



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**CARACTERIZACIÓN DE POMELO ‘PARANÁ’
MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES**

**UNA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN PRODUCCIÓN VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL NORDESTE**

LIC. CECILIA CAROLINA LEZCANO

DIRECTORA: ING. AGR. (PHD.) BLANCA ISABEL CANTEROS

CO-DIRECTOR: PHD. JORGE OMAR GIECO

2018

Esta tesis se la dedico a mi papá, por su esfuerzo, dedicación y por ser el motor en nuestras vidas.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por otorgarme la Beca de Formación que permitió dedicarme enteramente a la tesis.

A la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA de Bella Vista, Corrientes por brindarme las instalaciones, equipamiento y un lugar para desarrollar el trabajo de tesis.

A la Maestría en Producción Vegetal de la Universidad Nacional del Nordeste por otorgarme la posibilidad de realizar el posgrado.

A la Facultad de Ciencias Agrarias por brindar las instalaciones para la realización de los cursos de posgrado.

A mi directora, la Dra. Blanca Isabel Canteros “Nelly” por darme la posibilidad de trabajar en su equipo. Por su generosidad tanto profesional como personal. Por compartir su experiencia. Por apoyar y alentar la realización de esta tesis y por ayudarme a dar los primeros pasos en mi formación profesional. Por su entusiasmo y dedicación fuente de inspiración en el trabajo.

A mi codirector, el Dr. Jorge Omar Gieco por aceptar la codirección de esta tesis. Por la cordialidad y dedicar parte de su tiempo en las revisiones de los informes y manuscrito. Por las correcciones y sugerencias brindadas.

Al Dr. Esteban Hopp por su colaboración y la buena disposición en las consultas realizadas. Por compartir sus conocimientos. Por las sugerencias y dar su punto de vista.

A la Dra. Andrea Fabiana Puebla del Instituto de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Unidad de Genómica. Por la

buena disposición para la realización de pasantías y capacitaciones con su grupo de trabajo. Por el apoyo y conocimientos brindados y supervisar los trabajos de entrenamiento en el laboratorio. A Vero y Marianne por la dedicación y paciencia al enseñarme sus técnicas en el laboratorio. A todo el equipo, excelentes profesionales y personas que colaboraron para que mis estadías fueran muy gratas, Andrea, Vero, Marianne, Pablo, Naty, Vale, Analía y Flor.

Al Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) por permitirme realizar entrenamientos y consultas técnicas en el Laboratorio de Citogenética y Evolución Vegetal. A Viviana Solís Neffa por la buena disposición y facilitarme la realización de pasantías con su grupo de trabajo. Especialmente a la Dra. Sara Moreno y la Lic. Natalia Mola Moringa por la paciencia, por los consejos y sugerencias para el trabajo en laboratorio, por enseñarme los protocolos, manejo de instrumental y análisis de datos moleculares.

A la gente de personal y administración de la EEA por facilitarme los trámites y el papeleo.

A mis compañeros de la EEA, en especial al grupo Citrus. A Víctor por darme su apoyo y muchas veces aconsejarme.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Luci, Jorge, Fabián, Rolo por las largas jornadas de trabajo, por ayudarme y hacer que las tareas resulten más llevaderas. A los muchachos de campo Víctor, Anibal y Cambá. A Alberto por sus consejos y compartir su experiencia.

A mis compañeros y amigos de la Maestría (4ta cohorte) por los cursos compartidos y por formar un hermoso grupo. A Analía compañera y amiga, por explicarme cuestiones agronómicas, por su compañía y aguante en la cursada.

A mis amigos del trabajo y de la vida Sarita, Nati, Caro, Vale, Leti, Fede, Jorge, Analía, Pao, Yesi, Marisol. Por su amistad, por ayudarme, aconsejarme y respetar mis tiempos y sobre todo por el aguante.

A Sarita y a Nati por estar siempre cuando las necesité, por escucharme, por entender mis locuras y por acompañarme en los buenos y malos momentos.

A mi familia por entenderme y apoyarme. A mi mamá y a mis hermanos Ariel, Sergio y Amalia. Por el interés en lo que hago, por apoyarme y muchas veces cuestionarme.

A mi hermanito Sergio por el entusiasmo y por el querer superarse cada día, por las preguntas ocurrentes y por los momentos que compartimos.

A Amalia por ser mi hermana y gran amiga, por ser mi apoyo y ayudarme siempre, por escucharme y entenderme, por las alegrías y los momentos difíciles que pasamos.

A mi papá Antonio José Lezcano por enseñarnos tanto, por mostrar con el ejemplo el amor al trabajo, la responsabilidad y perseverancia, por no rendirse nunca, por escucharme y aconsejarme siempre. Por educarme y porque sin su apoyo y esfuerzo no hubiera podido realizar mi formación. Por todo lo que hiciste por mí y mis hermanos, por los buenos y no tan buenos momentos que pasamos. Porque fuiste y serás mi gran amigo.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	9
Historia y Áreas de Origen de los Cítricos	9
Características Generales	12
Origen y Clasificación de Cítricos Cultivados.....	13
Contexto de la Citricultura Actual.....	21
El cultivo de pomelo	23
Variedades de pomelo <i>Citrus x paradisi</i> Macf.y pummelo <i>C. maxima</i> (Burm.) <i>Merr.</i>	27
Pomelo ‘Paraná’ <i>Citrus sp.</i>	34
Marcadores Moleculares Empleados en la Caracterización de Material Vegetal	39
HIPÓTESIS.....	45
OBJETIVOS.....	46
General	46
Específicos	46
MATERIALES Y METODOS	47
Material de Estudio.....	47
Métodos	52

Extracción de ADN.....	52
Protocolo de Extracción	52
Cuantificación de ADN	56
Marcadores Moleculares	60
Análisis Estadístico	69
RESULTADOS.....	72
Caracterización de la Variabilidad Genética	72
Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD)	72
Polimorfismo de microsatélites (SSR)	75
Estructuración de la Variabilidad Genética	86
Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA)	86
Distancias y Similitudes Genéticas de Nei	87
F de Wright (<i>Fst</i>) y <i>PhiPT</i>	87
Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)	92
Método de Agrupamiento de a Pares no Ponderados Usando Medias Aritméticas (UPGMA).....	96
DISCUSIÓN.....	98
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFÍA.....	111

INDICE DE TABLAS

TABLA	PAGINA
1. Variedades cítricas utilizadas como material de estudio	51
2. Componentes para la preparación de Buffer CTAB	55
3. Cuantificación de ADN mediante el Programa <i>ImageJ</i> , gel de agarosa 1,5 %	58
4. Cantidad de ADN obtenidos mediante <i>NanoDrop</i> y <i>Qubit</i>	59
5. Secuencias de bases de RAPD seleccionados	61
6. Protocolo de amplificación para cebadores RAPD	62
7. Condiciones de amplificación de cebadores RAPD	62
8. Secuencias forward (f) y reverse (r) de los oligonucleótidos SSR seleccionados	64
9. Protocolo para amplificación de SSR	66
10. Condiciones de amplificación de los cebadores SSR	67
11. Solución de tinción para geles de poliacrilamida	67
12. Diversidad genética estimada del pomelo 'Paraná' en base a 33 loci RAPD de 104 muestras	73
13. Resumen de la diversidad genética del germoplasma cítrico basado en 15 loci SSR de 194 muestras	82
14. Alelos exclusivos para cada variedad y la frecuencia con la que fueron hallados	84
15. Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) basado en datos de SSR de las variedades cítricas estudiadas	86
16. Matriz de distancias e identidades genéticas de Nei entre las variedades cítricas	88

17.	Matriz de distancias e identidades genéticas de Nei de pomelo 'Paraná' sobre los cuatro portainjertos utilizados	89
18.	Valores de <i>Fst</i> para las variedades cítricas analizadas	90
19.	Valores de <i>PhiPT</i> y el nivel de significancia entre las variedades analizadas	91
20.	Resultados del análisis de coordenadas principales de las 14 variedades de <i>Citrus</i>	93

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Mapa con la indicación de las áreas geográficas donde se originaron las principales especies comerciales de cítricos	11
2. Relaciones entre especies y variedades de <i>Citrus</i> conocidas en la actualidad	17
3. Resumen del origen de los primeros cítricos	21
4. Pomelo 'Duncan'	24
5. Pomelo 'Marsh'	28
6. Pomelo 'Red Blush'	29
7. Pomelo 'Red Shambar'	30
8. Pomelo 'Star Ruby'	30
9. <i>Pummelo</i> 'Chandler'	31
10. Híbrido triploide 'Oroblanco'	32
11. Síntomas de cancrrosis en pomelo	33
12. Pomelo 'Paraná'	37
13. Procedimiento para la extracción de ADN de <i>Citrus</i> a partir de material fresco	54
14. Prueba de calidad y cantidad de ADN cítrico	57
15. Perfiles electroforéticos RAPD del cebador OPAT 14 en pomelo 'Paraná'	74
16. Perfiles electroforéticos RAPD a partir del cebador OPH 15 de distintas variedades cítricas	74
17. Perfiles electroforéticos SSR del cebador P 73 de distintas variedades cítricas	76

18.	Perfiles electroforéticos SSR de distintas variedades cítricas mediante gel de poliacrilamida 6 %	77
19.	Perfiles electroforéticos del cebador CCSM09 por el sistema <i>Fragment Analyzer</i> en distintas variedades cítricas	78
20.	Perfiles electroforéticos del cebador CCSM156 por el sistema <i>Fragment Analyzer</i>	79
21.	Perfiles electroforéticos del marcador CCSM77 por el sistema <i>Fragment Analyzer</i>	80
22.	Gráfico resultante del análisis de coordenadas principales (PCoA) obtenido a partir de los patrones de marcadores SSR de las variedades cítricas	93
23.	Gráfico resultante del análisis de coordenadas principales (PCoA) de pomelo ‘Paraná’ considerando cada muestra según el portainjerto utilizado	94
24.	Gráfico resultante del análisis de coordenadas principales (PCoA) donde se consideraron los portainjertos para el agrupamiento	95
25.	Dendrograma que representa las relaciones entre las 14 variedades cítricas	97

ABREVIATURAS

a. A. C. – años antes de Cristo

ADN – ácido desoxirribonucleico

AFLP – polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados

CFI – Consejo Federal de Inversiones

CICV y A – Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas

CINa – cloruro de sodio

CNIA – Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias

CTAB – bromuro de cetiltrimetilamonio (*cetyl trimethyl ammonium bromide*)

dNTP – desoxiribonucleótido trifosfato

EDTA – ácido etilendiaminotetra-acético

EEA – Estación Experimental Agropecuaria

HLB – huanglongbing

INASE – Instituto Nacional de Semillas

INTA – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

kb – kilobases

kg – kilogramos

km – kilómetros

M – molar

mg – miligramos

MgCl₂ – cloruro de magnesio

mili-Q – agua ultrapura

min – minutos

ml – mililitros

mm – milímetros

mM – milimolar

NEA – Nordeste Argentino

ng – nanogramos

PCoA – Análisis de Coordenadas Principales

PCR – Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa

pb – pares de bases

PVP – polyvinylpoly-pyrrolidone

RAPD – Polimorfismos de ADN Amplificado al Azar (*random amplified polymorphic DNA*)

RNasa – ribonucleasa

rpm – revoluciones por minuto

seg – segundos

SENAVE – Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas de Paraguay

SENASA – Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina

SSR – microsatélites (*simple sequence repeats*)

TAE – tampón Tris-ácido acético-EDTA

tn – toneladas

Tris – N-Tris-(hidroximetil)-aminoetano

U – unidades

μl – microlitros

μM – micromolar

UV – ultravioleta

V – voltaje

x – proporción de concentración en soluciones

X – cruzamientos que originaron híbridos

RESUMEN

El género *Citrus* al igual que los géneros *Fortunella* (kumquat) y *Poncirus* (naranja trifolio) pertenecen a la familia Rutaceae (subfamilia Aurantoidea, tribu Citreae) subtribu Citrinae, y son los tres géneros de importancia comercial en la familia. La gran diversidad de especies y variedades en el género *Citrus*, se debe principalmente a la ocurrencia de mutaciones y la frecuente aparición de semillas poliembriónicas. El pomelo 'Paraná' (*Citrus sp.*) como la mayoría de las especies cítricas, surgió en el Sudoeste asiático, en contraste con los demás pomelos (*C. paradisi*) cuyo centro de origen fue en las islas Barbados, en el Caribe. Tal como los citrus diploides, pomelo 'Paraná' cuenta con número cromosómico $2n= 18$. Además de presentar características industriales mejoradas, como la calidad de frutos y buen comportamiento a campo, el pomelo 'Paraná' ha demostrado alta resistencia cuantitativa a la cancrrosis de los cítricos, enfermedad bacteriana causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Esta enfermedad es endémica en la zona del NEA, afecta a todos los cítricos, pero en particular todas las variedades de pomelo son muy susceptibles. En la actualidad, las investigaciones en cuanto a sanidad, principalmente están dirigidas a la obtención de nuevas variedades cítricas para contrarrestar las pérdidas producidas por una enfermedad nueva en la zona, cuyo agente causal es la bacteria *Candidatus Liberibacter* y provoca el "greening" o HLB (huanglongbing). Enfermedad muy devastadora en los cítricos que ha causado y sigue afectando ampliamente la producción de todas las variedades cítricas. En plantas cultivadas y en especial en *Citrus*, la caracterización de material genético ha sido dificultosa debido a que la alta fertilidad entre especies, la reproducción apomíctica y poliembriónía son habituales, así como la escasez de marcadores de ADN polimórficos. A su vez, la identificación de variedades y en particular, cultivares derivadas por mutaciones

espontáneas e inducidas, sigue siendo una tarea difícil. En tal sentido, se planteó la siguiente hipótesis: el estudio de la diversidad genética relativa de pomelo 'Paraná' y su correspondiente caracterización genética mediante marcadores moleculares específicos del genoma cítrico permite genotipificar el material de interés facilitando la evaluación del grado de parentesco relativo del pomelo 'Paraná' con las demás especies cítricas. Consecuentemente, los objetivos propuestos fueron: caracterizar molecularmente pomelo 'Paraná' y otras especies cítricas mediante marcadores de ADN. Caracterizar mediante el uso de marcadores SSR y RAPD el material de pomelo 'Paraná'. Estimar posibles relaciones de parentesco de pomelo 'Paraná' con otras especies y variedades cítricas conocidas. Con el fin de analizar la variabilidad y estructura genética se emplearon marcadores nucleares RAPD y SSR. El análisis de la variabilidad genética mediante RPAD reveló que el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosis esperada promedio fueron elevados en pomelo 'Paraná'. Sin embargo, no se detectaron bandas exclusivas. Asimismo, el Índice de diversidad para el mismo también resultó elevado. El mayor número de alelos diferentes se observó en naranja 'Valencia' (*C. sinensis*), pomelo 'Duncan' (*C. paradisi*) y pomelo 'Paraná' (*Citrus sp.*). Sin embargo, el porcentaje de loci polimórficos (PLP) varió entre las muestras, los mayores valores de PLP en general se observaron en variedades de pomelo, entre ellos pomelo 'Duncan' y pomelo 'Paraná' obtenidos con SSR. A su vez, la heterocigosis esperada y el índice de diversidad resultaron mayores en naranja 'Valencia'. Sin embargo, la variabilidad dentro de cada variedad fue en general escasa. El análisis de la estructuración genética de germoplasma cítrico, indicó que el mayor grado de división se da entre variedades. Asimismo, en el análisis de la varianza molecular (AMOVA) las variedades resultaron genéticamente diferentes entre sí y los resultados fueron estadísticamente significativos. La mayor distancia genética se observó entre pomelo 'Paraná' y naranja 'Salustiana' (*C. sinensis*) (1,666) y entre 'Paraná' y 'Poorman' (*Citrus sp.*) (1,020). A su vez, los índices *Fst* y *PhiPT* indicaron menor distancia genética entre pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' (*Fst* 0,233 y

PhiPT 0,394) y entre pomelo 'Paraná' y *C. maxima* (*pummelo*) (*Fst* 0,311 y *PhiPT* 0,490). Es decir que están mucho más relacionados genéticamente éstos que cualquier otra. El análisis de coordenadas principales agrupó principalmente pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia', y *C. maxima* muy cercana a ellos. En el análisis de UPGMA se diferenció el pomelo híbrido 'Poorman' del resto de las variedades. Pomelo 'Paraná' se agrupó junto a naranja 'Valencia' separado del resto de las variedades de pomelo. En principio, los caracteres morfológicos distintivos que permitieron diferenciar agronómicamente las variedades de pomelo, *C. paradisi* ('Marsh', 'Foster', 'Duncan', 'Red Blush', 'Red Shambar' y 'Star Ruby'), no coincidieron con la similitud genética entre éstos. Se logró diferenciar genéticamente pomelo 'Paraná' y se la consideró como una variante distinta, separada de otros cultivares de pomelo. Se pudo establecer que el pomelo 'Paraná' es un híbrido natural independiente, originado posiblemente del cruzamiento de una variante de naranja dulce (*Citrus x sinensis*) y *pummelo* (*C. maxima*). El análisis exhaustivo de pomelo 'Paraná', considerando los portainjertos ('Rangpur', tangelo 'Orlando', 'Citrumelo' y 'Duncan') demostró que estos no influyen en el agrupamiento debido a que no hay diferencias en cuanto a las distancias genéticas y las similitudes son muy elevadas. Los resultados indicaron que la selección visual en combinación con el análisis de SSR para la identificación y caracterización de híbridos mejorará la precisión de la selección, ahorrará tiempo y reducirá los costos involucrados en los programas de mejoramiento genético cítrico. Al mismo tiempo, los SSR son técnicas eficaces en la identificación de genotipos que muchas veces se comercializan con el mismo nombre y que pueden acarrear problemas en la comercialización. A su vez, con este trabajo se logró avanzar en la caracterización genética del pomelo 'Paraná'. Esto favorece y al mismo tiempo beneficia la comercialización, dada la demanda del mismo, ya que brinda información complementaria para la inscripción en el INASE. De esta manera se potencia el estudio del germoplasma cítrico y los trabajos futuros para la identificación de variedades comerciales.

SUMMARY

The genus *Citrus* as well as the genera *Fortunella* (kumquat) and *Poncirus* (orange trifolio) belong to the family Rutacea (subfamily Aurantoidea, tribe Citreae) subtribe Citrinae, and are the three genera of commercial importance in the family. The great diversity of species and varieties in the genus *Citrus*, is mainly due to the occurrence of mutations and the frequent appearance of polyembryonic seeds. The grapefruit 'Paraná' (*Citrus sp.*) like the majority of the citric species, arose in the Asian Southwest, in contrast with the other grapefruit (*C. paradisi*) whose center of origin was in the Barbados Islands in the Caribbean. As citrus diploids, 'Paraná' grapefruit has chromosome number $2n = 18$. In addition to presenting improved industrial characteristics, such as fruit quality and good field behavior, 'Paraná' grapefruit has shown high quantitative resistance to canker citrus, a bacterial disease caused by *Xanthomonas citri* subsp *citri*. This disease is endemic in the NEA zone, it affects all citrus fruits, but in particular all cultivars of grapefruit are very susceptible. Currently, research in terms of health, mainly are aimed at obtaining new citrus varieties to offset the losses caused by a new disease in the area, whose causative agent is the bacterium *Candidatus Liberibacter* and causes "greening" or HLB (huanglongbing). Very devastating citrus disease that has caused and continues to greatly affect the production of all citrus varieties. In cultivated plants and especially in *Citrus*, the characterization of genetic material has been difficult because the high fertility between species, apomictic reproduction and polyembryony are common, as well as the scarcity of polymorphic DNA markers. The identification of varieties and in particular, cultivars derived by spontaneous and induced mutations, remains a difficult task. In this sense, the following hypothesis was proposed: the study of the relative genetic

diversity of 'Paraná' grapefruit and its corresponding genetic characterization by means of specific molecular markers of the citric genome allows genotyping the material of interest, facilitating the evaluation of the degree of relative kinship of the 'Paraná' grapefruit with the other citrus species. Consequently, the proposed objectives were: to characterize molecularly 'Paraná' grapefruit and other citrus species by means of DNA markers. Characterize, using the SSR and RAPD markers, the 'Paraná' grapefruit material. Estimate possible parental relationships of 'Paraná' grapefruit with other known citrus species and varieties. In order to analyze the variability and genetic structure, RAPD and SSR nuclear markers were used. The analysis of the genetic variability by RPAD revealed that the percentage of polymorphic loci and expected average heterozygosity were high in 'Paraná' grapefruit. However, no exclusive bands were detected. Likewise, the diversity index for the same was also high. The largest number of different alleles was observed in 'Valencia' orange (*C. sinensis*), 'Duncan' grapefruit (*C. paradisi*) and 'Paraná' grapefruit (*Citrus sp.*). However, the percentage of polymorphic loci (PLP) varied between samples, the highest PLP values were generally observed in grapefruit cultivars, among them 'Duncan' grapefruit and 'Paraná' obtained with SSR. The expected heterozygosity and the diversity index were higher in 'Valencia' orange. However, the variability within each variety was generally poor. The analysis of the genetic structuring of citrus germplasm, indicated that the greatest degree of division is between varieties. In the analysis of molecular variance (AMOVA) the varieties were genetically different from each other and the results were statistically significant. The greatest genetic distance was observed between 'Paraná' grapefruit and 'Salustiana' orange (*C. sinensis*) (1,666) and between 'Paraná' and 'Poorman' (*Citrus sp.*) (1,020). In turn, the *Fst* and *PhiPT* indices indicated a lower genetic distance between 'Paraná' grapefruit and 'Valencia' orange (*Fst* 0,233 and *PhiPT* 0,394) and between 'Paraná' grapefruit and *C. maxima* (pummelo) (*Fst* 0,311 and *PhiPT* 0,490). That is to say that these are

much more genetically related than any other. The analysis of main coordinates grouped mainly 'Paraná' grapefruit and 'Valencia' orange, and *C. maxima* very close to them. In the UPGMA analysis, the hybrid 'Poorman' grapefruit was differentiated from the rest of the cultivars. 'Paraná' grapefruit was grouped together with 'Valencia' orange separated from the rest of the varieties of grapefruit. In principle, the distinctive morphological characters that allowed agronomically differentiate the cultivars of grapefruit, *C. paradisi* ('Marsh', 'Foster', 'Duncan', 'Red Blush', 'Red Shambar' and 'Star Ruby'), it does not match with the genetic similarity between these. It was possible to differentiate genetically 'Paraná' grapefruit and it was considered as a different variant, separated from other grapefruit varieties. It was established that 'Paraná' grapefruit is an independent natural hybrid, possibly originated from the crossing of a variant sweet orange (*Citrus x sinensis*) and pummelo (*C. maxima*). The comprehensive analysis of 'Parana' grapefruit, considering the rootstocks ('Rangpur', tangelo 'Orlando', 'Citrumelo' and 'Duncan') showed that these do not influence the grouping because there are no differences in terms of distances genetic and the similarities are very high. The results indicated that the visual selection in combination with the SSR analysis for the identification and characterization of hybrids will improve the selection precision, save time and reduce the costs involved in the citrus breeding programs. At the same time, SSR are effective techniques in the identification of genotypes that are often marketed under the same name and that can lead to marketing problems. With this work it was possible to advance in the genetic characterization of 'Paraná' grapefruit. This favors and at the same time benefits the commercialization, given the demand of the same, since it provides complementary information for the inscription in the INASE. In this way, the study of citrus germplasm and future work for the identification of commercial varieties is strengthened.

INTRODUCCIÓN

Historia y Áreas de Origen de los Cítricos

“Detrás de toda fruta cítrica hay una historia épica en las que resuenan las batallas de Alejandro Magno, la expansión del islam, las campañas militares de los cruzados cristianos, la diáspora judía y el descubrimiento de América” (Ansede, 2015).

Se considera que el centro de origen de las especies de cítricos fue en el Sudeste del Himalaya. Los análisis sugieren que las especies cítricas ancestrales existieron alrededor de unos 8 millones de años en el Sudeste Asiático, las cuales sufrieron un evento de especiación repentina durante el Mioceno tardío (Wu *et al.*, 2018). Existen referencias, en escritos muy antiguos de aquellas zonas que datan de 2.200 a. A. C., donde se utilizaban ciertas frutas “doradas” en ceremonias religiosas. Asimismo, el filósofo griego Teofrasto (IV y III a. A. C.) escribió sobre las “hespérides” haciendo alusión a cidra (*Citrus medica* L.) como fruta utilizada en ritos religiosos (Calabrese, 1992; Palacios, 2005).

El primer cítrico descrito por Carl von Linné fue el cidrero o árbol de cidra (*C. medica*) originario de la India, y fue quizás el primer cítrico conocido por los europeos. Asimismo, en el nordeste de India, *C. reticulata* (Christm.) Swingle (mandarina) habría tenido su centro de origen, posiblemente en el área de ‘Rangpur’, al igual que *Citrus x aurantifolia* Swingle (lima). Además, en las regiones orientales de la India se habrían originado *Citrus x limon* (L.) Burm. (limón) y *Citrus x aurantium* L. (naranja agrio) nativas del nordeste de India y regiones cercanas a ella. Por su parte, *Citrus x sinensis* Osbeck (naranja dulce) probablemente se originó en el sudeste de China (Fig. 1) (Webber, 1967; Gmitter y Hu, 1990; Palacios, 2005).

Alrededor del año 1750, en las islas Barbados habría aparecido la primera planta de pomelo al sur de las Antillas Menores (Fig. 1). De esta manera, *Citrus x paradisi* Macf. (pomelo) fue la única especie cítrica que se apartó del sudeste asiático como centro de origen. El origen híbrido de pomelo sería resultado del cruzamiento entre *pummelo* (shaddock o pamplémusa) *C. maxima* (Burm.) Merr., sin: *C. grandis* L. Osb. y naranja dulce (*Citrus x sinensis* Osbeck). Sin embargo, otros autores consideran que se habría originado mediante una mutación de una planta de *pummelo*. Por otra parte, la variante híbrida pomelo 'Paraná' (*Citrus sp.*) analizada en este trabajo, se considera que al igual que la mayoría de las especies cítricas, habría surgido en el Sudeste asiático y difiere así del resto de las variedades de pomelo que se originaron en el Caribe (Fig. 1).

Los primeros en distribuir y comercializar cítricos fueron los mercaderes chinos, fenicios, indios y cartagineses quienes aprovecharon las bondades de aquellas frutas. En principio, desde el Océano Índico, el Mar Árabe y a través del Mar Rojo ingresaron en Asia Menor, toda la Mesopotamia y desde allí al Mediterráneo. Luego continuó la diseminación por Grecia, Turquía, Italia y España, llegando a Marruecos a través de los árabes (Palacios, 2005). Principalmente, la distribución de semillas dio inicio a la comercialización y posteriormente con la distribución de frutas. Fue así que, desde sus centros de origen, los cítricos fueron utilizados como elementos curiosos de intercambio, ya sea por su calidad alimenticia o por sus características medicinales.

En América, la propagación de los cítricos probablemente comenzó cuando en 1493 Cristóbal Colón incluyó semillas en su segundo viaje desde España y las trasladó a la Isla Española (actualmente Haití). A partir de allí comenzó a difundirse a Cuba, Florida y California y desde estas áreas a todo el Caribe, México, Perú, Chile, Argentina y Uruguay. En Brasil, habría llegado desde Portugal, pasando luego a Bolivia y Paraguay (Palacios, 2005).

En la actualidad, es posible centralizar las áreas geográficas típicamente cítrícolas en dos franjas bien definidas. Estas franjas incluyen zonas tropicales a subtropicales de todo el mundo que van desde los 41° a 16° en el hemisferio Norte y desde los 11° a 35° en el hemisferio Sur.



Figura 1. Mapa con la indicación de las áreas geográficas donde se originaron las principales especies comerciales de cítricos. **Sudeste asiático:** C: cidra, NA: naranjo agrio, L: limón, LM: lima, PU: *pummelo*, ND: naranja dulce, M: mandarina, PP: pomelo 'Paraná'; **Caribe:** P: pomelo.

Características Generales

Las plantas del género *Citrus* son árboles espinosos o inermes en algunas variedades, de mediano a gran porte. Perennifolias y generalmente glabras, aunque en algunas especies son pubescentes. Las hojas alternas, unifoliadas, poseen bordes serrados y pecíolo articulado al limbo, alado, marginado o áptero. Las flores son solitarias o en racimos corimbosos cortos, terminales o también axilares. Flores actinomorfas, hermafroditas. Cáliz pequeño, persistente provisto de 4-5 sépalos cortos. Pétalos oblongos, agudos o redondeados en el ápice, generalmente 5, aunque pueden existir de 4 a 8, iguales o desiguales entre sí, carnosos, caedizos, de coloración blanco o matizados de púrpura. Estambres comúnmente en número cuádruple al de pétalos, libres o más o menos soldados entre sí, filamentos blancos insertos alrededor del disco, las anteras son alargadas. Ovario súpero, ovoide y globoso; estilo cilíndrico y estigma subcapitado. Ovario 8-15 locular, generalmente con varios óvulos por celda. Fruto hesperidio, globoso, subgloboso, deprimido-globoso, alargado, piriforme, con o sin mamelón terminal. Pericarpio anaranjado o amarillo, rugosos, conteniendo numerosas glándulas de aceite esencial, parte interna de la corteza blanca (albedo) esponjosa; parte central del fruto compuesta por una pulpa jugosa, dulce o ácida, constituida por numerosos sacos jugosos. Semillas 1 o más por cavidad, a veces ausentes (Parodi, 1959, Dimitri 1972).

Una de las particularidades en los frutos cítricos es la presencia de ciertos compuestos fenólicos involucrados en el metabolismo de la dieta humana. Estos compuestos además están presentes normalmente en hojas, frutos y semillas de todas las plantas y se denominaron flavonoides. En principio los flavonoides fueron considerados sin acción benéfica, sin embargo, en algunos estudios científicos se descubrieron múltiples efectos positivos para la salud humana. Esencialmente, se analizaron su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. Asimismo, la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos y su papel protector

frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías fueron estudiadas (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Entre los miles de flavonoides que se han identificado, los citroflavonoides (hesperidina, naringina y limoneno) fueron aislados de cítricos. Además de la importancia médica para el hombre, fueron considerados como otra alternativa para tratar de dilucidar la compleja taxonomía de los cítricos. Así, en algunos estudios los flavonoides se utilizaron como marcadores taxonómicos del género *Citrus* y cultivares relacionados. Si bien se emplearon distintos métodos para medir las concentraciones de flavonoides en jugo de cítricos de distintos cultivares, esencialmente se comenzaron a estudiar las concentraciones de los principales flavonoides contenidos en jugo de naranja comercial. De esta manera, el contenido de naringina y hesperidina fueron cuantificados, en algunos casos para determinar la significancia de estos componentes en la calidad del jugo. En otros, el objetivo fue establecer una base de datos para la caracterización de las variedades y detección de jugos adulterados (Rouseff *et al.*, 1987; Mata-Bilbao *et al.*, 2007).

Origen y Clasificación de Cítricos Cultivados

En general, se considera que el continente asiático fue el centro de origen de las principales especies y variedades de cítricos. Sin embargo, a lo largo de la historia, la diseminación por el resto de los continentes ha generado muchas transformaciones que dieron origen a los cultivares comerciales tal como se los conoce en la actualidad.

Las especies y variedades cítricas cultivadas pertenecen a la familia Rutaceae, Sapindales (subfamilia Aurantoidea, tribu Citreae) en la cual la subtribu Citrinae incluye los tres géneros de importancia comercial, *Fortunella* (kumquat) *Poncirus* (naranja

trifolio) y *Citrus* (APG, 2003). Dentro del género *Citrus* las especies cultivadas más importantes son:

- *Citrus x sinensis* (L.) Osbeck (naranja dulce)
- *Citrus reticulata* Blanco (mandarina)
- *Citrus x paradisi* Macfadyen (pomelo)
- *Citrus maxima* (Burm.) Merr. (*C. grandis* (L.) Osbeck) (*pummelo*)
- *Citrus x limon* (L.) Burm. (limón)
- *Citrus x aurantifolia* Swingle (lima)
- *Citrus medica* L. (cidra)
- *Citrus x aurantium* L. (naranja agrio)

A pesar de la trascendencia económica de algunos de los cultivares más importantes del mundo como naranjas, limones, pomelos y otros cítricos bien conocidos popularmente, el proceso de domesticación y la taxonomía de estas especies es aún poco conocida y hay muchas discrepancias con respecto a las relaciones filogenéticas dentro del género (Scora, 1975; Carbonell-Caballero *et al.*, 2015).

La gran diversidad de especies dentro del género *Citrus* se debe principalmente a la ocurrencia de mutaciones, la selección natural, domesticación y la amplia historia del cultivo, así como también la frecuente aparición de semillas poliembriónicas. A su vez, la alta compatibilidad sexual existente se debe a que prácticamente no existen barreras para el cruzamiento dentro del género como entre géneros cercanos. En este sentido, las diversas especies cítricas se caracterizan por un alto grado de variación genética producto de hibridaciones naturales (Nicolisi *et al.*, 2000; Moore, 2001; Hvarleva *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2018).

La aparición de variaciones en cultivares estrechamente relacionados, se produce muchas veces como consecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas

que alteran los rasgos específicos de una variedad. Asimismo, un aspecto característico de los cítricos es la propagación vegetativa. Mediante ella los mejoradores han asegurado la permanencia de las mutaciones a través del uso de injertos y portainjertos (pie).

En la mayoría de las variedades cítricas es común la existencia de plántulas de origen nucelar apomíctica, generadas mediante poliembrionía. Las plantas así generadas son genéticamente idénticas a sus progenitores. Sin embargo, ocasionalmente pueden surgir diferencias con sus antecesores, generando rasgos beneficiosos agrónomicamente. Estas diferencias o modificaciones fueron aprovechadas por los mejoradores y muchas veces se consideraron como nuevos cultivares generados por mutaciones.

Diversas variedades cítricas producidas comercialmente en la actualidad fueron producto de hibridaciones naturales. En algunos casos, debido a cruzamientos y retrocruzamientos interespecíficos y en otros como resultado de la alta fertilidad existente entre géneros relacionados con *Citrus* como *Poncirus* y *Fortunella* (Wu et al., 2018). De esta manera, las especies de naranja dulce (*Citrus x sinensis*) y naranjo agrio (*Citrus x aurantium*) surgieron como resultado de un cruzamiento entre *C. maxima* (pummelo) y *C. reticulata* (mandarina salvaje). A su vez, *C. aurantium* (naranjo agrio) y *C. medica* (cidra) dieron origen al limón (*Citrus x limon*). Mientras que lima 'Rangpur' *Citrus x limonia* Osbeck resultó del cruzamiento entre *C. reticulata* (mandarina salvaje) y cidra (*C. medica*). Además, las mandarinas actuales serían resultado del cruzamiento entre una mandarina salvaje y *C. sinensis* (naranjo dulce) (Fig. 2).

Se considera que los progenitores de *C. paradisi* (pomelo) fueron *C. sinensis* y *C. maxima*. Luego, los procesos de selección de caracteres agrónomicos deseables dieron origen a las variedades cultivadas comercialmente. De esta manera, las

variedades fueron clasificadas en dos grupos, por un lado, los pomelos “blancos” (variedades como ‘Duncan’ y ‘Marsh’) y por otro, los pomelos “pigmentados” que incluyen las variedades ‘Foster’, ‘Star Ruby’, ‘Red Blush’ y ‘Red Shambar’, entre otras.

Existen, además variedades híbridas generadas a partir del cruzamiento entre especies con distinto nivel de ploidía. Así fue obtenido el híbrido triploide ‘Oroblanco’ producto del cruzamiento entre *C. maxima* (*pummelo*) diploide y *C. paradisi* (pomelo) tetraploide obtenido por duplicación. A su vez, a partir del cruzamiento entre especies de géneros distintos como *Poncirus trifoliata* (naranja trifolio) y *C. sinensis* (naranja dulce) se originaron los híbridos denominados citranges, (citrango ‘Troyer’ y citrango ‘Carrizo’) utilizados tradicionalmente como portainjertos de numerosas variedades comerciales.

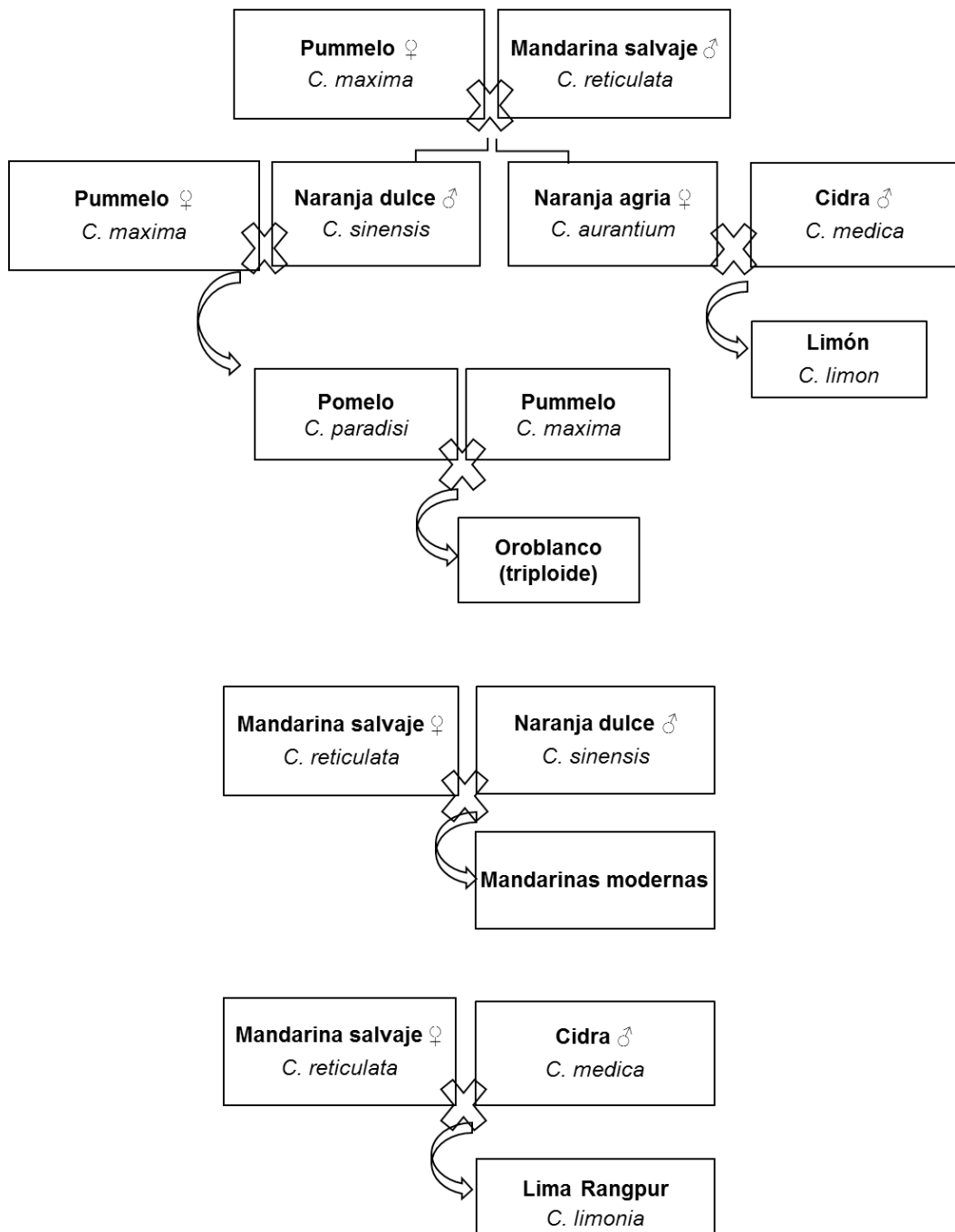


Figura 2. Relaciones entre especies y variedades de *Citrus* conocidas en la actualidad.

Actualmente existen muchos sistemas de clasificación para especies y variedades cítricas. Los más conocidos se basaron solamente en características morfológicas y de ubicación geográfica, lo que potenció las diferencias dentro del género (Nicolisi *et al.*, 2000; Moore, 2001; Hvarleva *et al.*, 2008). Swingle (1943) y Tanaka (1977) propusieron un sistema de clasificación en el cual consideraron 16 géneros y 162 especies de cítricos. Sin embargo, Scora (1975) y Barrett y Rhodes (1976) consideraron que sólo existen tres especies “verdaderas”, *C. maxima* (Burm.) Merr., sin: *C. grandis* (L) Osb. (*pummelo*) *C. medica* L. (cidra) y *C. reticulata* Blanco (mandarina) y sugirieron que todas las demás especies se originaron mediante hibridaciones entre aquellas especies consideradas “verdaderas” o entre estas y otros géneros afines de la misma familia (Fig. 3).

Existen numerosas especies y variedades cítricas que según la región donde se produzcan son más o menos conocidas y cultivadas comercialmente. En este sentido Beñatena y Anderson (1996) presentaron una clasificación para cítricos cultivados de la región del Río Uruguay donde se incluyeron distintos grupos botánicos en la nomenclatura.

A continuación, se detalla la denominación de especies y variedades cítricas cultivadas más reconocidas en el país.

Citrus x sinensis naranja

- naranjas de ombligo: ‘Newhall’, ‘Navelina’, ‘Navel Late’, ‘Lane Late’
- naranjas comunes: ‘Hamlin’, ‘Westin’, ‘Pineapple’, ‘Salustiana’, ‘Valencia’
- naranjas pigmentadas o sanguíneas

Citrus sp. mandarina

- *Citrus unshiu* Marcovitch: mandarina ‘Satsuma’, ‘Okitsu’

- *Citrus x nobilis* Loureiro: mandarina 'King'
- *Citrus deliciosa* Tenore: mandarina común
- *Citrus x clementina*: mandarina 'Clementina', 'Clemenules'
- *Citrus reticulata* Blanco: mandarina 'Dancy', 'Ponkan'
- *Citrus x reshni*: mandarina 'Cleopatra'
- mandarina 'Clementina' x tangelo 'Orlando': mandarina 'Nova'
- naranja x mandarina: 'Ellendale', 'Murcott'

Citrus x paradisi pomelo

- pulpa blanca: 'Duncan', 'Marsh'
- pulpa pigmentada: 'Foster', 'Thompson', 'Red Blush', 'Star Ruby', 'Red Shambar'

Citrus maxima (C. grandis) pummelo

- 'Chandler'

Citrus x limon limón

- 'Eureka', 'Lisboa', 'Génova'

Citrus sp. lima

- *Citrus x latifolia* Tanaka: lima 'Tahiti' o lima de 'Persia'
- *Citrus x aurantifolia* Swingle: lima 'Mejicana' o lima 'key', lima 'Sutil'
- *Citrus lamettioides* Tanaka: lima dulce de 'Palestina'

- *Citrus x limeta* Riso: lima 'Criolla' o 'Limeta'

Citrus medica Linné ('Citron') cidra

Citrus x aurantium Linné naranjo agrio

Misceláneas

- Con características de mandarinas: *Citrus limonia* Osbeck. 'Rangpur'
- Con características de naranjas agrias: *Citrus myrtifolia* Rafinesque Mirtifolia ('Chinotto') *Citrus bergamia* Risso 'Bergamota'
- Con características de limoneros: *Citrus jambhiri* Lush limonero 'Rugoso'

Otros géneros cultivados

- *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle: 'kumquat'
- *Poncirus trifoliata* (L.) Rafinesque: 'Trifolio'

Híbridos cultivados más reconocidos

- Interespecíficos (entre especies de un mismo género):

Tangor (mandarina x naranja): 'Ellendale', 'Murcott'

Tangelo (mandarina x pomelo) (*C. paradisi* x *C. reticulata*): 'Orlando'
'Minneola'

'Oroblanco': *Citrus maxima* x *Citrus paradisi*

- Intergenéricos (entre géneros diferentes)

Citrange (*Poncirus* x *Citrus*): 'Troyer', 'Carrizo'

Citrumelo (*Poncirus* x *Citrus*): 'Swingle'

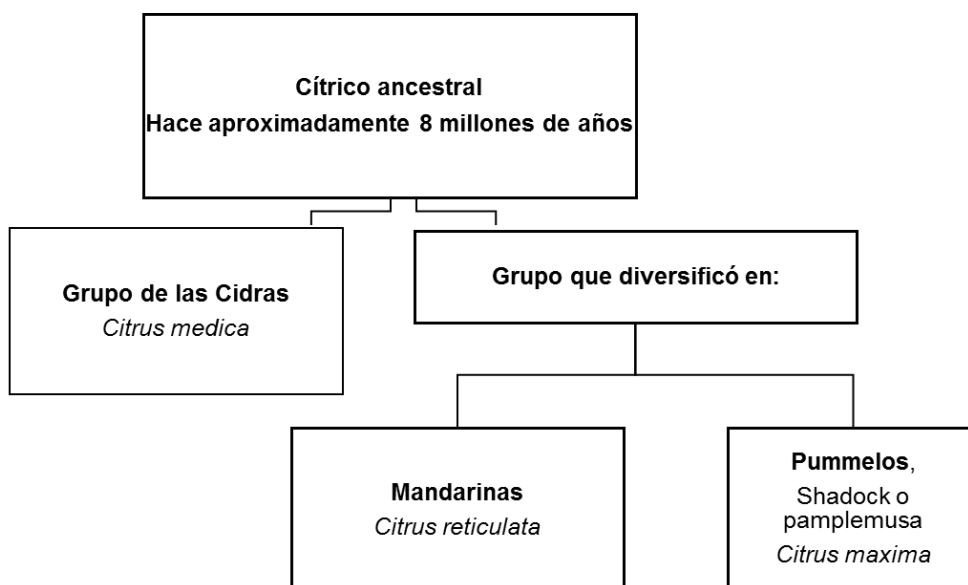


Figura 3. Resumen del origen de los primeros cítricos. El ancestro habría existido hace aproximadamente 8 millones de años. A partir de él habrían derivado las cidras y un grupo que diversificó en mandarinas y *pummelos*.

Contexto de la Citricultura Actual

La citricultura es una de las principales actividades agropecuarias de la región del noreste y noroeste del país, principalmente en Tucumán, Entre Ríos, Corrientes, Salta y Jujuy. Desde mediados de la década de 1980 la producción creció aceleradamente al incorporar nuevas tecnologías en toda la cadena de valor, de este modo las economías regionales también se vieron favorecidas. Actualmente, se calcula que en las mejores temporadas de cosecha más de 110.000 empleos directos y 165.000 indirectos son generados mediante esta actividad (Federcitrus, 2017).

En el período 2010-2014 la producción anual de cítricos frescos promedió las 2.897.271 tn. Además, se calcula que aporta anualmente más de 660 millones de

dólares, por lo cual la Argentina se destaca entre los 10 principales productores de cítricos del mundo y como principal productor de limón. La mayor parte de la producción de limón se destina al mercado externo, los cítricos dulces, en cambio, están destinados principalmente al mercado interno. Así, los cítricos locales se exportan a más de 70 mercados del mundo incluyendo Rusia, España, Holanda, Italia y Paraguay (Federcitrus, 2017).

El sector cítrico, como la mayoría de las producciones agropecuarias, depende en gran medida de factores externos como el clima, los precios, la oferta y demanda mundial, así como también de los costos internos, el tipo de cambio y las políticas de gobierno (Federcitrus, 2017). Por todo esto, se considera que actualmente el sector no se ve muy favorecido tanto para la exportación como para mercado interno.

En el 2013 las zonas productoras de limones fueron muy afectadas por las heladas del invierno de ese año y en el 2014 por la falta de lluvias y las altas temperaturas. Si bien en el año 2015 las condiciones climáticas fueron más estables, hubo una leve mejoría en la producción ya que las plantas requieren de tiempo para la recuperación. Se estima que en el año 2016 a nivel regional el NEA aportó 52,32 % de la superficie productiva y el 38,83 % de la producción cítrica. De la cual, la provincia de Corrientes participa con un 16,61 % (Federcitrus, 2017).

La importancia del sector cítrico en la región se ve reflejada en los componentes de la cadena de valor. Existen más de 5000 productores cítricos, cerca de 450 establecimientos de empaque y 20 plantas industriales de jugo (Molina, 2007). De esta manera se vieron favorecidos tanto los empleos directos, en relación al campo, cosecha, empaque e industria; como así también los empleos relacionados al asesoramiento, reparaciones o proveedores de bienes e insumos.

Hace algunos años (2006-2007) se inició el Programa de Reposicionamiento de la Citricultura Correntina. El programa cuenta con la participación del INTA, Gobierno

de Corrientes, CFI (Consejo Federal de Inversiones) SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) y el Mercado Central de Buenos Aires. El objetivo fue la capacitación de productores y operarios para lograr exportar desde la Provincia de Corrientes y lograr incluir un mayor número de productores. En Corrientes, la EEA del INTA de Bella Vista cuenta con un Banco Multiplicador de Yemas de Variedades Cítricas Certificadas y un Banco Semillero Certificado, cuyo objetivo principal es proveer de yemas de variedades cítricas y semillas de portainjertos cítricos certificados, adecuados a las características agroecológicas de la provincia (Molina, 2007).

El cultivo de pomelo

Actualmente, el cultivo de pomelo se lleva a cabo en numerosos países tropicales y subtropicales y su producción mundial supera los 3,8 millones de toneladas. Estados Unidos lidera a nivel mundial en cuanto a producción con más de 2,3 millones de toneladas, de los cuales el 45 % se destina al consumo en fresco. Luego le siguen en importancia productiva los países como Argentina, Cuba, Chipre, Israel, México, Mozambique, Sudáfrica, China, Turquía y España (Federcitrus, 2017; InfoAgro, 2017;).

En Corrientes, hace varios años se ha dejado prácticamente de plantar pomelo, salvo excepciones. Esto se debe a que ocurrió una amplia y rápida dispersión de la cancrrosis de los cítricos (enfermedad bacteriana cuyo agente causal es *Xanthomonas citri* subsp *citri*) desde 1976. Sin embargo, el interés por este tipo de fruta continúa, pero se hace muy costosa la producción justamente por la alta susceptibilidad a la cancrrosis (Gochez y Canteros, 2004, 2006, 2008).

Tal vez el pomelo no sea la fruta habitualmente más consumida y aprovechada productivamente, quizás por la combinación de su sabor dulce pero ácido y ligeramente amargo. Además de la incidencia de ciertas enfermedades que influyen en la sanidad de las plantas alterando el rendimiento y la calidad del cultivo.

Si bien todas las variedades cítricas son afectadas por la cancrrosis, existen variedades más susceptibles que otras al ataque de este patógeno. La resistencia a la enfermedad en todo el género *Citrus* es cuantitativa y va desde muy susceptible a muy resistente. De esta manera se conoce que todas las variedades de pomelos (*C. paradisi*) son muy susceptibles a las cepas del grupo A de *Xac* y sin tratamientos de control de la enfermedad puede causar daños muy severos en la calidad y cantidad de fruta y el crecimiento de la planta (Fig.4). Además, existen otras cepas, las del grupo B que ya no se han detectado a campo y las del grupo C que afecta a lima 'Key' (*C. aurantifolia*) (Gochez y Canteros 2006).

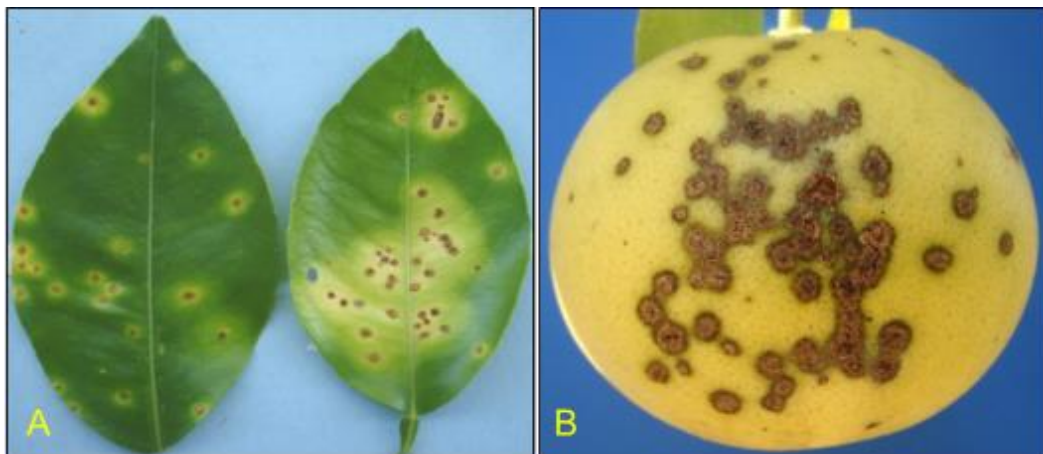


Figura 4. Síntomas de cancrrosis en pomelo. **A:** Hojas de pomelo con síntomas en el haz. **B:** Fruta madura con cancros en parte externa del fruto.

Actualmente, numerosas investigaciones están dirigidas al interés por nuevas variedades cítricas para contrarrestar las pérdidas producidas por el "greening" o HLB (huanglongbing) enfermedad bacteriana, causada por *Candidatus Liberibacter*, muy

devastadora que afecta a todas las variedades cítricas y que ha causado pérdidas incalculables en muchos países. En este sentido, en Florida (Estados Unidos) se realizaron estudios sobre variedades de pomelo para prevenir de esta forma la enfermedad. Aunque el "greening" de los cítricos ha devastado la industria citrícola de Florida desde su primera detección en el estado, los productores se mostraron optimistas sobre el futuro de la industria gracias a nuevas variedades prometedoras.

A pesar de los problemas acarreados por estas enfermedades, la popularidad y el interés por este tipo de fruta en general se debe a las cualidades y funciones fitoterapéuticas del jugo de pomelo, ya que posee excelentes propiedades antioxidantes y actúa como depurativo del organismo. En general, en cítricos el interés por flavonoides tales como flavonoles, flavononas, hidroxiflavonas es debido a su potencial fisiológico y actividad bioquímica, así como sus propiedades organolépticas. Muchos de estos compuestos tienen potencialmente una actividad antioxidante y pueden actuar como eliminadores de radicales libres. Al mismo tiempo, pueden actuar contra compuestos alergénicos, inflamación, infecciones de virus, colesterol y compuestos cancerígenos (Wang *et al.*, 2007). Las concentraciones de flavonona son diferentes en cada uno de los cítricos. En los pomelos el patrón de flavononas es similar al naranjo agrio, y está dominado por la naringina. Así, las naringinas están presentes en mayor contenido y dan el sabor amargo al pomelo. Además, hay varios glucósidos de flavonona únicos de los cítricos y algunos son específicos para algunos cultivares de cítricos, los cuales podrían ser utilizados como marcadores taxonómicos.

Recientemente se conoció que los compuestos involucrados en la inhibición de la absorción de algunos medicamentos en la pared intestinal y el hígado estaban presentes, al igual que en otras especies vegetales, en el jugo de pomelo. Aquellos compuestos responsables de la interferencia en el metabolismo de ciertos fármacos eran las furanocumarinas. Sin embargo, durante mucho tiempo no se conocieron los mecanismos exactos y funciones específicas en el organismo (Manthey y Buslig,

2005). Si bien las concentraciones de furanocumarinas fueron estudiadas en distintas fracciones del material extraído de las frutas de pomelo, se observaron que las mayores cantidades de furanocumarinas estaban concentradas en el jugo, a diferencia de lo que se podía observarse en pulpa (Manthey y Buslig, 2005). Se conocieron además algunas de las vías por las cuales la interacción entre el jugo de pomelo y el medicamento administrado pueden modificar el metabolismo de éste último. La interacción se produce entre las furanocumarinas o derivados de ellas que inhiben la acción del citocromo P450 (CYP) 3A4 principal catalizador intestinal (Lin *et al.*, 2009).

Precisamente, se ha desarrollado y continúa en evaluación una nueva variedad de pomelo con bajas concentraciones de furanocumarinas. Esta nueva variedad, descrita con el código UF-914, tiene la particularidad de ser ligeramente más grande, además de que la cáscara al ser un poco más gruesa que la del pomelo tradicional, también es más fácil de pelar. En la Universidad de Florida, los investigadores evalúan tanto la calidad del jugo, ya que el contenido de azúcares sería mucho mayor que el pomelo cotidiano, así como también se estudia su tolerancia a la cancrrosis y su potencial tolerancia al HLB.

Variedades de pomelo, Citrus x paradisi Macf. y pummelo, C. maxima (Burm.) Merr.

Según algunos autores no se conoce con exactitud el origen del pomelo. Sin embargo, otros estiman que *C. paradisi* es nativo de las Islas Barbados en el Caribe, en contraste con *pummelos* y otros cítricos originarios de regiones tropicales y subtropicales de Asia. Posteriormente, su cultivo se extendió por todo el Caribe y luego a Estados Unidos. Se considera que fue producto de un proceso de hibridación natural entre *pummelo* (*C. maxima* (Burm.) Merr., sin: *C. grandis* L. Osb.) y naranja dulce (*C. sinensis* L. Osb.).

En las plantas de pomelo es muy frecuente la ocurrencia de mutaciones somáticas que se producen en brotes o ramas. En general, fueron estas particularidades los únicos métodos utilizados para desarrollar nuevas variedades de pomelo. Así, las variedades con frutos con pulpa roja 'Red Blush', 'Ruby Red' y 'Star Ruby' se originaron de esta forma. Sin embargo, otras variedades fueron producto de clones nucelares como la variedad 'Thompson' que luego se cultivó en diferentes estaciones experimentales en California donde produjeron frutos similares a la variedad 'Marsh' (Corazza-Nunes *et al.*, 2002).

A lo largo del tiempo, la selección de clones procedentes de embriones nucelares con características agronómicas deseables y la variabilidad genética asociada a mutaciones naturales, dieron origen a las variedades de pomelo conocidas en la actualidad (Webber, 1967; Corazza-Nunes *et al.*, 2002). De esta manera, ciertas características del fruto de pomelo, como la forma y tamaño, cantidad y calidad de jugo y número de semillas, así como también el comportamiento de los árboles al ambiente, el vigor y productividad, fueron escogidas, como ocurre con la mayoría de los cítricos, como características comerciales.

Las variedades comerciales de pomelo se caracterizan por sus frutas de tamaño grande y cáscara de color amarillo, pero en ciertas variedades se torna rojiza. El albedo es blanco y esponjoso, la pulpa contiene mucho jugo, está conformada por 10-12 carpelos y la columela abierta. Generalmente el gusto es amargo debido a una flavona.

Las variedades se denominaron según la coloración de los frutos, especialmente la tonalidad de su pulpa, una característica considerada para la comercialización. Así, existen variedades blancas, son las que poseen la pulpa de color amarillo, y a pesar de ser las más cultivadas cada vez fueron más desplazadas por las variedades pigmentadas.

'**Duncan**' es una variedad de pomelo blanco (Fig. 5). Se considera el pomelo de referencia en el mercado en cuanto a calidad. Se distinguen por su gran tamaño, la pulpa es firme y jugosa, de excelente sabor y buena acidez. Posee niveles altos de azúcar y además numerosas semillas (30-50 por fruto). Esta variedad se usa en la industria para la elaboración de jugo y se cultiva casi exclusivamente en Florida, Estados Unidos. También en las provincias de Chaco y Formosa en Argentina.

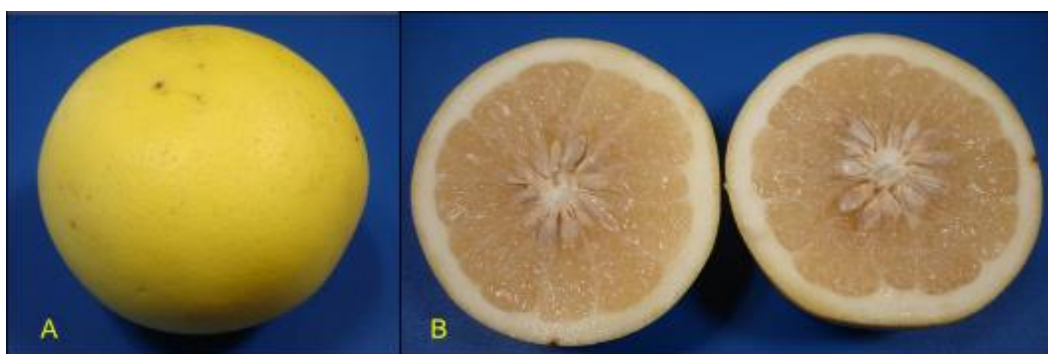


Figura 5. Pomelo 'Duncan'. **A:** Fruta madura, entera. **B:** Corte transversal de la fruta, se observa gran cantidad de semillas.

La variedad '**Marsh**' (o '**Marsh Seedless**') se obtuvo a partir de semillas de la variedad 'Duncan', y actualmente se considera la variedad de pomelo más importante

comercialmente a nivel mundial. El fruto tiene un tamaño medio, algo más pequeño que 'Duncan' y pesa alrededor de 300 gr. La corteza es muy lisa, ligeramente gruesa y la pulpa es de color claro. Contiene mucho jugo y es considerado sin semillas, contiene apenas 2-3 semillas por fruto. Su sabor es dulce, aunque al principio de la cosecha puede resultar muy ácido (Fig. 6).

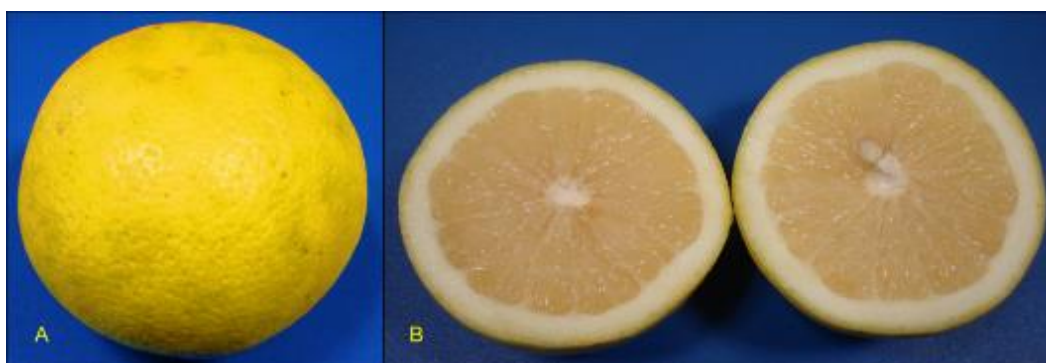


Figura 6. Pomelo 'Marsh' **A:** Fruta madura, entera. **B:** Corte transversal de la fruta.

Las variedades pigmentadas contienen una pulpa de tono rosa o rojizo en sus frutos y deben su color al pigmento licopeno. Sin embargo, el color llamativo sólo se produce si las temperaturas de cultivo son elevadas. Su popularidad y consumo se ha incrementado en muchos países en las dos últimas décadas.

La primera variedad pigmentada se originó a partir de una mutación de una variante de pulpa blanca ('Marsh') dando como resultado la variedad denominada '**Thompson**' o '**Pink Marsh**' de pulpa rosada. Asimismo, la variedad '**Foster**' se originó a partir de una mutación natural de pomelo 'Walters', posee una intensa pigmentación rosada en la pulpa y la cáscara levemente enrojecida, pero puede formar un medallón rojizo en el punto de contacto entre dos frutos. Posee gran cantidad de semillas, alrededor de 50 y debido a esto se dejó de plantar.

La variedad '**Red Blush**' surgió mediante una mutación natural de pomelo 'Thompson' en California. Tiene la particularidad que los frutos se disponen en

racimos. Los frutos son ligeramente aplanados y la pulpa de color rosado (Fig. 7). Poseen buena cantidad de jugo, de buen sabor y alto °Brix. La cáscara es apenas pigmentada. La textura de la piel, así como la buena presentación en el empaque lo convierten en excelente candidato para la exportación. Sin embargo, la alta susceptibilidad a la enfermedad causada por el virus de la tristeza de los cítricos resulta una desventaja.

Otra variedad con tonalidad rosada en su pulpa es la variedad '**Red Shambar**'. Se originó en el año 1936 debido a una mutación de la variedad 'Marsh Seedless' en California. El tamaño del fruto oscila entre 90 a 95 mm de diámetro. La cantidad de semillas es reducida, de 3 a 4 por fruto (Fig. 8).



Figura 7. Pomelo 'Red Blush'. **A:** Fruta madura, entera. **B:** Corte transversal de la fruta.

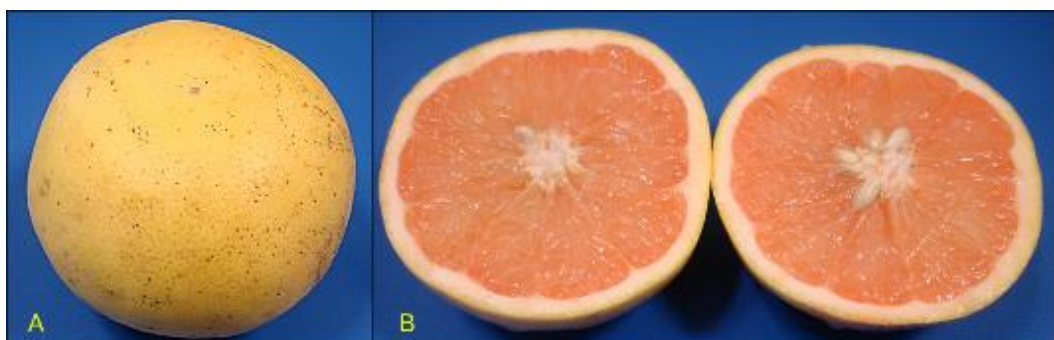


Figura 8. Pomelo 'Red Shambar'. **A:** Fruta madura, entera. **B:** Corte transversal de la fruta.

'Star Ruby' es una variante de pulpa color rojo intenso obtenida por mutación inducida a partir de la irradiación de neutrones. La cáscara es muy delgada y lisa, de color amarillo con tonalidades rojizas (Fig. 9). El tamaño es medio y posee muy pocas semillas (1-2 en algunos frutos). Las frutas proporcionan abundante jugo de sabor más dulce y menos amargo que otros.

Existen, además numerosas variedades pigmentadas como **'Burgundy'**, **'Flame'**, **'Henderson'**, **'Ray Ruby'**, **'Río Red'**, **'Ruby'** cultivadas en todo el mundo.

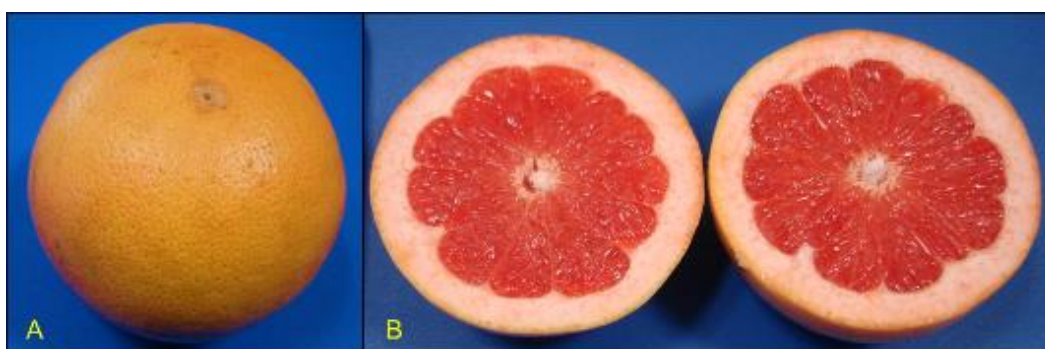


Figura 9. Pomelo 'Star Ruby'. **A:** Fruta madura, entera. **B:** Corte transversal de la fruta.

Entre las especies cítricas, el **Pummelo** (o Shaddock) *Citrus maxima* (*C. grandis*) es conocido también como la "madre" de muchos tipos de cítricos. Se presume que se originó en el sur de China y desde allí se distribuyó por el sudoeste de Asia. Las frutas son de tamaño grande, pueden medir entre 10 y 25 cm de diámetro y pesar de 500 a 1500 g (se han reportado frutos de 60 cm de diámetro y con un peso de hasta 10 kg) y varían de forma redonda a forma de pera. La textura de la cáscara es extremadamente lisa, pero la superficie contiene unas glándulas de aceite en forma de puntos verdosos. Algunas variedades tienen pulpa pigmentada y pueden exhibir también un color rosado a rojo en la cáscara.

La variante de *pummelo* llamada **'Chandler'**, da frutos de tamaño grande y la pulpa de tonalidad algo rosada (Fig. 10). Probablemente su origen fue California, a

partir del cruzamiento entre las variedades de *pummelo* 'Siamese Sweet' y 'Siamese Pink', en 1961. Las frutas contienen gran cantidad de jugo y es muy dulce. La acidez es muy baja y prácticamente carece de gusto amargo.

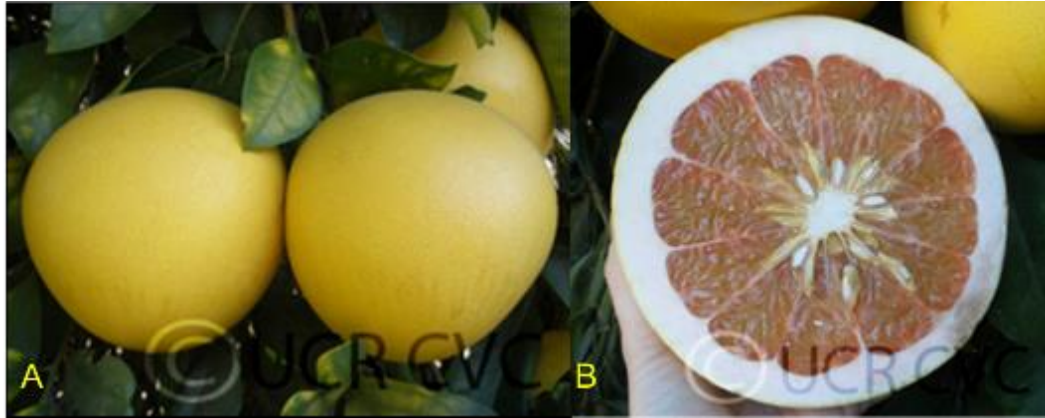


Figura 10. *Pummelo* 'Chandler'. **A:** Frutas maduras, enteras. **B:** Corte transversal de una fruta. Fotografías extraídas de "*Citrus Variety Collection*" (<http://www.citrusvariety.ucr.edu>).

Otras variedades de *pummelo* 'Kao Panne', 'Kao Phuang', 'Goliath', 'Mato', 'Shatinyu', 'Banpeiyu' son producidas sobre todo en las regiones de Asia.

Además, los híbridos comerciales, obtenidos entre *pummelo* diploides y selecciones de tetraploides de pomelo, son plantas triploides sin semilla, como la variedad 'Melogold' y 'Oroblanco' (*C. paradisi* x *C. maxima*). Esta última es una variedad desarrollada en la Universidad de California y resultó del cruzamiento entre una planta diploide de *pummelo* (*C. maxima*) sin acidez y una variedad de pomelo (*C. paradisi*) blanco tetraploide duplicado. Su nombre se debe al color amarillo intenso externo del fruto. La pulpa también es de color amarillo a blanquecino. Contiene gran cantidad de jugo, es bastante dulce y contiene bajos niveles de acidez. Si bien la cáscara es gruesa es bastante fácil de pelar (Fig. 11).



Figura 11. Híbrido triploide 'Oroblanco'. **A:** Fruta madura, entera. Fotografía extraída de "Citrus Variety Collection" (<http://www.citrusvariety.ucr.edu>) **B:** Corte transversal de una fruta.

Otra variante híbrida, cuyo origen genético es desconocido es el denominado '**Pomelo de Nueva Zelanda**' o naranja '**Poorman**'. No se conoce con exactitud los parentales que dieron origen a esta variante. Se considera que es un híbrido natural, probablemente entre un *pummelo* y mandarina. Por conveniencia, se lo ha clasificado como un híbrido de pomelo y así es ampliamente cultivado en Nueva Zelanda donde se comercializa como tal. El tamaño del fruto es de mediano a grande, color anaranjado a amarillo pálido, de forma casi globosa y posee numerosas semillas. La cascara es gruesa y muy rugosa y contiene bastante jugo de mediana acidez.

Pomelo 'Paraná' Citrus sp.

Al Pomelo 'Paraná' se lo conoció también como 'Dalandan', este término en idioma tagalog y cebuano en Filipinas significa naranja. Asimismo, en numerosas colecciones internacionales este nombre hacía referencia a una naranja llamada 'Dalandan'. Consecuentemente y debido a su origen genético desconocido, se prefirió abandonar el término 'Dalandan' ya que se generaron interpretaciones confusas acerca de su identificación sobre todo en la comercialización.

Originariamente se consideró como una variante de pomelo (*Citrus x paradisi*). Sin embargo, es un híbrido natural cuyo origen genético y ubicación taxonómica aún no se determinaron con exactitud. El sitio de origen, al igual que la mayoría de los cítricos, habría sido el sudeste asiático, en las Islas Filipinas. A diferencia de *C. paradisi* nativo de las Islas Barbados en el Caribe.

En el año 1967, con la denominación de pomelo 'Dalandan', el material original de pomelo 'Paraná' ingresó desde Filipinas a Brasil como semillas. Allí fue conservado como Accesoión NC678 en el Banco de Germoplasma del Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis en San Pablo (Rinsdahl-Canavosio, *et al.*, 2008). En 1981, fue enviado material desde la Experimental de Limeira (Brasil) a la Colección de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA Montecarlo (Misiones) Argentina, con el código F2P14.

En 1995, de una planta de 13 años de la Colección de la EEA INTA Montecarlo, se tomaron yemas y se envió material a Concordia, Entre Ríos. Allí ingresó como pomelo híbrido (Accesión CCC-618-Dalandan) y desde ese momento integra la Colección del Banco de Germoplasma Protegido de Citrus y Géneros Afines de Argentina, situado en la EEA INTA Concordia, Entre Ríos.

A su vez, fue enviado a Florida, Estados Unidos, desde la EEA Bella Vista como semilla. Allí, integra la Colección de semillas con el Código: 'Paraná' Gft CGIP-167 11/2/12. Y se lo incluyó en el Programa de Introducción al Germoplasma de Cítricos para Lanzamientos Varietales (1978-2015).

En el año 2003, para estudiar el comportamiento de esta variedad en la Provincia de Corrientes, se implantó el primer lote en la EEA INTA Bella Vista. El material procedía de Misiones y las plantas habían sido injertadas en INTA Montecarlo sobre los portainjertos citrange 'Troyer' y citrange 'Carrizo' (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*).

Estudios iniciales incluyeron análisis fenológicos y de calidad de jugo de las frutas de pomelo 'Paraná' para la zona de Corrientes. Los datos fenológicos registrados indicaron los picos de máxima brotación en la primera quincena de agosto y de septiembre de 2006. En 2007 hubo tres momentos de mayor intensidad, en los meses de febrero, agosto y diciembre. A su vez, la máxima floración registrada fue en agosto de 2006 y septiembre de 2007. En todos los casos el portainjerto con mejor comportamiento en los datos tomados fue citrange 'Troyer' (Rinsdahl-Canavosio, *et al.*, 2008).

En el 2010 un nuevo ensayo de esta variedad fue plantado con material saneado procedente de la Colección del INTA EEA Concordia sobre cuatro portainjertos, lima 'Rangpur', tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* x *C. reticulata*), citrumelo 'Swingle' (*Poncirus* x *Citrus*) y pomelo 'Duncan'. Cada parcela con tres plantas sobre un mismo portainjerto y en cuatro bloques. En total 12 plantas por combinación pie/copa.

En Paraguay también se realizaron análisis fenológicos y de calidad de jugo y fruta con el objetivo de lograr la comercialización y aprovechando todas las virtudes de la variedad. En Paraguay fue inscripto en el SENAVE (Servicio Nacional de Calidad y

Sanidad Vegetal y de Semillas de Paraguay) y fue incorporado oficialmente como pomelo (*Citrus x paradisi*) variedad 'Paraná' en el año 2011.

Por otra parte, en el año 2013 fue inscripto en el Registro Nacional de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas de Argentina (INASE), un pomelo híbrido (*Citrus sp.*) con la denominación 'Paraná', expediente N° S05: 0529325/2013.

En los análisis de jugo y de otras características de la fruta se consideraron los distintos portainjertos en el ensayo del 2010. Las comparaciones incluyeron los datos obtenidos a partir de frutas de pomelo 'Paraná', sobre los portainjertos citrange 'Troyer' y citrange 'Carrizo', en comparación con la variedad 'Duncan', variedad de copa utilizada como referencia en estos análisis. Así, se observó que los mayores valores de porcentaje de jugo, ratio y °Brix se obtuvieron en pomelo 'Paraná' (Rinsdahl-Canavosio, *et al.*, 2008; Canteros, *et al.* 2013).

Al igual que los citrus diploides, pomelo 'Paraná' cuenta con número cromosómico $2n= 18$ (Gochez, *et al.* 2008). Los frutos son de forma y tamaño semejante a un pomelo blanco y también son similares el color de la cáscara y de la pulpa, aunque algo más claro en pomelo 'Paraná' (Fig. 12). Sin embargo, la principal característica es el bajo contenido de acidez del jugo por lo que puede considerarse como un pomelo dulce. Contiene baja concentración de naringina (bioflavonoide responsable del sabor amargo del pomelo).

El tamaño promedio de la fruta es de 8,5 cm, el espesor de cáscara varía entre 5,3 a 5,5 mm y el peso promedio de la fruta es de 282 gramos. El color de la cáscara determinado según valores estándar corresponde a un amarillo verdoso. El contenido de vitamina C es de 52, 65 mg por cada 100 ml de jugo y el número de semillas varía entre 17 a 45. Los niveles de naringina en pomelos 'Duncan' fueron cuatro veces mayores que en el pomelo 'Paraná' ($15,16 \pm 0,48$ mg /litros en pomelo 'Paraná' y $76,11 \pm 3,7$ mg /litros en pomelo 'Duncan'). Sin embargo, los niveles de neohesperidina

fueron más altos en frutas de pomelo 'Paraná' que en las de 'Duncan' donde las frutas tenían 80% menos de neohesperidina. La acidez y el pH del jugo de los pomelos fueron $1299,09 \pm 4,71$ mg de ácido cítrico / litro de jugo y $\text{pH} = 3,76 \pm 0,01$ en promedio (Sgroppo *et. al.*, 2015).



Figura 12. Pomelo 'Paraná'. **A:** Porte del árbol con frutas maduras. **B:** Rama con inflorescencias (flores en estadio, F4). **C:** Rama fructífera (frutos en fase de cuajado). **D:** Rama con frutas maduras. **E:** Corte transversal del fruto donde se aprecia el color de la pulpa y con pocas semillas.

Las evaluaciones complementarias más recientes incluyeron además de los datos anteriormente mencionados, tamaño de las plantas, cantidad, color, peso y tamaño de las frutas, así como también el número de gajos, número de semillas, volumen de jugo y peso de pulpa. Estos datos fueron tomados del lote experimental de pomelo 'Paraná' sobre los portainjertos lima 'Rangpur', tangelo 'Orlando', citrumelo 'Swingle' y pomelo 'Duncan'.

Además de presentar características industriales mejoradas, como la calidad de fruta y buen comportamiento a campo, el pomelo 'Paraná' ha demostrado alta resistencia cuantitativa a la cancrrosis de los cítricos. Y se la clasificó como de tipo cuantitativo, basado en un período de susceptibilidad en hojas mucho más corto que en otro tipo de citrus. Se obtuvieron valores significativos para los niveles de inóculo e infección y se observó que el número de lesiones disminuyó en pomelo 'Paraná' con respecto a pomelo 'Duncan'. Es decir, hubo una respuesta diferencial por infiltración del mesófilo con diferentes inóculos y a diferentes edades (Gochez y Canteros, 2004, 2006, 2008; Canteros, *et al.* 2013).

Todas estas particularidades además de el sabor jugo mas dulce, la cantidad de semillas menor y la baja susceptibilidad a la cancrrosis del pomelo 'Paraná', comparado con la variedad 'Duncan', lo hacen productivamente un excelente candidato. Por todas estas razones se considera una variedad promisoría para la región. Ya que en la región del NEA se ha abandonado la producción de pomelo por los problemas ocasionados por la cancrrosis.

Aunque se conoció que el pomelo 'Paraná' es un híbrido natural, no se pudieron establecer con exactitud las relaciones filogenéticas para ubicarlo taxonómicamente. Y así poder inscribirlo con la denominación exacta en los organismos correspondientes.

Marcadores Moleculares Empleados en la Caracterización de Material Vegetal

La utilización de marcadores moleculares para analizar los cambios producidos a nivel de ADN, es fundamental en las aplicaciones biotecnológicas, así como en los estudios básicos de genética. Sin embargo, la identificación de variedades cítricas y en particular, variedades derivadas por mutaciones espontáneas e inducidas, sigue siendo una tarea difícil.

En poblaciones naturales, la cantidad y distribución espacial de la variabilidad genética puede influir tanto en la viabilidad como en el potencial para producir cambios evolutivos (Masatoshi, 1987). Mientras que en especies cultivadas puede influir en su productividad y consecuentemente en la rentabilidad económica del cultivo (Escalante *et al.*, 1994; Roubik, 2002).

En plantas cultivadas el estudio de la variabilidad del germoplasma es fundamental, ya que constituye la base para el éxito de los programas de selección y desarrollo de nuevas variedades (Elisario *et al.*, 1999). A pesar de que existe numerosa información sobre la magnitud y distribución de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones naturales, poco se conoce de la variabilidad que alberga y cómo se reparte entre y dentro de los cultivares (Hamrick y Godt, 1997).

En las disciplinas como biología molecular se han encontrado herramientas para el mejoramiento de variedades cítricas. Esto ha favorecido significativamente la identificación y selección de nuevos materiales, y son generalmente preferidas para la evaluación de la diversidad y estructura genética de la población y mapeo genético (Ciampi *et al.*, 2013, Pinar *et al.*, 2017).

La aplicación de marcadores moleculares ha facilitado y potenciado el análisis genético de plantas. Además, pueden resultar herramientas de gran ayuda en los

programas de mejoramiento cítrico y proporcionar datos complementarios a la información morfológica para la clasificación de germoplasma específico (Tinker *et al.*, 1994; Morgante *et al.*, 1996; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005; Pinar *et al.*, 2017).

Sin embargo, la caracterización de material genético ha sido dificultosa en *Citrus* debido a ciertas características propias del género. La alta fertilidad entre especies, la reproducción apomíctica y poliembrionía son habituales, así como también la larga fase juvenil y la escasez de marcadores de ADN polimórficos (Corazza-Nunes *et al.*, 2002). Por lo tanto, utilizar sólo rasgos morfológicos puede ser un obstáculo para distinguir entre muchos cultivares cítricos y entre grupos relacionados.

Generalmente, la baja diversidad intraspecífica encontrada en especies cítricas cultivadas contrasta con la alta variabilidad de rasgos de importancia agronómica, como el período de maduración, el color y tamaño de los frutos (Herrero *et al.*, 1996). Debido a la dificultad para distinguir entre grupos relacionados, la caracterización de cultivares cítricos generalmente se basa en rasgos morfológicos (Fang y Roose, 1997) especialmente ciertas características de los frutos relacionados al color de la cascara, pulpa y jugo. Aun así, la distinción entre cultivares mediante estos rasgos sigue siendo muy dificultosa.

La identificación de numerosos cultivares en viveros cítricos ha sido en general muy compleja, debido a que algunas variedades se distinguen sólo por las características del fruto, y las plantas cítricas por lo general no dan fruto hasta varios años después de la siembra (3 o 4 años generalmente). Esto puede resultar problemático para un vivero, ya que, entre otros motivos, se corre el riesgo de comercializar plantas en un pie o portainjerto distinto de lo reglamentado. Por ello, la capacidad de identificar cultivares cítricos con una pequeña muestra de hoja u otro tejido vegetal sería, de gran ayuda para preservar y proteger los derechos de los usuarios, productores, viveristas y mejoradores.

Con el avance en la utilización de marcadores moleculares, se han desarrollado nuevas metodologías para la identificación, caracterización y estudios filogenéticos de material vegetal. Han sido ampliamente utilizados en la identificación de especies, variedades y clones. A su vez, fueron empleados en la caracterización de híbridos a partir de plántulas nucelares, establecer relaciones filogenéticas y evaluar colecciones de germoplasma cítrico (Krueger y Roose, 2003; Novelli *et al.*, 2006; Palmieri *et al.*, 2007; Pang *et al.*, 2007; Kyndt *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013).

Ciertos marcadores como Isoenzimas, AFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados), RAPD (polimorfismo de ADN amplificado al azar) y SSR (repeticiones de secuencias simples) se han empleado en el análisis de la diversidad genética y las relaciones de parentesco dentro del género *Citrus* (Nicolosi *et al.*, 2000; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005; Pang *et al.*, 2007; Chacoff *et al.*, 2009; Uzun *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2011).

El análisis de isoenzimas en algunos casos resultó útil para distinguir los cultivares originados a partir de la reproducción sexual, pero generalmente en los cultivares que se han diferenciado por mutación este análisis no resulta adecuada (Roose, 1988; Herrero *et al.*, 1996).

Los AFLP han sido eficientes para identificar especies de cítricos con gran precisión en combinación con otros marcadores nucleares. Además, fueron utilizados para mapeo genético localizado en gran diversidad de cultivares. En cítricos, se han investigado las relaciones filogenéticas entre especies del género con estas herramientas (Pang *et al.*, 2007). Sin embargo, generalmente no son recomendados por ser marcadores dominantes y trabajar con ellos puede volverse engorrosa y complicada debido a la metodología.

Si bien, los RAPD son marcadores dominantes se distinguieron por ser relativamente más sencillos y rápidos que otros marcadores. Se utilizaron para estudiar el origen genético de posibles híbridos de plantas de limón (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005). A su vez, fueron empleados en la identificación de híbridos de mandarinas y otros cultivares cítricos (Coletta Filho *et al.* 1998; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005). Al mismo tiempo, los RAPD fueron eficaces al analizar la diversidad genética de otros frutales, como el caso del banano (*Musa sp.*) en el cual se pudieron identificar los híbridos y se utilizaron para la caracterización e identificación de germoplasma en los programas de mejoramiento genético de esos cultivares (Fortes-Ferreira *et al.*, 2004).

En ocasiones, los RAPD pueden conducir a una subestimación del nivel de polimorfismo existente entre individuos, debido entre otros motivos, a que son dominantes, por lo que no es posible diferenciar heterocigotos de homocigotos. Sin embargo, a pesar de esta desventaja siguen siendo marcadores ampliamente utilizados como una aproximación inicial en los estudios de variabilidad genética en material vegetal (Arias *et al.*, 2010).

Los estudios genéticos con marcadores microsatélites (SSR, *Simple Sequence Repeats*) se han incrementado rápidamente debido a que son codominantes, altamente polimórficos y expresan una distribución uniforme en el genoma (Gupta *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2002). Los SSR son intervalos de ADN con unidades de uno a seis pares de bases repetidas en tándem dispuestas en todo el genoma de la mayoría de las especies eucarióticas (Tautz, 1989). Los estudios realizados por Ruiz *et al.*, 2000, mostraron la importancia y eficiencia de los marcadores SSR para distinguir entre las plántulas cigóticas y nucelares y así descartar los genotipos no deseados. Según estos análisis los SSR resultaron ser más eficientes que las isoenzimas en la identificación de individuos cigóticos. A pesar de que los SSR son marcadores

codominantes como las isoenzimas, los SSR son mucho más variables tanto en el número de loci polimórficos como en el número de alelos por cada locus.

Los SSR han sido ampliamente utilizados en estudios filogenéticos y de variabilidad genética interespecífica, intraespecífica e intrapoblacional. En especies cítricas la identificación de plantas cigóticas y la construcción e integración de mapas de ligamiento fueron posibles mediante el uso de estos marcadores (Barkley *et al.*, 2006; Novelli *et al.*, 2006; Palmieri *et al.*, 2007; Hvarleva *et al.*, 2008; Cristofani-Yaly *et al.*, 2010; Uzun *et al.*, 2010; Amar *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2015).

Numerosos investigadores incluyeron los microsatélites para la identificación de cultivares cítricos estrechamente relacionados y ampliamente comercializados como naranja *C. sinensis*, pomelo *C. paradisi*, limón *C. limon*, mandarina *C. reticulata*, trifolío *Poncirus trifoliata*, citrange *Poncirus x Citrus* (Ruiz *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Cristofani *et al.*, 2003; Krueger y Roose, 2003; Novelli *et al.*, 2006; Palmieri *et al.*, 2007; Hvarleva *et al.*, 2008; Uzun *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013, Sharma *et al.*, 2015).

Algunos autores utilizaron los SSR para estudiar la diversidad de especies cítricas y géneros relacionados en combinación con EST (de la sigla en inglés Expressed Sequence Tags). El alto nivel de polimorfismo detectado en muchos cultivares se correlacionaron con caracteres de importancia agronómicas y potencialmente fueron de utilidad en la construcción de mapas de ligamiento. Así, observaron que los datos también podrían aplicarse en programas de mejoramiento cítrico como en la caracterización de germoplasma, la diferenciación de plántulas cigóticas y nucelares y el desarrollo de marcadores para la selección asistida por marcadores (Oliveira *et al.*, 2002; Palmieri *et al.*, 2007; Pinar *et al.*, 2017).

Es sumamente importante contar con material certificado para la comercialización de cualquier material cítrico. Dada la gran demanda de información y debido a la potencialidad rentable tanto productiva como en investigación del pomelo

‘Paraná’, resulta de interés el desarrollo de nuevas metodologías para la caracterización de este tipo de material.

La utilización de metodologías aptas para la caracterización de germoplasma cítrico específico es fundamental para la identificación genética y molecular del pomelo ‘Paraná’ en comparación con otros pomelos de referencia, *pummelos* o shaddock (*C. maxima* (Burm.) Merr., sin: *C. grandis* L. Osb.) y otros pomelos híbridos.

Considerando los antecedentes analizados y la situación expuesta resulta evidente que se requiere la descripción molecular y el análisis comparativo del pomelo ‘Paraná’ con otras variedades de pomelo. También, establecer las relaciones filogenéticas con *pummelos* y otras especies cítricas para caracterizar genéticamente el material y conocer las relaciones con otras variedades y especies o híbridos.

Los resultados ayudarán a caracterizar el material y lograr así complementar los datos para la inscripción en los organismos pertinentes. Con esto se pretende lograr una comercialización más fluida de la fruta y jugo y otros subproductos del pomelo ‘Paraná’, en mercados internacionales que se rigen por estándares más rígidos y exigen una autenticación de origen. Permitirán, además, enfatizar los conocimientos para avanzar en el programa de multiplicación y comercialización de las variedades, mediante la obtención de materiales disponibles para el diseño y desarrollo de programas de mejora productiva.

HIPÓTESIS

El estudio de la diversidad genética relativa de pomelo 'Paraná' y su correspondiente caracterización genética mediante marcadores moleculares específicos del genoma cítrico permite genotipificar el material de interés facilitando la evaluación del grado de parentesco relativo del pomelo 'Paraná' con las demás especies cítricas.

OBJETIVOS

General

Caracterizar molecularmente el pomelo 'Paraná' y otras variedades y especies cítricas mediante marcadores de ADN.

Específicos

Caracterizar mediante el uso de marcadores microsatélites y RAPD el material de pomelo 'Paraná' disponible en el Banco de Germoplasma de Argentina.

Estimar posibles relaciones de parentesco de pomelo 'Paraná' con otras especies y variedades cítricas conocidas.

MATERIALES Y METODOS

Material de Estudio

Se utilizaron variedades cítricas seleccionadas de las quintas experimentales de la EEA INTA, Bella Vista, ubicada en Colonia 3 de abril, Ruta provincial 27 km 38,3 de la localidad de Bella Vista, Corrientes. El material originalmente se obtuvo de yemas certificadas de la colección del Banco de Germoplasma Protegido de *Citrus* y Géneros Afines de la EEA INTA Concordia, Entre Ríos. Las plantas de pomelo 'Paraná' fueron injertadas sobre cuatro portainjertos: lima 'Rangpur', tangelo 'Orlando', citrumelo 'Swingle' y pomelo 'Duncan', lo que se tuvo en cuenta para un análisis complementario.

Además de pomelo 'Paraná', otras especies cítricas y variedades de pomelo fueron seleccionadas, así como también de cultivares afines y variedades híbridas (Tabla 1). Las muestras de catorce (14) variedades cítricas fueron incluidas, para lo cual se extrajo material fresco, es decir se prefirió seleccionar hojas nuevas tomadas al azar de las plantas elegidas. En la toma de muestras además se incluyeron réplicas biológicas de cada material.

Pomelo "Paraná". *Citrus sp.* En la EEA INTA Bella Vista este material fue implantado inicialmente en el año 2003, con el objetivo de estudiar el comportamiento de este cultivar en la provincia de Corrientes. Las plantas de dos años eran procedentes de Misiones y se trasladaron desde un vivero a campo.

Estas plantas fueron preparadas por la EEA INTA Montecarlo (Misiones) con yemas injertadas sobre los portainjertos citrange 'Troyer' y citrange 'Carrizo'. En total

fueron 60 plantas, 30 sobre 'Troyer' y la misma cantidad sobre 'Carrizo'. Se plantaron en dos bloques de cada portainjerto, en total 4 parcelas de 15 plantas cada una.

Luego en el 2010 se recibieron plantas certificadas, es decir material saneado, de la Sección Mejoramiento Cítrico de la EEA Concordia, Entre Ríos, con yemas procedentes del Banco de Germoplasma de Concordia. Un total de 48 plantas fueron injertadas sobre cuatro portainjertos: lima 'Rangpur', tangelo 'Orlando', citrumelo 'Swingle' y pomelo 'Duncan'.

El objetivo inicial de estos ensayos, independientemente de los objetivos propuestos en el presente trabajo, fue realizar distintas evaluaciones, entre ellas, análisis de fenología, características de importancia agronómica como calidad de jugo y fruta. También fue evaluado el comportamiento sobre diversos portainjertos. Así como también se utilizó en investigación para la genotipificación del material partiendo de un material más uniforme y saneado. Hasta el presente se continúan con éstas evaluaciones.

Se tuvo en cuenta que el material proporcionado, tanto de Misiones como del banco de Germoplasma de Concordia, fue de origen clonal. Esto se utilizó para evitar o reducir el riesgo de pérdida de material por enfermedades y condiciones ambientales adversas. Por consiguiente, se prefirió trabajar con réplicas de cada individuo para corroborar dicho origen.

'Duncan'. Variedad de pulpa blanca, seleccionada del lote experimental "Sanidad Controlada" de la EEA INTA Bella Vista. En este lote fueron implantadas además diversas especies y variedades cítricas donde rutinariamente se evalúan ensayos con distintos objetivos referentes a la sanidad del cultivo.

'MARSH'. Variedad de pigmentación blanca. Se recolectaron muestras de esta variedad implantada en el lote experimental "IVIA" de la EEA Bella Vista. En este lote

se cuenta con material certificado proveniente del Banco de Germoplasma Cítrico de España.

'FOSTER'. Variedad de pulpa pigmentada tonalidad rosada. Al igual que el pomelo 'Duncan', el material fue seleccionado del lote "Sanidad Controlada" de la EEA INTA Bella Vista.

'RED BLUSH'. Variedad de pulpa con tonalidad rosada. Las plantas seleccionadas provenían del lote "Cancrosis" de la estación experimental. Fueron producidas en 1990 en la EEA INTA Bella Vista de material seleccionado. La recolección de hojas se realizó teniendo en cuenta que fueran hojas jóvenes y libre de síntomas de cancrrosis de los *Citrus* (enfermedad bacteriana causada por *Xanthomonas citri*) ya que allí se realizan evaluaciones periódicas de dicha enfermedad.

'STAR RUBY' y **'RED SHAMBAR'**. Variedades de pigmentación rojiza. Las hojas fueron recolectadas del lote "IVIA" de la EEA Bella Vista.

'OROBLANCO'. Pomelo triploide (*C. maxima* x *C. paradisi*). Las muestras fueron seleccionadas del lote "IVIA" (EEA INTA Bella Vista).

'POORMAN'. Pomelo de Nueva Zelanda o naranjo 'Poorman', híbrido. Esta variedad se utilizó para comparar otros materiales híbridos con respecto a pomelo 'Paraná'. Las hojas fueron seleccionadas de una planta de la cámara de cultivo de plantas cítricas de la EEA INTA Bella Vista y habían sido traídas de INTA Concordia.

NARANJA 'VALENCIA' y **NARANJA 'SALUSTIANA'**. Variedades de jugo dulce. Se tomaron hojas de cada variedad seleccionadas del lote "Sanidad Controlada" (EEA INTA Bella Vista).

NARANJO 'AGRIO'. Variedad amarga. Se eligieron las plantas contiguas a los lotes de ensayos de otras variedades cítricas en la EEA Bella Vista.

PUMMELO 'CHANDLER' *C. maxima* o *C. grandis*, variedades de *pummelo* también conocido como shaddock, pamplemusa o cimboa. Se extrajo el material de la cámara de cultivo de plantas cítricas de la EEA donde habitualmente se realizan evaluaciones de éste material junto con otras variedades cítricas para distintos ensayos. El material original se trajo de la EEA Concordia.

CIDRA *Citrus medica* L. Al igual que el material anterior fue tomado de la cámara de cultivo y tenían el mismo origen.

Tabla 1. Variedades cítricas utilizadas como material de estudio. Incluye el número de replicas biológicas y el código utilizado en el texto.

Variedades/ Nombre común	Especie	Número de Replicas	Código
Pomelo			
‘Paraná’	<i>Citrus sp.</i>	78	PP
‘Duncan’	<i>C. paradisi</i> Macf.	14	PD
‘Foster’	<i>C. paradisi</i> Macf.	18	PF
‘Marsh’	<i>C. paradisi</i> Macf.	18	PM
‘Red Blush’	<i>C. paradisi</i> Macf.	6	RB
Star Ruby’	<i>C. paradisi</i> Macf.	6	SR
‘Red Shambar’	<i>C. paradisi</i> Macf.	4	RS
‘Oroblanco’	<i>C. maxima</i> x <i>C. paradisi</i>	8	OB
‘Poorman’	<i>Citrus sp.</i>	4	POO
Naranja			
‘Valencia’	<i>C. sinensis</i> Osbeck	16	NV
‘Agria’	<i>C. aurantium</i> L.	6	NA
‘Salustiana’	<i>C. sinensis</i> Osbeck	4	NS
Pummelo	<i>C. máxima</i> (Burm.)		
‘Chandler’	Merr.	8	Ch
Cidra	<i>C. medica</i> L.	4	Ci

Métodos

Extracción de ADN

El procedimiento para la extracción del ADN genómico total se basó en el método propuesto por Murray y Thompson (1980), el cual fue adaptado para el análisis de material cítrico.

Se extrajeron 3-4 hojas nuevas, es decir material fresco que denotaba un tejido joven. Y posteriormente se lavaron con agua corriente para eliminar residuos. Para el procedimiento se utilizaron 400 mg de tejido.

Protocolo de Extracción

- 1- Se pesaron 400 mg de tejido foliar.
- 2- Por cada muestra, se colocaron 3 ml de buffer de extracción CTAB en tubos de plástico tipo Falcon (Tabla 2). Y se llevaron a baño térmico (65°C) durante 20 minutos.
- 3- Se procedió a triturar el tejido en morteros de cerámica con nitrógeno líquido y pilón. Se maceró hasta observar el material seco de color verde claro (Fig. 13 A, B, C).
- 4- Luego por cada 10 ml de buffer CTAB, previamente precalentado, se adicionaron 20 μ l de 2-mercaptoetanol y se mezcló agitando suavemente. El 2-mercaptoetanol se colocó solamente al momento de utilizar el CTAB.
- 5- Se colocó el tejido macerado en tubos de 15 ml y se adicionaron los 3 ml de buffer CTAB precalentado y conteniendo el 2-mercaptoetanol.
- 6- Se agitaron suavemente los tubos y se incubó durante 30 minutos a 65°C, en ese tiempo se mezcló por inversión cada 10 minutos.

- 7- Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 3500 rpm.
- 8- Se recuperaron 900 µl de la fase acuosa o sobrenadante en tubos de 2 ml y se adicionaron 900 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 conservado a 4 °C (Fig. 13 D).
- 9- Se recuperaron nuevamente 900 µl de sobrenadante y se incorporó a nuevos tubos de 2 ml y se adicionaron 900 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 conservado a 4 °C (Fig. 13 D).
- 10- Posteriormente se se agitó ligeramente en Vortex y centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm.
- 11- Del sobrenadante obtenido en el paso 10 se recuperaron 800 µl y se adicionó la misma proporción de isopropanol (Fig. 13 E).
- 12- Se incubaron las muestras a -20 °C durante 4 horas como mínimo o durante 24 horas. En este paso es posible incubar durante mas días a -20 °C.
- 13- Luego de centrifugar durante 10 minutos a 14.000 rpm se descartó el sobrenadante y se recuperó el precipitado de ADN. Se puede centrifugar por más tiempo hasta observar el precipitado. Durante los posteriores y consecutivos lavados se trabajó con suma precaución para evitar perder el precipitado al desprenderse del tubo.
- 14- Para el lavado se adicionaron 100 µl de etanol 70 % conservado a -20 °C.
- 15- Nuevamente las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 14.000 rpm.
- 16- Se repitieron los pasos 13 y 14 tres veces.
- 17- Finalmente se descartó el alcohol y los tubos se colocaron en flujo laminar para secar el precipitado (Fig. 13 F).

18- Se utilizaron 100 μ l de agua de calidad mili-Q para la resuspensión final y se agitó ligeramente en Vortex.

19- A la resuspensión obtenida se adicionó 1 μ l de RNasa por cada tubo y se incubó durante 20 minutos en baño térmico a 37 °C.

20- La integridad y calidad del ADN fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 %, 90 V durante 1 hora.

21- Para las PCRs se utilizaron de 1 a 2 μ l de ADN.

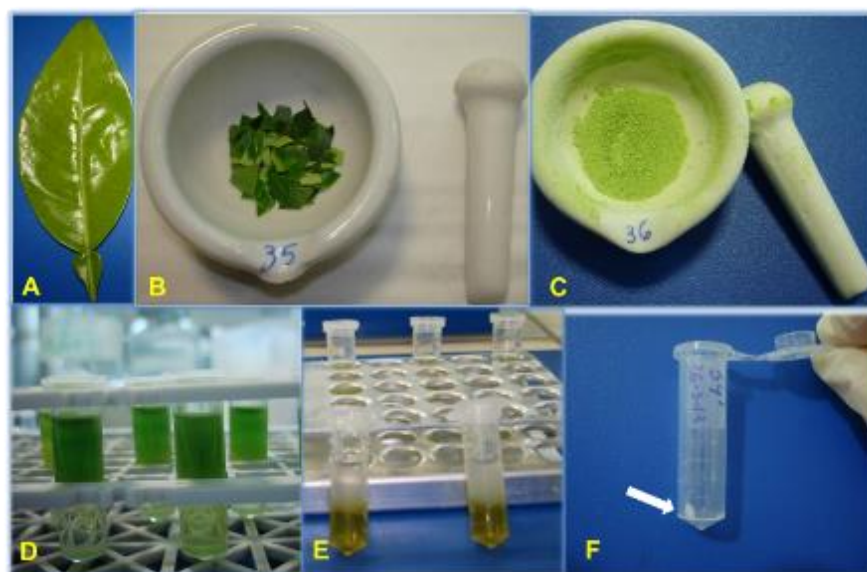


Figura 13. Procedimiento para la extracción de ADN de *Citrus* a partir de material fresco. **A:** Lamina foliar joven. **B:** Trozos pequeños de hojas cortadas con tijera. **C:** Material triturado con nitrógeno líquido y pilón en mortero de cerámica. **D:** 900 μ l de sobrenadante más la misma proporción de cloroformo- alcohol isoamilico 24:1 en tubos de 2 ml. **E:** 800 μ l de sobrenadante del paso anterior más 800 μ l de isopropanol. **F:** precipitado de ADN (la flecha indica el pellet).

Tabla 2. Componentes para la preparación de Buffer CTAB.

Sustancias	Cantidades
CTAB	20 g
NaCl	82 g
Tris HCl 1M pH8	100 ml
EDTA 0,5 M pH8	100 ml
PVP	20 g
Agua destilada	Enrazar a 1000 ml

Cuantificación de ADN

Inicialmente la integridad y cantidad de ADN fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% a 90 V durante 1 hora (Fig. 14). Se utilizó el programa *Image J* con el cual se analizó el perfil de bandas obtenido en cada gel. La intensidad de las bandas fue comparada en relación al patrón de ADN conocido (*Ladder* 100 pb PB-L) (Tabla 3).

Sin embargo, cuando fue posible se realizó la cuantificación del ADN mediante espectrofotometría *nanoDrop* y *Qubit* para verificar la concentración y pureza del ADN de *Citrus* disponibles en las muestras analizadas. Para el equipo *nanoDrop1000 Spectrophotometer* se utilizó 1 μ l de ADN de cada muestra resuspendida en agua miliQ.

Para cuantificar el ADN de manera más precisa y con mediciones más sensibles se utilizó un equipo *Qubit 2.0*. En éste equipo se utilizaron muestras de ADN sin tratamiento previo. Se utilizó el ADN resuspendido en agua miliQ del cual se tomó 1 μ l y se siguió el procedimiento especificado en el protocolo de funcionamiento del equipo.

Asimismo, mediante el equipo *Fragment Analyzer (AATTI)* también fue posible cuantificar el ADN y corroborar las concentraciones, sin embargo se incluyeron pocas muestras ya que se tuvo en cuenta el costo de los insumos para dicho equipamiento.

En la Tabla 4 se detallan los valores de ADN obtenidos por las técnicas descritas anteriormente.

Si bien, se pudo observar que en algunos casos existen diferencias importantes en cuanto a las concentraciones brindadas entre distintos métodos, se resalta la importancia de contar con un método de cuantificación para validar los posteriores análisis moleculares. En este trabajo la cuantificación mediante

electroforesis en gel de agarosa resultó ser la más conveniente y eficaz teniendo en cuenta además, que en ese momento no se contaba con equipamiento propio para cuantificar.

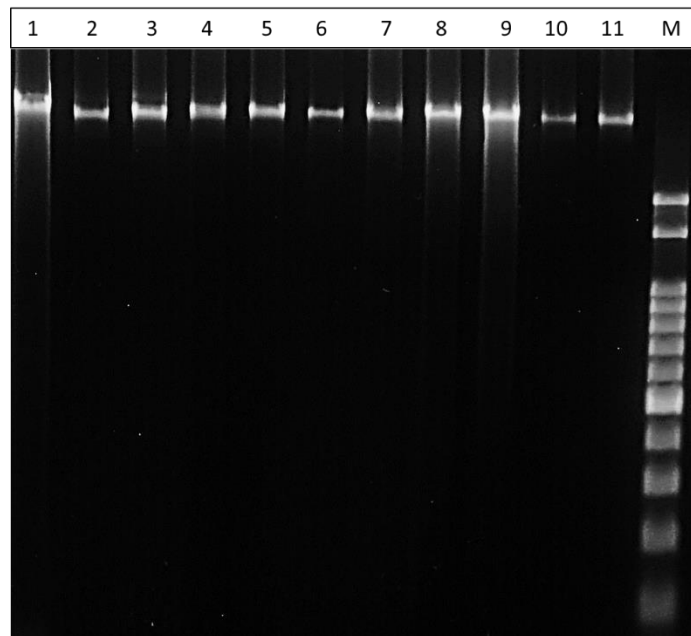


Figura 14. Prueba de calidad y cantidad de ADN cítrico. Gel de agarosa 1,5 %. **M:** Marcador de 100 pb (*Ladder* PB-L). **Calles:** **1** y **2:** 'Oroblanco'. **3, 4 y 5:** Naranja 'Agrio'. **6:** 'Poorman'. **7:** 'Cidra'. **8:** Pomelo 'Paraná'. **9 y 10:** Naranja 'Salustiana'. **11:** Pomelo 'Duncan'.

Tabla 3. Cuantificación de ADN mediante el Programa *ImageJ* con gel de agarosa 1,5 %.

Código	Gel agarosa ng/μl	ImageJ ng/μl	Código	Gel agarosa ng/μl	ImageJ ng/μl
PPLG1	150	100	PPLCH1	40	40
PPLG2	50	80	PPLCH2	150	120
PPLG3	40	40	PPLCH3	50	60
PPLG4	40	60	PPLCH6	40	40
PPLG5	200	130	PPLCH10	150	100
PPLG6	200	100	PPLCH11	50	80
PPLG7	40	40	PPLCH12	150	150
PPLG8	200	120	PPLCH13	100	120
PPLG9	200	120	PPLCH14	150	150
PPLG10	200	140	PPLCH15	150	110
PPLG11	40	50	PPLCH16	40	50
PPLG12	40	50	PPLCH17	50	60
PPLG13	50	50	PPLCH18	50	80
PPLG14	150	100	PPLCH19	50	80
PPLG15	150	100	PPLCH20	50	80
PPLG16	150	100	PPLCH21	60	120
PPLG17	10	20	PPLCH22	150	150
PPLG18	150	90	PPLCH23	150	170
PPLG19	150	90	PPLCH24	200	170
PPLG20	40	50	PPLCH25	200	180
PPLG21	30	40	PPLCH27	50	100
PPLG22	30	30	PPLCH28	150	170
PPLG23	30	40	PPLCH29	150	120
PPLG24	30	30	PPLCH30	150	160
PPLG25	40	50	PPLCH31	150	150
PPLG26	30	40	PPLCH32	20	40
PPLG27	30	40	PPLCH33	100	100
PPLG28	20	30	PPLCH34	150	150
PPLG29	30	40	PPLCH35	100	100
PPLG39	40	40	PPLCH36	20	40
PPLG40	200	130	PPLCH37	150	150
PPLG41	50	60	PF	10	30
PPLG42	100	80	NV	100	80
PPLG43	100	70	RB	50	50
PPLG44	50	60	PM	40	60
PPLG45	50	80	RSH	50	80
PPLG46	50	60	OB	40	50
PPLG47	100	90	SR	50	80

Tabla 4. Cantidad de ADN obtenidos mediante *NanoDrop* y *Qubit*.

Código	NanoDrop			Qubit 2.0	
	ng/ul	A260	A280		260/280
control	25,58	0,512	0,284	1,8	
136PP1	94,46	1,889	1,203	1,57	3,81
137PP2	509,32	10,186	5,749	1,77	37,2
140PP3	450,62	9,012	5,159	1,75	37,6
141D1	403,09	8,062	4,558	1,77	28,3
142D2	508,56	10,171	5,55	1,83	31
143D3	380,78	7,616	3,992	1,91	29
145F2	341,06	6,821	3,528	1,93	17,6
146F3	191,49	3,83	2,149	1,78	6,8
147M1	317,4	6,348	3,917	1,62	35,8
148M2	841,66	16,833	8,757	1,92	46,5
149M3	360,77	7,215	4,097	1,76	36,7
150V1	476,9	9,538	5,379	1,77	17,3
151V2	411,93	8,239	6,214	1,33	36
151V2.1	578,23	11,565	6,779	1,71	-
152Ch1	264,8	5,296	2,755	1,92	26,8
153RB1	467,06	9,341	5,354	1,74	16,5
154RB2	730,6	14,612	7,827	1,87	29,9
155SR1	205,53	4,111	2,333	1,76	15,5
156SR2	81,33	1,627	0,956	1,7	3,03
157SR3	54,45	1,089	0,838	1,3	-1
158RSh1	369,33	7,387	4,269	1,73	23,1
159RSh2	322,1	6,442	3,584	1,8	14,2
160OB1	402,16	8,043	4,163	1,93	30,2
161OB2	247,12	4,942	2,607	1,9	6,2
162NA1	380	7,6	4,012	1,89	14,5
163NA2	305,06	6,101	4,1	1,49	14,1
164NA3	351,9	7,038	3,709	1,9	10,3
165Poo1	109,81	2,196	1,128	1,95	7,02
166Ci1	279,22	5,584	2,737	2,04	11,7
167LE1	395,34	7,907	4,316	1,83	24
168NS1	399,75	7,995	4,306	1,86	28,8
169NS2	315,53	6,311	3,558	1,77	7,24
170Dun1	201,96	4,039	2,202	1,83	8,51

Marcadores Moleculares

La variabilidad y estructura genética fueron evaluadas mediante el uso de marcadores nucleares RAPD y SSR (de las siglas en inglés *Random Amplified Polymorphic DNA* y *Simple Sequence Repeats*, respectivamente).

Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar (RAPD)

Se escogieron los marcadores RAPD por su relativa sencillez y debido a que el conocimiento previo de las secuencias de la especie no fue necesario. Para evaluar los RAPD se utilizaron muestras de las plantas de los lotes de pomelo 'Paraná' implantados tanto en el 2003 como el de 2010 en la EEA Bella Vista. Estos lotes fueron comparados como ensayo experimental para evaluar la existencia de variabilidad en el material ingresado en esos años.

Se emplearon cuatro cebadores arbitrarios (OPAT-14, OPB-07, OPH-15, OPI-11) de *Operon Technologies* (Tabla 5). Estos cebadores fueron escogidos ya que resultaron polimórficos en trabajos previos realizados en especies y variedades afines a *Citrus* (Coletta Filho *et al.*, 1998; Corazza-Nunes *et al.*, 2002; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2005; Baig *et al.*, 2009). Las amplificaciones se realizaron en termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* para un volumen final de 13 µl (Tabla 6 y 7).

Tabla 5. Secuencias de bases de RAPD seleccionados.

Código del marcador	Secuencia de base (5´3´)
OPAT-14	GTCCCGCACT
OPB-07	GGTGACGCAG
OPH-15	AATGGCGCAG
OPI-11	ACATGCCGTG

En cada amplificación se incluyó un control negativo (una muestra con todos los reactivos necesarios para la amplificación, pero sin ADN molde) para confirmar que los fragmentos obtenidos (bandas) no fueran “artefactos” de la técnica. Además, con el fin de comprobar la reproducibilidad de las bandas, las reacciones fueron realizadas por duplicado en algunos individuos tomados al azar de cada cultivar.

Los productos de amplificación fueron identificados visualmente mediante electroforesis en geles de agarosa 1,5% en buffer TAE 1 X, teñidos en una solución de gel *Red* y fotografiados bajo luz UV. Las bandas generadas con el mismo coeficiente de migración, amplificadas con el mismo cebador fueron consideradas como correspondientes al mismo locus. Cada banda fue considerada como un único locus bialélico, uno amplificable y el otro nulo. Los datos fueron registrados como presencia de la banda (1) o ausencia de la banda (0). Con los datos obtenidos se construyeron matrices de individuos x caracteres.

Tabla 6. Protocolo de amplificación para cebadores RAPD.

Reactivos	Concentración final
Buffer	1 x
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,2mM
Cebador	0,2 mM
Taq Pol	1,5 U
ADN	2,31 ng

Tabla 7. Condiciones de amplificación de los cebadores RAPD. Ciclado.

Ciclado
1- 92 °C 1 min
2- 92 °C 1 min
3- 36 °C 1 min
4- 72 °C 2 min
Repetir desde el paso 2 x 36 veces
5- 72 °C 10 min

Polimorfismo de Secuencias Simples Repetidas (SSR)

La estructura y variabilidad genética de pomelo 'Paraná' se determinó utilizando las plantas disponibles en la EEA Bella Vista, Corrientes.

En total se escogieron 18 microsatélites (SSR) de bases de datos públicas. Se evaluaron los marcadores P73, P94, P620, P1826, P1223 descritos previamente por Corazza-Nunes *et al.*, 2002. A su vez, se utilizaron los marcadores CCSM18, CCSM147, CCSM17, CCSM111, CCSM95, CCSM04, CCSM06, CCSM09, CCSM77, CCSM156, CCSM68, CCSM112, CCSM13 estudiados por Oliveira *et al.*, 2002; Cristofani *et al.*, 2003; Cristofani-Yaly *et al.*, 2010 (Tabla 8).

Tabla 8. Secuencias *forward* (f) y *reverse* (r) de los oligonucleótidos SSR seleccionados.

SSR	Secuencia de base (5'3')
P73	f-CCATTGCTTACGAAGTTG r-TTGACTTGCAGCAATCAG
P94	f-ATTGAATCTTCTGTAGCTC r-ATCATCATCTAGTGCACTG
P620	f- GACTGGATTAGAGTTCTCTG r- ATGGATGTGTTATCTCACTC
P1223	f- ATCTGTGTAAGGACTGAA r- CCTCTATTAATGTGCCTG
P1826	f- GGACACTGTGACGGCTAA r- AGCTACCAAGACACCACC
CCSM04	f- TTCTCCTCATCTTCGACTCC r- CCGATCTTACGACGTATCAA
CCSM06	f- ATCTGTGTGAGGACTGAA r- CCTCTATTAATGTGCCTG
CCSM09	f- GACTGGATTAGAGTTCTCTG r- ATGGATGTGTTATCTCACTC
CCSM13	f- CTAGAGCCGAATTCACC r- AACAGCTACCAAGACACC
CCSM17	f- ACATGGACAGGACAACCTAAG

	r- GTTATGATACGTCTGTGTCC
CCSM18	r- AACAGTTGATGAAGAGGAAG f- GTGATTGCTGGTGTCGTT
CCSM68	f- ACATGGACAGGACAACTAAG r- CACTTCTGCCTTGCTATG
CCSM77	f- TATCCAACCATGTGTGTCCATA r- CACTAGGTCACCATTAATTG
CCSM95	f- AAGAAGCTCTCACCTCTC r- TAACGTCTGAACGAACTG
CCSM111	f- TGATACATAATATGGGATAG r- TTAGTGATTTCGTGGAGC
CCSM112	f- ATGCCATTATGTGTGTG r- CAGACCTGAACATAACTC
CCSM147	r- ARACTCACGTAACCTACTTC f- GCTATGTTATGATACGTCTG
CCSM156	f- GTCTCTGTTGTGTGTCTGGTT r- ACGAAGTGAAGTGTGTAATG

Las amplificaciones se realizaron para un volumen final de 12 μ l (Tabla 9 y 10). Los productos de amplificación fueron verificados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % buffer TAE 1 x, teñidos con una solución de gel *Red* y fotografiados bajo luz UV. Se sembraron 6 μ l de PCR. La corrida electroforética se realizó durante 1

hora 50 minutos (100 V). Para determinar el tamaño de los productos se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases.

Cuando fue posible, los amplicones fueron resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 % teñidos posteriormente con nitrato de plata (Tabla 11). Se sembraron 10 μ l de PCR. Y se realizó una precorrida durante 35 minutos a 100 V y una corrida final a 80 V durante 1 hora 30 minutos en Buffer TBE 1 x. El patrón de tamaño molecular empleado fue de 100 pares de bases.

Tabla 9. Protocolo para amplificación de SSR. Reactivos y concentraciones de los mismos.

Reactivos	Concentración final
Buffer	1 x
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Cebador	0,1 μ M
Taq Pol	1 U
ADN	2,5 ng

Tabla 10. Condiciones de amplificación de los cebadores SSR. Ciclado.

Ciclado
1- 94 °C 5 min
2- 94 °C 45 seg
3- 56 °C 30 seg
4- 72 °C 45 seg
Repetir desde el paso 2 32 veces
5- 72 °C 10 min

Tabla 11. Solución de tinción para geles de poliacrilamida.

Solución de tinción	
Valores para 1 gel	Volumen final (2 litros)
1- Nitrato de Plata (NO ₃ Ag)	1 gr
2- Formaldehído	1,5 ml
	Llevar a volumen con agua ultrapura

A su vez, para afianzar y complementar los datos generados con electroforesis en geles de agarosa, las muestras se examinaron mediante electroforesis capilar utilizando el equipo *Fragment Analyzer* (AATI). El mismo posee un poder de resolución mas preciso y confiable que los tipos de electroforesis convencionales. Se utilizaron las mismas condiciones para las amplificaciones detalladas anteriormente en la Tabla 9. Se utilizaron 2 μ l de PCR y la corrida duró alrededor de 35 minutos.

La sensibilidad de esta técnica está basada en la especificidad de resolución y es dependiente del gel, con una lectura de hasta 2 pb. Los datos en este equipo se analizaron con el Programa *PROSize v2.0*. Mediante este programa los productos de amplificación fueron visualizados en cromatogramas y gráficos donde fue posible analizar cada banda generada (Unidad de Genómica-Nodo plataforma de Genómica CICV y A, CNIA-INTA).

Los productos de amplificación se codificaron en una matriz de datos para alelos codominantes. La confección de la matriz se realizó empleando dos columnas por locus. Cada banda generada para el mismo locus fue codificada numéricamente (1, 2, 3, etc.).

Análisis Estadístico

Caracterización de la Variabilidad Genética

Con el fin de llevar a cabo la caracterización genética del material de *Citrus* estudiado se calcularon los siguientes estadísticos descriptivos:

-Número total de bandas (NTB): es el número de bandas diferentes encontradas en una población.

-Número de alelos (N_a): se refiere al número de alelos diferentes en una población y se obtiene cuando se trabaja con datos codominantes como el caso de SSR.

-Número de alelos efectivos (N_e): esta medida indica el número de alelos esperados en cada locus de una determinada población, y es la inversa de la homocigosidad de un locus. Hace referencia a la probabilidad de un alelo de pasar a la siguiente generación.

-Índice de diversidad de Shannon (Sh) (Shannon y Weaver 1949): se calcula para proporcionar una estimación relativa del grado de variación genética dentro de las poblaciones. Su valor mínimo es cero (0) y aumenta al aumentar la diversidad.

-Número de Bandas exclusivas (NBE): es el número de alelos presentes sólo en una población. Se utilizó éste parámetro en análisis de marcadores RAPD.

-Número de Alelos exclusivos: se calculó el número de alelos y su frecuencia en cada población, fue calculado para los análisis de datos SSR.

-Número de Alelos comunes: es el número de alelos compartidos en un 25% o menos en la población.

-Heterocigosis esperada (H_e): proporción esperada de loci heterocigoto por individuo en una población con cruzamiento al azar.

-Porcentaje de loci polimórficos (PLP): es el número total de loci polimórficos en relación al número total de loci.

Estructuración de la variabilidad genética

-Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA): se realizó para estimar el grado de diferenciación genética entre las variedades. Este análisis estima la variabilidad interpoblacional, mediante el estadístico Φ_{ST} que es análogo a los estadísticos jerárquicos F de Wright (Nybom y Bartish, 2000; Nybom, 2004).

-Distancias y similitudes Genéticas de Nei (Nei, 1973): se calcularon los índices de distancia y de identidad genética de Nei entre las variedades cítricas. A partir de los valores de distancia genética obtenidos se realizó un PCoA. Además, se calcularon los índices de distancia y de identidad genética de Nei de exclusivamente pomelo 'Paraná', sobre los distintos portainjertos, lima 'Rangpur', tangelo 'Orlando', citrumelo 'Swingle' y pomelo 'Duncan'.

-F de Wright (F_{st}) y $PhiPT$: se emplearon los estadísticos F_{st} y su análogo $PhiPT$ para determinar el grado de diferenciación genética entre las variedades cítricas. También se obtuvo un F_{st} de las muestras de pomelo 'Paraná' entre los portainjertos utilizados.

-Análisis de Coordenadas Principales (PCoA): la disposición espacial de la variabilidad genética presente en las variedades estudiadas se determinó mediante un PCoA a partir de la matriz de distancias genéticas de Nei entre pares de individuos. Además, se realizó un PCoA teniendo en cuenta los portainjertos utilizados para pomelo 'Paraná'.

-Método de Agrupamiento de a pares no ponderados usando Medias Aritméticas (UPGMA): se construyó un dendrograma a partir de las distancias genéticas de Nei (1972) utilizando el programa TFGA (Miller, 1998).

Todos los análisis y cálculos nombrados se realizaron empleando el software GENEALX 6 (Peakall y Smouse, 2006).

RESULTADOS

Caracterización de la Variabilidad Genética

Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD)

En la Tabla 12 se resumen los estadísticos descriptivos calculados sobre pomelo 'Paraná' implantado en distintos portainjertos en la EEA INTA, Bella Vista. Sobre los portainjertos citrange 'Troyer' y citrange 'Carrizo'; sobre pomelo 'Duncan', citrumelo 'Swingle', tangelo 'Orlando' y lima 'Rangpur'.

Los productos de amplificación con los cuatro cebadores escogidos (OPAT-14, OPB-07, OPH-15, OPI-11) fueron visualizados satisfactoriamente en geles de agarosa 1,5 % (Fig. 15 y 16). El patrón de bandas obtenido para cada cebador permitió realizar la matriz de datos para el análisis correspondiente.

En total se detectaron 33 *loci* RAPD. El mayor porcentaje de *loci* polimórficos (**PLP**= 93,94 %) y la heterocigosis esperada promedio (**He**= 0,37) fueron mayores en las muestras del material implantado en el 2003 con respecto al lote implantado en 2010 (**PLP**= 84,85 % y **He**= 0,34). También, el Índice de Shannon resultó mayor en el lote del 2003 (**Sh**= 0,54) que en el material implantado en 2010 (**Sh**= 0,49). Con respecto al número de bandas exclusivas, no se hallaron para ninguna de las muestras analizadas en este estudio, lo cual podría deberse a que se trata de material idéntico por ser de origen clonal (Tabla 12).

Debido a la ausencia de bandas exclusivas en el material analizado con los marcadores RAPD, se continuaron los análisis moleculares con SSR, por su mayor potencial para detectar polimorfismos.

Tabla 12. Diversidad genética estimada del pomelo 'Paraná' en base a 33 *loci* RAPD de 104 muestras. **NTB**= número total de bandas; **NBE**= número de bandas exclusivas; **PLP**= porcentaje de *loci* polimórficos; **He**= heterocigosis esperada; **Sh**= índice de diversidad de Shannon; **DE**= desvío estándar.

Muestras	N	NTB	NB	PLP	He (DE)	Sh (DE)
Lote 2003	59	33	0	93,94 %	0,37 (0,023)	0,54 (0,030)
Lote 2010	45	33	0	84,85 %	0,34 (0,031)	0,49 (0,042)
Total	104	33				

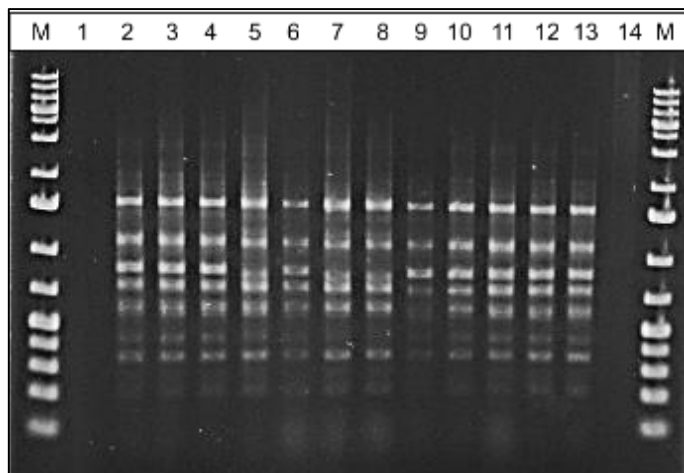


Figura 15. Perfiles electroforéticos RAPD del cebador OPAT 14 en pomelo 'Paraná'. Gel de agarosa 1,5 %. Material implantado en 2003. **Calles**, 1: Control (PCR + agua). 2, 3 y 4: Pomelo 'Paraná' sobre citrange 'Carrizo'. 5, 6, 7 y 8: Pomelo 'Paraná' sobre citrange 'Troyer'. 9, 10, 11, 12 y 13: Pomelo 'Paraná' sobre citrange 'Carrizo'. 14: Control (PCR + agua). **M:** Marcador 1 kb (*Ladder* PB-L).

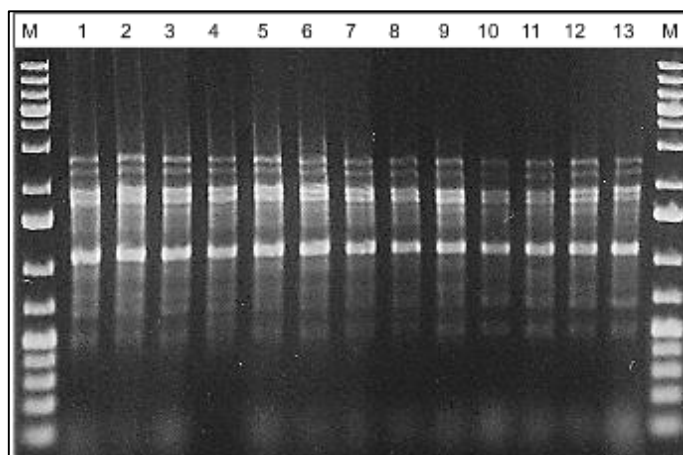


Figura 16. Perfiles electroforéticos RAPD a partir del cebador OPH 15 de distintas variedades cítricas. Fotografía de un gel de agarosa al 1,5 % corrido con los fragmentos amplificados por ADN purificado de material implantado en 2010. Calles, 1: 2 y 3: Pomelo 'Paraná' sobre citrumelo 'Swingle'. 4, 5 y 6: Pomelo 'Paraná' sobre tangelo 'Orlando'. 7, 8, 9, 10, 11 y 12: Pomelo 'Paraná' sobre lima 'Rangpur'. 13: Pomelo 'Paraná' sobre pomelo 'Duncan'. **M:** marcador 1 kb (*Ladder* PB-L).

Polimorfismo de microsatélites (SSR)

15 de los 18 marcadores mostraron productos de amplificación detectables (P73, P94, P620, P1826, P1223 CCSM18, CCSM147, CCSM17, CCSM111, CCSM04, CCSM06, CCSM09, CCSM77, CCSM156, CCSM68) y solo 3 de los oligonucleótidos diseñados no permitieron producir una amplificación visible en ninguna de las condiciones de PCR ensayadas (CCSM112, CCSM13 y CCSM95). El número total de muestras para este análisis fue de 194 para un total de 14 variedades.

En general se logró optimizar eficazmente la resolución de los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %. Sin embargo, existieron diferencias en cuanto al patrón de bandas resueltas. En algunos casos no se pudieron distinguir con exactitud debido posiblemente a condiciones propias de la corrida electroforética (Fig. 17).

En la figura 17 se puede apreciar el perfil de bandas con el cebador P73, en el cual la amplificación diferencial permitió distinguir parcialmente al pomelo 'Paraná' del resto de los materiales analizados. A su vez, la amplificación de bandas del pomelo 'Paraná' fue muy similar a de *pummelo* (*C. maxima*) y permitió también distinguir a éste de los restantes.

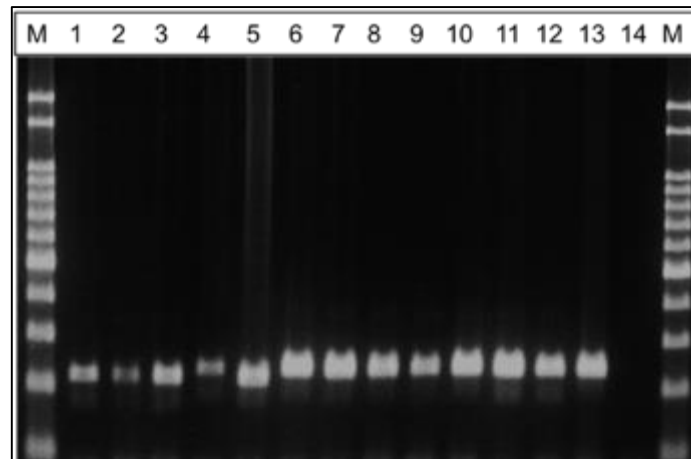


Figura 17. Perfiles electroforéticos SSR del cebador P 73.de distintas variedades cítricas. Gel de agarosa 2 %. **Calles, 1, 2 y 3:** Pomelo 'Paraná'. **4:** 'Oroblanco' (triploide). **5:** *C. maxima* (pummelo 'Chandler'). **6:** Pomelo 'Duncan'. **7:** Pomelo 'Foster'. **8:** Pomelo 'Marsh'. **9:** Naranja 'Valencia'. **10:** 'Red Blush'. **11:** 'Red Shambar'. **12:** 'Star Ruby'. **13:** Cidra. **M:** marcador 100 pb (*Ladder* PB-L).

A su vez, en geles de poliacrilamida al 6 % no se logró de manera optima la visualización de todas las bandas generadas (Fig. 18). De esta manera y debido a la escasa resolución de amplicones y la obtención de bandas tenues en la mayoría de los marcadores utilizados, se prefirió abandonar esta técnica ya que para este trabajo resultó insuficiente.

Mediante *Fragment Analyzer* (FA), los amplicones fueron analizados de manera más eficaz que con geles de poliacrilamida y se logró analizar la variabilidad genética entre las muestras estudiadas. Por lo tanto, las mismas muestras se analizaron mediante electroforesis capilar lo cual resultó mas práctico para un gran volumen de muestras y los resultados fueron mucho mas precisos en acunto a la resolución de amplicones (Fig. 19, 20 y 21).

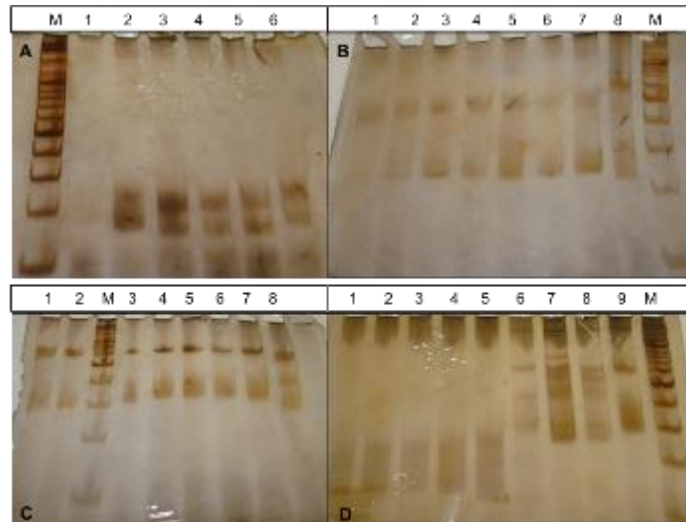


Figura 18. Perfiles electroforéticos SSR de distintas variedades cítricas mediante gel de poliacrilamida 6 %. **A.** PCR cebador **CCSM77**. **Calles:** 1: Control (PCR + agua). 2: Naranja 'Valencia'. 3: 'Oroblanco' (triploide). 4: Pomelo 'Foster'. 5: Pomelo 'Duncan'. 6: Pomelo 'Paraná'. **B.** PCR cebador **CCSM06**. **Calles,** 1 y 2: Pomelo 'Paraná'. 3, 4 y 5: Pomelo 'Duncan'. 6: Pomelo 'Foster'. 7: 'Oroblanco' (triploide). 8: Naranja 'Valencia'. **C.** PCR cebador **CCSM09**. **Calles,** 1 y 2: Pomelo 'Paraná'. 3, 4 y 5: Pomelo 'Duncan'. 6: Pomelo 'Foster'. 7: 'Oroblanco' (triploide). 8: Naranja 'Valencia'. **D.** PCR cebador **CCSM47**. **Calles,** 1: Pomelo 'Paraná'. 2: Pomelo 'Duncan'. 3: Pomelo 'Foster'. 4: 'Oroblanco'. 5: Naranja 'Valencia'. PCR cebador P1826. **Calles,** 6: Pomelo 'Paraná'. 7: Pomelo 'Duncan'. 8: Pomelo 'Foster'. 9: Naranja 'Valencia'. **M:** marcador 100 pb (*Ladder PB-L*).

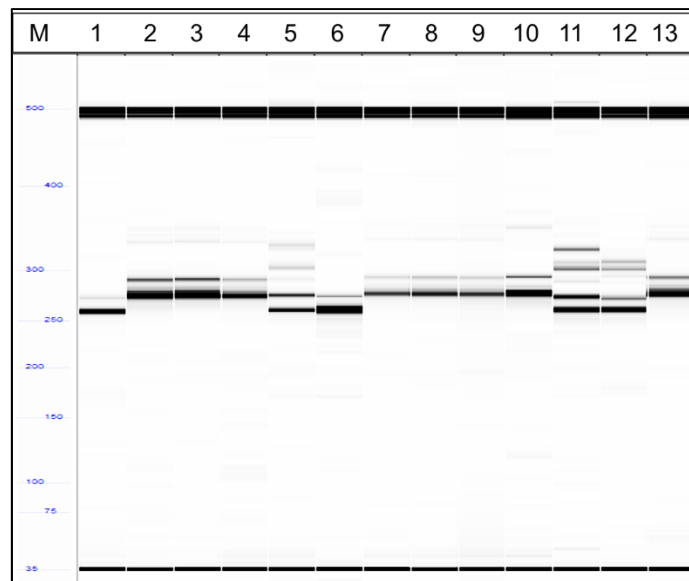


Figura 19. Perfiles electroforéticos del cebador CCSM09 por el sistema *Fragment Analyzer* en distintas variedades cítricas. **Calles**, **1:** Pomelo 'Paraná'. **2:** Pomelo 'Duncan'. **3:** Pomelo 'Foster'. **4:** Pomelo 'Marsh'. **5:** Naranja 'Valencia'. **6:** *C. maxima* (*pummelo* 'Chandler'). **7:** 'Red Blush'. **8:** 'Star Ruby'. **9:** 'Red Shambar'. **10:** 'Oroblanco' (triploide). **11:** Naranja 'Agrio'. **12:** 'Poorman'. **13:** Cidra. **M:** marcador 35-500 pb kit del equipo (AATI *Fragment Analyzer*).

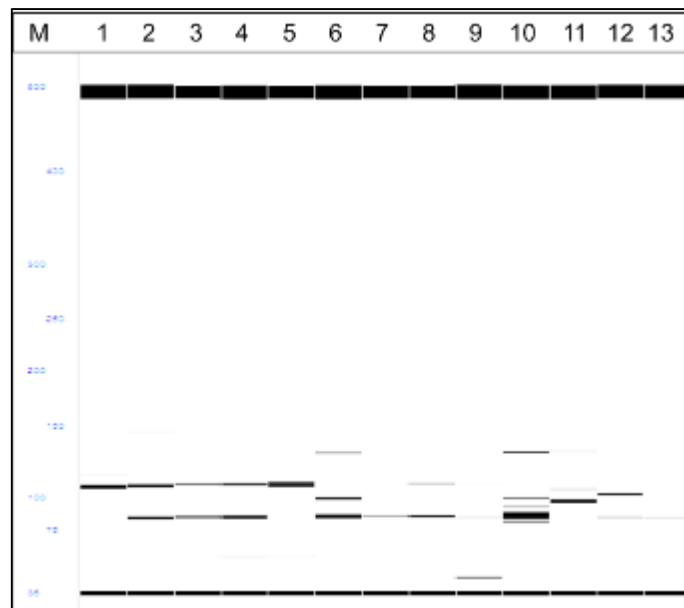


Figura 20. Perfiles electroforéticos del cebador CCSM156 por el sistema *Fragment Analyzer*. **Calles**, **1:** Pomelo ‘Paraná’. **2:** Pomelo ‘Duncan’. **3:** Pomelo ‘Foster’. **4:** Pomelo ‘Marsh’. **5:** Naranja ‘Valencia’. **6:** *C. maxima* (*pummelo* ‘Chandler’). **7:** ‘Red Blush’. **8:** ‘Star Ruby’. **9:** ‘Red Shambar’. **10:** ‘Oroblanco’ (triploide). **11:** Naranja ‘Agrio’. **12:** ‘Poorman’. **13:** Cidra. **M:** Marcador 35- 500 pb kit del equipo (*AATI Fragment Analyzer*).

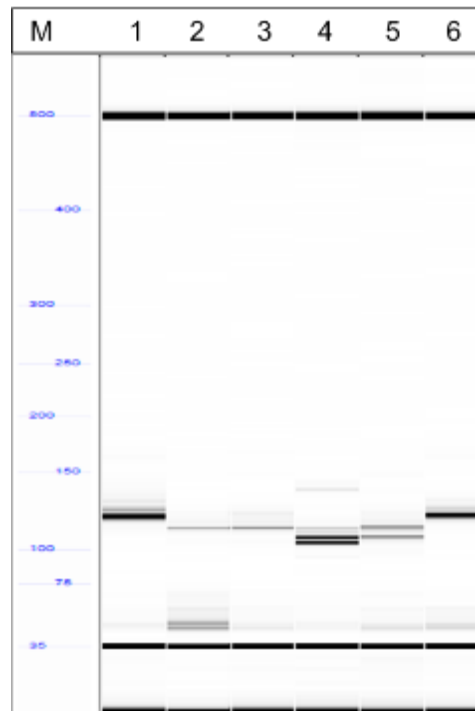


Figura 21. Perfiles electroforéticos del marcador CCSM77 por el sistema *Fragment Analyzer*. Calles, **1:** Pomelo 'Paraná'. **2:** Pomelo 'Duncan'. **3:** Pomelo 'Foster'. **4:** *C. maxima* (*pummelo* 'Chandler'). **5:** 'Oroblanco' (triploide). **6:** Naranja 'Valencia'. **M:** Marcador 35- 500 pb kit del equipo (*AATI Fragment Analyzer*).

Los estadísticos descriptivos calculados para SSR se resumen en la Tabla 13. Se observaron gran cantidad de alelos diferentes (319) esto debido probablemente a la diversidad de cultivares seleccionados para el análisis. El mayor número de alelos diferentes se registró en naranja 'Valencia' (**Na**= 33), pomelo 'Duncan' (**Na**= 32) y pomelo 'Paraná' (**Na**= 31) a diferencia de naranja 'Salustiana' con el menor número de alelos (**Na**= 4).

A su vez, el mayor número de alelos exclusivos fue observado en naranja 'Valencia' (4) y pomelo 'Paraná' (3) (Tabla 14). Sin embargo, no se hallaron alelos exclusivos en las variedades de pomelo 'Duncan', 'Foster', 'Red Shambar' y naranja 'Salustiana'. El porcentaje de loci polimórficos varió entre las muestras, los mayores valores de PLP en general se observaron en variedades de pomelo, entre ellos pomelo 'Duncan' (**PLP**= 60 %) y pomelo 'Paraná' (**PLP**=53,33 %).

La heterocigosis esperada y el índice de diversidad de Shannon resultaron en general muy bajos teniendo en cuenta todas las variedades. No obstante, los valores más altos se obtuvieron en naranja 'Valencia' (**He**=0,218, **Sh**=0,388) a diferencia de naranjo 'Agrio' que obtuvo el valor más bajo (**He**= 0,099).

Tabla 13. Resumen de la diversidad genética del germoplasma cítrico basado en 15 *loci* SSR de 194 muestras. **N**= número de individuos de cada variedad; **Na**= número de alelos diferentes; **PLP**= porcentaje de *loci* polimórficos; **He**= heterocigosis esperada; **Sh**= índice de diversidad de Shannon; **DE**= desvío estándar. **PP**: pomelo 'Paraná', **PD**: pomelo 'Duncan', **PF**: pomelo 'Foster', **PM**: pomelo 'Marsh', **NV**: naranja 'Valencia', **Ch**: *pummelo* 'Chandler', **RB**: 'Red Blush', **SR**: 'Star Ruby', **RS**: 'Red Shambar', **OB**: 'Oroblanco', **NA**: naranja 'Agrida', **POO**: 'Poorman', **Ci**: Cidra, **NS**: naranja 'Salustiana'.

Variedades	N	Na	PLP	He (DE)	Sh (DE)
PP	78	31	53,33 %	0,143 (0,048)	0,259 (0,083)
PD	14	32	60,00 %	0,197 (0,056)	0,355 (0,101)
PF	18	31	46,67 %	0,172 (0,056)	0,317 (0,102)
PM	18	29	46,67 %	0,150 (0,055)	0,274 (0,099)
NV	16	33	46,67%	0,218 (0,068)	0,388 (0,123)
Ch	8	24	40,00 %	0,183 (0,065)	0,301 (0,108)
RB	6	20	40,00 %	0,142 (0,053)	0,229 (0,083)
SR	6	21	40,00 %	0,152 (0,055)	0,250 (0,091)
RS	4	21	33,33 %	0,152 (0,063)	0,262 (0,111)
OB	8	25	46,67 %	0,192 (0,063)	0,334 (0,111)

Tabla 13 (continuación)					
Variedades	N	Na	PLP	He (DE)	Sh (DE)
NA	6	14	20,00 %	0,099 (0,053)	0,138 (0,074)
POO	4	10	20,00 %	0,100 (0,053)	0,139 (0,074)
Ci	4	24	53,33 %	0,200 (0,056)	0,307 (0,084)
NS	4	4	0,00 %	0,000 (0,000)	0,000 (0,000)
Total	194	319			

En la Tabla 14 se detallan los alelos exclusivos de cada variedad y el locus correspondiente. Pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' fueron los que mayor número de alelos exclusivos; mostraron, tres y cuatro alelos, respectivamente. Solamente un alelo exclusivo se observó en pomelo 'Marsh', así como también en *pummelo* 'Chandler', pomelo 'Star Ruby' y 'Poorman'. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con pomelo 'Duncan', 'Foster', 'Red Shambar' y naranja 'Salustiana' en los cuales no fueron hallados alelos exclusivos.

Tabla 14. Alelos exclusivos para cada variedad y la frecuencia con la que fueron hallados. **PP:** pomelo 'Paraná', **PM:** pomelo 'Marsh', **NV:** naranja 'Valencia', **Ch:** *pummelo* 'Chandler', **RB:** 'Red Blush', **SR:** 'Star Ruby', **OB:** 'Oroblanco', **NA:** naranja 'Agrida', **POO:** 'Poorman', **Ci:** Cidra.

Variedades	Locus	Alelo	Frecuencia
PP	P94	2	0,015
	P94	6	0,023
	P1826	1	0,027
PM	CCSM18	4	0,941
NV	CCSM06	1	0,192
	CCSM06	2	0,308
	CCSM06	5	0,308
	CCSM147	4	1,000
Ch	CCSM04	1	0,500
RB	CCSM77	1	0,100
	CCSM77	2	0,100
SR	CCSM77	6	0,250
OB	CCSM77	3	0,125
	CCSM156	5	0,750
NA	CCSM06	4	0,500
	CCSM18	2	0,500
POO	CCSM06	3	0,500
Ci	P73	1	0,125
	P1223	6	0,250

Los productos de amplificación de los marcadores P73, P94, P620, P1826, P1223, CCSM77, CCSM156, CCSM09, CCSM68, permitieron diferenciar pomelo 'Paraná' del resto de las variedades cítricas. A su vez, los marcadores P1826, P1223, CCSM156, CCSM09, CCSM147, CCSM68 revelaron un patrón de bandas similares en pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia'. Asimismo, los marcadores CCSM06 y CCSM77 permitieron diferenciar específicamente naranja 'Valencia' del resto. Sin embargo, los marcadores CCSM17, CCSM18, CCSM04 y CCSM111 resultaron monomórficos para las variedades analizadas.

Mediante los productos de amplificación del marcador CCSM09, se pudo observar el patrón de bandas que permitió diferenciar pomelo 'Paraná' del resto de las variedades de pomelo. Mientras que las variedades de naranja 'Valencia' y 'Agrio' presentaron el mismo patrón de bandas con este marcador (Fig. 19). Además, el marcador CCSM156 permitió diferenciar pomelo 'Paraná' del resto de las variedades de pomelo, además se observó cierta similitud en el patrón de bandas de pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' (Fig. 20).

En la figura 21 los productos de amplificación del marcador CCSM77, evidenciaron claramente la similitud de pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' entre las variedades más representativas del germoplasma cítrico (pomelo 'Paraná', 'Duncan', 'Foster', 'Chandler', 'Oroblanco', naranja 'Valencia') las cuales fueron sembradas una muestra por cada variedad.

Estructuración de la Variabilidad Genética

Todos los cálculos y estadísticos utilizados para el análisis de la estructuración de la variabilidad genética se realizaron a partir del análisis de los marcadores SSR.

Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA)

El análisis de la varianza molecular demostró que el mayor porcentaje de variación se da entre variedades (63 %), es decir los cultivares son genéticamente diferentes entre sí. Y los resultados fueron estadísticamente significativos (Tabla 15). A su vez, el análisis de estructuración genética reveló que el mayor grado de división se da entre cultivares ($\Phi_{ST} = 0,631$).

Tabla 15. Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) basado en datos de SSR de las variedades cítricas estudiadas. **g.l.** = grados de libertad.

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre variedades	13	1651,331	10,128	63 %
Intravarietal	180	1068,097	5,934	37 %
Total	193	2719,428	16,062	100 %
Índice de fijación $\Phi_{ST} = 0,631$ *				

*Significativo P ($\geq 0,001$)

Distancias y Similitudes Genéticas de Nei

A partir de los valores de distancias genéticas entre las variedades cítricas, se logró establecer que pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' fueron los menos distantes (0,239). Así como también, entre pomelo 'Paraná' y *C. maxima* (pummelo 'Chandler') el valor de distancia genética fue bajo (0,319). A su vez, las variedades más distantes fueron pomelo 'Paraná' y naranja 'Salustiana' (1,666) y pomelo 'Paraná' y 'Poorman' (1,020). Los valores de las similitudes genéticas indicaron que el pomelo 'Paraná' posee mayor similitud con naranja 'Valencia' (0,788) y *C. maxima* (pummelo 'Chandler') (0,727). Sin embargo, la menor similitud se dio entre pomelo 'Paraná' y la variedad naranja 'Salustiana' (0,189). Los valores se resumen en la matriz de la Tabla 16.

Cuando se analizaron las distancias y similitudes genéticas exclusivamente de pomelo 'Paraná', agrupados según el portainjerto utilizado ('Rangpur', tangelo 'Orlando', 'Citrumelo' y 'Duncan') se pudo observar que todos los grupos mostraron valores muy elevados de identidad (todos los valores cercanos a 1). En cambio, los valores de distancias genéticas fueron muy bajos (con valores cercanos a 0), siendo los más distantes, pomelo 'Paraná' sobre el portainjerto tangelo 'Orlando' y 'Paraná' sobre el portainjerto 'Duncan' con 0,013 de distancia de Nei (Tabla 17).

F de Wright (Fst) y PhiPT

Las variedades cítricas con menor distancia genética entre sí fueron pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' (*Fst* 0,233 y *PhiPT* 0,394). Todos los valores de *Fst* y *PhiPT* se detallan en Tabla 18 y 19. Asimismo, las distancias genéticas entre pomelo 'Paraná' y *C. máxima* también fueron menores (*Fst* 0,311 y *PhiPT* 0,490). Sin embargo, pomelo 'Paraná' y naranja 'Salustiana' fueron los que mayor distancia

genética registraron en éste análisis (F_{st} 0,837 y $PhiPT$ 0,771). Todos los valores obtuvieron un alto nivel de significancia ($P < 0,05$).

Tabla 16. Matriz de distancias e identidades genéticas de Nei entre las variedades cítricas. Por encima de la diagonal se detallan los valores de distancias genéticas, debajo de la diagonal se encuentran las identidades o similitudes genéticas. Los valores de distancias genéticas indican que cuanto más cercano a cero (0) son menos distantes. Se resaltan los valores menos distantes (0,239; 0,319) y los más distantes (1,020; 1,666). En similitud genética, los valores cercanos a uno (1) son más similares genéticamente. Los valores resaltados (0,788; 0,727) indican aquellos más similares genéticamente y los de menor similitud (0,189). **PP:** pomelo ‘Paraná’, **PD:** pomelo ‘Duncan’, **PF:** pomelo ‘Foster’, **PM:** pomelo ‘Marsh’, **NV:** naranja ‘Valencia’, **Ch:** pummelo ‘Chandler’, **RB:** ‘Red Blush’, **SR:** ‘Star Ruby’, **RS:** ‘Red Shambar’, **OB:** ‘Oroblanco’, **NA:** naranjo ‘Agrio’, **POO:** ‘Poorman’, **Ci:** Cidra, **NS:** naranja ‘Salustiana’.

PP	PD	PF	PM	NV	Ch	RB	SR	RSH	OB	NA	POO	Ci	NS	
	0,583	0,496	0,795	0,239	0,319	0,884	0,789	0,879	0,686	0,827	1,020	0,601	1,666	PP
0,558		0,042	0,106	0,591	0,274	0,208	0,183	0,240	0,591	0,931	1,106	0,447	1,019	PD
0,609	0,959		0,164	0,512	0,271	0,241	0,206	0,254	0,513	0,968	1,247	0,428	1,025	PF
0,452	0,900	0,848		0,821	0,440	0,230	0,219	0,248	0,737	1,255	1,220	0,655	1,259	PM
0,788	0,554	0,599	0,440		0,361	0,654	0,590	0,687	0,516	0,700	1,253	0,693	0,935	NV
0,727	0,760	0,763	0,644	0,697		0,399	0,391	0,432	0,454	0,563	0,743	0,547	0,827	Ch
0,413	0,812	0,786	0,794	0,520	0,671		0,015	0,042	0,463	1,004	0,924	0,409	0,857	RB
0,455	0,832	0,814	0,803	0,554	0,676	0,985		0,052	0,436	1,035	0,993	0,428	0,881	SR
0,415	0,787	0,776	0,780	0,503	0,649	0,959	0,949		0,467	0,953	0,912	0,396	0,865	RSH
0,504	0,554	0,599	0,479	0,597	0,635	0,629	0,647	0,627		0,500	0,809	0,447	0,765	OB
0,438	0,394	0,380	0,285	0,497	0,569	0,366	0,355	0,386	0,606		0,532	0,450	0,543	NA
0,361	0,331	0,287	0,295	0,286	0,476	0,397	0,370	0,402	0,446	0,588		0,842	0,852	POO
0,549	0,639	0,652	0,519	0,500	0,578	0,664	0,652	0,673	0,640	0,638	0,431		0,924	Ci
0,189	0,361	0,359	0,284	0,393	0,437	0,424	0,414	0,421	0,466	0,581	0,426	0,397		NS

Tabla 17. Matriz de distancias e identidades genéticas de Nei de pomelo ‘Paraná’ sobre los cuatro portainjertos utilizados. Por encima de la diagonal se detallan los valores de distancias genéticas, debajo de la diagonal se encuentran las identidades o similitudes genéticas. Los valores de distancias genéticas indican que cuanto más cercano a 0 menos distantes son los grupos. En similitud, los valores cercanos a 1 son más similares genéticamente. **PPLCh/R:** pomelo ‘Paraná’ sobre el portainjerto ‘Rangpur’, **PPLCh/TO:** pomelo ‘Paraná’ sobre tangelo ‘Orlando’, **PPLCh/C:** pomelo ‘Paraná’ sobre ‘Citrumelo’, **PPLCh/D:** pomelo ‘Paraná’ sobre ‘Duncan’.

PPLCh/R	PPLCh/TO	PPLCh/C	PPLCh/D	
	0,003	0,007	0,008	PPLCh/R
0,997		0,007	0,013	PPLCh/TO
0,993	0,993		0,005	PPLCh/C
0,992	0,987	0,995		PPLCh/D

Tabla 18. Valores de *Fst* para las variedades cítricas analizadas. Valores cercanos a 1 indican mayor distancia genética entre lo que se compara. Se resaltan los valores de menor distancia genética (0,233, 0,311) y el mayor valor obtenido (0,837). **PP:** pomelo ‘Paraná’, **PD:** pomelo ‘Duncan’, **PF:** pomelo ‘Foster’, **PM:** pomelo ‘Marsh’, **NV:** naranja ‘Valencia’, **Ch:** *pummelo* ‘Chandler’, **RB:** ‘Red Blush’, **SR:** ‘Star Ruby’, **RS:** ‘Red Shambar’, **OB:** ‘Oroblanco’, **NA:** naranjo ‘Agrio’, **POO:** ‘Poorman’, **Ci:** Cidra, **NS:** naranja ‘Salustiana’.

PP	PD	PF	PM	NV	Ch	RB	SR	RSH	OB	NA	POO	Ci	NS	
0,000														PP
0,422	0,000													PD
0,407	0,063	0,000												PF
0,532	0,139	0,243	0,000											PM
0,233	0,398	0,404	0,542	0,000										NV
0,311	0,266	0,269	0,458	0,3642	0,000									Ch
0,618	0,358	0,394	0,424	0,542	0,497	0,000								RB
0,583	0,337	0,369	0,419	0,512	0,494	0,353	0,000							SR
0,615	0,404	0,433	0,483	0,557	0,563	0,379	0,388	0,000						RSH
0,522	0,474	0,487	0,584	0,465	0,487	0,532	0,518	0,534	0,000					OB
0,660	0,662	0,677	0,744	0,611	0,586	0,697	0,705	0,730	0,606	0,000				NA
0,735	0,715	0,744	0,760	0,727	0,697	0,700	0,710	0,738	0,696	0,771	0,000			POO
0,443	0,386	0,375	0,515	0,459	0,432	0,445	0,453	0,469	0,446	0,587	0,705	0,000		Ci
0,837	0,831	0,786	0,891	0,764	0,811	0,859	0,861	0,860	0,771	0,891	0,884	0,820	0,000	NS

Tabla 19. Valores de *PhiPT* y el nivel de significancia entre las variedades analizadas. Debajo de la diagonal los valores de *PhiPT* cercanos a 0 indican cultivares con menor distancias genéticas. La significancia se observa por encima de la diagonal, la cual indica que todos los valores fueron significativos ($P < 0,05$). Se resaltan en la tabla los valores que representan menor distancia genética (0,394, 0,490) y el valor más distante (0,771). **PP:** pomelo ‘Paraná’, **PD:** pomelo ‘Duncan’, **PF:** pomelo ‘Foster’, **PM:** pomelo ‘Marsh’, **NV:** naranja ‘Valencia’, **Ch:** *pummelo* ‘Chandler’, **RB:** ‘Red Blush’, **SR:** ‘Star Ruby’, **RS:** ‘Red Shambar’, **OB:** ‘Oroblanco’, **NA:** ‘naranja Agrio’, **POO:** ‘Poorman’, **Ci:** Cidra, **NS:** naranja ‘Salustiana’.

PPLCh	PD	PF	PM	NV	Ch	RB	SR	RSH	Ob	NA	POO	Ci	NS		
0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	PPLCh
0,607	0,000	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	PD
0,565	0,107	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	PF
0,654	0,307	0,343	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	PM
0,394	0,584	0,515	0,625	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	NV
0,490	0,498	0,432	0,591	0,482	0,000	0,001	0,001	0,001	0,005	0,001	0,001	0,002	0,003	0,006	Ch
0,686	0,583	0,501	0,518	0,600	0,637	0,000	0,410	0,383	0,001	0,003	0,002	0,007	0,003	0,003	RB
0,675	0,566	0,474	0,507	0,573	0,621	0,000	0,000	0,309	0,002	0,002	0,006	0,003	0,003	0,006	SR
0,688	0,615	0,521	0,535	0,596	0,671	0,024	0,039	0,000	0,001	0,003	0,043	0,045	0,025	0,025	RSH
0,659	0,707	0,612	0,689	0,581	0,663	0,521	0,495	0,529	0,000	0,002	0,001	0,004	0,005	0,005	Ob
0,705	0,816	0,748	0,801	0,673	0,826	0,849	0,813	0,872	0,815	0,000	0,002	0,008	0,003	0,003	NA
0,730	0,823	0,754	0,784	0,715	0,832	0,740	0,690	0,773	0,772	0,990	0,000	0,018	0,001	0,001	POO
0,601	0,621	0,536	0,664	0,577	0,698	0,640	0,614	0,654	0,695	0,896	0,916	0,000	0,037	0,037	Ci
0,771	0,836	0,761	0,799	0,717	0,857	0,767	0,695	0,775	0,802	0,992	1,000	0,927	0,000	0,000	NS

Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

El análisis de Coordenadas Principales (PCoA) se basó en las distancias genéticas. En primer lugar, se utilizaron las variedades cítricas estudiadas para observar las relaciones entre ellas. Este análisis reveló que las dos primeras coordenadas explican un 42,67 % de la variación total (Tabla 20). El gráfico resultante del análisis se muestra en la Figura 22, en el mismo se pudo observar el agrupamiento de las variedades, donde principalmente se destacan pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' muy cercanas. A su vez, *C. maxima* (pummelo 'Chandler') muy próximo a estas últimas. Esto explica el grado de relación y posiblemente parentesco entre los cultivares mencionados.

Luego, se analizaron únicamente las muestras de pomelo 'Paraná' teniendo en cuenta los portainjertos donde fueron implantados. En cuanto al agrupamiento resultante de este análisis, el único que se distinguió del resto es pomelo 'Paraná' sobre 'Rangpur' (PPLCh/R). Sin embargo, solamente fueron 2 muestras, las cuales tampoco se agruparon juntas. El resto de las muestras no se agrupó siguiendo un orden aparente (Figura 23). En cambio, cuando se realizó el análisis de coordenadas entre portainjertos, sin distinguir las muestras, los portainjertos sí quedaron separados, pero mostraron valores muy bajos de distancia genética (Figura 24).

Tabla 20. Resultados del análisis de coordenadas principales de las 14 variedades de *Citrus*. El análisis se basó en los patrones de 15 *loci* SSR de 194 muestras.

Coordenadas	1	2
Porcentaje	28,18 %	14,49 %
Porcentaje Acumulado	28,18 %	42,67 %

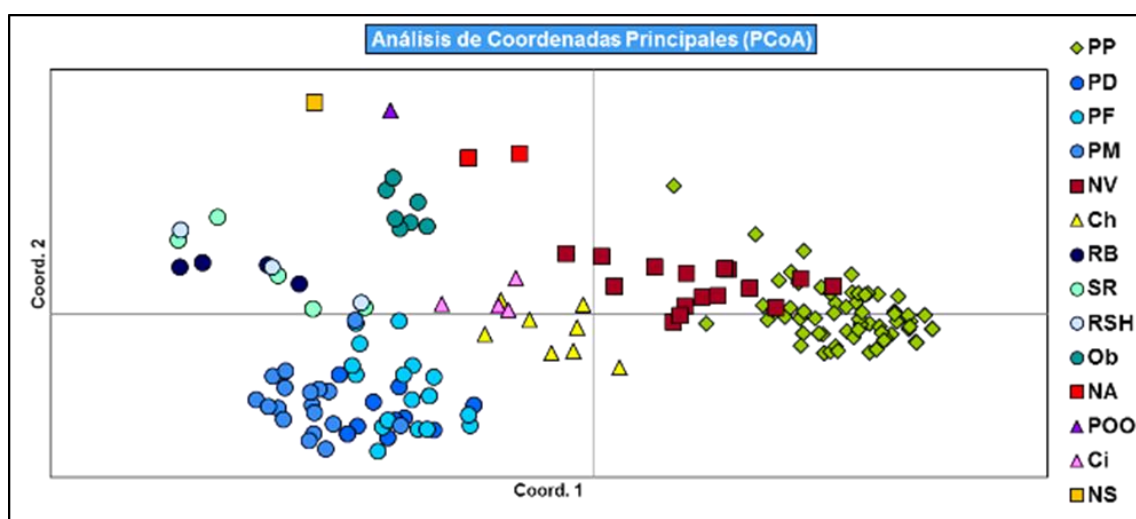


Figura 22. Gráfico resultante del análisis de coordenadas principales (PCoA) obtenido a partir de los patrones de marcadores SSR de las variedades cítricas. Se destacan las muestras de pomelo 'Paraná' agrupados muy cercanamente junto a naranja 'Valencia' y pummelo 'Chandler' (*C. maxima*). **PP:** pomelo 'Paraná', **PD:** pomelo 'Duncan', **PF:** pomelo 'Foster', **PM:** pomelo 'Marsh', **NV:** naranja 'Valencia', **Ch:** pummelo 'Chandler', **RB:** 'Red Blush', **SR:** 'Star Ruby', **RS:** 'Red Shambar', **OB:** 'Oroblanco', **NA:** naranjo 'Agrio', **POO:** 'Poorman', **Ci:** Cidra, **NS:** naranja 'Salustiana'.

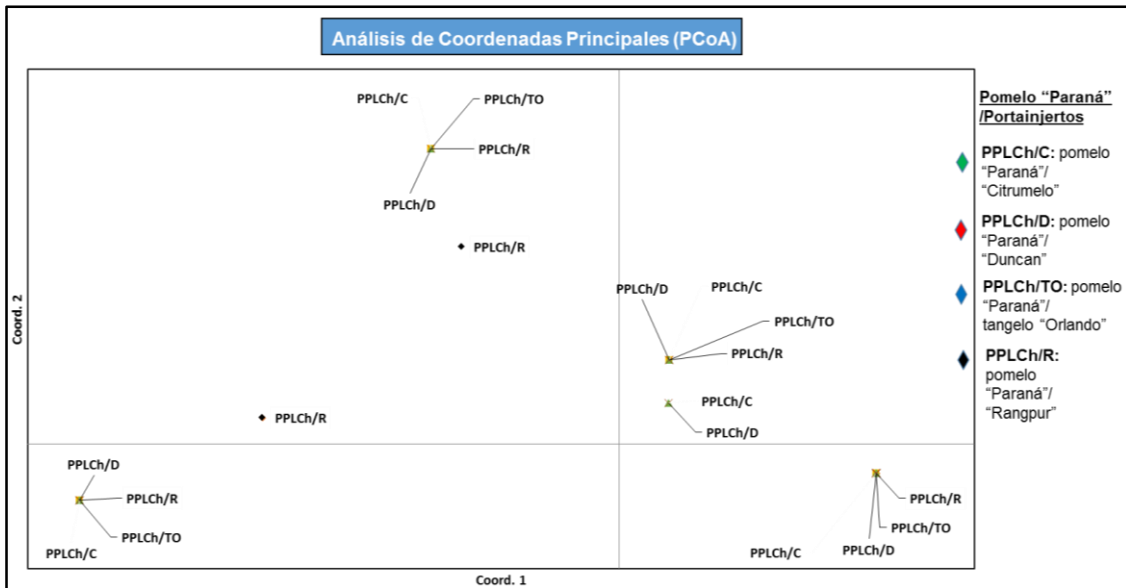


Figura 23. Gráfico resultante del análisis de coordenadas principales (PCoA) de pomelo 'Paraná' considerando cada muestra según el portainjerto utilizado. Se observa que las muestras no se agruparon siguiendo un orden específico, y los portainjertos no influyeron en el agrupamiento. Las únicas muestras que se apartan claramente corresponden a pomelo 'Paraná' sobre el portainjerto 'Rangpur', sin embargo, solamente son dos muestras. **PPLCh/R:** pomelo 'Paraná' sobre el portainjerto 'Rangpur', **PPLCh/TO:** pomelo 'Paraná' sobre tangelo 'Orlando', **PPLCh/C:** pomelo 'Paraná' sobre 'Citrumelo', **PPLCh/D:** pomelo 'Paraná' sobre 'Duncan'.

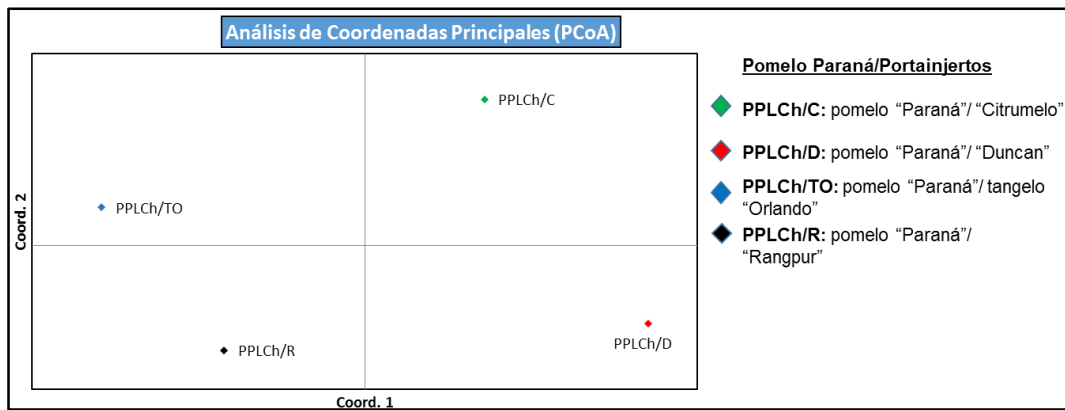
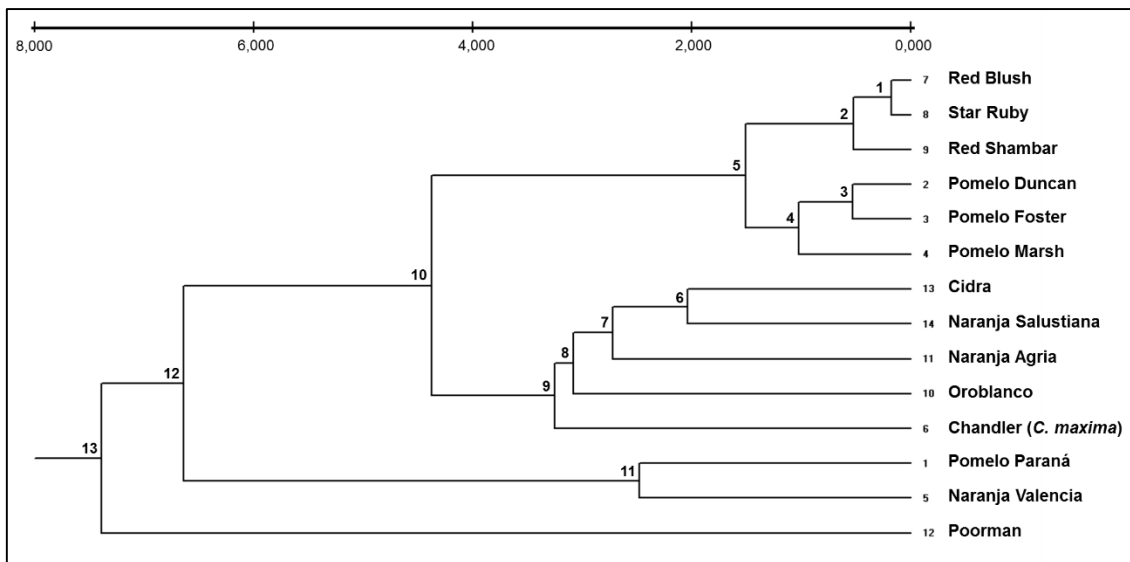


Figura 24. Gráfico resultante del análisis de coordenadas principales (PCoA) donde se consideraron los portainjertos para el agrupamiento. Se observa que los cuatro portainjertos utilizados se agruparon por separado. **PPLCh/R:** pomelo 'Paraná' sobre el portainjerto 'Rangpur', **PPLCh/TO:** pomelo 'Paraná' sobre tangelo 'Orlando', **PPLCh/C:** pomelo 'Paraná' sobre 'Citrumelo', **PPLCh/D:** pomelo 'Paraná' sobre 'Duncan'.

Método de Agrupamiento de a Pares no Ponderados Usando Medias Aritméticas (UPGMA)

Mediante UPGMA se obtuvo el dendograma que representa las agrupaciones formadas entre las 14 variedades cítricas analizadas. Se pudo determinar que 'Poorman' se separa de las 13 variedades restantes, en un nodo aparte. A su vez, las variedades de pomelo establecieron un grupo donde claramente los pomelos "pigmentados" ('Red Blush', 'Star Ruby' y 'Red Shambar') se separan del resto de los pomelos ('Duncan', 'Foster' y 'Marsh'). Sin embargo, pomelo 'Paraná' constituyó un grupo junto a naranja 'Valencia', es decir no se incluyó dentro del grupo formado por los otros pomelos. Por último, se observó el agrupamiento entre las variedades cidra, naranja 'Salustiana', naranja 'Agria', 'Oroblanco' y 'Chandler'. (Figura 25).

Además, se observó el porcentaje de soporte para cada nodo del dendograma. En general variaron los porcentajes, sin embargo, uno de los mayores porcentajes se observó en el nodo 11, con el agrupamiento que incluyó a pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia', con un 75 % de soporte.



Nodos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
% Soporte de cada nodo	86	78	68	64	37	13	12	6	2	23	75	16	100

Figura 25. Dendrograma que representa las relaciones entre las 14 variedades cítricas. El dendrograma se basó en el análisis de cluster con UPGMA utilizando la matriz de similaridad derivada de 15 *loci* microsatélites. En la figura también se representa el soporte de cada nodo expresado en porcentajes.

DISCUSIÓN

El estudio de la diversidad genética en cultivos es fundamental para comprender la evolución y estabilidad de los agroecosistemas. Al igual que muchas especies del género *Citrus* diversas variedades de pomelo se cultivan a nivel mundial. En la región del NEA nunca se perdió el interés por este tipo de fruta y a escala mundial fueron muy bien valoradas y constantemente se evalúan, ya sea por sus características agronómicas, su potencialidad en la resistencia a enfermedades tan devastadoras como el “greening” (HLB) y/o sus particularidades fitoterapéuticas, tanto como a nivel productivo.

Mediante RAPD y microsatélites se analizó la variedad cítrica pomelo ‘Paraná’ en perspectiva de estudios futuros para mejoramiento cítrico. El análisis de marcadores moleculares RAPD reveló que el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosis esperada promedio fueron elevados en las muestras de pomelo ‘Paraná’ seleccionadas para dicho análisis. Sin embargo, no se detectaron bandas exclusivas mediante RAPD. Asimismo, el Índice de diversidad para el mismo también resultó elevado, pero no significativamente. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Chacoff *et al.*, 2009 quienes estudiaron marcadores moleculares isoenzimáticos y encontraron que la variación genética observada dentro de las plantaciones de pomelo fue alta, a pesar de representar cultivares propagados clonalmente. De igual manera, estos autores hallaron altos niveles de polimorfismo en plantaciones de pomelo del noroeste argentino.

Algunos autores destacaron la potencialidad de los RAPD para determinar el nivel y distribución de la diversidad genética de una colección de germoplasma cítrico y para evaluar las relaciones entre especies relacionadas. Así, al igual que en el

presente trabajo, las relaciones entre las especies cítricas y variantes híbridas fueron analizados utilizando marcadores RAPD por Ciampi *et al.*, 2013. Los resultados arrojaron altos niveles de polimorfismo, al igual que Pal *et al.*, 2013, quienes estudiaron RAPD y SSR en mandarinas. Esto concuerda con lo observado en este trabajo, donde se obtuvieron altos porcentajes de loci polimórficos y la heterocigosis esperada promedio fueron elevados. Asimismo, la variabilidad genética de distintas variedades de pomelo (*C. paradisi*) y de *pummelos* (*C. maxima*) mediante RAPD y SSR fueron evaluados por Corazza-Nunes *et al.*, 2002. Estos autores observaron altos niveles de polimorfismo en los tres *pummelos* y en el material original de pomelo 'Paraná'. Las similitudes genéticas analizadas entre accesiones de pomelo se basaron en la presencia/ausencia de bandas RAPD como así también presencia/ausencia de alelos para SSR, de la misma forma que en el presente estudio. El alto nivel de polimorfismo en las variedades de pomelo y *pummelo* analizados por aquellos autores coincide con lo observado en esta tesis, donde los mayores porcentajes de loci polimórficos se encontraron en variantes de pomelo ('Duncan' y 'Paraná') analizados con SSR. Por otra parte, Pal *et al.*, 2013 realizaron estudios similares en mandarinas y al igual que aquellos autores obtuvieron un porcentaje de loci polimórficos elevado y realizaron agrupamientos entre accesiones relacionadas. Ellos concluyeron que los SSR son más informativos que los RAPD y pueden ser utilizados para evaluar especies y géneros relacionados. Por otra parte, los trabajos de Ibáñez, 2012 indicaron que el polimorfismo de nucleótidos simples (SNP) podrían ser una herramienta válida en la identificación y clasificación de variedades cítricas comerciales, sobre todo teniendo en cuenta la dificultad en el análisis de material originadas por mutaciones naturales o inducidas, como el caso de cultivares de pomelo.

Mediante SSR, pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' mostraron el mayor número de alelos exclusivos. Sin embargo, el porcentaje de loci polimórficos varió entre las

muestras, los mayores valores de PLP (porcentaje de loci polimórficos) en general se observaron en variedades de pomelo, entre ellos pomelo 'Duncan' y pomelo 'Paraná'. A su vez, la heterocigosis esperada y el índice de diversidad resultaron mayores en naranja 'Valencia'. Lo que no fue consistente con la baja frecuencia de polimorfismo hallado por Corazza-Nunes *et al.*, 2002 para SSR analizados en naranja dulce y prácticamente sin frecuencia de alelos específicos. Esto al igual que los bajos niveles de polimorfismo que fueron observados al analizar variedades de naranja dulce con SSR por Novelli *et al.*, 1999. Uzun *et al.*, 2010 utilizaron marcadores SSR para distinguir pomelo (*Citrus paradisi*), pummelo (*C. maxima*) y especies relacionadas. El bajo nivel de polimorfismo que éstos autores observaron en la mayoría de los pomelos, no concuerda con lo hallado en este estudio. El bajo nivel de variación en los pomelos era debido probablemente a su origen por mutación. Asimismo, Fang y Roose, 1997 obtuvieron niveles de polimorfismo bajo en pomelos, a partir de marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), lo que fue consistente con estudios previos basados en isoenzimas (Roose, 1988). Además, propusieron que todos los pomelos derivaron del mismo árbol ancestral por mutación (Fang y Roose, 1997). Los estudios de Corazza-Nunes *et al.*, 2002, sugirieron que las variedades de pomelo estudiadas representaban diferentes variedades originadas a partir de variaciones fenotípicas que no fueron identificadas con los marcadores moleculares neutros utilizados. Sin embargo, el análisis de la variabilidad genética intravarietal de citrus mediante SSR en esta tesis, reveló que todos los índices de diversidad resultaron elevados excepto en una variedad de naranja (naranja 'Salustiana'). Esta muestra incluyó pocos individuos, además puede ser el resultado de propagación clonal, lo que explicaría el motivo por el cual el valor de diversidad para este material resultó nulo.

Luro *et al.*, 2000 concluyeron que los microsatélites neutros no eran marcadores suficientes para distinguir entre especies derivadas por mutación como en naranja

dulce y agrio. Gulsen y Roose, 2001 encontraron resultados similares en limones (*C. limon*) basados en datos de isoenzimas, ISSR y SSR. Sin embargo, algunos de los cebadores microsatélites utilizados en el presente estudio, CCSM13, CCSM17, CCSM18 y CCSM147, también fueron analizados en trabajos previos de Novelli *et al.*, 2006 para la caracterización de *C. sinensis*. Estos autores destacaron la potencialidad de los marcadores microsatélites para distinguir entre cultivares más conocidos y la utilidad en la certificación de variedades e identificación de plantas cigóticas. En esta tesis, los loci CCSM04 y CCSM06 fueron los más eficientes para la identificación de los híbridos seleccionados. Asimismo, los loci P1826, P1223, CCSM156, CCSM09, CCSM147, CCSM68 mostraron un patrón de bandas similares en pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia'. A su vez, CCSM06 y CCSM77 permitieron distinguir naranja 'Valencia' del resto de material cítrico. Sin embargo, no se hallaron diferencias en los productos de amplificación de CCSM17, CCSM18 y CCSM111.

El análisis de la estructuración genética de germoplasma cítrico en el presente trabajo, indicó que el mayor grado de división se da entre variedades. Asimismo, en el análisis de la varianza molecular (AMOVA) las variedades resultaron genéticamente diferentes entre sí y los resultados fueron estadísticamente significativos. Las variedades con mayor distancia genética fueron pomelo 'Paraná' y naranja 'Salustiana' (1,666) además de pomelo 'Paraná' y 'Poorman' (1.020). A su vez, los índices *Fst* y *PhiPT* indicaron menor distancia genética entre pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' (*Fst* 0,233 y *PhiPT* 0,394) como así también, las distancias genéticas entre pomelo 'Paraná' y *C. máxima* también fueron mínimas (*Fst* 0,311 y *PhiPT* 0,490). Esto sugiere cierto grado de parentesco entre pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia', como así también pomelo 'Paraná' y *pummelo* (*C. maxima*) es decir, están mucho más relacionados genéticamente estos materiales que cualquier otro. Esto corresponde con lo observado por Scora *et al.*, 1982 y Yamamoto *et al.*, 1993 quienes hallaron estrechas relaciones filogenéticas entre pomelos y su parental masculino, naranja

dulce. En el presente trabajo, a pesar de los altos niveles de polimorfismo encontrados en general en variedades de pomelo, los índices de fijación (F_{st}) indican una deficiencia de heterocigosis en muchos loci. Esto puede estar relacionado con el proceso de mejoramiento durante la selección de plantas heterocigotas. Así, estas plantas fueron mantenidas y perpetuadas como tales por clonación, debido a que por vía sexual segregaban, perdiendo las características deseables.

En el análisis de coordenadas principales se destacó principalmente el agrupamiento entre pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia'. Asimismo, *C. maxima* (*pummelo* 'Chandler') y pomelo 'Paraná' con naranja 'Valencia' muy cercanos. En Corazza-Nunes *et al.*, 2002 las accesiones de pomelo estudiadas quedaron conformadas en un grupo, mientras los *pummelos* fueron separados en otro. Por otra parte, pomelo 'Paraná' estaba claramente en un grupo separado del resto de los pomelos, al igual que en lo observado en esta tesis. En el análisis de UPGMA se observó una clara separación del pomelo híbrido ('Poorman') del resto de las variedades. A su vez, en un nodo fueron agrupados pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia', donde específicamente pomelo 'Paraná' se diferenció del resto de las variedades de pomelos utilizados en este trabajo. Uzun *et al.*, 2010 observaron que la mayor parte de los marcadores analizados eran polimórficos y el análisis de UPGMA demostró que las accesiones tenían un alto rango de similitud. Estos autores pudieron distinguir todos los *pummelos*, mientras que algunas accesiones de pomelo no estaban claramente separadas, debido presumiblemente a su origen por mutaciones puntuales no detectables con marcadores moleculares de tipo neutro. Las accesiones de naranjo trifolio en estudios previos de Fang *et al.*, 1997 fueron agrupadas en base al análisis de conglomerados UPGMA y el dendrograma resultante incluyó cuatro grupos principales. En base a los resultados obtenidos llegaron a la conclusión que los marcadores SSR eran los más eficaces para describir la estructuración genética de grupos cítricos estrechamente relacionadas. Del mismo modo, Novelli *et al.*, 2006, en

base a la similitud genética obtenida por UPGMA, pudieron establecer las relaciones y el posible origen mediante mutaciones de las accesiones de naranja dulce estudiadas. Sin embargo, el análisis de UPGMA realizado con marcadores RAPD en germoplasma cítrico, demostró que el material también podía ser clasificado y la distribución de la diversidad genética analizada mediante éste tipo de marcador (Ciampi *et al.*, 2013). Las similitudes genéticas de cultivares de mandarinas también fueron analizadas mediante marcadores RAPD y SSR. La diferenciación genética y las relaciones entre aquellos cultivares se realizó mediante UPGMA, mostrando tanto la eficiencia de los marcadores moleculares utilizados para detectar polimorfismo, como así también el nivel de diversidad genética dentro del grupo. El nivel de diversidad hallado fue moderado lo que atribuyeron al libre intercambio genético dentro del grupo de mandarinas, así como especies estrechamente relacionadas (Pal *et al.*, 2013).

Al igual que en otros estudios, en el presente trabajo los caracteres morfológicos distintivos (como la pigmentación de frutos y número de semillas o ausencia de ellas) que permitieron diferenciar agronómicamente las variedades 'Marsh', 'Foster', 'Duncan', 'Red Blush', 'Red Shambar' y 'Star Ruby', no coinciden con la similitud genética entre estas variantes de pomelo. Esto, además coincide con trabajos previos de Corazza-Nunes *et al.*, 2002 y Sharma *et al.*, 2015. A su vez, la diversidad de caracteres agronómicos contrasta con la menor variabilidad genética hallada en citrus cultivados mediante marcadores moleculares (Sharma *et al.*, 2015). Además, los estudios de la diversidad genética en cultivares de *Citrus paradisi* Macf (pomelo) y *Citrus maxima* (Burm.) Merr. (*pummelo*) demostraron claramente la distinción entre los grupos de este último. Sin embargo, esa distinción no pudo establecerse entre los grupos de pomelo analizados. Esto sugiere que el origen por mutaciones es la vía más probable en el surgimiento de cultivares de pomelo (Unzun *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2015).

En trabajos previos, fue posible distinguir y separar todas las variedades de pomelo (*C. paradisi*) y de pummelos (*C. maxima*) mediante los marcadores SSR (Uzun *et al* 2011; Uzun y Yesiloglu, 2012) al igual que en este análisis. A su vez, en este trabajo se logró distinguir pomelo 'Paraná' como una variante distinta, separada de otras variedades de pomelo. Se determinó que existieron más afinidades genéticas que permitieron, por un lado, el agrupamiento entre las variedades 'Duncan', 'Foster' y 'Marsh', y por otro lado el agrupamiento entre 'Red Blush', 'Star Ruby' y 'Red Shambar'. Además, 'Poorman' quedó separado de los cultivares restantes, lo que evidencia la escasa afinidad o similitudes genéticas entre estas variedades. Esta distinción, presumiblemente ocurre por tratarse pomelo 'Paraná' de un híbrido independiente. Las variaciones genéticas halladas entre pomelos fueron mínimas y podrían deberse a mutaciones o cambios epigenéticos que dieron origen a tales variaciones. Esto concuerda con Uzun *et al.*, 2010 y Sharma *et al.*, 2015 que detectaron un bajo nivel de polimorfismo en pomelos y en algunos casos resultaron idénticos. Además, en Uzun *et al.*, 2010, algunos cultivares con caracteres morfológicos distintivos (como pigmentación y frutos sin semillas) mostraron completa similitud genética (variedades 'Duncan', 'Star Ruby' y 'Henderson').

Si bien la variabilidad genética observada entre las especies de *Citrus* fue diversa, la variabilidad dentro de cada variedad fue en general escasa. Esto no resulta extraño ya que todos los genotipos están estrechamente emparentados. La baja variabilidad en los cultivos de pomelo se atribuye al método de selección de las variaciones fenotípicas durante el mejoramiento, las cuales pueden tener una base genética estrecha y no estar representadas por marcadores moleculares neutros como los que se usaron en este estudio. Así, las yemas se reproducen clonalmente lo que evita recurrir a la línea germinal. Sin embargo, los altos niveles de variación genética que se observaron entre pomelo 'Paraná' y 'Duncan' en este estudio, pueden atribuirse a procesos de hibridaciones independientes que involucraron progenitores de distinto

origen. La diversidad genética hallada en *Citrus* es considerada como resultado de muchos factores tales como hibridaciones, mutación y perpetuación de heterocigotas con interacciones epistáticas mediante el tipo de reproducción (principalmente apomíctica). A su vez, la comprensión de la diversidad genética en los cítricos es esencial para la planificación y aplicación de programas de mejoramiento genético, el establecimiento de recolección de germoplasma y la realización de estudios moleculares (Ibañez *et al.*, 2012; Uzun y Yesiloglu 2012; Sharma *et al.*, 2015; Pinar *et al.*, 2017). Es posible que aquellas características fenotípicas seleccionadas en las variedades de pomelos pudieran ser atribuibles a modificaciones epigenéticas que se conservan clonalmente y por lo tanto no pueden ser detectadas por marcadores basados en la secuencia de ADN. En general, la selección de nuevos caracteres fenotípicos deseables generados probablemente en mutaciones somáticas o epigenéticas que se producían en los brotes o ramas fueron los únicos métodos utilizados para desarrollar y seleccionar nuevas variedades de pomelo. Estos cambios a nivel molecular pueden explicarse por la acumulación y fijación progresiva de mutaciones espontáneas y a nivel reproductivo por apomixis e hibridaciones.

Se considera cada vez más relevante la vinculación de estudios científico-tecnológicos para la secuenciación, genotipificación y desarrollo de herramientas genómicas en la obtención de variedades cítricas mejoradas. Y de esta forma facilitar la generación y selección y mantenimiento de nuevas líneas y variedades. Esto incluye en primer lugar la identificación de variantes de genes de interés agronómico. Posteriormente la aplicación tecnológica de este conocimiento mediante la utilización de técnicas de genotipado para facilitar la obtención de marcadores que puedan utilizarse en programas de mejora de cítricos más rápidos y precisos (Talon *et al.*, 2011; Pinar *et al.*, 2017). Así, las estrategias que involucran el uso combinado de genotipificación mediante marcadores moleculares en conjunto con la selección directa, podrían ser muy eficientes para estudiar la herencia de la resistencia a

enfermedades. Además, en la construcción de mapas de ligamiento utilizados para localizar los genes asociados con la resistencia.

CONCLUSIONES

La escasa variabilidad genética hallada mediante RAPD fue insuficiente para estimar los parámetros de diversidad requeridos para una caracterización exhaustiva del germoplasma del pomelo 'Paraná'. Si bien se observó un elevado porcentaje de loci polimórficos, el índice de diversidad hallada no fue significativamente elevado. Y no se hallaron bandas exclusivas con estos marcadores. Además, la utilización de los RAPD presenta varias controversias, como la baja reproducibilidad entre laboratorios y la escasa confiabilidad de la información generada. Por lo que se pueden utilizar, con las limitaciones del caso, en estudios de diversidad molecular conducidos bajo condiciones controladas constantes, como las utilizadas y ajustadas en este trabajo. Debido a esto se considera que es más eficiente el uso de marcadores con mayor potencial para detectar polimorfismos como los SSR. Sin embargo, aquí se emplearon los RAPD para una aproximación inicial a la caracterización y estudio de colecciones de germoplasma cítrico. A su vez, la técnica resultó muy sencilla y rápida para el manejo de dicho germoplasma.

Se llegó a la conclusión que los SSR son los más eficaces que los RAPD en estudios de grupos estrechamente relacionados, como el caso de variedades de *Citrus*. A su vez, son útiles para dilucidar la diversidad genética, determinar el parentesco y revelar las relaciones filogenéticas entre diversas especies de cítricos. Si bien la resolución de los loci SSR en geles de agarosa fue satisfactorio, el uso combinado de equipamiento innovador, como el sistema *Fragment Analyzer*, para este tipo de estudio, permitió el análisis simultáneo de una gran cantidad de muestras con mayor precisión y sensibilidad. Por lo que este sistema, resultó válido y eficiente para caracterizar mediante marcadores SSR el germoplasma cítrico de interés.

Los loci SSR mas informativos en la caracterización de pomelo 'Paraná' fueron P73, P94, P620, P1826, P1223, CCSM77 CCSM156, CCSM09, CCSM68. Así, mediante ellos se logró diferenciar específicamente pomelo 'Paraná' del resto de las variedades cítricas analizadas. A su vez, los perfiles genéticos derivados de los marcadores P1826, P1223, CCSM156, CCSM09, CCSM147, CCSM68 mostraron similitudes entre pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' lo que sugiere cierta proximidad filogenética entre ellos. Además, se distinguió inequívocamente el loci CCSM09 para distinguir las muestras de pomelo 'Paraná', evidenciando un patrón de bandas diferente al que se observó en el resto de las variedades de pomelo. Se demostró que las variedades de pomelo en general están estrechamente relacionadas. Sin embargo, se pudo establecer que el pomelo 'Paraná' es un híbrido natural independiente, originado posiblemente del cruzamiento de una variante de naranja dulce (*C. sinensis*) y *pummelo* (*C. maxima*). Por lo cual los trabajos futuros incluirían el estudio de los alelos ancestrales y la historia del mejoramiento de esta variedad para dilucidar fehacientemente su origen.

Mediante el análisis de la varianza molecular se pudo demostrar que las variedades cítricas estudiadas son genéticamente diferentes entre sí. Además, el análisis de estructuración genética reveló que el mayor grado de división se da entre variedades. Esto sugiere que, los cambios producidos a través del tiempo, en la generación de nuevos cultivos, fueron tan profundos que las especies que integran estas variedades lograron separarse unas de otras. Lo que evidencia que se pueden utilizar los marcadores seleccionados en esta tesis para distinguir variedades de *Citrus*.

En cuanto a las distancias genéticas entre pomelo 'Paraná' y las restantes variedades cítricas analizadas, se pudo establecer que pomelo 'Paraná' y naranja 'Valencia' fueron las menos distantes. Así como también, pomelo 'Paraná' y *C. maxima* (*pummelo* 'Chandler') con valores de distancias genéticas bajas. Además, los

valores de similitudes genéticas indicaron que el pomelo 'Paraná' posee mayor similitud con naranja 'Valencia' y *C. maxima* (*pummelo* 'Chandler') que con cualquier otra variedad de pomelo. Esto nos brinda una aproximación para dilucidar el origen genético de pomelo 'Paraná' y hallar sus parentales.

El análisis de UPGMA reveló que, los pomelos forman un agrupamiento donde los pomelos "pigmentados", 'Red Blush', 'Star Ruby' y 'Red Shambar' están en un nodo y los restantes pomelos, 'Duncan', 'Foster' y 'Marsh', en otro. Además, pomelo 'Paraná' no se agrupa con ninguna de estas variedades de pomelo, al contrario de esto, forma un agrupamiento junto con naranja 'Valencia'. Esto evidencia la diferenciación que existe en cuanto a las distancias genéticas entre pomelo 'Paraná' y los otros pomelos. Por otra parte, las similitudes morfológicas que permitieron distinguir y al mismo tiempo agrupar a las variedades de pomelo, no concuerda con las similitudes genéticas halladas en esta tesis las cuales demuestran el grado de diferenciación existente. A su vez, esto destaca la validez en la utilización de los SSR como herramientas eficaces en la detección de polimorfismos y al mismo tiempo, en la descripción de la estructuración genética de los grupos de cítricos estrechamente relacionados.

En el Análisis de Coordenadas Principales entre las variedades estudiadas, debido a que la mayor variabilidad se da entre variedades, y que las muestras se agruparon de acuerdo a las distancias genéticas, se evidencia la estructuración genética entre ellas. Así, las muestras de pomelo 'Paraná' se agruparon muy cercanas a naranja 'Valencia' y a *pummelo* 'Chandler', lo que hace presumir que en la historia del mejoramiento del cultivo debiera ocurrir un cierto grado de acercamiento genético entre pomelo 'Paraná' y estas últimas. Al analizar exclusivamente las muestras de pomelo 'Paraná', pero considerando los cuatro portainjertos utilizados ('Rangpur', tangelo 'Orlando', 'Citrumelo' y 'Duncan'), se obtuvieron valores muy elevados de identidad. Esto demuestra que los portainjertos no influyen en el agrupamiento debido

a que no hay diferencias en cuanto a las distancias genéticas, y por ello las muestras no se agrupan de acuerdo a sus portainjertos.

Con esta tesis se logró avanzar en la caracterización genética del pomelo 'Paraná'. Esto favorece y al mismo tiempo beneficia la comercialización de este tipo de material, dada la demanda del mismo, ya que brinda información complementaria para la inscripción en el INASE. De esta manera se potencia el estudio del germoplasma cítrico y los trabajos futuros para la identificación de variedades comerciales. En este sentido, los resultados indicaron que, la selección visual en combinación con el análisis de SSR para la identificación y caracterización de híbridos, mejorará la precisión de la selección, y reducirá el tiempo y los costos involucrados en los programas de mejoramiento genético cítrico. Al mismo tiempo, se intensificará la identificación de variedades de distintas procedencias, ya que muchas veces se comercializan con el mismo nombre, en la misma o en diferentes áreas.

BIBLIOGRAFÍA

Amar, M. H., Biswas, M. K., Zhang, Z., Guo, W. W. 2011. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of citrus germplasm collection. *Scientia Horticulturae*. 128: 220-227.

Andrade-Rodríguez, M., Villegas-Monter, A., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Carrillo-Castañeda, G., García-Velázquez, A. 2005. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucelar seedlings. En: *Citrus Agrociencia* 39: 371-383.

Angiosperm Phylogeny Group (APG). 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.

Ansele, M. 2015. La naranja es hija de una mandarina y de la madre del pomelo. El país [en línea]. 15 de abril de 2015. [fecha de consulta 27 de abril de 2015]. Disponible en: http://elpais.com/elpais/2015/04/14/ciencia/1429035387_315915.html).

Arias, Y., Peteira, B., González, I., Martínez, Y., Miranda, I. 2010. Variabilidad genética entre genotipos promisorios de tomate (*Solanum lycopersicum*) obtenidos en programas de mejoramiento frente al TYLCV. *Revista de Protección Vegetal* 25: 190-193.

Baig, M. N. R. Grewal, S., Dhillon, S. 2009. Molecular characterization and genetic diversity analysis of citrus cultivars by RAPD marker. *Turkish Journal of Agriculture* 33: 375-384.

- Barkley, N., Roose, M., Krueger, R., Federici, C. 2006. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1519-1531.
- Barrett, H. C., Rhodes, A. M. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany* 1:105-136.
- Beñatena, H., Anderson, C. Los Cítricos. 1996. En: Fabiani, A., Mika, M., Larocca, L. y Anderson, C. (eds.) Manual para productores de naranja y mandarina de la región del río Uruguay. Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1- 4.
- Canteros, B. I., Gochez, A. M., Lezcano, C., Beltrán, V. M., Anderson, C. 2013. Evaluación de un pomelo resistente a concrosis en Corrientes. En: VII Congreso Argentino de Citricultura: Citricultura asociativa y sustentable. Puerto Iguazú: INTA, 2013, P. S1-20.
- Calabrese, F. 1992. The history of citrus in the Mediterranean countries and Europe. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 1: 35-38.
- Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Ibanez, V., Terol, J., Talon, M., Dopazo, J. 2015. A phylogenetic analysis of 34 chloroplast genomes elucidates the relationships between wild and domestic species within the genus *Citrus*. *Molecular Biology and Evolution* 32: 2015-2035.
- Chacoff, N. P., Souto, C.P., Aizen, M. A., Premoli, A. 2009. Is there genetic variation in seedless Argentinean grapefruit? Implications for crop production and conservation. *Journal of Basic & Applied Genetics* 20: 27-35.
- Ciampi, A. Y., Novelli, V. M., Bastianel, M., Lopes, C. R., Cristofani-Yaly, M., Machado M. A. 2013. Genetic variability in *Citrus sp.*, related genera and hybrids from

germplasm collection evaluated by random amplified polymorphic DNA (RAPD).
Citrus Research & Technology, Cordeirópolis 34: 47-55.

Coletta Filho, H. D., Machado, M. A., Targon, M. L. P. N., Moreira, M.C.P.Q.D.G.,
Pompeu, J. Jr. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus*
spp.) using RAPD markers. *Euphytica* 102: 133-139.

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.

Cristofani, M., Figueiredo, J. O. M., Penteadó, L., Targon, N., Machado, M. A. 2003.
Differentiation of Lemon varieties by Microsatellites. *Laranja* 24: 165-175.

Cristofani-Yaly, M., Moreira Novelli, V., Bastianel, M., Machado, M. A. 2010.
Transferability and Level of Heterozygosity of Microsatellite Markers in *Citrus*
Species. *Plant Molecular Biology Reporter*.

Dimitri, M. J. 1972. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Segunda
Edición. Volumen 1. Acmé. Bs. As.

Escalante, A. M., Coello, G., Eguiarte, L. E., Piñero, D. 1994. Genetic structure and
mating systems in wild and cultivated populations of *Phaseolus coccineus* and
P. vulgaris (Fabaceae). *American Journal of Botany* 81: 1096-1103.

Elisiario, P. J., Justo, E. M., Leitao, J. M. 1999. Identification of mandarin hybrids by
isozyme and RAPD analysis. *Scientia Horticulturae* 81: 287-99.

Fang, D. Q., Roose, M. L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with
inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95:
408-417.

- Fang, D. Q., Roose, M. L., Krueger, R. R., Federici, C. T. 1997. Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 211-219.
- Federcitrus. 2017. La Actividad Citrícola Argentina. www.federcitrus.org.
- Gmitter, F. G., Hu, X. 1990. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). *Economic Botany* 44: 237-277.
- Gochez, A. M.; Canteros, B. I. 2004. Caracterización de la resistencia a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en Dalan Dan (*Citrus* sp.). *Journal of Basic and Applied Genetics* 16: 96.
- Gochez, A. M.; Canteros, B. I. 2006. Evaluación de la patogenicidad de *Xanthomonas axonopodis* Tipo B y C en Rutaceas. En: 12 Jornadas Fitosanitarias Argentinas (Catamarca, 2006, jun 28 -30) p.215.
- Gochez, A. M., Canteros, B. I. 2008. Resistance to citrus canker caused by *Xanthomonas xonopodis* pv. *citri* in an accession of *Citrus* sp. similar to grapefruit. *The American Phytopathological Society* 92: 652.
- Gochez, A. M., Solís Neffa, V. G., Anderson, C., Canteros, B. I. 2008. Determinación del número cromosómico del pomelo Dalan Dan (*Citrus* sp.). XXXI Congreso Argentino de Horticultura. Mar del Plata, Bs As. Argentina.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Gulsen, O., Roose, M. L. 2001. Lemons: diversity and relationships with selected *Citrus* genotypes as measured with nuclear genome markers. *Journal of American Society for Horticultural Science* 126: 309-317.

- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W. 1997. Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop Science* 37: 26-30.
- Herrero, R., Asíns, M. J., Carbonell, E. A., Navarro, L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 599-609.
- Hvarleva, T., Kapari-Isaia, T., Papayiannis, I., Atanassov, A., Hadjinicoli, A., Kyriakou, A. 2008. Characterization of *Citrus* cultivars and clones in Cyprus through Microsatellite and RAPD analysis. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 22: 787-794.
- Ibañez, V., Terol, J., Carbonell, J., Alonso, R., López-García Usach, A., Colmenero-Flores, J. M., Arbona, v., Estornell, L. H., Licciardello, C., Conesa, A., Tadeo, F. R., Dopazo, J., Talón, M. 2012. Identificación inequívoca de variedades de cítricos mediante comparación genómica. *Levante Agrícola (Genómica/Identificación de Variedades)* 309-317.
- InfoAgro, 2018. Cítricos. www.infoAgro.com.
- Ji, Q., Zeng, J., Guo, Y. 2011. Using optimized random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify the category status of *Citrus nobilis* Lour. Gonggan. *African Journal of Biotechnology* 10: 13982-13990.
- Krueger, R. R., Roose, M. L. 2003. Use of Molecular Markers in the Management of *Citrus* Germplasm Resources. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128: 827-837.
- Kyndt, T., Dung, T. N., Goetghebeur, P., Toan, H. T., Gheysen, G. 2010. Analysis of ITS of the rDNA to infer phylogenetic relationship among Vietnamese *Citrus* accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57: 183-192.

- Lin, Y., Sheu, M., Huang, C., Ho, H. 2009. Development of a Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Method for Analyzing Furanocoumarin Components in *Citrus* Fruit Juices and Chinese Herbal Medicines. *Journal of Chromatographic Science* 47: 211-215.
- Lu, Z., Zhou, Z., Xie, R. 2011. Molecular phylogeny of the true *Citrus* fruit trees group (Aurantioideae, Rutaceae) as inferred from chloroplast DNA sequences. *Agricultural Sciences in China* 10: 49-57.
- Luro, F., Rist, D., Ollitrault, P. 2000. Sequence tagged microsatellites polymorphism: an alternative tool for cultivar identification and evaluation of genetic relationships in *Citrus*. En: Proc. 9th Int. Citrus Congress. Florida 170-171.
- Manthey, J. A., Buslig, B. S. 2005. Distribution of Furanocoumarins in Grapefruit Juice Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5158-5163.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 6: 271-278.
- Masatoshi, N. 1987. Genetic variation within population. En: Molecular evolutionary genetics, Nei, M. (ed.) 176-207.
- Mata-Bilbao, M., Andres-Lacueva, C., Jauregui, O., Lamuela-Raventós, R. M. 2007. Determination of flavonoids in a *Citrus* fruit extract by LC–DAD and LC–MS. *Food Chemistry* 101: 1742-1747.
- Miller, M. 1998. Tools for population genetic analyzes (TFPGA), Version 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Available at: herb.bio.nau.edu/miller/tfpga.htm.

- Molina, N. 2007. La Citricultura Correntina: Diagnóstico Actual, Empleo e Inserción Internacional INTA Bella vista. pp45 Publicación Técnica n° 19. INTA Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista Centro Regional Corrientes.
- Morgante, M., Pfeiffer, A., Costacurta, A., Olivieri, A. M. 1996. Molecular tools for population and ecological genetics in coniferous trees. *Phyton* 36: 133-142.
- Moore, G. A. 2001. Oranges and lemons: Clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends in Genetics* 17: 536-540.
- Murray, M. G., Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist*. 106: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 70: 3321-3323.
- Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., Tribulato, E. 2000. *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical Applied Genetics* 100: 1155-1166.
- Novelli, V. M., Machado, M. A., Cristofani, M. 1999. Marcadores microssatélites (SSR-Simple Sequence Repeats) na identificação de cultivares de laranja doce. *Genetics and Molecular Biology* 22: 724.
- Novelli, V. M., Cristofani, M., Souza, A. A., Machado, M. A. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology* 29: 90-96.

- Nybom, H., Bartish, I. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematic* 3/2: 93-114.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Oliveira, A. C., Garcia, A. N., Cristofani, M., Machado, M. A. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica* 128: 397-403.
- Pal, D., Malik, S. K., Kumar, S., Choudhary, R., Sharma, K. C., Chaudhury, R. 2013. Genetic Variability and Relationship Studies of Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) Using Morphological and Molecular Markers. *Agricultural Research* 2:236-245.
- Palacios, J. 2005. Citricultura. Capial Federal, Argentina. Alfa Beta S. A.
- Palmieri, D. A., Novelli, V. M., Bastianel, M., Cristofani-Yaly, M., Astúa-Monge, G., Carlos, E. F., Oliveira, A. C., Machado, M. A. 2007. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of *Citrus*. *Genetics and Molecular Biology* 30: 1009-1018.
- Pang, X. M., Hu, C. G., Deng, X. X. 2007. Phylogenetic relationship within *Citrus* and related genera as inferred from AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 429-436.
- Parodi, L. R. 1959. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Volume 1. Acmé. Bs. As.

- Peakall, R., Smouse, P. E. 2006. GENEALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pinar, H., Bulut, M., Altunoz, D., Uzun, A., Ubeyit, S., Ugurtan, K. Y. 2017. Determination of genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera using DAMD markers. *Bangladesh Journal of Botany* 46: 163-170.
- Rinsdahl-Canavosio, M. A., Gochez, A. M., Lezcano A., Soliz J., Canteros, B. I. 2008. Phenology and juice quality of "Dalan Dan" grapefruit in Corrientes, Argentina. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 1: 55- 58.
- Roose, M. L. 1988: Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in *Citrus* breeding and systematics. En: Goren R., Mendel K. (eds): Proc. 6th Int. Citrus Congres. Margraf Scientific Books, Weikersheim 155-165.
- Roubik, D. W. 2002. The values of bees to the coffee harvest. *Nature* 417-708.
- Rouseff, R. L., Martin, S. F., Youtsey, C. O. 1987 Quantitative Survey of Narirutin, Naringin, Hesperidin, and Neohesperidin in *Citrus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 1027-1030.
- Ruiz, C., Paz Breto, M., Asíns, M. J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112: 89-94.
- Scora, R. W. 1975. On the history and origin of *Citrus*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102: 369-375.
- Scora, R. W., Kumamoto, J., Soost, R. K., Nauer, E. M. 1982. Contribution to the origin of grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). *Systematic Botany* 7: 170-177.

- Sgroppo, S. C., Pereyra, M. V., Wlosek Stañgret, C. R., Canteros, B. I. 2015. Characterization of Grapefruit (*Citrus paradisi*) Fruits Produced in Argentina and Paraguay. *Acta Horticulturae* 1065.
- Shannon, C., Weaver, W. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.
- Sharma, N., Dubey, A. K., Srivastav, M., Singh, B. P. Singh, A. K., Singh, N. K. 2015. Assessment of genetic diversity in grapefruit (*Citrus paradisi* Macf) cultivars using physico-chemical parameters and microsatellite markers. *Australian Journal of Crop Science* 9: 62-68.
- Swingle, W. T. 1943. The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily. En: The *Citrus* Industry. Webber, H. J. y Batchelor, L. D., eds. 1: 129-474, University of California Press.
- Talon, M., López-García Usach, A., Terol, J., Cercós, M., Ibañez, V., Herrero-Ortega, A., Muñoz-Sanz, J. V., Colmenero-Flores, J. M., Arbona, V., Estornel, L. H., Carbonel, J., Concesa, A., Dopazo, J., Tadeo, F. R. 2011. CITRUSEQ: Una Aproximación Genómica a la Mejora de los Cítricos. CITRUSEQ Levante Agrícola 2º Trimestre 2011.
- Tanaka, T. 1977. Fundamental discussion of *Citrus* classification. *Studia Citrologica* 14:1-6.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Tinker, N. A., Mather, D. E., Fortin, M. G. 1994. Pooled DNA for linkage analysis: Practical and statistical consideration. *Genome* 37: 999-1004.

- Uzun, A., Yesiloglu, T., Aka-Kacar, Y., Tuzcu, O., Gulsen, O. 2009. Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Scientia Horticulturae* 121: 306-312.
- Uzun, A., Gulsen, O., Yesiloglu, T., Aka-Kacar, Y., Tuzcu, O. 2010. Distinguishing Grapefruit and Pummelo Accessions using ISSR Markers. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 46: 170-177.
- Uzun, A., Yesiloglu, T., Aka Kacar, Y., Tuzcu, O., Gulsen, O., Kafa, G., Yildirim, B., Anil S. 2011. Genetic diversity of grapefruit and pummelo accessions based on SRAP markers. Proc. IInd IS on *Citrus* Biotechnology (eds.): Gentile, A., La Malfa, S. *Acta Horticulturae* 892.
- Uzun, A., Yesiloglu, T. 2012. Genetic Diversity in *Citrus*. En: M. Caliskan (ed.), *Genetic Diversity in Plants* (213-230).
- Wang, Y., Yueh, C., Ku, Y. 2007. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry* 102:1163-1171.
- Webber, H. J. 1967. History and development of the citrus industry. En: Reuther, W., Webber, H. J., Batchelor, L. D. (eds.). *The Citrus industry*. University of California Press, Berkeley 1: 1-39.
- Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., Lopez-García, A., Perez-Roman, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F. R., Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Curk, F., Du, D., Ollittrault, P., Roose, M. L., Dopazo, J., Gmitter jr F. G., Rokhsar, D. D, Talon, M. 2018. Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature* 554: 312-316.
- Xu, Q., Chen, L., Ruan, X., Chen, D., Zhu, A., Chen, C., Bertrand, D., Jiao, W., Hao, B., Lyon, M. P., Chen, J., Gao, S., Xing, F., Lan, H., Chang, J., Ge, X., Lei, Y., Hu, Q., Miao, Y., Wang, L., Xiao, S., Biswas, M. K., Zeng, W., Guo, F., Cao, H.,

Yang, X., Xu, X., Cheng, Y., Xu, J., Liu, J., Luo, O. J., Tang, Z., Guo, W., Kuang, H., Zhang, H., Roose, M. L., Nagarajan, N., Deng, X., Ruan, Y. 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics*. 45: 59-66.

Yamamoto, M., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Yamada, Y. 1993. Phylogenetic relationships of *Citrus* revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. *Japanese Journal of Breeding* 43: 355-365.

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.