



Artículo original

Comparación de dos protocolos de radiomutagénesis *in vitro* para el portainjertos cítrico citrumelo Swingle


Alba Álvarez-González^{1*} 


Amarilys Martínez-Pérez¹ 

Victoria Zamora-Rodríguez² 

Mayda Betancourt-Grandal² 

Livia Santiago-Hernández¹ 

Mario Varela-Nualles³ 

María C. González-Cepero³ 

Sandra Carro-Palacios¹ 

Armando Chávez-Ardanza¹ 

¹Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN), calle 30 # 502 esq. 5ta Ave., Miramar, Playa, La Habana

²Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), calle 7ma e/: 30 y 32, Miramar, Playa, La Habana

³Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

* Autor para la correspondencia: aalvarez@ceaden.edu.cu

RESUMEN

Con el objetivo de establecer un esquema de radiomutagénesis *in vitro* eficiente para el portainjertos citrumelo Swingle, se compararon el Protocolo 1 (se irradiaron semillas y se propagaron los brotes axilares de las plántulas regeneradas) y el Protocolo 2 (se irradiaron segmentos de epicótilo y se propagaron los brotes adventicios). Se evaluó la radiosensibilidad frente a rayos gamma de ⁶⁰Co, la brotación y tres tratamientos de enraizamiento (MS, MS+ANA y MS+AIB). Se comparó la eficiencia en cuanto al total de plantas y el tiempo, hasta su adaptación a sustrato y se estimó el tamaño de la población mutada. Se determinaron dosis mutagénicas (DL₃₀) de 29 y 37 Gy para semillas y segmentos de epicótilo, respectivamente. La brotación fue mayor del 93 % para ambos protocolos. El enraizamiento

fue significativamente mayor para los brotes adventicios en MS+ANA (0,5 mg L⁻¹), debido al mayor enraizamiento secundario (92 %), que favoreció su adaptación a sustrato (91,8 vs 70,4 %). A partir de 1000 semillas, con las DL₃₀ propuestas y considerando una frecuencia de mutaciones inducidas de 0,5 %, se estimaron 50 y 70 mutantes en los Protocolos 1 y 2, respectivamente. Se demostró que el Protocolo 2 basado en organogénesis adventicia es más eficiente que el Protocolo 1, basado en irradiación de semillas y propagación de brotes axilares; pues permite obtener mayor número de mutantes en la mitad del tiempo (siete meses), debido principalmente a la elevada capacidad de enraizamiento y mejor arquitectura radicular, favoreciendo una mayor supervivencia *ex vitro* de las plantas.

Palabras clave: *Citrus*, micropropagación, mutación inducida, radiosensibilidad

Recibido: 29/06/2020

Aceptado: 27/07/2021

INTRODUCCIÓN

El citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L). Raf.) es uno de los portainjertos más utilizados comercialmente, no solo en Cuba ⁽¹⁾, sino a nivel mundial ^(2,3). Es un árbol vigoroso que induce elevados rendimientos, es resistente a suelos con poco drenaje y de moderada tolerancia a la sequía. Sin embargo, al igual que otros portainjertos trifoliados, crece poco en los suelos calcáreos ⁽⁴⁾, por lo que es necesario mejorar su tolerancia a la deficiencia de hierro inducida por la caliza; lo cual es un problema de importantes regiones del mundo y en Cuba para la zona citrícola de Jagüey Grande en Matanzas ⁽⁵⁾. Asimismo, es de interés reducir su arquitectura, pues se requieren portainjertos enanizantes en las plantaciones de alta densidad, como una de las estrategias de manejo del Huanglongbing ⁽⁶⁾.

Caracteres como el enanismo y la tolerancia a diferentes estreses bióticos y abióticos se han podido inducir en numerosas especies vegetales mediante la radiomutagénesis ⁽⁷⁾. En el caso de los cítricos, existen 15 cultivares mutantes en la base de datos (MVD) del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), registrados entre 1970 y 2017 ⁽⁸⁾. En su mayoría, se trata de cultivares copa mejorados para el tamaño y calidad del fruto, la reducción del número de semillas, retardo de la madurez, rendimiento, así como la tolerancia a algunas enfermedades ^(9,10).

Para los cítricos, en particular los portainjertos, los métodos tradicionales de hibridación sexual están más limitados por su biología reproductiva (la apomixis), los largos períodos juveniles y la alta heterocigocidad ⁽¹¹⁾. En este sentido, la radiomutagénesis *in vitro* es una estrategia alternativa, ya que combina las ventajas de la inducción de mutaciones con las técnicas biotecnológicas ⁽¹²⁾. De hecho,

recientemente, se informaron cinco mutantes del portainjertos *Citrus macrophylla* con mayor tolerancia a la salinidad, obtenidos por radiomutagénesis y selección *in vitro* ^(13,14).

Para el desarrollo de enfoques de mutagénesis *in vitro* en *Citrus spp.* se utilizan diferentes explantes que incluyen semillas, yemas, callos, protoplastos, segmentos de epicótilo y ápices caulinares ⁽¹⁵⁾. Sin embargo, en todos ellos es necesario establecer las condiciones óptimas de irradiación así como protocolos de propagación eficientes ⁽⁷⁾, ya que la respuesta a los mismos también está determinada por el genotipo y el tipo de explante ⁽¹⁶⁾.

Con el objetivo de establecer un esquema de radiomutagénesis *in vitro* eficiente para citrumelo Swingle, en este trabajo se comparan dos protocolos: en el Protocolo 1 se irradian semillas y se propagan los brotes axilares de las plántulas regeneradas y en el Protocolo 2 se irradian segmentos de epicótilo y se propagan los brotes adventicios inducidos. Se evalúa la radiosensibilidad de ambos explantes frente a rayos gamma de ⁶⁰Co; se determinan los porcentajes de brotación, enraizamiento y adaptación a sustrato de los propágulos y se compara la eficiencia de ambos protocolos en cuanto al número final de plantas adaptadas a sustrato y el tiempo requerido hasta su adaptación. Basado en estos resultados, se estima también el tamaño de la población mutada necesario para obtener un número adecuado de posibles mutantes en cada protocolo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los frutos maduros fueron colectados en la UCTB “Félix Duque” de Jagüey Grande, perteneciente al Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT); a partir de plantas de citrumelo Swingle que mostraron un 40 % de poliembrionía y un promedio de 1,8 plántulas por semilla (datos no mostrados).

Explantes

Los explantes irradiados en los Protocolos 1 y 2 fueron semillas y segmentos de epicótilo, respectivamente.

Las semillas se extrajeron de los frutos frescos, se descascararon y desinfectaron con hipoclorito de sodio (0,7 %) y se transfirieron a tubos de cultivo que contenían medio de Murashige y Skoog (MS) basal, sin vitaminas ni sacarosa ni reguladores del crecimiento vegetal (RCV). Luego de la irradiación, se transfirieron inmediatamente a nuevos tubos de cultivo con medio fresco, una semilla por tubo y se mantuvieron para su germinación por 30 días en cuarto de crecimiento controlado a 25 °C, 60 % de humedad relativa, fotoperiodo de 16-h luz / 8-h oscuridad e iluminancia de 2500 lx suministrada con

lámparas fluorescentes Chiyoda. Las plántulas germinadas se transfirieron a MS líquido con mioinositol ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) y 30 g L^{-1} de sacarosa y se subcultivaron por 60 días hasta tener al menos tres entrenudos. En las semillas poliembriónicas solo se tomó la plántula más vigorosa por semilla.

Los segmentos de epicótilo se obtuvieron de plántulas etioladas (regeneradas de semillas germinadas en la oscuridad en MS basal por 30 días). De la región del epicótilo se cortaron segmentos de aproximadamente $0,5 \text{ cm}$ que se colocaron en Placas Petri con MS basal. Inmediatamente después de irradiados, los segmentos se transfirieron a nuevas placas Petri con medio de brotación: Murashige y Tucker (MT) suplementado con $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-bencilaminopurina (6-BAP) ⁽¹⁶⁾ y fueron mantenidos en cuarto controlado en la oscuridad para la brotación.

Protocolos

En la Figura 1 se muestra un esquema con las etapas de los protocolos evaluados. En el Protocolo 1 se irradiaron semillas y se propagaron los brotes axilares de las plántulas regeneradas. En el Protocolo 2 se irradiaron segmentos de epicótilo y se propagaron los brotes adventicios inducidos. Ambos propágulos se sometieron a etapas de elongación, enraizamiento y adaptación a sustrato.

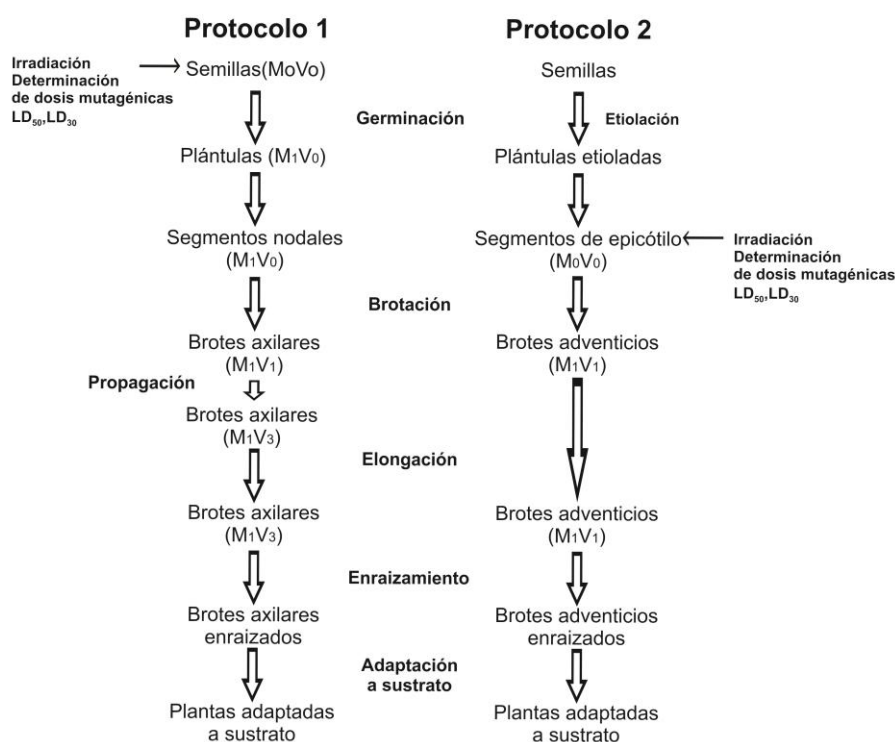


Figura 1. Protocolos de radiomutagénesis *in vitro* de citrimento Swingle comparados en el estudio

Curvas de radiosensibilidad

Los explantes fueron irradiados a 10, 20, 30, 40 y 50 Gy de rayos gamma de Cobalto 60 (^{60}Co), a 35 °C y a una tasa de dosis de 14 Gy/min. El rango de dosis se seleccionó basado en estudios previos de radiosensibilidad en *Citrus spp.* con estos tipos de explantes ^(16,17). Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. Se irradió una semilla por tubo y 20 semillas por tratamiento (dosis de irradiación), en dos experimentos independientes. Para los segmentos de epicótilo se irradiaron dos placas Petri por dosis en dos experimentos independientes. Cada placa contuvo 15 segmentos en el primer experimento y 20 segmentos en el segundo. Como criterio de radiosensibilidad de semillas y segmentos de epicótilo se consideró la fracción de semillas germinadas (FSG); es decir, semillas con brotes completos del total de semillas y la fracción de segmentos que respondieron a la inducción de brotes adventicios (FSR) del total de segmentos, respectivamente.

Propagación *in vitro*

Inducción de brotes y elongación

Para la inducción de brotes axilares, los segmentos nodales se transfirieron a medio de inducción consistente en MS suplementado con 6-BAP (1 mg L^{-1}) y ácido 1-naftilacético (ANA) ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) ⁽¹⁸⁾, en cuarto de crecimiento controlado durante 60 días. Para aislar los sectores mutados, los brotes axilares se separaron y se propagaron en dos subcultivos, hasta la generación M_1V_3 . Para la inducción de brotes adventicios, se mantuvieron los segmentos de epicótilo en medio de brotación ⁽¹⁶⁾ en la oscuridad por 15 días en cuarto de crecimiento controlado y luego se restauró el fotoperiodo de 16-h luz/8-h oscuridad por 60 días. El porcentaje de brotación (B), longitud del brote (LB) (mm) y número de brotes por explante (BE) se evaluaron en 150 explantes para cada protocolo. Para BE, sólo se registraron los brotes adventicios de aproximadamente 10 mm, considerando que los menores de este valor no se desarrollan posteriormente, de acuerdo a observaciones previas y a otros autores ⁽¹⁹⁾.

Posteriormente los brotes se transfirieron a medio de elongación, consistente en MS suplementado con 6-BAP ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) y ácido giberélico (GA_3) ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) ⁽²⁰⁾. Basado en los valores de longitud promedio de brotes axilares ⁽²¹⁾ y adventicios ⁽¹⁹⁾, en varias especies cítricas, se decidió evaluar la eficiencia de elongación (EE) como el porcentaje de brotes mayores de 15 mm para brotes axilares o de 10 mm para los adventicios. Este se determinó a los 30 días de cultivo, en 150 brotes para cada protocolo.

Enraizamiento y supervivencia en el sustrato

Se compararon tres tratamientos de enraizamiento: I) MS (MS a la mitad de su fuerza iónica (MS (1/2)) + 30 g L⁻¹ de sacarosa), II) MS + ANA (MS (1/2) + 30 g L⁻¹ de sacarosa + 0,5 mg L⁻¹ de ANA) y III) MS + AIB (MS (1/2) + 30 g L⁻¹ de sacarosa + 0,5 mg L⁻¹ de ácido 4-3 indolbutírico (AIB)). A los 60 días se determinó el porcentaje de enraizamiento (E), número de raíces por explante (RE) y la longitud promedio de las raíces (LR). También se evaluó el porcentaje de enraizamiento secundario (ES) y el número de raíces secundarias por explante (RSE).

Los brotes enraizados fueron transferidos a recipientes plásticos de 1 L de capacidad, con una mezcla de tierra y humus de lombriz. La tierra se desinfectó en horno, a 200 °C por dos horas y se mezcló con el humus de lombriz (50 %:50 %). Las plantas se protegieron con una cubierta plástica transparente por 15 días. Se aplicó riego manual tres veces por semana entre las 8:00 y las 10:00 de la mañana, hasta saturación del sustrato. Se regó con MS (1/2) en la primera semana y con agua corriente posteriormente. Durante la tercera semana se retiró la cubierta una hora diaria, en la mañana. Cuando emergieron las hojas nuevas a partir de la cuarta semana, se removió la cubierta una hora más cada día hasta que las plantas se dejaron completamente destapadas. A los 30 días se determinó el porcentaje de supervivencia en el sustrato (S).

Análisis de los datos

Las curvas dosis-efecto se obtuvieron por ajuste de los valores medios de radiosensibilidad en Origin-PC. Para comparar la brotación, el enraizamiento y la supervivencia en el sustrato, se calculó la media, desviación estándar y error estándar de cada carácter. El ajuste a la normalidad y la homogeneidad de varianza se determinaron por las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente.

Los valores de BE y LB se compararon por una prueba de Mann-Whitney y un test t de Student, respectivamente. Los valores de LR se analizaron por un ANOVA de clasificación simple seguido de un test de comparación múltiple de Tukey. Para los valores de RE se aplicó un Kruskal-Wallis seguido de una prueba de Dunn (SPSS V19). Para comparar los porcentajes de B y EE se calcularon los intervalos de confianza ($p < 0,05$). En el caso de los porcentajes de E y S se aplicó una prueba Chi cuadrado (χ^2) de comparación de proporciones (Statgraphics Plus V5.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Radiosensibilidad y dosis mutagénicas

A partir de las curvas dosis-efecto se determinó una dosis letal media (DL₅₀) de 40 Gy y 45 Gy para semillas y segmentos de epicótilo, respectivamente (Figura 2).

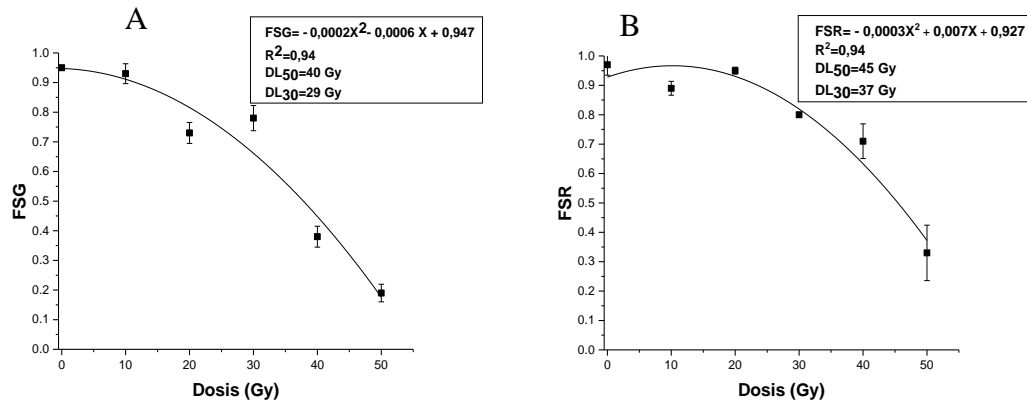


Figura 2. Curvas dosis-efecto frente a rayos gamma (^{60}Co), para semillas (A) y segmentos de epicótilo (B) del portainjertos citrumelo Swingle

Aunque se encontró un valor de DL_{50} mayor (200 Gy) para semillas de *C. suhuiensis* ‘limau madu’ que fueron desecadas hasta un 25 % de humedad antes de la irradiación ⁽¹⁷⁾, los mismos autores hallaron una DL_{50} de 50 Gy cuando las semillas de *C. suhuiensis* ‘limau langkat’ fueron irradiadas sin desecar. Este valor es más cercano a nuestro resultado, donde las semillas fueron irradiadas inmediatamente después de extraídas de los frutos frescos con un elevado contenido de humedad. Esta puede ser la causa de las diferencias entre estos resultados, ya que en las semillas, los contenidos de agua y de dióxígeno son los principales factores que modifican la radiosensibilidad ^(22,23).

En el caso de los segmentos de epicótilo, se informan valores de DL_{50} menores al obtenido en este trabajo en otras especies cítricas como las mandarinas Fremont y Thomas, el tangor Murcott y la lima de Rangpur, los que variaron entre 22 y 34,5 Gy ⁽¹⁶⁾. Aunque estas diferencias pudieran estar explicadas por una respuesta dependiente del genotipo; otros factores como las condiciones del cultivo, de la irradiación (temperatura, tasa de dosis, energía de la radiación gamma) y el estado fisiológico del material vegetal, contribuyen también a las diferencias.

La selección de la dosis mutagénica depende de la experiencia del mejorador, así como de la genética y fisiología del material vegetal. Frecuentemente se recomienda el uso de la DL_{50} ($\pm 10\%$), ya que se considera la dosis a la cual ocurre la mayor frecuencia de mutaciones ^(23,24). Sin embargo, ocurren numerosas mutaciones deletéreas que causan la pérdida del 50 % del material irradiado. Por ello, muchos estudios recomiendan una dosis intermedia que permita inducir mutaciones sin un alto grado de daño fisiológico; por ejemplo, la dosis que reduce en un 30 % la supervivencia (DL_{30}) o el crecimiento (GR_{30}) de la planta o del propágulo ^(16,23,25). En este estudio, se determinó y se recomienda una DL_{30} de 29 Gy y 37 Gy para los Protocolos 1 y 2, respectivamente.

Brotación y elongación

Se obtuvieron elevados porcentajes de brotación y un número similar de brotes por explante (BE) tanto para brotes axilares como adventicios (Tabla 1).

Tabla 1. Brotación y elongación de brotes axilares y adventicios de citrumelo Swingle

| | | Brotos axilares | Brotos adventicios | |
|------------|---------|-----------------|--------------------|-------------|
| Brotación | BE | 2,16 ± 0,07 | 2,01 ± 0,07 | n.s. p<0,01 |
| | B (%) | 94,6 | 93,5 | n.s. p<0,05 |
| Elongación | LB (mm) | 26,5 ± 0,8 | 15,1 ± 0,5 | ** p<0,01 |
| | EE (%) | 94,3 | 95,3 | n.s. p<0,05 |

BE y LB expresados como media ± error estándar

Para los brotes axilares, el valor de 2,16 BE resultó mayor al obtenido en estudios previos con la misma concentración de 1 mg L⁻¹ de 6-BAP, tanto para el mismo genotipo (BE=1,14) ⁽²⁶⁾, como para mandarina Cleopatra, naranjo agrio y *C. macrophylla* (1 a 1,5) ⁽²¹⁾.

El valor de BE (2,01) para los brotes adventicios resultó más bajo que el obtenido para este tipo de explante en otros cultivares copa ⁽¹⁰⁾; mientras que, fue mayor al obtenido en otros portainjertos como mandarina Cleopatra, naranjo agrio y *C. macrophylla* (BE entre 0,8-1,4) ⁽²⁷⁾. En especies de *Citrus*, está demostrado un marcado efecto del genotipo tanto en la vía de regeneración, como en los requerimientos ambientales y hormonales para la óptima formación del brote adventicio ⁽²⁷⁾, por lo que estas condiciones deben ser bien establecidas para cada cultivar.

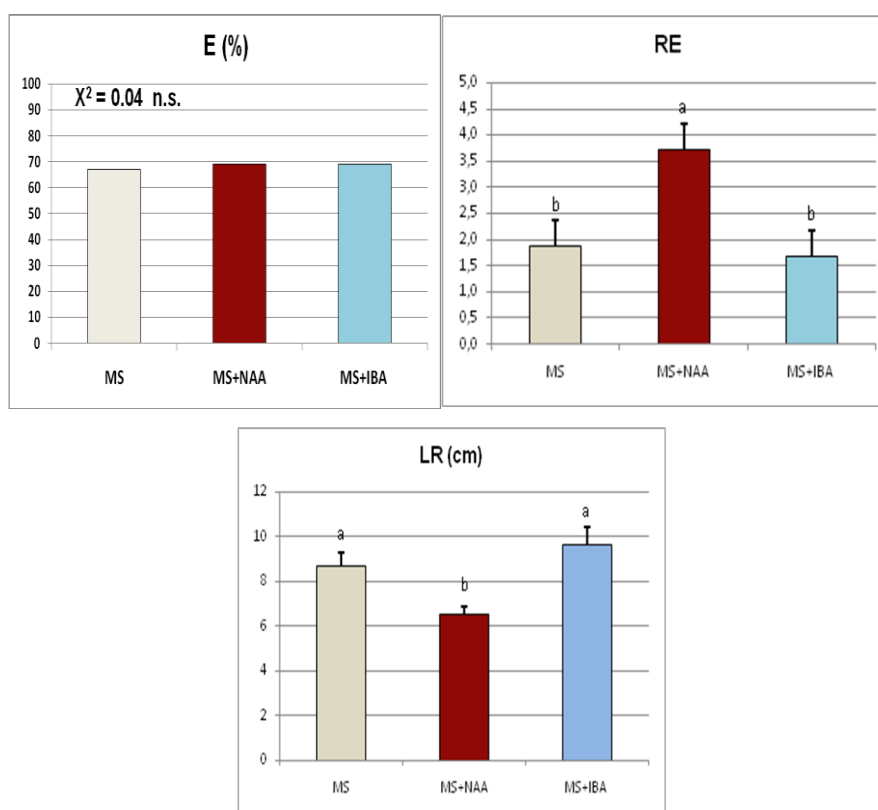
Varios autores han demostrado el efecto estimulante del 6-BAP y su interacción con otros RCV en la organogénesis directa o indirecta de diferentes especies ^(19,21). En este estudio se indujo la brotación adventicia de citrumelo Swingle con 2 mg L⁻¹ de 6-BAP, la misma concentración utilizada previamente en varios cultivares de *Citrus* spp. ⁽¹⁶⁾, mientras que otros autores utilizaron hasta 6 mg L⁻¹ de 6-BAP, con fines de transformación genética en brotes adventicios de citrange Carrizo ⁽²⁸⁾. Sin embargo, otros autores coinciden en señalar que concentraciones de 6-BAP superiores a 1 mg L⁻¹ resultaron inhibitorias de la brotación ⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Por ello, para incrementar el grado de multiplicación de los brotes adventicios en estudios posteriores deberían evaluarse cuidadosamente las concentraciones de 6-BAP y probar combinaciones de este con otros reguladores del crecimiento, considerando el efecto sinérgico que estas tienen.

En cuanto al medio de elongación utilizado, se observó una buena respuesta de ambos propágulos. A los 30 días, el 94,3 % de los brotes axilares sobrepasó los 15 mm (LB=26,5 mm), casi tres veces su valor inicial y el 95,3 % de los brotes adventicios sobrepasó los 10 mm (LB=15,1 mm) (Tabla 1).

Enraizamiento y supervivencia en el sustrato

A los 60 días no hubo diferencias significativas entre el enraizamiento de los brotes axilares en MS basal (67 %) y MS suplementado con ANA o con AIB (69 %) (Figura 3).

En investigaciones anteriores se obtuvo un 65 y 95 % de enraizamiento en mandarina Cleopatra y naranjo agrio, respectivamente ⁽²¹⁾, con 2 mg L⁻¹ de ANA; mientras que se indujo un 80 % de enraizamiento en *C. macrophylla* con una combinación de AIB (1 mg L⁻¹) + ácido indolacético (AIA) (1 mg L⁻¹). Por el contrario, los resultados de este trabajo sugieren cierta competencia de los brotes axilares de citrumelo Swingle para enraizar, independientemente de la acción de RCV exógenos. De hecho, otros investigadores encontraron hasta un 55 % de enraizamiento de brotes axilares de este portainjertos en RMAN ⁽¹⁸⁾: un medio de enraizamiento estándar para *Citrus*, que contiene muy baja concentración de ANA (0,02 mg L⁻¹). Estudios posteriores que incluyan la determinación los niveles de auxinas endógenas en brotes axilares de citrumelo Swingle serían necesarios para corroborar esta hipótesis.



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

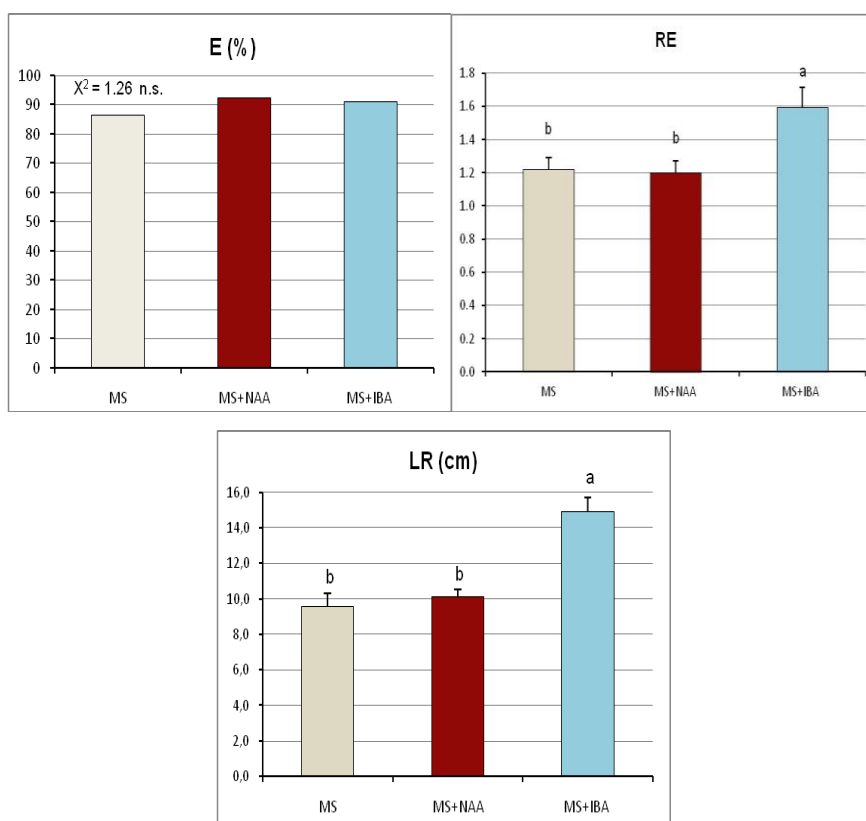
Los valores de E (%) no fueron significativamente diferentes (χ^2 , $p < 0,05$)

Figura 3. Porcentaje de enraizamiento (E), número de raíces por explante (RE) y longitud de la raíz (LR) para brotes axilares a los 60 días en los medios de cultivo MS, MS+ANA (0,5 mg L⁻¹) y MS+AIB (0,5 mg L⁻¹)

Aunque el suplemento de auxinas no incrementó el porcentaje de enraizamiento de los brotes axilares respecto al medio de cultivo MS basal, sí se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto al número de raíces por explante (RE) y a la longitud de la raíz (LR). El AIB ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) indujo raíces más largas (9,6 cm) comparadas con el medio de cultivo suplementado con ANA (6,5 cm). Sin embargo, este último indujo un número significativamente mayor de raíces por explante (3,7), en comparación con el medio de cultivo MS basal (1,7) o MS+AIB (1,7).

En un estudio previo, en citrumelo Swingle, se encontró el máximo enraizamiento y un promedio de 5,66 RE, cuando se usó 2 mg L^{-1} de ANA ⁽²⁶⁾. Cuando se propagan *in vitro* explantes de especies leñosas, es importante desarrollar suficientes raíces que permitan un trasplante y supervivencia en condiciones *ex vitro* exitosos. Por lo tanto, el enraizamiento de brotes axilares con ANA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) fue mejor, ya que se indujo un mayor número de raíces por explante mientras que la longitud de estas no fue significativamente diferente del obtenido con el medio de cultivo MS basal.

Los brotes adventicios mostraron elevados porcentajes de enraizamiento, incluso en el medio de cultivo sin RCV. Su capacidad de enraizamiento fue mayor que la de los brotes axilares: 86 % en el medio de cultivo MS basal, 93 % en el MS+ANA y 91 % en el MS+AIB (Figura 4).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

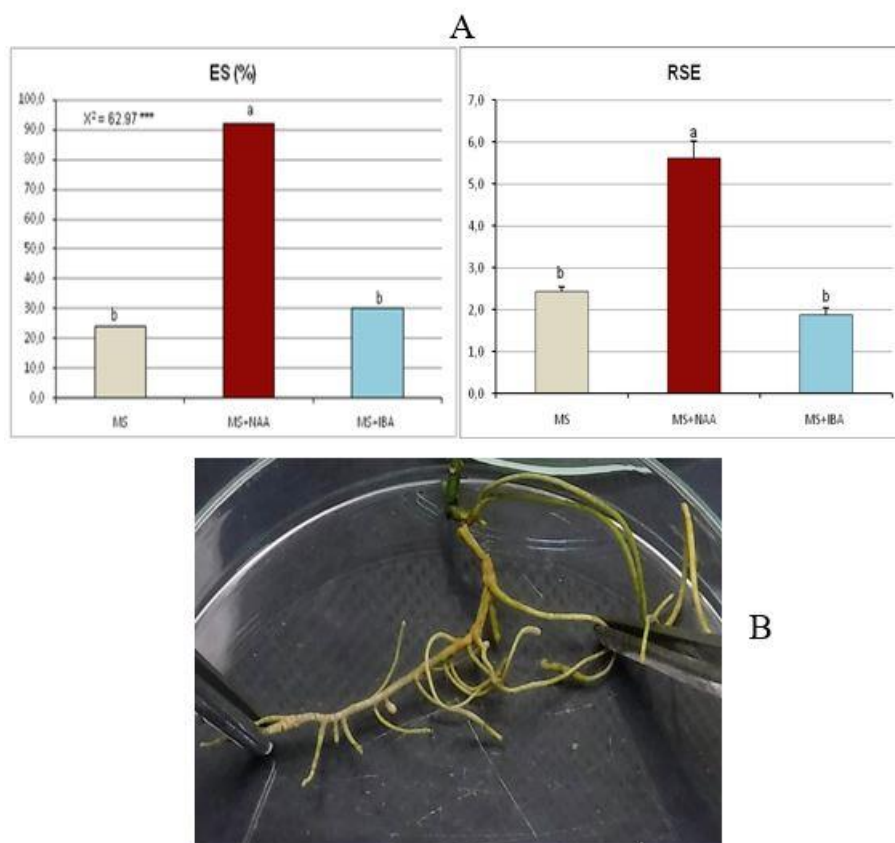
Los valores de E (%) no fueron significativamente diferentes ($\chi^2, p < 0,1$)

Figura 4. Porcentaje de enraizamiento (E), número de raíces por explante (RE) y longitud de la raíz (LR) de los brotes adventicios a los 60 días en los medios de cultivo MS, MS+ANA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) y MS+AIB ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$)

En este estudio se observó una respuesta diferencial en el porcentaje de enraizamiento entre los brotes axilares y los adventicios. En cada tipo de explante podrían estar actuando diferentes mecanismos de regulación de la biosíntesis, el transporte o la respuesta a la señal auxínica. Por ejemplo, se conoce que los receptores de la señal auxínica de tipo TIR1/AFB forman parte de un complejo ligasa ubiquitina-proteína ($SCF^{TIR1/AFB}$) y que existen proteínas (Aux/IAA) que normalmente actúan como represores de los factores de transcripción de la respuesta a auxinas (*ARF*). Al detectarse la presencia de auxinas en la célula, el complejo $SCF^{TIR1/AFB}$ marca las proteínas Aux/IAAs para su degradación. Al eliminarse estas, se activan los factores *ARFs*, desencadenando la respuesta a las auxinas. Sólo en *A. thaliana* existen 6 *AFBs*, 29 *AUX/IAAs* y 23 *ARFs* y las diferentes combinaciones de estos pueden dar diferentes respuestas transcripcionales, en dependencia de su presencia en ciertos tejidos o del estado fisiológico de las plantas. Aún más, existe una afinidad diferencial de estos receptores por los análogos sintéticos de las auxinas, que complejiza mucho más las vías de señalización de estas respuestas ⁽²⁹⁾.

En cuanto al número de raíces para los brotes adventicios se observó un mayor número de raíces primarias (1,6) y de mayor longitud (14,9 cm) en el medio de cultivo MS+AIB (Figura 4), en contraste con otros estudios en *Citrus spp.* que informaron mejores enraizamientos con ANA, que con AIB o AIA ^(21,30). Sin embargo, desde los 30 días se observó un enraizamiento lateral o secundario, que alcanzó un valor significativo (92 %) a los 60 días en el medio suplementado con ANA (Figura 5). En este medio de cultivo, la inducción y la elongación de las raíces primarias fueron reemplazadas por la emisión de raíces secundarias y se obtuvo el mayor promedio de raíces secundarias por explante. A los 60 días, los brotes axilares mostraron valores mucho más bajos que los brotes adventicios: 10, 10 y 8 % para el medio MS basal, MS+ANA y MS+AIB, respectivamente y estos no fueron, estadísticamente, diferentes.

La acción de las auxinas exógenas en la formación de un sistema radicular completo es conocida en varias especies. En plántulas de maíz, el ANA está asociado a este proceso. Se demostró que a bajas concentraciones ($0,002 \text{ mg L}^{-1}$) se inhibe la elongación de raíz primaria incrementando la emisión de raíces laterales y que el mecanismo está asociado a un alargamiento de las células del periciclo ⁽³¹⁾.



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) y de χ^2 para ES ($p < 0,01$)

Figura 5. (A) Porcentaje de enraizamiento secundario (ES) y número de raíces secundarias por explante (RSE) para los brotes adventicios a los 60 días en los medios de cultivo MS, MS+ANA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) y MS+AIB ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$). (B) Raíces secundarias desarrolladas por un brote adventicio a los 60 días en el medio de cultivo MS+ANA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$)

El porcentaje de supervivencia en condiciones *ex vitro* se comparó en base al tratamiento de enraizamiento previo (Tabla 2). Los brotes axilares no mostraron diferencias significativas en la supervivencia, independientemente del tratamiento de enraizamiento *in vitro* previo. Por su parte, los brotes adventicios provenientes del medio de cultivo MS+ANA mostraron una mayor supervivencia (91,8 %) que los provenientes del medio de cultivo suplementado con AIB y del MS basal. Esto se debió probablemente a un sistema radical más eficiente que incluyó el desarrollo de raíces secundarias. Excepto este, el resto de los tratamientos estuvieron entre el 58 y el 74 % de supervivencia, por lo que sería de interés probar otras condiciones de aclimatación, probando diferentes mezclas de sustrato, fertilización, mejor control de la iluminación y el uso de algún fungicida previo al pase a sustrato.

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia *ex vitro* (S) de los brotes axilares y adventicios basado en tratamiento de enraizamiento previo

| Tratamiento de enraizamiento | Brotes axilares | | Brotes adventicios | |
|------------------------------|-----------------|---------|--------------------|--------|
| | N | S (%) | N | S (%) |
| MS | 29 | 58,6 | 50 | 68,0 b |
| MS+ANA | 27 | 70,4 | 49 | 91,8 a |
| MS+AIB | 27 | 63,0 | 50 | 74,0 b |
| Prueba de χ^2 | | 0,86 ns | | 8,77** |

Comparación de la eficiencia

Con el Protocolo 1 se pueden obtener 15 plantas que sobrevivieron por cada plántula germinada, mientras que con el Protocolo 2, se produjeron 19 plantas por cada plántula inicial (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de los protocolos en cuanto al número total de plantas que sobreviven *ex vitro* en el sustrato, a partir de cada plántula germinada

| | Protocolo 1 | Protocolo 2 |
|---|-------------|-------------|
| Plántulas germinadas por semilla * | 1 | 1 |
| Segmentos (nodales/de epicótilo) por planta | 3-4 | 10-12 |
| Brotes axilares/adventicios inducidos | 6-8 | 20-24 |
| Brotes axilares propagados (M ₁ V ₃) | 24-32 | - |
| Brotes elongados ^(a) | 30 | 23 |
| Brotes enraizados ^(b) | 21 | 21 |
| Supervivencia <i>ex vitro</i> ^(c) | 15 | 19 |

(a) EE de 0,94 y 0,95 para brotes axilares y adventicios, respectivamente

(b) E de 69 % y 93 % para brotes axilares y adventicios, respectivamente (0,5 mg L⁻¹ ANA)

(c) S de 70 % y 92 % para brotes axilares y adventicios, respectivamente

Como se observa en la Tabla 3, en el Protocolo 1 se incluye un paso de propagación de los brotes axilares hasta la generación M₁V₃, con el objetivo de aislar los sectores mutados y disminuir el quimerismo. En tejidos pluricelulares que se propagan vegetativamente sin pasar por la fase haploide (meiótica), la célula mutada deberá enfrentar una selección diplóntica, es decir, una competencia con el resto de los linajes diploides no mutantes que por lo general tienen más probabilidad de dividirse exitosamente. Por ello, muchas mutaciones recesivas se pierden ⁽³²⁾. En los meristemas axilares, si la célula mutante logra dividirse hasta cierta extensión, se desarrollarán quimeras sectoriales. Estos brotes axilares darán origen a plantas quiméricas no deseadas. Por el contrario, si se propagan vegetativamente los brotes M₁V₁, es probable que se generen nuevas yemas axilares a partir del sector

mutado con un menor grado de quimerismo. Se ha demostrado que al propagar hasta la generación vegetativa M_1V_3 , se reduce entre un 60 a un 80 % el número de citoquimeras ⁽³³⁾.

Es por ello que en el Protocolo 1 se incluye el avance de las generaciones vegetativas hasta M_1V_3 . Con este proceso, el valor inicial de 2,16 brotes por explante se incrementa a 32 brotes por semilla germinada al final de la propagación. Sin embargo, esto hace al Protocolo 1 cuatro veces más extenso en esta etapa, con respecto al Protocolo 2 (Figura 6). Por el contrario, cuando el método *in vitro* involucra una etapa unicelular, como los brotes adventicios, se evitan las quimeras ⁽¹⁵⁾ y es innecesaria la propagación vegetativa de cuatro meses. Los brotes adventicios mostraron además una elevada capacidad de enraizamiento secundario y una mayor supervivencia *ex vitro* en el sustrato. Por ello, se perdieron menos brotes adventicios en esta etapa, en comparación con los axilares. Estos resultados indican una mayor eficiencia del Protocolo 2 para citrumelo Swingle.

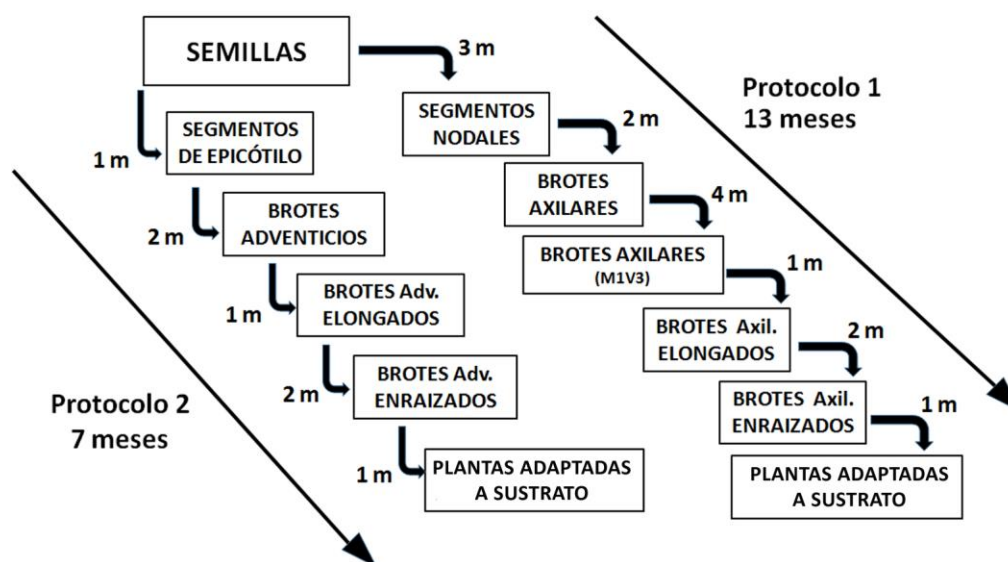


Figura 6. Tiempo de los protocolos 1 y 2 hasta la supervivencia *ex vitro* de las plantas de citrumelo Swingle

Tamaño de la población mutada

Al aumentar el número de explantes tratados se debe esperar una mayor probabilidad de éxito; es decir, la obtención de los mutantes deseados depende del tamaño de la población mutada. Para estimar el mismo, deben considerarse el número de ciclos de propagación vegetativa después de la irradiación, así como los porcentajes de enraizamiento y de supervivencia ⁽³³⁾. A partir de los resultados de este trabajo, se puede estimar el número de posibles mutantes a obtener en cada protocolo.

Con el Protocolo 1, de una población inicial de 1000 semillas (irradiadas a la DL_{30}), se regenerarán 700 plántulas y 2800 segmentos nodales, los cuales rendirán unos 21000 brotes axilares después de la micropropagación. A partir de los porcentajes de enraizamiento y supervivencia *ex vitro* obtenidos,

se regenerarán 10100 plantas. Con el Protocolo 2, 1000 semillas darán lugar a 12000 segmentos de epicótilo. Al irradiar los mismos a la DL_{30} , se regenerarán unos 16800 brotes adventicios. Después de la propagación, enraizamiento y supervivencia *ex vitro* en el sustrato, se obtendrán 13655 plantas. Considerando que la frecuencia común de mutaciones inducidas está en el orden de 0,5 % ⁽³³⁾, se podrán esperar entre 50 y 70 mutantes, partiendo de 1000 semillas iniciales, en los Protocolos 1 y 2, respectivamente.

El grado de poliembrionía puede influir en el número total de plantas obtenidas en estos protocolos. Como la mayoría de los portainjertos, citrumelo Swingle es un cultivar poliembriónico, donde más de un embrión puede desarrollarse de una semilla. Un lote con un elevado grado de poliembrionía podría producir un mayor número de plántulas y con ello, de posibles mutantes. Además, los embriones nucelares son más vigorosos y competitivos que los embriones cigóticos producidos por autopolinización, por lo que a mayor grado de poliembrionía mayor será la frecuencia de plántulas nucelares, con el mismo genotipo de la planta madre ⁽³⁴⁾. Como la mutagénesis inducida está dirigida a la mejora de determinados caracteres sin cambiar el fondo genético del cultivar, es recomendable usar frutos de aisladores o campos controlados, donde es más elevada la frecuencia de plántulas nucelares. Por el contrario, el número de plántulas híbridas se incrementa en semillas provenientes de polinización abierta debido a que estos embriones cigóticos son más vigorosos. La calidad de la polinización, la nutrición y el ambiente, entre otros factores ⁽³⁴⁾, afectan el grado de poliembrionía. Por ello, aunque los lotes usados en este trabajo mostraron un 40 % de poliembrionía, con un promedio de 1,8 plántulas por semilla, en este análisis solo se consideró una plántula (la más vigorosa) por semilla (Tabla 3). En cualquier caso, es recomendable confirmar el origen nucelar de los mutantes seleccionados.

La embriogénesis somática se propone como un enfoque adecuado en programas de transformación genética y mutagénesis *in vitro* de especies cítricas por ser una importante fuente de explantes unicelulares ⁽³⁰⁾. Aunque este método permite elevados grados de embriogénesis y regeneración, el proceso total puede ser largo y la supervivencia después del trasplante puede disminuir entre un 30 y un 40 % ^(35,36). Además, los explantes ovulares de citrumelo Swingle son recalcitrantes a la embriogénesis somática, mientras que este genotipo tiene una elevada respuesta a la micropropagación vía organogénesis ⁽³⁰⁾. En este sentido, la combinación de radiomutagénesis *in vitro* con organogénesis adventicia propuesta en este trabajo, permitió elevados porcentajes de enraizamiento y supervivencia en siete meses. Este enfoque pudiera considerarse una alternativa a la embriogénesis somática para el mejoramiento por radiomutagénesis de este portainjertos.

CONCLUSIONES

Para el portainjertos citrumelo Swingle, el protocolo de radiomutagénesis *in vitro*, basado en organogénesis adventicia en segmentos de epicótilo, es más eficiente que el protocolo basado en irradiación de semillas y propagación de brotes axilares; ya que permite obtener mayor número de mutantes en la mitad del tiempo (siete meses). Esto se debe, principalmente, a la elevada capacidad de enraizamiento y formación de una mejor arquitectura radicular, lo que favorece una mayor supervivencia *ex vitro* de las plantas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Internacional de Energía Atómica (OIEA) por su financiamiento a través de los proyectos ARCAL 5/053 y 5/063 y a la Agencia de Energía Nuclear y Tecnologías de Avanzada de Cuba (AENTA) que también financió la investigación. Agradecimientos especiales al Dr. Richard E. Litz por contribuir amablemente a la revisión de este manuscrito.

REFERENCIAS

1. Jiménez R, Zamora V. Principales cultivares y patrones utilizados en la citricultura. In: Taller Regional sobre viveros de cítricos., Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba. [Internet]. 2010. Available from: <http://riacnet.net/wp-content/uploads/2014/11/Conf-1-Cultivares.pdf>
2. Caruso M, Continella A, Modica G, Pannitteri C, Russo R, Salonia F, et al. Rootstocks Influence Yield Precocity, Productivity, and Pre-Harvest Fruit Drop of Mandared Pigmented Mandarin. *Agronomy* [Internet]. 2020;10(9):1305.
3. Albrecht U, Alferez F, Zekri M. 2019–2020 Florida Citrus Production Guide: Rootstock and Scion Selection1. 2019; Available from: <https://crec.ifas.ufl.edu/media/crecifasufledu/production-guide/Rootstock-and-Scion-Selection.pdf>
4. Calvez L, Dereeper A, Mournet P, Froelicher Y, Bruyère S, Morillon R, et al. Intermediate inheritance with disomic tendency in tetraploid intergeneric Citrus × *Poncirus hybrids* enhances the efficiency of citrus rootstock breeding. *Agronomy* [Internet]. 2020;10(12):1961. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4395/10/12/1961>
5. González JF, Cabrera JS, Vega MB, Sobrinho NA, García AC, Díaz JF. Effects of climate change on soils of cattle regions from the southern karst plain Habana-Matanzas, Cuba. *Cuban Journal*

- of Agricultural Science [Internet]. 2017;51(1). Available from: <http://cjas.science.com/index.php/CJAS/article/view/694>
6. F A. Struggling Citriculture in Florida is a Source for Innovation in Horticultural Science. Journal of Horticulture [Internet]. 2018 [cited 06/11/2021];05(01). doi:10.4172/2376-0354.1000224
 7. Bado S, Forster BP, Nielen S, Ali AM, Lagoda PJ, Till BJ, et al. Plant mutation breeding: current progress and future assessment. Plant breeding reviews [Internet]. 2015;39:23–88. Available from: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=riqsBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA23&dq=7.+Bado+S.+Forster+BP,+Nielen+S,+Ali+AM,+Lagoda+PJL,+Till+BJ,+Laimer+M.+Plant+Mutation+Breeding:+Current+Progress+and+Future+Assessment&ots=QtrFuw2vGn&sig=fSokTocBYjo0ZJum38LlFhRezrg#v=onepage&q&f=false>
 8. IAEA/MVD. MVD - Search. Mutant Variety Search [Internet]. [cited 06/11/2021]. Available from: [https://mvd.iaea.org/#!/Search?Criteria\[0\]\[val\]=citrus](https://mvd.iaea.org/#!/Search?Criteria[0][val]=citrus)
 9. Lamo K, Bhat DJ, Kour K, Solanki SPS. Mutation studies in fruit crops: a review. Int J Curr Microbiol Appl Sci [Internet]. 2017;6(12):3620–33. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Shivendu-Solanki/publication/321939382_Mutation_Studies_in_Fruit_Crops_A_Review/links/5c07fcd24585157ac1aaf376/Mutation-Studies-in-Fruit-Crops-A-Review.pdf
 10. Rattanpal HS, Singh G, Gupta M. Studies on mutation breeding in mandarin variety Kinnow. Current Science (00113891) [Internet]. 2019;116(3). Available from: <https://web.p.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=00113891&AN=134629874&h=rZxcJ1utCQly08li1lXZAePhBVfqA%2fVOXTcHBhyCQm%2fZZ1u%2fz9jehNe5X9T4k0vLhHUCIsmRtTNvrkGRZHE6Qw%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrlNotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d00113891%26AN%3d134629874>
 11. Ruiz M, Pensabene-Bellavia G, Quiñones A, García-Lor A, Morillon R, Ollitrault P, et al. Molecular characterization and stress tolerance evaluation of new allotetraploid somatic hybrids between carrizo citrange and *Citrus macrophylla* W. rootstocks. Frontiers in plant science [Internet]. 2018;9:901. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00901/full>

12. Çelik Ö, Atak Ç. Applications of ionizing radiation in mutation breeding. New Insights on Gamma Rays [Internet]. 2017;111–32. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/53504>
13. Pérez-Jiménez M, Pérez-Tornero O. Improved salt-tolerance in *Citrus macrophylla* mutant rootstocks. Scientia Horticulturae [Internet]. 2020;259:108815. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423819307010>
14. Pérez-Jiménez M, Pérez-Tornero O. Mutants of *Citrus macrophylla* rootstock obtained by gamma radiation improve salt resistance through toxic ion exclusion. Plant Physiology and Biochemistry [Internet]. 2020;155:494–501. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942820303053>
15. Latado RR, Neto AT, Figueira A. *In vivo* and *in vitro* mutation breeding of citrus. Induced mutagenesis in crop plants. Bioremed Biodivers Bioavail [Internet]. 2012;6:40–5. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Antonio-Figueira/publication/305725241_Invited_Mini-Review_Bioremediation_Biodiversity_and_Bioavailability_C2012_Global_Science_Books_In-Vivo_and_in_Vitro_Mutation_Breeding_of_Citrus/links/579d1e0608ae802facbb9885/Invited-Mini-Review-Bioremediation-Biodiversity-and-Bioavailability-C2012-Global-Science-Books-In-Vivo-and-in-Vitro-Mutation-Breeding-of-Citrus.pdf
16. Gonzaga DL, Latado RR, Tulmann Neto A, Pio RM. Radiossensibilidade de dois tipos de propágulos de citros. Bragantia [Internet]. 2011;70:13–8. Available from: <https://www.scielo.br/j/brag/a/Q9MfKfn5FNyRfd5M8vYMFxb/?format=pdf&lang=pt>
17. Noor NM, Jeevamoney J, Clyde MM, Rao VR. Radiosensitivity and *in vitro* studies of *Citrus suhuiensis*. 2009; Available from: https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:46015424
18. Cantagallo F de S, Azevedo FA de, Schinor EH, Mourão Filho F de AA, Mendes BMJ. Micropropagação de citrumelo 'Swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. Revista Brasileira de Fruticultura [Internet]. 2005;27(1):136–8. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbf/a/WJTW5cwpBcK5vQq4SwpbhTm/?lang=pt>
19. Almeida WAB de, Mourão Filho F de AA, Mendes BMJ, Rodriguez APM. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. Scientia Agricola [Internet]. 2002;59:35–40. Available from: <https://www.scielo.br/j/sa/a/fwK3SfNBsnJvm7gZdZcDGrz/?lang=en>
20. Bespalhok Filho JC, Kobayashi AK, Pereira LF, Hissano Z, Vieira LG. *In vitro* adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. Crop Breeding and Applied

- Biotechnology [Internet]. 2001;1(1). Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/4106/78de4684a493efb0318d756543a04825d70c.pdf>
21. Tallón CI, Porras I, Pérez-Tornero O. Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* [Internet]. 2012;48(5):488–99. Available from: https://www.researchgate.net/publication/257704390_Efficient_propagation_and_rooting_of_the_three_citrus_rootstocks_using_different_plant_growth_regulators
 22. Caplin N, Willey N. Ionizing radiation, higher plants, and radioprotection: from acute high doses to chronic low doses. *Frontiers in plant science* [Internet]. 2018;9:847. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00847/full>
 23. Spencer-Lopes MM, Forster BP, Jankuloski L. Manual on mutation breeding. [Internet]. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 2018. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183379823>
 24. Gupta N, Sood S, Singh Y, Sood D. Determination of lethal dose for Gamma Rays and Ethyl Methane Sulphonate induced mutagenesis in Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.). *SABRAO Journal of Breeding & Genetics* [Internet]. 2016;48(4). Available from: <https://web.a.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=10297073&AN=120099886&h=OvCd0eMLYeHznracVdaMp%2b%2bwdpJDsAjmnis3Sn1LPXmWwz4oHRU710dL3kv8QuXKufUS9KZ8S4CfXsEGsE09%2fw%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrlNotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d10297073%26AN%3d120099886>
 25. Bado S, Laimer M, Gueye N, Deme NF, Sapey E, Ghanim AMA, et al. Micro-tuber production in diploid and tetraploid potato after gamma irradiation of *in vitro* cuttings for mutation induction. *American Journal of Plant Sciences* [Internet]. 2016;7(14):1871. Available from: https://www.scirp.org/html/5-2602822_70993.htm
 26. Salis C, Papadakis IE, Kintzios S, Hagidimitriou M. *In vitro* propagation and assessment of genetic relationships of citrus rootstocks using ISSR molecular markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* [Internet]. 2017;45(2):383–91. Available from: <https://notulaeobotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/10900>
 27. Bordón Y, Guardiola JL, García-Luis A. Genotype affects the morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of Citrus rootstocks. *Annals of Botany* [Internet]. 2000;86(1):159–66. Available from: <https://academic.oup.com/aob/article/86/1/159/2588260?login=true>

28. Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, Lawrence SD, Cline K. Agrobacterium-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* [Internet]. 1992;11(5):238–42. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Susan-Lawrence-6/publication/258349507_Agrobacterium-mediated_transformation_of_Citrus_stem_segments_and_regeneration_of_transgenic_plants/links/5ec2d85d299bf1c09ac5c169/Agrobacterium-mediated-transformation-of-Citrus-stem-segments-and-regeneration-of-transgenic-plants.pdf
29. Olatunji D, Geelen D, Verstraeten I. Control of endogenous auxin levels in plant root development. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2017;18(12):2587. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/12/2587>
30. Kumar K, Gill MIS, Gosal SS. Somatic embryogenesis, *in vitro* selection and plantlet regeneration for citrus improvement. In: *Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 1* [Internet]. Springer; 2018. p. 373–406. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-78283-6_11
31. Alarcón M, Salguero J, Lloret PG. Auxin modulated initiation of lateral roots is linked to pericycle cell length in maize. *Frontiers in plant science* [Internet]. 2019;10:11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00011/full>
32. Vondras AM, Minio A, Blanco-Ulate B, Figueroa-Balderas R, Penn MA, Zhou Y, et al. The genomic diversification of clonally propagated grapevines. *bioRxiv* [Internet]. 2019;585869. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/585869v1.abstract>
33. Sarsu F, Penna S, Kunter B, Ibrahim R. Mutation breeding for vegetatively propagated crops. *Manual on Mutation Breeding*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, International Atomic Energy Agency, Vienna [Internet]. 2018;157–76. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183379823>
34. Arruda N, Cicero SM, Gomes FG. Radiographic analysis for the evaluation of polyembryony in Swingle citrumelo seeds. *Journal of Seed Science* [Internet]. 2018;40:118–26. Available from: <https://www.scielo.br/j/jss/a/SgLTBK4VdsdbJWbwSTj3cLK/abstract/?lang=en>
35. Dutt M, Erpen L, Grosser JW. Genetic transformation of the ‘W Murcott’ tangor: comparison between different techniques. *Scientia Horticulturae* [Internet]. 2018;242:90–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423818305260>
36. Poles L, Licciardello C, Distefano G, Nicolosi E, Gentile A, La Malfa S. Recent advances of *in vitro* culture for the application of new breeding techniques in Citrus. *Plants* [Internet]. 2020;9(8):938. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/8/938>