que resulta más adecuado comparado con un tratamiento *in vivo*, ya que se disminuye el riesgo de obtener quimeras y hay una alta probabilidad de que las células mutadas expresen la mutación en el fenotipo.

Otra de las ventajas que presenta el cultivo *in vitro* es que permite el manejo de grandes poblaciones y la selección y clonación de las variantes seleccionadas. Además, ofrece la posibilidad de realizar en forma rápida los distintos ciclos de propagación con el propósito de separar los sectores mutados de los no mutados en el tejido tratado, y

permite un control de las condiciones fitosanitarias durante todo el proceso (Ahloowalia, 1998; Predieri y Zimmerman, 2001).

El análisis de la respuesta de las plantas a los diferentes estreses abióticos en campo ó condiciones de invernadero suele ser complicada debido a su naturaleza compleja y variable y herramientas basadas en el cultivo de tejidos permiten una comprensión más profunda de la fisiología y bioquímica de las plantas cultivadas bajo condiciones ambientales adversas (Benderradji y col., 2012). Así, el screening *in vitro* basado en la presión de selección constituye una técnica muy valiosa para la caracterización e identificación de los individuos tolerantes (Pérez-Clemente y Gómez-Cadenas, 2012). Esta metodología se basa en el cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos en un medio de cultivo suplementado con el agente selectivo, permitiendo la selección y regeneración de las plantas con las características deseadas.

La técnica de la presión de selección *in vitro* ha sido utilizada con éxito para identificar genotipos más tolerantes a diferentes estreses abióticos (Rai y col., 2011), entre los que destaca los estudios sobre la salinidad mediante el uso de NaCl como agente selectivo (Woodward y Benett, 2005).

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue el desarrollo de herramientas biotecnológicas basadas en el cultivo de tejidos que pudieran ser aplicadas a la mejora genética de patrones de cítricos para la obtención de clones tolerantes a salinidad. Para ello se siguió una estrategia basada en los siguientes objetivos secundarios:

1. Definir las condiciones óptimas para la propagación *in vitro*, micropropagación, enraizamiento y aclimatación, de plántulas procedentes de material adulto de 3 patrones de cítricos (*Citrus macrophylla*, *C. aurantium* y *C. reshni*). Este protocolo nos permitirá la producción eficiente de plantas de estas especies y los explantos micropropagados podrán ser utilizados como fuente de material homogéneo y aséptico en experimentos de mutagénesis ó transformación.

2. Estudiar el uso del cultivo *in vitro* para evaluar la respuesta al estrés salino en diferentes tipos de explantos de *C. macrophylla*. Examinar las respuestas fisiológicas, nutricionales y en el crecimiento de explantos cultivados *in vitro* en respuesta a un incremento en la concentración salina del medio de cultivo para estudiar los diferentes mecanismos utilizados por los explantos tanto en fase de proliferación como de enraizamiento.

3. Analizar el efecto de la composición del medio de cultivo, condiciones de incubación, tipo y origen de explanto en la regeneración de *C. macrophylla* y *C. aurantium*. Evaluar la capacidad de regeneración *in vitro* de explantos adultos de *C. macrophylla* y *C. aurantium* procedentes de brotes cultivados *in vitro* como base para desarrollar un programa de mejora genética basado en el uso de mutagénesis con radiación gamma en combinación con el cultivo de tejidos.

CONCLUSIONES

- 1^a.- Se ha desarrollado por primera vez un protocolo eficiente para la propagación, enraizamiento y aclimatación, a partir de tejidos procedentes de material adulto, de tres importantes patrones de cítricos en España: Macrophylla, mandarina Cleopatra y Naranja Amargo. El protocolo fue optimizado mediante el ensayo de distintos medios basales y de diferentes concentraciones de varios reguladores del crecimiento. En la fase de proliferación, medios con alta concentración salina, como DKW o MS, y diferentes combinaciones de BA y GA o BA y AD fueron indispensables para la multiplicación de los explantos. La productividad más alta se obtuvo en cada variedad con diferentes combinaciones de los reguladores del crecimiento. En Macrophylla, la mayor productividad fue obtenida con 1 mg/l de BA en combinación con 2 mg/l de GA, en Naranja Amargo con 2 mg/l de BA y 0.6 mg/l de GA o 4 mg/l de AD, y en mandarina Cleopatra con una combinación de 2 mg/l de BA y 1 mg/l de GA o 4 mg/l de AD.
- 2^a.- En la fase de enraizamiento, del protocolo de micropropagación, diferentes combinaciones de IBA e IAA para Macrophylla, y de NAA e IBA para mandarina Cleopatra o Naranja Amargo, produjeron los porcentajes de enraizamientos más altos. En Macrophylla, cerca del 100% de los explantos enraizados fueron obtenidos cuando se utilizó una combinación de 1 mg/l de IBA y 1 mg/l de IAA, sin embargo, en Naranja Amargo o en mandarina Cleopatra 1 mg/l de IBA en combinación con 1 ó 2 mg/l de NAA produjeron los mejores resultados. La aclimatación de los explantos fue casi del 100% para todos los patrones estudiados. Los explantos crecieron activamente durante el proceso de aclimatación y las plantas viables fueron establecidas en macetas en el invernadero.
- 3^a.- El protocolo de micropropagación puesto a punto en esta tesis podría ser utilizado para la producción eficiente de plantas certificadas de patrones de cítricos y estas plantas micropropagadas podrían ser una fuente ideal de material homogéneo y aséptico para su integración en ensayos de mutagénesis o transformación genética. Además este protocolo podría ser fácilmente aplicado a la propagación de las plantas genéticamente modificadas.
- 4^a.- La tasa de crecimiento de los explantos de Macrophylla, tanto en proliferación como en enraizamiento, disminuyeron con el aumento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo. La concentración de solutos compatibles, como prolina y compuestos de amonio cuaternario, aumentaron en los explantos en proliferación cuando se cultivaron en medio salino, pero no en los explantos en enraizamiento. La concentración total de clorofila disminuyó de manera significativa con la sal, y este efecto fue más significativo en los explantos enraizados.
- 5^a.- La concentración de Na⁺ y Cl⁻ en los explantos de Macrophylla aumentó de manera significativa con la salinidad, pero los niveles fueron más altos en los explantos en proliferación que en los enraizados. Los resultados obtenidos sugieren que los importantes daños sufridos en los explantos se deben principalmente a la toxicidad celular de los iones salinos, principalmente al Cl⁻. Los niveles de malondialdehído aumentaron en los explantos en proliferación indicando un aumento del grado de daño producido en las membranas celulares. La concentración en los explantos de

NO_3^- , K^+ , Mg^{2+} , Ca^+ y Fe también estuvo afectada por la concentración salina del medio de cultivo

- 6^a.- En los explantos de *Macrophylla* en proliferación en medio salino, los niveles de prolina y compuestos de amonio cuaternario estuvieron altamente correlacionados con la concentración de sodio y cloruro, indicando un posible papel de estos compuestos en el ajuste osmótico.
- 7^a.- Los resultados de este estudio indican el potencial del cultivo de tejidos en la evaluación de explantos de cítricos al estrés salino, ya que las respuestas se pueden observar en un tiempo relativamente corto y en un ambiente controlado. Se han observado importantes evidencias de que los explantos de *Macrophylla* cultivados *in vitro* responden a la salinidad de manera similar que en la planta *ex vitro*, así esta técnica podría ser utilizada para la pre-selección y evaluación de la tolerancia a la salinidad de explantos de cítricos.
- 8^a.- En esta tesis, se ha desarrollado un sistema eficiente de organogénesis *in vitro* para explantos nodales adultos de *Macrophylla* y Naranja Amargo. Los explantos de los dos patrones de cítricos mostraron respuestas similares en el medio de regeneración. Una pequeña cantidad de callo friable y blanco se desarrolló en la superficie dañada y la diferenciación del callo llevó a la formación de yemas adventicias. La mayoría de las yemas se desarrollaron desde el callo por organogénesis indirecta pero algunas veces se observó la producción de yemas directamente desde el tejido.
- 9^a.- El protocolo de organogénesis de patrones de cítricos fue optimizado variando la concentración de los reguladores del crecimiento, las condiciones de incubación, el medio basal y el tipo de explanto usado. La adición de BA y el periodo de inducción en oscuridad fueron indispensables para la regeneración de los explantos y el tipo de explanto o el medio basal tuvieron una gran influencia. Los mejores resultados fueron obtenidos con 3 ó 2 mg/l de BA para explantos adultos de *Macrophylla* y Naranja Amargo, respectivamente. Altos porcentajes de regeneración fueron obtenidos con los medios basales de WPM y DKW en los explantos de *Macrophylla* y, aunque el medio basal no influyó de manera significativa en la regeneración de los explantos de Naranja Amargo, los mejores resultados fueron obtenidos con el medio DKW. Cuando se analizó el tipo de explanto, los mejores resultados fueron obtenidos con segmentos nodales de *Macrophylla* frente al uso de segmentos internodales y se observó un gradiente morfogénico en los explantos; la eficiencia organogénica fue superior cuando se utilizaron explantos de la zona apical del brote. La incubación en oscuridad durante las primeras 3 ó 4 semanas del cultivo fue esencial en el proceso de regeneración en ambos patrones.
- 10^a.- En la mayoría de los estudios realizados en organogénesis de explantos de cítricos, se ha utilizado material juvenil como fuente del explanto. En este trabajo se ha establecido un protocolo simple y altamente eficiente de regeneración adventicia utilizando segmentos nodales de material adulto de *Macrophylla* y Naranja Amargo. En ambos patrones, fueron obtenidos altos porcentajes de regeneración, por encima del 50%. Este protocolo podría ser utilizado para la introducción de variación

genética a través de transformación o mutagénesis de explantos de *Macrophylla* y Naranja Amarga. En los últimos meses, experimentos de mutagénesis y pre-selección *in vitro* de clones tolerantes a salinidad, utilizando explantos adultos de *Macrophylla* y Naranja Amarga, han sido realizados con éxito en el laboratorio del Equipo de Citricultura del IMIDA.

In Vitro Cellular and Developmental Biologia Plant.

Tallón, C. I., Porras, I. y Pérez-Tornero, O. (2012) "Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators". *In Vitro Cellular and Developmental Biologia Plant.* 48: 488-499.

The influence of various basal medium and plant growth regulators on the efficient micropropagation of nodal explants from mature trees of alemow, sour orange, and 'Cleopatra' mandarin citrus rootstocks was studied. All three citrus rootstock shoot cultures showed a preference for high-salt media, like Murashige and Skoog or Driver and Kuniyuki Walnut medium. Several combinations of N⁶-benzyladenine (BA) and adenine (AD), kinetin (KIN) or gibberellic acid (GA) were tested to optimize the shoot proliferation phase. BA/GA combinations improved the proliferation of all the rootstocks studied, especially alemow. The addition of BA and AD to the culture medium improved shoot proliferation in sour orange and 'Cleopatra' mandarin in the same way as BA and GA. The addition of different combinations of BA/KIN did not result in further improvement of any of the studied variables. The transfer of in vitro shoots to rooting media, containing different concentrations of indolebutyric acid (IBA) and indoleacetic acid (IAA), resulted in regeneration of complete plantlets.

Alemow and 'Cleopatra' mandarin shoots rooted well using these plant growth regulators; however, all combinations of IBA and IAA tested resulted in very low rooting percentages in sour orange. To improve rooting in sour orange and 'Cleopatra' mandarin, different combinations of naphthaleneacetic acid (NAA) and IBA were tested. All NAA/IBA combinations produced higher rooting percentages than did the IBA/IAA combinations, and in sour orange nearly 100 % of explants developed roots. An efficient and simple protocol for the micropropagation of three citrus rootstocks, alemow, 'Cleopatra' mandarin, and sour orange, by culturing nodes from mature plants, has been established.

DOI 10.1007/s11627-012-9457-9

<http://link.springer.com/article/10.1007/s11627-012-9457-9>

Journal of Plant Physiology.

Pérez Tornero, O., Tallón, C.I., Porras, I. y Navarro, J.M. (2009) "Physiological and growth changes in micropropagated Citrus macrophylla explants due to salinity". **Journal of Plant Physiology**. 166: 1923-1933.

Salinity is one of the major abiotic stresses affecting arable crops worldwide, and is the most stringent factor limiting plant distribution and productivity. In the present study, the possible use of in vitro culture to evaluate the growth and physiological responses to salt-induced stress in cultivated explants of Citrus macrophylla was analyzed. For this purpose, micropropagated adult explants were grown in proliferation and rooting media supplemented with different concentrations of NaCl. All growth parameters were decreased significantly by these NaCl treatments; this was accompanied by visible symptoms of salt injury in the proliferated shoots from 60 mM NaCl and in the rooted shoots from 40 mM NaCl. Malondialdehyde (MDA) increased with increasing salinity in proliferated shoots, indicating a rising degree of membrane damage. The concentration of total chlorophyll significantly decreased in the presence of NaCl, and this effect was more pronounced in the rooted explants.

The Na⁺ and Cl⁻ concentrations in the explants increased significantly with the salinity level, but Cl⁻ levels were higher in the proliferated explants than in the rooted explants. For osmotic adjustment, high concentrations of compatible solutes (proline and quaternary ammonium compounds-QAC) accumulated in salt-stressed plants in proliferation, but differences were not observed in rooted explants. In proliferation, proline and QAC were highly correlated with the sodium and chloride concentrations in the explants, indicating a possible role of these compounds in osmotic adjustment. The plant concentrations of NO₃⁻, K⁺, Mg²⁺, Ca⁺ and Fe were also affected by the NaCl concentration of the medium. We suggest that the important deleterious effects in the in vitro explants of Citrus macrophylla grown at increasing NaCl concentrations were due mainly to toxic effects of saline ions, particularly Cl⁻, at the cellular level.

DOI:10.1016/j.jplph.2009.06.009

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161709002569>

In Vitro Cellular and Developmental Biologia Plant.

Tallón, C. I., Porras, I. y Pérez-Tornero, O. (2013) "High efficiency *in vitro* organogenesis from mature tissue explants of *Citrus macrophylla* and *C. aurantium*". ***In Vitro Cellular and Developmental Biologia Plant.*** 49: 145-155.

A simple and efficient protocol for obtaining organogenesis from mature nodal explants of *Citrus macrophylla* (alemow) and *Citrus aurantium* (sour orange) has been developed by optimizing the concentrations of the plant growth regulators, the incubation conditions, the basal medium and by the choice of explant. In order to optimize the plant growth regulator balance, explants were cultured in the regeneration medium supplemented with several N6- benzyladenine (BA) concentrations or with 2 mg l⁻¹ BA in combination with kinetin (KIN) or 1-naphthaleneacetic acid (NAA). The presence of BA was found to be essential for the development of adventitious buds; the best results were obtained using BA at 3 and 2 mg l⁻¹ for alemow and sour orange, respectively. The combination of BA with KIN or NAA in the culture medium decreased the regeneration frequency, with respect to the use of BA alone. The effect of three different basal media was rootstock-dependent. For *C. macrophylla* the best results were obtained with Woody Plant Medium or Driver and Kuniyuki Walnut Medium (DKW). However, for *C. aurantium*, although high percentages of regenerating explants were obtained independently of the basal medium used, the highest number of buds per regenerating explants was obtained with DKW medium. Attempts were made to identify the type of explants which had a higher regeneration ability using particular regions along the mature shoots of *C. macrophylla*. When nodal segments, where the buds were completely removed, and internode segments were compared, the highest percentage of responsive explants was obtained with nodal segments. The existence of a morphogenetic gradient along the shoot was observed and the organogenic efficiency was highest when explants from the apical zone were used. Incubation in darkness for 3 or 4 wk was essential for regeneration process in both rootstocks.

DOI 10.1007/s11627-012-9476-6.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s11627-012-9476-6>

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M.K., Sopory, S.K. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* 25: 1263-1274.
- Agustí, M. 2003. *Citricultura*. Ed. Mundi Prensa. Madrid. España. 416 pág.
- Ahloowalia, B.S. 1998. *In-vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. En: Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S. (eds) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 293–309.
- Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M., Nochterlein, K. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135: 187-204.
- Almeida, W.A.B., Mourão-Filho, F.A.A., Mendes, B.M.J., Rodriguez, A.P.M. 2002. In vitro organogénesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Sci. Agric.* 59(1): 35-40.
- Almeida, W.A.B., Mourão-Filho, F.A.A., Pino, L.E., Boscarol, R.L., Rodriguez, A.P.M., Mendes, B.M. J. 2003. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Plant Sci.* 164:203–211.
- Amorós, M. 2003. Los patrones en citricultura. Producción de agrios. Ed. Mundi-Prensa. pp 144-145.
- Arabidopsis Genome Initiative 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P., Gómez-Cadenas, A. 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiol.* 44, 388–394.
- Arbona, V., Marco, A.J., Iglesias, D.J., López-Climent, M.F., Talón, M., Gómez-Cadenas, A., 2005. Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. *Plant Growth Regul.* 46, 153–160.
- Arbona, V., Gómez-Cadenas, A. 2008. Hormonal modulation of *Citrus* responses to flooding. *J. Plant Growth Regul.* 27: 241-250.
- Arbona, V., Hossain, Z., Lopez-Climent, M.F., Perez-Clemente, R.M., Gomez-Cadenas, A. 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiol. Plant.* 132: 452–466.
- Arrillaga, I., Lerman, V., Segura, J. 1992. Micropropagation of juvenile and adult flowering ash. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 346–350.
- Arumuganathan, K., Earle, E.D. 1991 Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218.

- Asins, M.J., Juárez, J., Pina, J.A., Puchades, J., Carbonell, E.A., Navarro, L. 2002. Una nueva clementina de baja fertilidad llamada 'Nulessín'. *Vida Rural* 157: 50-52.
- Ashraf, M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 199: 361-376.
- Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007. Improving plant abiotic-stress resistance by exogenous application of osmoprotectants glycinebetaine and proline. *J. Environ. Exp. Bot.* 59: 206–16.
- Bairu, M.W., Kane, J. 2011. Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. *Plant Growth Regul.* 63: 101-103.
- Bañuls, J., Legaz, F., Primo-Millo, E. 1990. Effect of salinity on uptake and distribution of chloride and sodium in some citrus scion-rootstock combinations. *J. Hortic. Sci.* 65: 715-724.
- Barceló-Muñoz, A., Encina, C.L., Simón-Pérez, E., Pliego-Alfaro, F. 1999. Micropropagation of adult avocado. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 58: 11-17.
- Barlass, M., Skene, K. 1982. *In vitro* plantlet formation from citrus species and hybrids. *Sci. Hortic.* 17: 333—341.
- Barlass, M., Skene, K. 1986. Citrus. En: Bajaj, Y. (ed). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 1: Trees. Ed. Springer-Verlag. Alemania. Pp 207-219.
- Barret, H.C., Rhodes, A.M. 1976. A numerical taxonomic study of the affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *System. Bot.* 1: 105-136.
- Bassan, M.M., Mourao-Filho, F.A.A., Miyata, L.Y., Mendes, B.M.J.M. 2011. *In vitro* organogenesis from internodal segments of adult sweet orange plants. *Pesq. Agrop. Bras.* 46: 672–674.
- Basu, S. K., Acharya, S.N., Thomas, J.E. 2008. Genetic improvement of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) through EMS induced mutation breeding for higher seed yield under western Canada prairie conditions. *Euphytica* 160: 249-258.
- Begum, F., Amin, M.N., Islam, S., Azad, M.A.K. 2004. A comparative study of axillary shoot proliferation from the nodal explants of three varieties pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.). *Biotechnology* 3: 46–62.
- Ben-Hayyim, G., Moore, G. 2007. Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. Pp. 627-642.
- Benderradji, L., Brini, F., Kellou, K., Ykhelf, N., Djekoun, A., Masmoudi, K., Bouzerour, H. 2012. Callus production, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions. *ISRN Agronomy*. En: Ahmad, P., Azooz, M. M., Prasad, M. N. V. (eds.). *Salt Stress in Plants: Signalling, Omics and Adaptations*, Springer Science Business Media New York, USA. pp. 465-495.

- Bermejo, A., Pardo, J., Cano, A., 2011. Influence of gamma irradiation on seedless citrus production: pollen germination and fruit quality. *Food Nutr. Sci.* 2: 169-180
- Birnbaum, K.D., Sánchez-Alvarado, A. 2008. Slicing across Kingdoms: Regeneration in Plants and Animals. *Cell.* 132: 697-710.
- Bonga, J.M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility; maturity and rejuvenation. En: Bonga JM, Durzan DJ (eds) *Tissue culture in forestry*. Nijhoff, M., Junk, W. The Hague. pp 387–412.
- Bordón, Y., Guardiola, J.L., García-Luis, A. 2000. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus* Rootstocks. *Ann. Bot.* 86: 159-166.
- Bracci, T., Minnocci, A., Sebastiani, L. 2008. *In vitro* olive (*Olea europaea* L.) cvs Frantoio and Moraiolo microshoot tolerance to NaCl. *Plant Biosyst.* 142: 563–571.
- Broertjes, C. 1977. Artificially induced genetic variation in fruit trees. *Acta Hort.* 75:19–26.
- Broertjes, C., Van Harten, A.M.1988. Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops. Elsevier, Amsterdam.
- Brumós, J., Colmenero-Flores, J.M., Conesa, A., Izquierdo, P., Sánchez, G., Iglesias, D., López-Climent, M.F., Gómez-Cadenas, A., Talón, M. 2009. Membrane transporters and carbon metabolism implicated in chloride homeostasis differentiate salt stress responses in tolerant and sensitive *Citrus* rootstocks. *Funct. Integr. Genom.* 9: 293–309.
- Cambra, M. Moreno, P. 2000. Tristeza. En: Durán-Vila, N., Moreno, P. (eds.) *Enfermedades de los cítricos*. Madrid: Ed. Mundi-Prensa, pp. 77-81.
- Cameron, J.W., Frost, H.B. 1968. Genetic, breeding and nucellar embryony. En: Reuther, W.; Batchelor, L.D.; Webber, H.J. (eds). *The Citrus Industry*. Vol. 2. University of California, Berkeley, U.S.A.
- Carimi F., De Pasquale F. 2003 Micropropagation of Citrus. En: Jain SM, Ishii K (eds) *Micropropagation of woody trees and fruits*. Kluwer, Holanda, pp 589–619.
- Carretero, C.L., Cantos, M., García, J. L., Troncoso, A. 2007. *In vitro–ex vitro* salt (NaCl) tolerance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant.* 43:364–369
- Castle, W.S. 1987 Citrus rootstocks. En: Rom, R.C.; Carlson, R.F. (eds.). *Rootstocks for fruit crops*, New York. Ed. Wiley. pp. 361-399.
- Castle, W.S., Tucker, D.P.H., Krezdorn, A.H., Youtsey, C.O. 1993. Rootstocks for Florida citrus. Rootstock selection. The first step to success. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, Florida. USA.

Cerdá, A., Caro, M., Fernandez, F.G., Guillén, M.G. 1977. Foliar contents of sodium and chloride on citrus rootstock irrigated with saline waters. En: Dregne, H.E. (ed) Managing saline water for irrigation. Proc. Int. Conf. Lubbock, Texas.

Cerezo, M., García-Agustín, P., Serna, M.D., Primo-Millo, E. 1997. Kinetics of nitrate uptake by citrus seedlings and inhibitory effects of salinity. *Plant Sci.* 126: 105–12.

Cervera, M., Juarez, J., Navarro, A.A., Pina, J.A., Durán-Vila, N., Navarro, L., Peña, L. 1998. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res.* 7: 51–59.

Cervera, M., Navarro, A., Navarro, L., Peña, L. 2008. Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. *Tree Physiol.* 28: 55-66.

Charbaji, T., Ayyoubi, Z. 2004. Differential growth of some grapevine varieties in Syria in response to salt *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 40(2): 221-224.

Chatzissavvidis, C., Chrysolvalantou, A., Therios, I., Dimassi, K. 2014. Responses of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) to continuously and gradually increasing NaCl concentration. *Acta Bot. Croat.* 73 (1), 275–280.

Chen, T.H.H., Murata, N. 2011. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell Environ.* 34: 1–20.

Consejería de Agua, Agricultura y Medio Ambiente Región de Murcia, 2013. www.carm.es/cagric

Corazza-Nunes, M.J., Machado, M.A., Nunes, W.M.C., Cristofani, M., Targon, M.L.P.N. 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* Burm. Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica* 126: 169–176.

Costa, M.G.C., Alves, V.S., Lani, E.R.G., Mosquim, P.R., Carvalho, C.R., Otoni, W.C. 2004. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of Citrus. *Sci. Hortic.* 100: 63–74.

Curtis, I.S., Mirkov, T.E. 2012. Influence of surfactants on growth and regeneration from mature internodal stem segments of sweet orange (*Citrus sinensis*) cv. Hamlin. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 108: 345-352.

Da Silva, R.M., Mendes, B.M.J., Mourao Filho, F.A. 2008. *In vitro* induction and culture of adventitious buds in epicotyl segments of sour orange. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 43: 1331–1337.

Dambier, D., Benyahia, H., Pensabene-Bellavia, G., Aka Kacar, Y., Froelicher, Y., Belfalah, Z., Beniken, L., Handaji, N., Printz, B., Morillon, R., Yesiloglu, T., Navarro, L., Ollitrault, P. 2011. Somatic hybridization for *Citrus* rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant Cell Rep.* 30: 883-900.

- Davies, F.S.; Albrigo, L.G. 1994. Cítricos. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- Donini, P., Sonnino, A. 1998. Induced mutation in plant breeding: current status and future outlook. In Somaclonal Variation and Induced Mutation in Crop Improvement. S. Jain, M., Brar, D.S., Ahloowalia B.S. (Eds). Kluwer Academic Publishers. pp. 255-291.
- Drew, R.A. 1988. Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field-grow trees. HortSci. 23: 609–611.
- Dutt, M., Madhavaraj, J., Grosser, J.W. 2010. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation and plant regeneration form a complex tetraploid hybrid citrus rootstock. Sci. Hortic. 123:454–458.
- El-Morsy, A.A., Millet, B. 1996. Rhythmic growth and optimization of micropropagation: the effect of excision time and position of axillary buds on *in vitro* culture of *Citrus aurantium* L. Ann. Bot. 78: 197–202.
- FAO. 2008. FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/nr/aboutnr/nrl/es/>
- FAO, 2009. <http://www.fao.org>
- FAO, 2013. <http://www.fao.org>
- FAO/IAEA. 2015. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/pbg/index.html>
- FEPEX. 2014. <http://www.fepex.es/datos-del-sector/comercio-intra-extra-ue-frutas-hortalizas>
- Ferguson, L., Grattan, S.R. 2005. How salinity damages citrus: osmotic effects and specific ion toxicities. Hortic. Technol. 15: 95–99.
- Flowers, T. J., Lachno, D. R., Flowers, S. A., Yeo, A. R. 1985. Some effects of sodium chloride on cells of rice cultured *in vitro*. Plant Sci. 39: 205–221.
- Forner, J.B. 1985. Características de los patrones de agrios tolerantes a tristeza. Consellería d’Agricultura i Pesca. Madrid, España. 20 pp.
- Forner-Giner, M.A., Llosá, M.J., Carrasco, J.L., Perez-Amador, M.A., Navarro, L., Ancillo, G. 2010. Differential gene expression analysis provides new insights into the molecular basis of iron deficiency stress response in the citrus rootstock *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. J. Exp. Bot. 61(2): 483–490.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. Physiol. Plant. 100: 241–254.

- Frankel, O.H. 1958. The dynamics of plant breeding. *J. Austr. Inst. Agricult. Sci.* 24: 112-123.
- Froelicher, Y., Wafa, M., Bassene, J. B., Costantino, G., Kamiri, M., Luro, F., Ruro, R., Morillon, R., Ollitrault, P. 2011. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genet. Genomes* 7: 49-61.
- Froneman, I.J., Breedt, H.J., Koekemoer, P.J.J., Van Rensburg, P.J.J. 1996. Producing seedless Citrus cultivars with gamma irradiation. *Proc. 8th Int. Citrus Cong.* 1: 159-163.
- Fu, X.Z., Khan, E.U., Hu, S.S., Fan, Q.J., Liu, J.H. 2011. Overexpression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Atriplex hortensis* enhances salt tolerance in the transgenic trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Environ. Exp. Bot.* 74: 106–113.
- Fuentes, J.L., Santiago, L., Valdés, Y., Guerra, M., Ramírez, L.L., Prieto, E.F., Rodríguez, N.N., Velázquez, B. 2004. Mutation induction in zygotic embryos of avocado (*Persea americana* Mill). *Biotecnología aplicada* 21: 82-84.
- Gárate, A., Bonilla, I. 2000. Nutrición mineral y producción vegetal. En: Azcón-Bieto, J. Talón, M. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. McGraw-Hill Iberoamericana. Barcelona. España. Pp. 113-130.
- García-Lidón, A., Ortiz, J.M., García-Legaz, M.F., Cerdá, A. 1998. Role of rootstock and scion or root and leaf ion accumulation in lemon trees grown under saline conditions. *Fruits* 53: 89-97.
- García-Luis, A., Molina, R. V., Varona, V., Castelló, S., Guardiola, J. L., 2006. The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration *in vitro* in epicotyl cuttings of Troyer citrange. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 85: 137-144.
- García-Reina, G., Robaina, R., Luque, A. 1988. Regeneration of thalliclones from *Laurencia sp.* (Rhodophyta). En: Pais, M. S. S., Mavituna, F., Novais, J. M. (eds). *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 81-86.
- García-Sánchez, F., Carvajal, M., Porras, I., Martínez, V. 2002. Effects of salinity and rate of irrigation on yield, fruit quality and mineral composition of 'Fino 49' lemon. *Europ. J. Agron.* 19 (3): 427–437.
- García-Sánchez, F., Carvajal, M., Porras, I., Botía, P., Martínez, V. 2003. Response of 'Star Ruby' grapefruit on two rootstocks to NaCl salinity. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 78(6): 859-865.
- García-Sánchez, F., Syvertsen, J.P., 2006. Salinity tolerance of Cleopatra mandarin and Carrizo citrange citrus rootstock seedlings is affected by CO₂ enrichment during growth. *J. Am. Hort. Sci.* 131: 24–31.
- George, E.F. 1993. *Plant propagation by tissue culture. Part 1: the technology. Exegetics*, London. Inglaterra. pp 231–272.

- George, E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2: in practice. Exegetics, London. Inglaterra.
- George, E.F., Hall, M.A., De Klerk G. 2008. Plant propagation by tissue culture. Vol. 1 The background. Ed. Springer. Dordrecht. Holanda.
- Germanà, M.A., Macaluso, L., Patricolo, G., Chiancone, B. 2008. Morphogenic response in vitro of epicotyl segments of *Citrus macrophylla*. *Plant Biosyst.* 142:661–664.
- Germaná, M.A., Micheli, M., Chiacone, B., Macaluso, L., Standardi, A. 2011. Organogenesis and encapsulation of in vitro-derived propagules of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 106: 299-307.
- Ghorbel, R., Navarro, L., Durán-Vila, N. 1998. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). *J. Hortic. Sci. Biotech.* 73:323–327.
- Giner, B. 1893. Tratado complete del Naranja. Ed. P. Aguilar, Valencia. España.
- Gmitter, F.G., Grosser, J.W., Moore, G.A. 1992. Citrus. En: Hammerschlag, F.A., Litz, R.E. (eds.). *Biotechnology of perennial fruit crops*. CAB International, Wallingford, Inglaterra.
- Gmitter, F.G., Jaya, R. Soneji, J.R., Rao, M.N. 2009. Citrus Breeding. En: Jain, S.M., Priyadarshan, P.M. (eds.). *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*. Pp. 105-134.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G. Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H. y col. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E., Talón, M. 1998. Involvement of abscisic acid and ethylene in the response of citrus seedlings to salt shock. *Plant Physiol.* 103: 475-484.
- Gonzaga, D.L., Rocha-Latado, R., Tulmann-Neto, A., Pio, R.M. 2011. Radiosensitivity of two propagules of citrus. *Bragantia.* 70 (1): 13-18.
- Gosal, S.S., Bajaj, Y.P.S. 1984. Isolation of sodium chloride resistant cell lines in some grain legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 22: 209-214.
- Gosal, S.S., Gill, M.I.S., Grewal, H.S. 1995. Somatic embryogenesis in Citrus species. En: Jain S, Gupta P, Newton R (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1–21.
- Goswami, R., Sharma, Singh, P.K., Singh, G. 2013. Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 19(1): 137–145.

- Grosser JW, Chandler JL (1986) *In vitro* multiplication of Swingle citrumelo rootstock with coumarin. HortSci. 21: 518–520.
- Grosser, J., Ollitrault, P., Olivares-Fuster, O. 2000. Somatic hybridization in Citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 36: 434-449.
- Grosser, J.W., Medina-Urrutia, V., Ananthkrishnan, G., Serrano, P. 2004. Building a replacement sour orange rootstock: Somatic hybridization of selected mandarin + pummelo combinations. J. Am. Soc. Hort. Sci. 129: 530–534.
- Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B.A., Ben-Hayyim, G. 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. Planta. 203:460–469.
- Gulsen, O., Uzum, A., Pala, H., Canihos, E., Kafa, G. 2007. Development of Seedless and Mal Secco Tolerant Mutant Lemons through Budwood Irradiation. Sci. Hortic. 112 (2): 184-190.
- Hackett, W.P. 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. Hortic. Rev. 7: 109-155.
- Hartman, H.H., Kester, D.E., Davies, F.T.D., Geneve, R.L. (eds) 2004. Plant propagation. Prentice Hall, New Delhi.
- He, S., Han, Y., Wang, Y., Zhai, H., Liu, Q. 2009. *In vitro* selection and identification of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants tolerant to NaCl. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 96: 69–74.
- Hensz, R.A. 1971. Star Ruby, a new deep-red-fleshed grapefruit variety with distinct tree Characteristics. J. Rio Grande Valley Hortic. Soc. 25: 54-58.
- Herrero, R., Asins, M.J., Carbonell, E.A., Navarro, L. 1996. "Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae .1. Intraspecies and intragenus genetic variability", Theor. Appl. Genet. 92 (5): 599-609.
- Hirai, M., Kozaki, I., Kajiura, I. 1986. The rate of spontaneous inbreeding of trifoliolate orange and some characteristics of the inbred seedling. Japan. J. Breed. 36:138–146.
- Hodgson, R.W. 1967. Horticultural varieties of Citrus. En Reuther, W., Batchelor, L.D., Webber, H.J. (eds.). The Citrus Industry. Vol 1. Univ. California, Berkeley, USA. pp.431-591.
- Hossain, Z., López-Climent, M.F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A. 2009. Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. J. Plant Physiol. 166(13): 1391-1404.
- Iglesias, D.J., Usach, A., Soler, G., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E., Talón, M. 2004. Descripción de nuevas mutaciones de naranjo ‘Washington Navel’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Levante agrícola. 371: 228-240.

Iwamasa, M. 1966. Studies on the sterility in the genus *Citrus* with special reference to the seedlessness. *Bull. Hortic. Res. Stat.* 6: 1-81.

Jain, S.M., Ahloowalia, B.S., Veilleux, R.E. 1998. Somaclonal variation in crop improvement. En: Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S. (eds) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. pp 203–218.

Jain, S.M. 2005. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. *Plant, Cell, Tissue Organ Culture.* 82: 113-123.

Khan, I.A., Roose, M.L. 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 113: 105–110.

Kobayashi A. K., Besspalhok J. C., Pereira L. F. P., Vieira L. G. E. 2003. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74: 99-102.

Kotsias, D., Roussos, P.A. 2001. An investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in *in vitro* shoot tip and node culture of lemon seedlings. *Sci. Hortic.* 89: 115–128.

Levy, Y., Syvertsen, J. 2003. Irrigation water quality and salinity effects in citrus trees. En: *Horticultural Reviews*, Vol. 30. Ed. J. Janick. Wiley, London, Inglaterra. 544 pp.

Liu, S., Wang, H., Zhang, J., Fitt, B.D.L., Xu, Z., Evans, N. Liu, W. 2005. *In vitro* mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Rep.* 24: 133-144.

Lokhande, V., Nikam, T., Patade, V., Ahire, M., Suprasana, P. 2011. Effects of optimal and supra-optimal salinity stress on oxidative defence, osmolytes and *in vitro* growth responses in *Sesuvium portulacastrum*. *Plant Cell Tiss, Organ Cult.* 104: 41-49.

López-Climent, M.F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A. 2008. Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in *Citrus*. *Environ. Exp. Bot.* 62: 176-184.

Luan, Y.S., Zhang, J., Gao, X.R., An, L.J. 2007. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 88: 77-81.

Lutts, S., Majerus, V., Kinet, J.M. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol. Plant.* 105: 450-458.

Maas, E.V. 1993. Salinity and citriculture. *Tree Physiol.* 12: 195–216.

Magrama. 2014, <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/default.aspx>

- Maluszynski, M., Nichterlein, K., van Zanten, L., Ahloowalia, B.S. 2000. Officially released mutant varieties – the FAO/IAEA Database. *Mut, Breed, Rev*, 12: 1–84.
- Marques, N.T., Nolasco, G.B., Leitao, J.P. 2011. Factors affecting *in vitro* adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. *Sci. Hortic.* 129: 176-182.
- Marutani-Hert, M., Evens, T.J., McCollum, G.T., Niedz, R.P. 2011. Bud emergence and shoot growth from mature citrus nodal stem segments. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106: 81-91.
- Marques, N.T., Nolasco, G.B., Leitao, J.P. 2011. Factors affecting *in vitro* adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. *Sci. Hortic.* 129: 176–182.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J., 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 49: 69–76.
- Mendes, B.M.J., Cardoso, S.C., Boscariol-Camargo, R.L., Cruz, R.B., Mourao-Filho, F.A.A., Bergamin-Filho, A. 2010. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. *Plant Pathol.* 59: 68–75.
- Micke, A. B., Donini y M. Manuzynski. 1987. Induced mutations for crop improvement. A review. *Tropic Agric.* 64: 259-278.
- Miles, J.W. 2007. Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. *Crop Sci.* 47 (3): 238-249.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9): 405-410.
- Molina, R.V., Castelló, S., García-Luis, A., Guardiola, J.L. 2007. Light cytokinin interactions in shoot formation in epicotyl cuttings of Troyer citrange cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 89: 131–140.
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Bessalho, J.C., Kobayashi, A.K., Pileggi, M., Leite, R.P., Pererira, L.F.P. Vieira, L.G.E. 2004. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Sci.* 167: 1375-1381.
- Montoliu, A., López-Climent, M.F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R., Gómez-Cadenas, A. 2009. A novel *in vitro* tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. *Plant Growth Regul.* 59: 179–187.
- Montoliu, A., Gómez-Cadenas, A., Pérez-Clemente, R. 2010. *In vitro* adventitious rooting of Carrizo citrange microshoots. *HortSci.* 45: 988-990.

Moreira-Dias, J.M., Molina, R.V., Bordón, Y., Guardiola, J.L., Garcia-Luis, A. 2000. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. *Ann. Bot.* 85:103–110.

Moreira-Dias, J.M., Molina, R.V., Guardiola, J.L., Garcia-Luis, A. 2000. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. *Sci. Hortic.* 87: 275–290.

Moreno, P., Ambrós, S., Albiach-Marti, M.R., Guerri, J., Peña, L. 2008 Plant diseases that changed the world - Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant Pathol.* 9: 251-268.

Moya, J.L., Primo-Millo, E., Talón, M. 1999. Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant Cell Environ.* 22: 1425-1433.

Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167: 645–63.

Munns, R., Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 651–81.

Navarro, L., Aleza, P., Juárez, J. 2006. Mejora de la calidad de los cítricos. En: Llacer, G., Díez, M.J., Carrillo, J.M., Badenes, M.L. (Eds.). *Mejora Genética de la Calidad de las Plantas*. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. pp. 581-596.

Nicolisi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., Malfa, S.L., Continella, G., Tribulato, E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. App. Gen.* 100: 1155-1166.

Niknam, S.R., McComb, J. 2000. Salt tolerance screening of selected Australian woody species-a review. *Forest Eco. Manag.* 139: 1-19.

Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.* 109, 735-742.

Oliveira, M.L.P., Costa, M.G.C., Silva, C.V., Otoni, W.C. 2010. Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 45: 654–660.

Omura, M., Hidaka, T. 1992 Shoot tip culture of Citrus. I. Longevity of cultured shoots. *Bull Fruit Tree Res Stn* 22: 37–47.

Paranychianakis, N.V., Chartzoulakis, K. 2005. Irrigation of Mediterranean crops with saline water: from physiology to management practices. *Agric. Ecosyst. Environ.* 106, 171–187.

Parry, A.J., Madgwick, J., Bayon, C., Teerall, K., Hernández-Lopez, A., Baudo, M., Rakszegi, M, Hamada, W., Al-Yassin, A., Ouabbou, H., Labhilili, M., Phillips, A. L. 2009. Mutation Discovery for crop improvement. *J. Exp. Bot.* 60: 2817-2825.

- Peña, L., Perez, R.M., Cervera, M., Juarez, J.A., Navarro, L. 2004 Early events in Agrobacterium-mediated genetic transformation of citrus explants. *Ann. Bot.* 94(1): 67-74.
- Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A. 2012. *In vitro* Tissue Culture, a Tool for the Study and Breeding of Plants Subjected to Abiotic Stress Conditions. En: Leva, A., Rinaldi, L. (eds.). *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. pp 91-108.
- Pérez-Pérez J.G., Castillo, I.P., García-Lidón, A., Botía, P., García-Sánchez, F. 2005. Fino lemon clones compared with the lemon varieties Eureka and Lisbon on two rootstocks in Murcia (Spain). *Sci. Hortic.* 106 (4): 530-538.
- Pérez-Tornero, O., Burgos, L. 2000. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 63: 133–141.
- Pérez-Tornero, O., Tallón, C.I., Porras, I. 2010. An efficient protocol for micropropagation of lemon from mature nodal segments. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100: 263–271.
- Phillips, R.C. 2004. *In vitro* morphogenesis in plants - recent advances. *In Vitro Cell Dev.-Plant.* 40: 342-345.
- Pinet-Leblay, C., Turpin, F.X., Chevreau, E. 1992. Effect of gamma and ultraviolet irradiation on adventitious regeneration from *in vitro* cultured pear leaves. *Euphytica* 62: 225-233.
- Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 64: 185–210.
- Predieri, S., Zimmerman, R.H. 2001. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma-rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica* 3: 217–227.
- Primo-Millo, E., Legaz, F. y Talón, M. 2000. Repercusión de la concentración de nitrato y la salinidad del agua de riego sobre la calidad del fruto de los cítricos. *Levante Agrícola.* 350: 18-26.
- Queirós, F., Fidalgo, F., Santos, I., Salema, R. 2007. *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. *Biol. Plant.* 51:728–734.
- Rai, M.K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M.P., Dhawan, A.K. 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—An overview of the recent progress. *Environ. Exp. Bot.* 71: 89-98.
- Rathore, J.S., Rathore, M.S., Singh, M., Singh, R.P., Shekhawat, N.S. 2007. Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. *Indian J. Biotechnol.* 6: 239–244.
- Roose, M.L., Williams, T.E. 2007. Mutation breeding. En :Citrus genetics. Khan, A. (ed.) CAB International, Wallingford, Inglaterra. pp. 345-352.

- Ruiz, D., Martínez, V., Cerdá, A. 1997. Citrus response to salinity: growth and nutrient uptake. *Tree Physiol.* 17: 141-150.
- Rullán, J. 1896. Cultivo del naranjo en las Baleares. Ed. La Sinceridad. Soller, España.
- Rus, A.M., Panoff, M., Perez-Alfocea, F., Bolarin, M.C. 1999. NaCl responses in tomato calli and whole plants. - *J. Plant Physiol.* 155: 727-733.
- Rus, A.M., Ríos, S., Olmos, E. 2000. Long-term culture modifies the salt responses of callus lines of salt tolerant and salt-sensitive tomato species. *J. Plant Physiol.* 157: 413-420.
- Sahi, C., Singh, A., Blumwald, E., Grover, A. 2006. Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. *Physiol. Plant.* 127: 1-9.
- Schinor, E.H., Azevedo, F.A., Mourao-Filho, F.A.A., Mendes, B.M.J. 2011. *In vitro* organogenesis in some *Citrus* species. *Rev. Bras. Frutic.* 33: 526-531.
- Scora, R.W. 1975. On the history and origin of Citrus. *Bull. Torrey Bot. Club* 102: 369-375.
- Serraj, R., T.R. Sinclair. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions. *Plant Cell Environ.* 25: 333-341.
- Shanchun, C., Feng, G., Jinren, Z. 1991. Studies on the seedless character of *Citrus* induced by irradiation. *Mut. Breed. News.* 37: 8-9.
- Shawkat, A., Bushra, M. 2006. Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): effect of explant type and hormone concentration. *Acta Bot. Croat.* 65: 137-146.
- Shibli, R.A., Shatnawia, M.A., Swaidata, I.Q. 2003. Growth, Osmotic Adjustment, and Nutrient Acquisition of Bitter Almond Under Induced Sodium Chloride Salinity *In Vitro*. *Com. Soil Sci. Plant Anal.* 1969-1979.
- Silva, R.P., Mendes, B.M.J., Mourao-Filho, F.A.A. 2008. *In vitro* induction and culture of adventitious buds in epicotyl segments of sour orange. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 43: 1331-1337.
- Silva, R.P., Souza, A.J., Mendes, B.M.J., Mourao-Filho, F.A.A. 2010. Sour orange bud regeneration and *in vitro* plant development related to culture medium composition and explant type. *Rev. Bras. Frutic.* 32: 1-8.
- Soost R.K., Cameron, J.W. 1975. Citrus. En: Janick, J., Moore, J.N. (eds.) *Advances in fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Ind. USA.
- Soost R.K., Roose, M. 1996. Citrus. En: Jules J, Moore JN (eds.) *Fruit breeding: tree and tropical fruits*, vol 1. John Wiley & Sons Inc., New York, USA. pp. 257-323.

- Spiegel-Roy, P., Vardi, A. 1989. Induced mutation in Citrus. Proc. 6th Int. Cong. 773-776.
- Spiegel-Roy, P., Goldschmidt, E.E. 1990. Biology of horticultural crops biology of citrus. Cambridge University Press, New York. USA. 244 pp.
- Spiegel-Roy, P., Vardi, A., Elhanati, A. 1990. Seedless induced mutant in highly seeded lemon (*Citrus limon*). Mut. Breed. News. 36: 11.
- Starrantino, A., Caruso, A. 1988 *In vitro* culture for Citrus micropropagation. Acta Hort. 227: 444–446.
- Storey, R., Walker, R.R. 1987. Some effects of root anatomy on K, Na and Cl loading of citrus roots and leaves. J. Exp. Bot. 38: 1769-1780.
- Storey, R., Walker, R.R. 1999. Citrus and salinity. Sci. Hortic. 78: 39–81.
- Sudhir, P., Murthy, S.D.S., 2004. Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. Photosynthetica 42: 481–486.
- Sugiyama, M. 1999. Organogenesis *in vitro*. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 61–64.
- Sutarto, I., Agisimanto, D., Supriyanto, A. 2009. Development of promising seedless Citrus mutants through gamma irradiation. En: SHU, Q.Y. (editor). Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia. pp. 306-308.
- Swingle, W. T. y Reece, P. C. 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives. En: Reuther W., Webber H. and Batchelor L. (eds.) The Citrus Industry, Vol. 1. pp. 190 – 430. University of California, USA.
- Tal, M. 1994. *In vitro* selection for salt tolerance in crop plants: theoretical and practical considerations. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 30: 175–180.
- Tanaka, T. 1977. Fundamental discussion of *Citrus* classification. Stud. Citrol. 14: 1–6.
- Teakle, N.L., Tyerman, S.D. 2010. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. Plant Cell Environ. 33: 566–589.
- Thorpe, T.A. 1994. Morphogenesis and regeneration. En: Vasil, I.K., Thorpe, T.A. (eds.). Plant cell and tissue culture. Kluwer Academic. Dordrecht. Holanda pp.17-36.
- Tong, Z., Tan, B., Zhang, J., Hu, Z., Guo, W., Deng, X. 2009. Using precocious trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) to establish a short juvenile transformation platform for citrus. Sci. Hortic. 119: 335–338.
- Torregrosa, L., Bouquet, A. 1993 Culture *in vitro*: apports actuels et perspectives pour la multiplication et l'amélioration de la vigne. Prog. Agri. Vit. 5/6: 113–114.

- Troncoso, A., Matte, C., Cantos, M., Lavee, S. 1999. Evaluation of salt tolerance of *in vitro* grown grapevine rootstock varieties. *Vitis*. 38: 55–60.
- Türkan, I., Demiral, T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 67: 2-9.
- Van Harten AM. 2007. Mutation Breeding: Theory and Practical Applications. Cambridge University Press. London, Inglaterra. 368 pp.
- Vardi, A., Elhanati, A., Frydman-Shani, A., Neumann, H. 1996. Strategies and considerations in mandarin improvement programmes. Proc. 8th Inter. Citrus Cong. 1: 109-112.
- Vardi, A., Levin, I., Carmi, N. 2008. Induction of Seedlessness in Citrus: From Classical Techniques to Emerging Biotechnological Approaches. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 133: 117-126.
- Vieitez, A.M., Ballester, A., Vieitez, M.L., Vieitez, E. 1983. *In vitro* plantlet regeneration of mature chesnut. *J. Hort. Sci.* 58: 457-463.
- Vieitez, A.M., San-José, M.C., Vieitez, E. 1985. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. *J. Hort. Sci.* 60: 99–106.
- Vijayan, K., Chakraborti, S.P., Gosh, P.D. 2003. *In vitro* screening of mulberry (*Morus spp.*) for salinity tolerance. *Plant Cell Rep.* 22: 350–357.
- von Aderkas, P., Bonga, J.M. 2000. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol.* 20: 921–928.
- Wong, S.H., Knight, J.A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Leach, C.N., Sunderman, W. 1987. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinic. Chem.* 32(2): 214-220.
- Woodward, A.W., Bartel, B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95: 707-735.
- Woodward, A.J., Bennett, I.J. 2005. The effect of salt stress and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of *in vitro* propagated shoots of *Eucalyptus camdulensis*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 82: 189–200.
- Yost, H.T., Cummings, J., Blakeslee, A.F. 1954. The effects of fast neutron radiation from a nuclear detonation on chromosome aberration in datura. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 40: 447-51.
- Zekri, M., Parsons, L.R. 1990. Calcium influences growth and leaf mineral concentration of citrus under saline conditions. *Hortic. Sci.* 25:784–786.

Zekri, M. 1993. Salinity and Calcium Effects on Emergence, Growth and Mineral Composition of Seedlings of Eight Citrus Rootstocks. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 68 (1): 53-62.

Zhang, Y.J., Qian, Y.Q., Mu, X., Cai, Q.C., Zhou, Y.L., Wei, X.P. 1998. Plant regeneration from *in vitro*-cultured seedling leaf protoplasts of *Actinidia eriantha* Benth. *Plant Cell Rep.* 17: 819-821.

Zhang, F., Yang, Y.L., He, W.L., Zhao, X., Zhang, L.X. 2004 Effects of salinity on growth and compatible solutes of callus induced from *Populus euphratica*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant.* 40: 491-494.

Zhu J.K. 2002. Salt and drought signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53: 247-73.

Zou, X., Li, D., Luo, X., Luo, K., Pei, Y. 2008. An improved procedure for Agrobacterium-mediated transformation of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliolate* L. Raf.) via indirect organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 44: 169-177.

ANEXOS