

EL ORIGEN DE LAS ESPECIES CULTIVADAS DE CITRICOS

¹ Centro de Genómica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada (Valencia) España

² Departament de Genòmica Computacional. Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Valencia, España.

*talón_man@gva.es

INTRODUCCIÓN

El género *Citrus* está incluido en la subfamilia Aurantioideae, que pertenece a la familia Rutaceae. Esta familia, ampliamente distribuida por los trópicos, está formada por aproximadamente 160 géneros y 1.800 especies. Existen estudios previos que indican que el género *Citrus* apareció hace aproximadamente 7 millones de años (Pfeil and Crisp 2008) y que muchos de los cultivares actuales proceden de cruces a partir de cuatro especies ancestrales de cítricos: *Citrus reticulata* (mandarinos), *Citrus maxima* (pummelos), *Citrus medica* (Cidros) y *Citrus micrantha* (Nicolosi *et al.*, 2000; Barkley *et al.*, 2006, García-Lor *et al.*, 2012; Ollitrault *et al.*, 2012; García-Lor *et al.*, 2013). Si bien este aspecto relacionado con el origen ancestral de los grandes grupos de cítricos parece bien establecido, siguen existiendo discrepancias importantes sobre las relaciones filogenéticas de las especies derivadas.

En estos últimos años, la comparación de la secuencia del genoma del cloroplasto de distintas especies ha permitido trazar con mucha precisión la relación de parentesco materno entre las mismas. Los cambios que se producen en la secuencia de

Resumen

El género *Citrus* constituye uno de los cultivos de frutales de mayor importancia en el mundo. Sin embargo, el origen de las distintas especies de cítricos cultivados todavía no se ha establecido con certeza, a pesar de todos los estudios que se han realizado hasta la fecha. En este trabajo se presenta un análisis filogenético de 34 genotipos de cítricos a partir del genoma completo de su cloroplasto. Para realizar este estudio filogenético se han empleado polimorfismos de tipo SNP (cambios de una base), Indels (pequeñas pérdidas o ganancias de bases) y deleciones de gran tamaño (pérdidas de un gran número de bases) en la secuencia del ADN. Este abordaje complementario, que aporta una gran solidez al estudio, demuestra que los principales grupos de cítricos cultivados en la actualidad proceden de cruces entre especies de mandarinas ancestrales salvajes, pummelos, cidros y micranthas y que estos ancestros en algunos casos actuaron como parentales femeninos y en otros como parentales masculinos. Los datos sugieren que todas las especies de cítricos se originaron a partir de un ancestro común que diversificó hace 8 millones de años en el sudeste asiático probablemente mediante un fenómeno de especiación alopátrica, provocado por una o más barreras geográficas. A partir de estas especies ancestrales y mediante cruzamientos interespecíficos se generaron las especies tradicionales que conocemos en la actualidad. Los cultivares más modernos proceden a su vez, o bien de hibridaciones de estas variedades tradicionales o bien de mutaciones espontáneas posteriores. La mayoría de especies de cítricos que se cultivan en la actualidad proceden de cruces producidos entre 4 grupos de cítricos ancestrales: los cidros, las mandarinas silvestres, micrantha y los pummelos. Así, tanto el naranjo dulce como el naranjo amargo surgieron de sendos cruces entre especies de pummelos y mandarinas o bien entre sus híbridos. Mientras que la naranja amarga es un cruce directo entre estos dos parentales, la naranja dulce surgió de una hibridación entre retrocruces de dos híbridos independientes de pummelo-mandarino. El pomelo, por otro lado, es hijo de un pummelo y un naranjo dulce. El limón es el fruto de un naranjo amargo cruzado con un cidro. La lima Rangpur se obtuvo en un cruzamiento entre una mandarina con un cidro y la lima mejicana procede del cruce entre micrantha y un cidro. Las mandarinas tradicionales se originaron por cruces entre mandarinas ancestrales o más antiguas o bien entre éstas y los naranjos dulces. Los datos también indican que la mandarina Clementina se generó por un cruce entre el mandarino común (*C. deliciosa*) y un naranjo dulce (*C. sinensis*).

los distintos cloroplastos no suelen afectar a los genes, que son imprescindibles para el correcto funcionamiento de la maquinaria cloroplástica, de forma que en las secuencias génicas de los cloroplastos de las plantas, el número de genes así como su orden están altamente conservados. Esta característica permite la comparación entre las secuencias y el establecimiento de relaciones materno-filiales.

Los estudios previos diseñados para desentrañar las relaciones filogenéticas de los cítricos se han

basado en marcadores o secuencias parciales del ADN mitocondrial y/o cloroplástico (Pfeil and Crisp 2008; Bayer *et al.*, 2009; Penjor *et al.*, 2013) que ofrecen una visión bastante limitada del genoma. Hoy en día, la publicación de los genomas de referencia nuclear (Xu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014) y cloroplástico (Bausher *et al.*, 2006) de los cítricos, permite realizar estudios mucho más detallados y profundos sobre el origen, la domesticación y las relaciones filogenéticas del género *Citrus*. En este artículo se muestran los resultados de la comparación entre

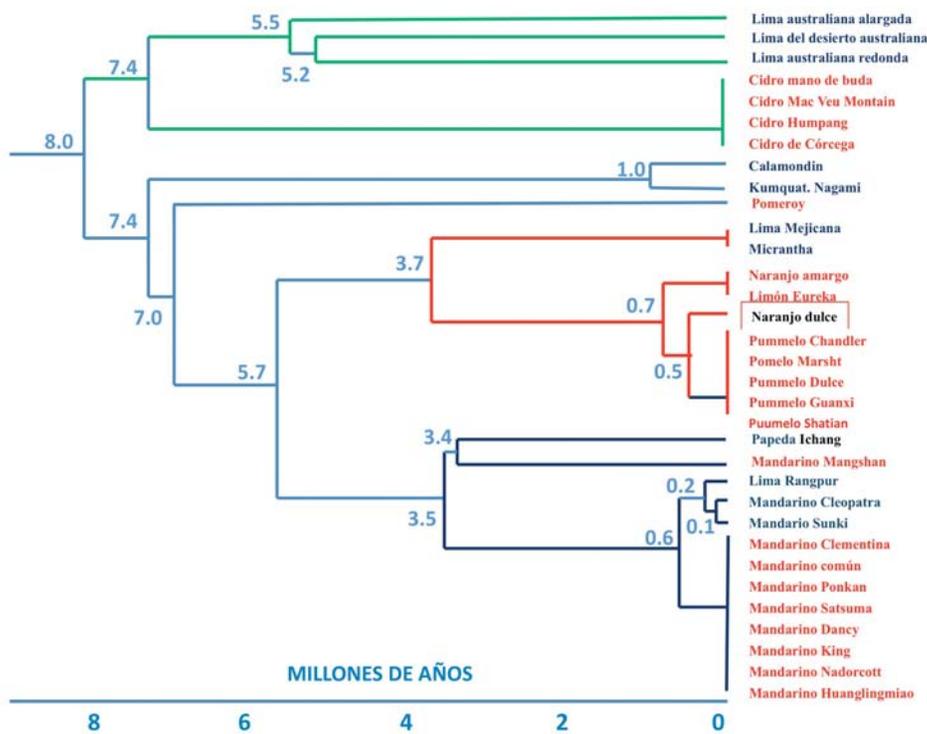


Figura 1.

Árbol filogenético del género Citrus obtenido a partir de las variantes identificadas en el genoma del cloroplasto de 34 genotipos de cítricos. Los 3 clados principales que se observan agrupan a los cidros y a especies australianas (clado en líneas verdes), pummelos y micranthas (clado en líneas rojas) y mandarinas y papedas (clado en líneas negras). La calibración temporal que dio lugar al cronograma que se presenta se llevó a cabo mediante un modelo de "reloj relajado". Las fechas de especiación inferidas en una escala de millones de años se presentan en la diversificación de los clados. El árbol se calibró utilizando estimaciones previas de la separación entre Severinia (no mostrada en la imagen) y el género Citrus.

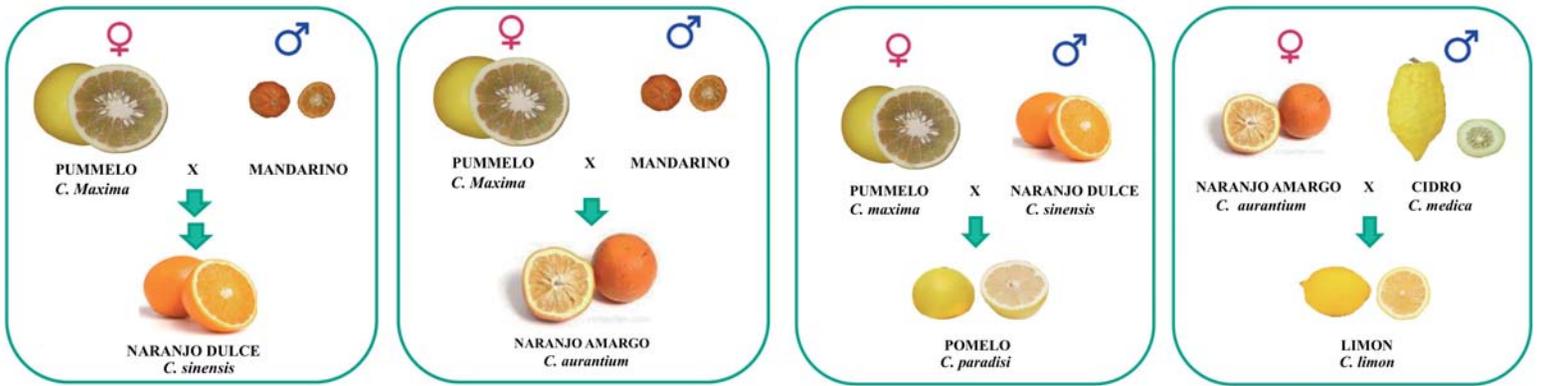


Figura 2. Identidad de las especies, determinación sexual de los parentales e hibridaciones interespecíficas que dieron lugar a las especies de naranja dulce, naranja amargo, pomelo y limón. La formación del naranja dulce probablemente implicó más de un retro-cruce adicional en dos híbridos interespecíficos independientes pummelo-mandarino. La especie ancestral de mandarino que intervino en estos cruces no ha sido identificada hasta la fecha y puede que exista hoy día como una especie silvestre en el sudeste asiático.

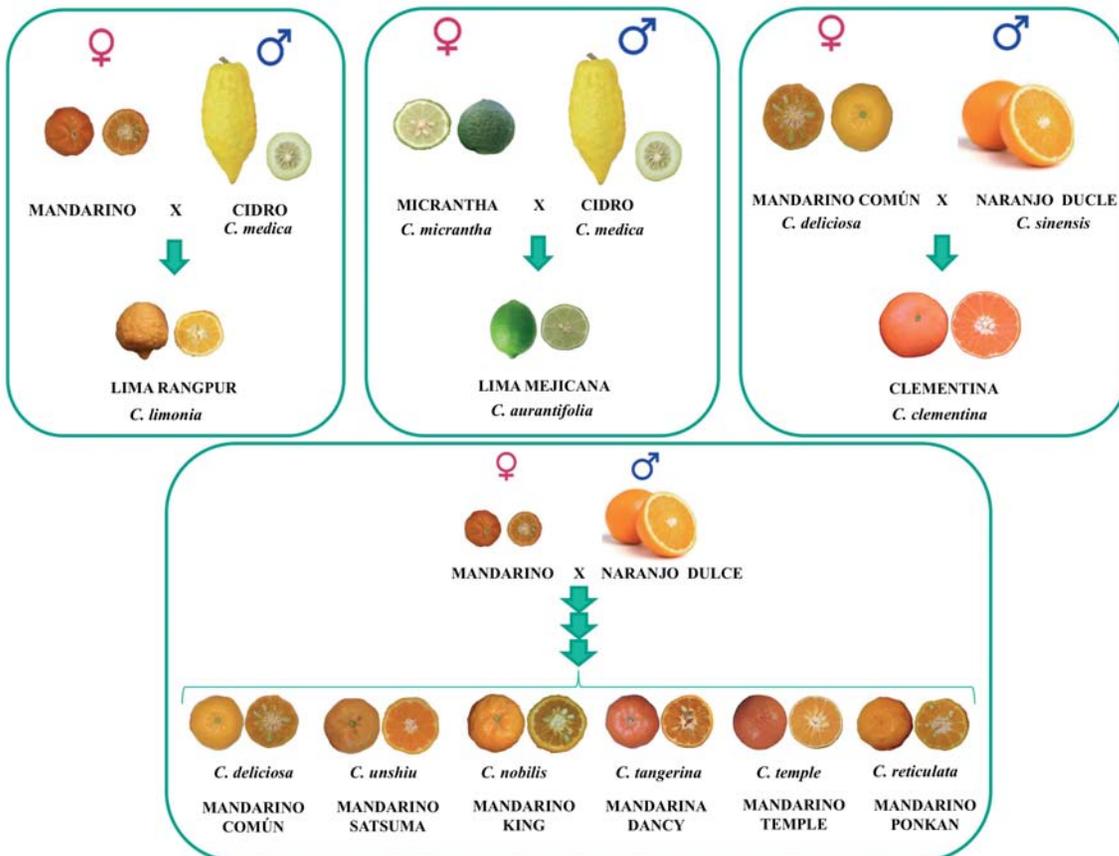


Figura 3.

Identidad de las especies, determinación sexual de los parentales e hibridaciones interespecíficas que dieron lugar a las especies de lima Rangpur, lima mejicana, a las variedades de mandarinas tradicionales y a la propia mandarina Clementina. La formación de mandarinas tradicionales probablemente implicó uno o varios retro-cruces adicionales de un primer híbrido mandarino ancestral-pummelo antes de la propia hibridación con la naranja dulce. La especie ancestral de mandarino que intervino en estos cruces iniciales no ha sido identificada hasta la fecha y puede que exista hoy día como una especie silvestre en el sudeste asiático. La mandarina Clementina es un híbrido directo del mandarino común y de la naranja dulce.



las secuencias de 34 genomas cloroplásticos representativos del género *Citrus* y de otras especies afines. En este trabajo, se han empleado varios tipos de marcadores moleculares: SNPs, Indels y variaciones estructurales presentes en el genoma del cloroplasto y que se han generado lo largo de la evolución del género *Citrus*. Esta información ha permitido construir la filogenia materna de las especies de cítricos más importantes.

Características generales de los grupos de cítricos

A continuación se describen someramente las características de las especies investigadas en este trabajo y que implican a cidros, pummelos, mandarinas, naranjos dulce y amargo, pomelos, lima mexicana, lima Rangpur, micrantha, Fortunellas, las especies australianas, *Poncirus* y papedas.

Cidro (*C. medica*). El cidro es un fruto de corteza gruesa, rugosa y de color amarillo o verde. Los frutos se utilizaron en medicina en el medievo y actualmente el cidro se utiliza fundamentalmente por su corteza en la fabricación de confituras y licores. Los gajos son muy ácidos. Su origen se sitúa en el sudeste asiático y se introdujo en el mediterráneo hace más de 2000 años.

Pummelo (*C. maxima*). Los frutos de pummelos son los más grandes que existen en los cítricos, presentan muchas semillas y una corteza gruesa, esponjosa y lisa de color amarillo o verdoso. Los gajos son dulces o ácidos según la variedad. Su origen se sitúa en el sudeste asiático.

Mandarinas. Es el grupo que mayor diversidad presenta, aunque el concepto popular de mandarina no corresponde a ninguna agrupación botánica. El término mandarina, en realidad, aglutina a los cítricos de pequeño tamaño que se pelan con

facilidad y presentan flavedo naranja. Se cree que las mandarinas ancestrales eran mandarinas de tamaño muy pequeño, llenas de semillas y probablemente muy ácidas, lo que las hacía poco atractivas para el consumo. Algunas mandarinas con poca palatabilidad son actualmente usadas como portainjertos, tal es el caso de la mandarina cleopatra (*C. reshni*) o del mandarino sunki (*C. sunki*). Las mandarinas tradicionalmente comestibles son mandarinas de mayor tamaño, menos ácidas y más succulentas, por lo que han sido consumidas con gran aceptación como por ejemplo, las mandarinas Ponkan e Imperial (*C. reticulata*). Otras mandarinas tradicionales son el mandarino común (*C. deliciosa*) que tiene un sabor y aroma inconfundibles, las tangerinas como la mandarina Dancy (*C. tangerina*), la mandarina Temple (*C. temple*), el mandarino King (*C. nobilis*) y las satsumas (*C. unshiu*). Las mandarinas más modernas proceden de cruces intraespecíficos entre variedades de mandarinas más tradicionales o bien de cruces interespecíficos con otras especies, principalmente de naranja dulce. En este grupo de variedades actuales se encuentran, por ejemplo, las Clementinas (*C. clementina*) y la mandarina Nadorcott (*C. reticulata*) entre otras.

Naranja amargo (*C. aurantium*). El fruto de naranja amargo es redondo, con corteza de color naranja cuando madura y pulpa amargo-ácida. Los frutos se usan en la elaboración de mermeladas y licores. También es usado como portainjerto, aunque debido a la presencia del virus de la tristeza, se restringe su uso a variedades de limón.

Naranja dulce (*C. sinensis*). En este grupo se incluyen las variedades de naranjas que se consumen actualmente, entre las que se distinguen 4 subgrupos: las naranjas navel, las blancas, las sanguinas y las que tienen poca acidez o sucreñas. Por lo general las naranjas tie-

nen la corteza naranja al madurar y su pulpa es primordialmente dulce, su tamaño es superior al de las mandarinas e inferior al de los pomelos y pummelos.

Lima mejicana (*C. aurantifolia*). El fruto de lima mejicana es pequeño, amarillo o verde, de pulpa ácida y muy aromática. Los frutos se utilizan tanto por su zumo como por su cáscara que es usada en repostería.

Lima Rangpur (*C. limonia*). El fruto de la lima Rangpur es pequeño, de pulpa muy ácida y presenta corteza y pulpa anaranjada. Se usa como ornamental y como portainjertos.

Micrantha (*C. micrantha*). Estos frutos son muy pequeños, están llenos de semillas y desarrollan una corteza fina, verdosa y rugosa. Los frutos son muy ácidos, amargos y no son comestibles, pero se usaron antiguamente en medicina. Se considera como una de las especies antiguas del género *Citrus*.

Kumquats (*Fortunella* sp.). Existen varias especies de kumquats que se distinguen por la forma de sus frutos que siempre son de tamaño pequeño, pulpa muy ácida, corteza y pulpa anaranjada y presentan abundantes semillas. Se usa como ornamental y como condimento en la alta gastronomía.

Poncirus (*Poncirus trifoliata*). Solo existe una única especie dentro del género *Poncirus*. Es el único cítrico caducifolio, sus hojas son compuestas y normalmente presentan tres folíolos. Se usa como portainjerto al igual que sus híbridos.

Severina (*Severina buxifolia*). Esta especie, que se propaga por semilla, presenta frutos no comestibles de tamaño inferior al de los kumquats. Es la que mayor resistencia presenta frente a las heladas, como el *Poncirus*. Carece de interés económico en la actualidad.

Especies de cítricos australianas.

Se cree que el centro de origen de estas especies se sitúa en el continente australiano, por lo que deben de haber evolucionado relativamente alejadas de las anteriores especies. Entre ellas destacan *Microcitrus australasica*, *Microcitrus australis* y *Eremocitrus glauca*. Todas ellas son resistentes a las condiciones de sequía y son cultivadas en la actualidad para usos gastronómicos. Se denominan caviar cítrico por la forma en la que las vesículas de zumo presentes en su pulpa se desgranar sin romperse, recordando a las huevas del esturión.

Papeda (*C. ichangensis*). La papeda Ichang presenta frutos pequeños, llenos de semillas y desarrollan una corteza fina y anaranjada que se pela con facilidad. Los frutos son muy ácidos y amargos y no son comestibles. No tiene importancia económica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de ADN

El ADN se extrajo de hojas jóvenes como se describe en Terol *et al.*, (2015) de 34 cultivares de cítricos procedentes de los bancos de germoplasma de Palermo, Córcega y del IVIA, así como de viveros autorizados de cítricos. Las 34 variedades utilizadas en el presente estudio están detalladas en la Tabla 1.

Abordaje genómico. Secuenciación y procesamiento de datos

El abordaje genómico, la secuenciación de los genomas cloroplásticos y el procesamiento de datos se realizó tal y como se describe en detalle en Carbonell-Caballero *et al.*, (2015).

RESULTADOS

El árbol filogenético obtenido mediante el análisis de los genomas del cloroplasto de las principales especies de cítricos (Figura 1) muestra que el género *Citrus* está compuesto por tres

Tabla 1. Identidad del cloroplasto inferida de la secuencia de ADN cloroplástica de distintas variedades y especies de cítricos y de especies relacionadas con los cítricos. Se ha realizado una traducción libre al español del nombre inglés de cultivares no presentes en nuestra citricultura.

Especie	Cultivar	Identidad del cloroplasto
<i>Citrus sinensis</i>	Naranja dulce	Pummelo
<i>Citrus aurantium</i>	Naranja amarga	Pummelo
<i>Citrus limon</i>	Limón Eureka	Pummelo
<i>Citrus maxima</i>	Pummelo Chandler	Pummelo
<i>Citrus paradisi</i>	Pomelo Marsh	Pummelo
<i>Citrus maxima</i>	Pummelo Dulce	Pummelo
<i>Citrus maxima</i>	Pummelo Guanxi	Pummelo
<i>Citrus maxima</i>	Pummelo Shatian	Pummelo
<i>Citrus aurantifolia</i>	Lima Mejicana	Micrantha
<i>Citrus micrantha</i>	Micrantha	Micrantha
<i>Citrus reticulata</i>	Mandarino Mangshan	Mangshan
<i>Citrus clementina</i>	Mandarino Clementina	Mandarino
<i>Citrus deliciosa</i>	Mandarino común	Mandarino
<i>Citrus reticulata</i>	Mandarino Ponkan	Mandarino
<i>Citrus unshiu</i>	Mandarino Satsuma	Mandarino
<i>Citrus tangerina</i>	Mandarino Dancy	Mandarino
<i>Citrus nobilis</i>	Mandarino King	Mandarino
<i>Citrus reticulata</i>	Mandarino Nadorcott	Mandarino
<i>Citrus reticulata</i>	Mandarino Huanglingmiao	Mandarino
<i>Citrus limonia</i>	Lima Rangpur	Mandarino
<i>Citrus reshni</i>	Mandarino Cleopatra	Mandarino
<i>Citrus sunki</i>	Mandarino Sunki	Mandarino
<i>Citrus ichangensis</i>	Papeda Ichang	Papeda
<i>Citrus madurensis</i>	Calamondin	Fortunella
<i>Fortunella margarita</i>	Kumquat Nagami	Fortunella
<i>Poncirus trifoliata</i>	Pomero	Poncirus
<i>Citrus medica</i>	Cidro mano de buda	Cidro
<i>Citrus medica</i>	Cidro Mac Veu Montain	Cidro
<i>Citrus medica</i>	Cidro Humpang	Cidro
<i>Citrus medica</i>	Cidro de Córcega	Cidro
<i>Microcitrus australasica</i>	Lima australiana alargada	Microcitrus
<i>Microcitrus australis</i>	Lima australiana redonda	Microcitrus
<i>Eremocitrus glauca</i>	Lima del desierto australiana	Eremocitrus
<i>Severinia buxifolia</i>	Naranja boj chino	Severinia

clados o ramas principales. En primer lugar tenemos el clado que agrupa a las especies de cítricos australianas y a los cidros, un segundo clado en el que se ubican los pummelos y micranthas y por último un tercer clado en el que se agrupan los mandarinos y las papedas. El ancestro de todos los cítricos probablemente apareció en el sudeste asiático hace aproximadamente 8 millones de años y se diversificó durante el siguiente millón de años. En una segunda radiación o intensificación de la diversidad ocurrida entre los 5,0 y 3,7 millones de años se separaron los cidros de las especies australianas, micrantha de los

pummelos y las papedas de los mandarinos. Una última radiación que comenzó hace aproximadamente medio millón de años y que se extiende hasta la actualidad diferenció al género *Fortunella*, la naranja dulce y amarga, los limones y las distintas clases de mandarinas (Figura 1). En estas circunstancias, debería tenerse en cuenta que estas últimas estimaciones, aquellas que afectan a las especies tradicionales y modernas cultivadas por el hombre, no son certeras puesto que los cambios introducidos en ellas no se deben al azar ni al paso del tiempo, sino a la efectividad de la propia domesticación.

Por otro lado, los resultados descritos por Carbonell-Caballero *et al.*, (2015) muestran que los genomas del cloroplasto del género *Citrus* contienen una “memoria” de la herencia paterna además de la materna, lo cual ha permitido construir y reforzar los conocimientos sobre las relaciones filogenéticas existentes dentro de este género. De este modo podemos conocer el origen de los principales grupos varietales de cítricos que se comercializan actualmente. El origen de estos grupos son resultados de cruces entre distintas especies de cítricos, principalmente cidros, mandarinas, naranjo amargo, naranjo dulce, pummelos, y micranthas.

Así, del cruce entre un pummelo (*Citrus maxima*) como parental femenino y una mandarina ancestral se originaron las naranjas amargas (*Citrus aurantium*), que pueden considerarse, por tanto, híbridos directos de estas especies. La naranja dulce (*Citrus sinensis*) (Figura 2) surgió de una hibridación entre retrocruces de dos híbridos iniciales e independientes de pummelo-mandarino.

Por otro lado, el naranjo amargo actuando como parental femenino hibridó con un cidro (*Citrus medica*) generando como resultado de este cruce el limón (*Citrus limon*). El pomelo, asimismo es el resultado de un cruzamiento entre el parental masculino naranjo dulce (*C. sinensis*) y el pummelo (*C. maxima*) (Figura 2).

Las mandarinas tradicionalmente cultivadas y comestibles, al parecer provienen de cruces entre naranjo dulce y algunas mandarinas más antiguas. Algunas de estas mandarinas, probablemente, son el resultado de mestizajes con diverso grado de penetración del genoma de pummelo en el genoma de las mandarinas ancestrales.

Los resultados también indican que la hibridación de las mandarinas con cidros produjo la lima Rangpur

(*C. limonia*). Otra lima, la lima mejicana (*C. aurantifolia*) se obtuvo con un cruce distinto al de la lima Rangpur. En este caso, fue una madre micrantha (*C. micrantha*) la que se cruzó con un cidro (*C. medica*) (Figura 3). Por último, las mandarinas clementinas se originaron por mutaciones espontáneas de Clementina Fina, cuyo origen es un cruce entre el mandarino común (*C. deliciosa*) como parental femenino y el naranjo dulce (*C. sinensis*) como parental masculino (Figura 3).

CONCLUSIONES

La mayoría de especies de cítricos que se cultivan en la actualidad tienen un origen híbrido. Estas especies proceden de cruces producidos entre 4 grupos de cítricos ancestrales: los cidros, las mandarinas silvestres, micrantha y los pummelos. Así, tanto el naranjo dulce como el naranjo amargo surgieron de sendos cruces entre las propias especies de pummelos y mandarinas o bien entre sus híbridos. Mientras que la naranja amarga es un cruce directo entre estos dos parentales, la naranja dulce surgió de una última hibridación entre retrocruces de dos híbridos iniciales e independientes de pummelo-mandarino. El pomelo, por otro lado, es hijo de un pummelo y un naranjo dulce. El limón es el fruto de un naranjo amargo cruzado con un cidro. La lima Rangpur se obtuvo en un cruzamiento entre una mandarina con un cidro y la lima mejicana procede del cruce entre micrantha y un cidro. Las mandarinas tradicionales se originaron por cruces entre mandarinas ancestrales o más antiguas o bien entre éstas y los naranjos dulces. Por tanto, se puede asumir que en general las mandarinas son el resultado de mestizajes, con diverso grado de penetración o de introgresión del genoma de pummelo en el genoma de las mandarinas. Los datos también indican que la mandarina Clementina se generó por un cruce entre el mandarino común (*C. deliciosa*) y

un naranjo dulce (*C. sinensis*).

AGRADECIMIENTOS

Los autores quisieran agradecer la colaboración de los bancos de germoplasma de Palermo, Córcega y del IVIA. También quisieran agradecer a nuestros compañeros Isabel Sanchís, Antonio Prieto y Ángel Boix por su colaboración en el trabajo de laboratorio y de campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bausher M.G., Singh N.D., Lee S.B., Jansen R.K., Daniell H. 2006. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Ridge Pineapple': organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Plant Biol* 6:21.
- Bayer R.J., Mabberley D.J., Morton C., Miller C.H., Sharma I.K., Pfeil B.E., Rich S., Hitchcock R., Sykes S. 2009. A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *Am J Bot* 96:668-685.
- Carbonell-Caballero J., Alonso R., Ibáñez V., Terol J., Talón 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* April 14.
- Nicolosi E., Deng Z., Gentile A., La Malfa S., Continella T.E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet* 100:1155-1166.
- Penjor T., Anai T., Nagano Y., Matsumoto R., Yamamoto M. 2010. Phylogenetic relationships of Citrus and its relatives based on rbcL gene sequences. *Tree Genet Genomes* 6:931-939.
- Pfeil B.E., Crisp M.D. 2008. The age and biogeography of Citrus and the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) in Australasia and New Caledonia. *Am J Bot* 95:1621-1631.
- Terol J., Ibanez V., Carbonell J., Alonso R., Estornell L.H., Licciardello C., Gut I., Dopazo J., Talon M. 2015. Involvement of a citrus meiotic recombination TTCrepeat motif in the formation of gross deletions generated by ionizing radiation and MULE activation. *BMC Genomics* 16:69.
- Wu G.A., Prochnik S., Jenkins J., *et al.*, 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat Biotechnol* 32:656-662.
- Xu Q., Chen L.L., Ruan X., *et al.*, 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet* 45:59-66.