

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**  
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos  
Departamento de Biotecnología



## Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española

*Borrador tesis doctoral*

*Presentada por:*  
Giovanni Pensabene Bellavia

*Dirigida por:*  
Dr. Oscar Olivares- Fuster  
Dr. Patrick Ollitrault  
Dr. Luís Navarro Lucas

**INSTITUTO VALENCIANO DE  
INVESTIGACIONES AGRARIAS**  
Centro de Protección Vegetal y Biotecnología

---

**ÍNDICE**


---

**INTRODUCCIÓN**


---

1	ORIGEN Y DIFUSIÓN DE LOS CÍTRICOS.....	1
2	CLASIFICACIÓN BOTÁNICA.....	2
3	IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS CÍTRICOS.....	6
4	NECESIDADES DE LA MEJORA DE CÍTRICOS.....	8
5	MEJORA GENÉTICA CLÁSICA EN LOS CÍTRICOS.....	12
	5.1 Selección clonal.....	12
	5.2 Mutagénesis inducida.....	12
	5.3 Hibridación sexual.....	13
6	MEJORA GENÉTICA MEDIANTE APROXIMACIONES BIOTECNOLÓGICAS.....	15
	6.1 Producción de triploides.....	15
	6.2 Variación somaclonal.....	17
	6.3 Selección asistida por marcadores moleculares.....	18
	6.4 Transformación genética.....	19
7	HIBRIDACIÓN SOMÁTICA DE CÍTRICOS.....	21
	7.1 Fundamento de la técnica.....	21
	7.1.1 Hibridación simétrica.....	22
	7.1.2 Hibridación asimétrica.....	23
	7.1.3 Ventajas de la hibridación somática frente a la mejora clásica.....	26
	7.2 Obtención y mantenimiento de callo embriogénico.....	27
	7.3 Aislamiento de protoplastos y regeneración de plantas.....	28
	7.4 Métodos de fusión.....	29
	7.5 Selección de los híbridos somáticos.....	33
	7.6 Caracterización de los híbridos somáticos.....	35
	7.7 Estado actual y perspectivas futuras de la hibridación somática.....	39
	<b>OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b>	<b>43</b>

---

---

**CAPÍTULO 1: Obtención de patrones de interés para la citricultura española mediante hibridación somática.**

---

1.1 IINTRODUCCIÓN.....	45
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
1.2.1 Obtención de una línea de callo embriogénico de <i>C. macrophylla</i> ...	52
1.2.2 Aislamiento de protoplastos.....	53
1.2.3 Fusión química.....	54
1.2.4 Fusión quimio-eléctrica.....	55
1.2.5 Fusión eléctrica.....	56
1.2.6 Evaluación de la tasa de fusión.....	58
1.2.7 Regeneración de híbridos.....	59
1.2.8 Trasplante.....	61
1.2.9 Comparación de los tres métodos de fusión.....	61
1.2.10 Caracterización de las plantas regeneradas.....	61
1.2.10.1 Determinación del nivel de ploidía.....	61
1.2.10.2 Conteo cromosómico.....	62
1.2.10.3 Caracterización molecular.....	62
1.2.11 Aplicación del método de fusión eléctrica a otros genotipos.....	63
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
1.3.1 Obtención de una línea de callo embriogénico de <i>C. macrophylla</i> ..	64
1.3.2 Optimización del método de fusión eléctrica.....	66
1.3.2.1 Análisis de ploidía.....	70
1.3.2.2 Análisis morfológico.....	73
1.3.2.3 Análisis genético con marcadores moleculares.....	75
1.3.3 Comparación de los tres métodos de fusión.....	76
1.3.4 Aplicación del método de fusión eléctrica a otros genotipos.....	80
1.4 CONCLUSIONES.....	82

---

**CAPÍTULO 2: Variabilidad molecular en los híbridos somáticos obtenidos tras la fusión de protoplastos de citrange Carrizo y de *C. macrophylla***

---

2.1 INTRODUCCIÓN.....	84
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	86
2.2.1 Material vegetal.....	86
2.2.2 Análisis genético con marcadores nucleares.....	86
2.2.3 Análisis de los electroferogramas.....	90
2.2.4 Análisis genético con marcadores citoplasmáticos.....	90
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	92
2.3.1 Caracterización molecular de los híbridos mediante marcadores nucleares.....	92
2.3.2 Caracterización molecular de los híbridos mediante marcadores citoplasmáticos.....	105
2.3.3 Caracterización nuclear de un híbrido somático entre <i>C. macrophylla</i> y <i>C. taiwanica</i> .....	108
2.4 CONCLUSIONES.....	110

---

**CAPÍTULO 3: Estudio del efecto de la radiación ultravioleta sobre protoplastos de cítricos**

---

3.1 INTRODUCCIÓN.....	112
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	117
3.2.1 Material vegetal.....	117
3.2.2 Aislamiento de protoplastos.....	117
3.2.3 Tratamiento con luz Ultravioleta.....	117
3.2.4 Cultivo de protoplastos tratados con UV.....	118
3.2.5 Viabilidad de protoplastos tratados con UV.....	118
3.2.6 Análisis por citometría de flujo de los protoplastos tratados con UV.....	119
3.2.7 Análisis de la fragmentación del genoma por electroforesis en gel de agarosa.....	120
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	121
3.3.1 Cultivo de protoplastos tratados con UV.....	121

3.3.2 Viabilidad de protoplastos tratados con UV.....	124
3.3.3 Análisis por citometría de flujo de los protoplastos tratados con UV.	129
3.3.4 Análisis de la fragmentación del genoma por electroforesis en gel de agarosa.....	137
3.4 CONCLUSIONES.....	141

---

**CAPÍTULO 4: Aislamiento de protoplastos de mesófilo de hojas de clementinas y otros híbridos de mandarinas.**

---

4.1 INTRODUCCIÓN.....	142
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	145
4.2.1 Protocolo general.....	145
4.2.1.1 Material vegetal.....	145
4.2.1.2 Purificación de protoplastos.....	145
4.2.1.3 Determinación del rendimiento de protoplastos.....	145
4.2.1.4 Análisis estadístico de los resultados.....	146
4.2.2 Influencia del material vegetal sobre el rendimiento en protoplastos.	147
4.2.2.1 Influencia del grado de desarrollo de las hojas sobre el rendimiento de protoplastos.....	147
4.2.2.2 Influencia de las condiciones de cultivo de las plantas sobre el rendimiento en protoplastos de las hojas.....	149
4.2.3 Optimización de las condiciones de aislamiento de protoplastos a partir de hojas de clementinas.....	149
4.2.3.1 Influencia de la composición de la solución enzimática sobre el rendimiento en protoplastos.....	149
4.2.3.2 Influencia de la velocidad de agitación y del soporte sobre el rendimiento en protoplastos.....	150
4.2.4 Aplicación del protocolo de aislamiento de protoplastos de clementinas a híbridos de clementinas y otros mandarinos.....	150
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	151
4.3.1 Influencia del material vegetal sobre el rendimiento en protoplastos.	151
4.3.1.1 Influencia del estado de desarrollo de las hojas sobre el rendimiento en protoplastos.....	151

---

4.3.1.2	Influencia de las condiciones de cultivo de las plantas sobre el rendimiento en protoplastos de las hojas.....	153
4.3.2	Optimización de las condiciones de aislamiento de protoplastos a partir de hojas de clementinas.....	155
4.3.2.1	Influencia de soluciones enzimáticas diferentes sobre el rendimiento en protoplastos.....	155
4.3.2.2	Influencia de la velocidad de agitación y del soporte sobre el rendimiento en protoplastos.....	157
4.3.3	Aplicación del protocolo de aislamiento de protoplastos a híbridos de clementinas y otros mandarinos.....	157
4.4	CONCLUSIONES.....	159

---

## **CAPÍTULO 5: Mejora de mandarinas basada en la hibridación somática**

---

5.1	INTRODUCCIÓN.....	160
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	164
5.2.1	Material vegetal.....	164
5.2.2	Aislamiento y fusión de protoplastos.....	164
5.2.3	Cultivo de protoplastos y regeneración de embriones.....	165
5.2.4	Caracterización de las plantas regeneradas.....	165
5.2.4.1	Análisis del nivel de ploidía.....	165
5.2.4.2	Caracterización nuclear.....	166
5.2.4.3	Caracterización citoplasmática.....	166
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	169
5.3.1	Análisis por citometría de flujo.....	170
5.3.2	Caracterización nuclear.....	170
5.3.3	Caracterización citoplasmática.....	174
5.4	CONCLUSIONES.....	176

---

**APÉNDICE: Los polimorfismos de conformación de ADN monocatenario (SSCP) como herramienta para identificar nuevos polimorfismos en marcadores microsatélites de cítricos**

---

A1 INTRODUCCIÓN.....	177
A2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	180
A2.1 Material vegetal.....	180
A2.2 Amplificación por PCR y electroforesis en geles de agarosa.....	180
A2.3 Análisis SSCP de los productos de PCR.....	181
A2.4 Clonación y secuenciación.....	182
A3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	183
A4 CONCLUSIONES.....	191
<b>FINAL CONCLUSIONS</b>	<b>192</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>194</b>
<b>ANEJO</b>	<b>220</b>

---

## INTRODUCCIÓN

### 1. ORIGEN Y DIFUSIÓN DE LOS CÍTRICOS.

Los cítricos son originarios de las zonas tropicales y subtropicales del Sureste Asiático y del Archipiélago Malayo, desde donde se distribuyeron a las otras regiones del mundo donde hoy se cultivan (Webber 1967).

No es fácil determinar con exactitud los centros de origen de las principales especies cultivadas debido a que muchas de ellas se han originado como consecuencia de hibridaciones naturales (Swingle & Reece 1967).

Tolkowsky (1938) considera que el centro de origen estaría ubicado en la región montañosa de sur de China y noroeste de la India, en las vertientes que están orientadas al sur o en los valles más protegidos de los vientos fríos y secos de la zona.

Tanaka (1954) propuso como zona de origen la región del noroeste de India y Burma, afirmando que el sur de China debería ser considerada una zona de sucesiva expansión junto con Indochina, Malasia, noroeste de Asia y Japón. Otros autores confirmaron la importancia de estas regiones como centro de origen de los cítricos por la diversidad de especies encontradas en la provincia de Yunnan (Gmitter y col. 1990).

Cooper y Chapot (1977), basándose en antiguos escritos, afirman que todas las especies conocidas de cítricos se originaron en China con la excepción de limonero y pomelo. Según esta fuente, el género monoespecífico *Poncirus* proviene del centro y norte de China, mientras que el género *Fortunella* del sur de China.

En una reciente revisión sobre el origen de las especies del género *Citrus*, Zaragoza (2007) afirma que todas provienen del sureste asiático: el cidro de noreste de India y Birmania, la zamboa del sureste de China, Indochina y Malasia y el mandarino del sureste de China. A partir de estas tres especies derivarían todas las restantes.

Existen muchas dudas sobre el origen de la mayoría de las especies de cítricos y muchas contradicciones entre los autores (Nicolosi 2007). Los únicos datos ciertos son que el cultivo de los cítricos se inició en China donde se produjo también la domesticación de muchas de las especies hoy conocidas (Calabrese 1998). La cita más antigua pertenece al *Libro de la Historia* (siglo V a.c. en China), donde se explica que durante el reinado de Ta-Yu (2205-2197 a.c.) se exigía como impuesto la entrega de algunos tipos de cítricos (podrían ser zambos o mandarinas) (Webber y col. 1967).



El cidro fue probablemente el primer cítrico que llegó a Europa y se supone que durante varios siglos fue también el único cultivado. Se utilizó como planta ornamental en Babilonia. Sucesivamente fue introducido en Egipto y Oriente Medio, llegando a Oriente Próximo y Grecia durante los tiempos de Alejandro Magno, siglo IV a.c. (Zaragoza 2007).

A partir del año 1150 los árabes contribuyeron de forma importante a la difusión de los cítricos en sus áreas de influencia del norte de África y sur de Europa, lo que supuso el origen de la citricultura en estas zonas.

Otra ruta de difusión más tardía fue la llevada a cabo por los cruzados, quienes en el siglo XIII descubrieron en oriente medio naranjas amargas, limones, zamboas y algunos híbridos de incierta identificación y los introdujeron en Europa (Zaragoza 2007). Durante este periodo los frutos eran apreciados más como medicamento que como alimento, ya que la acidez de la pulpa y la sequedad de la corteza hacían al fruto poco apetecible.

Se supone que las primeras variedades de naranja dulce llegaron a Europa gracias a los comerciantes genoveses o venecianos de finales del siglo XV, así como de las expediciones portuguesas a China (justificando el nombre de naranja de Lisboa o de Portugal) (Zaragoza 2007). Las primeras plantaciones de cítricos que se realizaron en la América recién descubierta fueron obra de españoles. Tuvieron lugar en la isla La Española (1493) y años después en Méjico (1518); desde allí se diseminaron al resto del continente: Brasil (mitad del siglo XVI), Florida (1515) y California (1769). Naranja, limón y zamboa llegaron a Sudáfrica a mitad del siglo XVII y a Australia a finales del siglo XVIII.

El comercio mundial de cítricos experimentó un fuerte incremento a partir de mediados del siglo XIX, concretándose en las zonas donde el cultivo podía desarrollarse con facilidad gracias a la climatología. A finales de este mismo siglo el comercio de España, sobre todo con Francia, comienza a ser relevante y la citricultura se transforma en una actividad lucrativa (Zaragoza 2007).

## **2. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA.**

Los cítricos pertenecen a la división de *Embriophyta Siphonogama*, subdivisión *Angiosperma*, clase *Dicotyledonae*, subclase *Rosidae*, superorden *Rutanae*, orden

*Rutales*. Las especies con interés comercial pertenecen a la familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantioideae*.

Según la clasificación propuesta por Swingle y Reece (1967) dentro de la subfamilia *Auratioideae* existen 2 tribus. La de mayor interés es la tribu *Citreae*, que presenta 3 subtribus una de las cuales es *Citrinae*, que contiene 13 géneros y 65 especies, incluido el género *Citrus* (tabla I.1).

El género *Citrus* es sin duda el de mayor interés y difusión. Incluye 16 especies de hoja perenne. El tamaño y la forma de los árboles es variable, desde erecta hasta globosa o desgarbada. La presencia de espinas en las axilas de las hojas es general aunque no es uniforme el tamaño y la dureza de las mismas. Las flores se organizan en inflorescencias uni y multiflorales; cada flor presenta 5 sépalos, 5 pétalos, 20-40 estambres soldados con polen no siempre fértil y 8-10 carpelos, cada uno de los cuales alberga entre 4 y 8 óvulos. El fruto es variable de forma (redonda, esférico-aplanada u oval) y color, y contiene numerosas glándulas de aceites esenciales. La pulpa está formada por vesículas que contienen el zumo, unidas por un filamento vascular a las paredes dorsales de los segmentos.

Entre los otros géneros de interés dentro de la subfamilia *Auratioideae* hay que destacar el género *Fortunella* (kumquat) caracterizado por el pequeño tamaño de las plantas y por sus frutos pequeños de forma redondeada y corteza dulce y comestible. También el género *Poncirus*, que posee una sola especie (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) con interés agronómico por ser utilizado como portainjerto. El género *Poncirus* se caracteriza por ser el único de la subtribu con hojas no perennes. Las hojas son trifoliadas y los frutos globosos presentan una superficie externa rugosa.

La clasificación botánica dentro del género *Citrus* presenta discrepancias entre distintos autores. La clasificación de Swingle y Reece (1967) reconoce la existencia de 16 especies y la de Tanaka (1954, 1961) 162 especies. La clasificación de Swingle sigue criterios más científicos que la de Tanaka, pero esta se adapta mejor a algunos grupos de interés agronómico, como las limas (divididas en tres especies) y los mandarinos (divididos en varias especies, entre ellas satsuma, clementina, mandarino común, tangerinas y mandarino “Cleopatra”), por lo que es generalmente más utilizada.

**Tabla I.1.** Taxonomía de la subfamilia *Aurantioideae* según Swingle y Reece (1967).

<b>TRIBU 1: <i>Clauseneae</i></b>	<b>(frutos citroideos remotos y muy remotos)</b>
<b>Subtribu 1: <i>Micromelinae</i></b>	<b>(frutos citroideos muy remotos)</b>
	<i>Micromelium</i>
<b>Subtribu 2: <i>Clauseninae</i></b>	<b>(frutos citroideos remotos)</b>
	<i>Glycosmis</i>
	<i>Clausena</i>
	<i>Murraya</i>
<b>Subtribu 3: <i>Merrillinae</i></b>	<b>(frutos citroideos remotos de gran tamaño)</b>
	<i>Merrillia</i>
<b>TRIBU 2: <i>Citrae</i></b>	<b>(frutos citroides y cítricos)</b>
<b>Subtribu 1: <i>Triphasiinae</i></b>	<b>(frutos citroides menores)</b>
	<i>Wenzelia</i>
	<i>Monanthocitrus</i>
	<i>Oxanthera</i>
	<i>Merope</i>
	<i>Tripashia</i>
	<i>Pamburus</i>
	<i>Luvunga</i>
	<i>Paramingnya</i>
<b>Subtribu 2: <i>Citrinae</i></b>	<b>(frutos cítricos)</b>
	<i>Severina</i>
	<i>Pleiospermium</i>
	<i>Burkillanthus</i>
	<i>Limnocitrus</i>
	<i>Hesperthusia</i>
	<i>Citropsis</i>
	<i>Atalantia</i>
	<i>Fortunella</i>
	<i>Eremocitrus</i>
	<i>Poncirus</i>
	<i>Clymenia</i>
	<i>Microcitrus</i>
	<i>Citrus</i>
<b>Subtribu 3: <i>Balsamocitrinae</i></b>	<b>(frutos citroides de piel dura)</b>
	<i>Swinglea</i>
	<i>Aegle</i>
	<i>Afraegle</i>
	<i>Aeglopsis</i>
	<i>Balsamocitrus</i>
	<i>Feronia</i>
	<i>Feroniella</i>

Estudios más recientes, basados en caracteres morfológicos (Barrett & Rhodes 1976; Handa & Oogaki 1985), en metabolitos secundarios (Scora & Malik 1970; Scora 1983), patrones de restricción de ADN mitocondrial (Green y col. 1986; Vardi 1988; Yamamoto y col. 1993), isoenzimas (Herrero y col. 1996; Ollitrault y col. 2003), RFLPs (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) (Roose 1988; Federici y col. 1998), RAPDs (polimorfismos en ADN amplificado aleatoriamente) (Luro y col., 1992; Federici y col. 1998), cantidad de ADN nuclear (Ollitrault & Michaux-Ferrière, 1992), SCARs (Sequence Characterized Amplified Region), marcadores cloroplásticos (cpDNA) (Nicolosi y col. 2000) y SSRs (Simple Sequence Repeat) (Barkley y col. 2006) indican que el género *Citrus* tiene tres especies básicas: zamboa, cidro y mandarino (*C. reticulata* (L.) Blanco). El resto de las especies del género se habrían originado mediante hibridaciones a partir de estas especies ancestrales (Federici y col. 1998; Nicolosi y col. 2000).

Las especies *C. halimii* B.C. Stone (Stone y col. 1974) y *C. tachibana* (Mack.) Tan. se consideran también especies silvestres muy antiguas en base a caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Cameroon & Soost 1982; Scora 1983; Luro y col. 1992; Herrero y col. 1996).

Desde un punto de vista agronómico y práctico podemos dividir los cítricos cultivados en ocho grupos bien definidos (Ortiz 1985):

- 1) Cidros (*Citrus medica* L.)
- 2) Limoneros (*C. limon* L. Burn f.)
- 3) Limas, destacan la lima “Mejicana” (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.), la lima “Rangpur” (*C. limonia* Osb.) y la lima “Tahití” (*C. latifolia* Tan.).
- 4) Mandarinos, entre los que destacan el grupo satsuma (*C. unshiu* (Mak.) Marc.), los clementinos (*C. clementina* Hort. ex Tan.), el mandarino común (*C. deliciosa* Ten.) y el mandarino “Cleopatra” (*C. reshni* Hort. ex Tan.)
- 5) Naranjos amargos (*C. aurantium* L.)
- 6) Naranjos dulces (*C. sinensis* (L.) Osb.)
- 7) Pomelos (*C. paradisi* Macf.)
- 8) Zamboas (*C. grandis* (L.) Osb. o *C. maxima*).

### 3. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS CÍTRICOS.

Los cítricos son el principal cultivo frutal del mundo. Se estima que en la actualidad el cultivo de los cítricos ocupa una superficie de 7,4 millones de hectáreas en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, aproximadamente entre los 40° de latitud Norte y los 40° de latitud Sur, aunque las principales áreas de producción se sitúan entre los 20° Norte y los 20° Sur.

La producción de cítricos está en continuo crecimiento y se estima que en el año 2007 se superaron los 110 millones de toneladas de frutos producidos (FAO, 2007) (tabla I.2.).

**Tabla I. 2.** Producción de fruta en el Mundo  
(1000 t)

<b>Tipo de cultivo frutal</b>	<b>Año 2007</b>
<b>Cítricos</b>	115.650,54
<b>Bananos y Plátanos</b>	115.407,28
<b>Uvas</b>	66.390,77
<b>Manzanas</b>	64.255,52
<b>otros frutos</b>	47.545,74
<b>Guayabas, mangos y mangostanes</b>	33.445,27
<b>Peras y membrillos</b>	20.595,36
<b>Piñas tropicales</b>	18.873,75
<b>Melocotones, (duraznos) y nectarinas</b>	17.457,08

FAOSTAT | © FAO Dirección de Estadística 2009.

Dentro de los cítricos las naranjas son el cultivo más abundante, con más de 60 millones de toneladas producidas en el año 2007, seguidas por el grupo de las clementinas y mandarinas con más de 24 millones de toneladas; posteriormente estarían limones y pomelos (tabla I.3.).

**Tabla I. 3.** Producción de cítricos en el Mundo (1000 t).

<b>Especie cultivada</b>	<b>Año 2007</b>
<b>Naranjas</b>	63.906,06
<b>Tangerinas, mandarinas y clementinas</b>	26.513,98
<b>Limonos y limas</b>	13.032,38
<b>Otros frutos cítricos</b>	7.137,08
<b>Toronjas y pomelos</b>	5.061,02

FAOSTAT | © FAO Dirección de Estadística 2009

Los principales países productores de cítricos en el mundo, de mayor a menor, son: Brasil, EE.UU., China, México y España. En Brasil y Florida (primera zona productora de EE.UU.) la citricultura está orientada a la producción de naranjas para la obtención de zumo concentrado, al contrario que en España donde la mayoría de la producción es destinada al mercado de fruta fresca.

España es líder mundial en exportaciones de cítricos frescos, sobre todo para el mercado de las mandarinas y clementinas donde supera la cantidad de 1,5 millones de toneladas de producto exportado anualmente (casi el 75% de la producción total de mandarinas en España). En total España exporta más del 50% de su producción de cítricos, lo que nos da una idea de la importancia económica que representa este cultivo para el país.

En el año 2007 la superficie de cultivo destinada a los cítricos en España era de aproximadamente 330.000 Ha (MAPA); esta superficie ha permitido alcanzar una producción de más de 6 millones de toneladas. Aproximadamente el 48% de la producción es de naranjo dulce, el 36% de mandarinos y el 16% de limones.

La mayor parte de la producción española de cítricos se realiza en la Comunidad Valenciana con más de 4 millones de toneladas (casi el 60% de la producción nacional) repartidos entre mandarinas y naranjas dulces. Así mismo, cabe destacar la producción de limones en la zona de Murcia y sur de Alicante.

La enorme importancia económica de la citricultura en España va asociada con algunos problemas, entre ellos el reducido tamaño de las explotaciones (parcelación minifundista del territorio), la escasez de mano de obra en épocas puntuales o el cultivo a tiempo parcial. La citricultura española se encuentra marcada también por una superproducción que en gran parte hay que recolectar y comercializar en un periodo de

tiempo bastante reducido; como consecuencia de este exceso en la oferta se registra un descenso importante en la cotización del producto. Todos estos factores han contribuido a que el cultivo de cítricos sea cada año menos rentable para los productores.

Por estos motivos, los retos que hay que superar para asegurar el futuro de la citricultura son principalmente la reducción de los costes de producción, la mejora de la calidad del producto final y la ampliación del calendario de oferta; esto se puede conseguir a través de la mecanización del cultivo, la mejora de las técnicas de post-recolección y la mejora genética de variedades y patrones.

#### 4. NECESIDADES DE LA MEJORA DE CÍTRICOS.

Los objetivos de los programas de mejora genética pueden variar considerablemente dependiendo de las necesidades de cada zona de cultivo. Desde aspectos relacionados con la producción y las características cualitativas de los frutos a aspectos relacionados con los estreses bióticos y abióticos que afectan las plantas.

La citricultura mundial ha estado condicionada por algunas enfermedades distribuidas en la mayor parte de zonas cítricas, que han causado grandes pérdidas económicas y limitado el uso de algunas variedades y patrones; tal es el caso de la gomosis, producida por el oomiceto *Phytophthora sp* (Timmer y col. 2000) y del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (Moreno y col. 2008). El CTV es un closterovirus que ha causado la muerte de unos 100 millones de árboles de naranjos y mandarinos injertados sobre naranjo amargo. Por esto, actualmente, el uso del naranjo amargo está restringido a las escasas zonas donde no se ha detectado el virus.

Otras enfermedades están restringidas a algunas áreas productoras, como por ejemplo el *Huanglongbing* (ex “greening”), producido por la bacteria *Candidatus Liberibacter spp* y transmitido naturalmente por *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae*. Es endémica de las zonas de Asia y África. Recientemente se ha descubierto esta enfermedad también en Brasil (en el año 2004) y Florida (en el año 2005), donde está causando daños muy graves que amenazan la supervivencia de las dos zonas de mayor producción en el mundo (Bové 2006).

La cancrrosis es otra enfermedad muy destructiva causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Es una enfermedad que se originó, probablemente, en India y que ahora está presente en las áreas cítricas de Florida, Sudáfrica y Australia y Sudamérica .

Otra bacteriosis, la clorosis variegada, causada por *Xylella fastidiosa* y transmitida por cicadélidos (Hartung y col. 1994), fue detectada por primera vez en Brasil en 1987 y también causa daños muy importantes.

El hongo *Phoma tracheiphila* causa daños relevantes en la zona del Mediterráneo oriental, sobre todo para el cultivo del limón, limitando además la utilización de algunos patrones.

El cultivo de los cítricos está limitado también por la presencia de estreses abióticos que pueden influir de manera determinante sobre la productividad de las plantaciones. Los daños que sufren los cítricos por la acción de agentes abióticos pueden ser en gran parte controlados a través el uso de patrones adecuados.

Entre las principales funciones de los patrones está la de facilitar la adaptación de las variedades a las diferentes condiciones ambientales en cada zona de cultivo. Por esto resulta de gran importancia la selección de genotipos que permitan cultivar cítricos en suelos salinos o alcalinos, ácidos, inundados, secos, y sobre todo con elevadas concentraciones de caliza (siendo estos los principales estreses abióticos en la zona de cultivo del Mediterráneo).

Actualmente la mejora de patrones está orientada a la obtención de nuevos genotipos que permitan una rápida entrada en producción y una elevada productividad. La elevada producción de semilla con alta poliembrionía es otro de los caracteres más buscados en los patrones, pues así se facilita la propagación y la uniformidad de las plantas obtenidas en vivero, además de reducir los costes de producción. La tolerancia a enfermedades como la tristeza y al hongo *Phytophthora* son características imprescindibles que deben presentar los nuevos patrones.

En los últimos años se está desarrollando un interés hacia los patrones tetraploides por su tolerancia a diferentes tipos de estreses y por su capacidad de controlar el crecimiento de las plantas.

En la citricultura moderna se utilizan muy pocos patrones por falta de genotipos que reúnan las características necesarias para su empleo en producción comercial. En España, por ejemplo, la mayoría de plantas están injertadas sobre el patrón citrange “Carrizo” (*C. sinensis* x *P. trifoliata*). Esto representa un gran riesgo para toda la citricultura ya que la hipotética aparición de una enfermedad específica provocaría daños parecidos a los sufridos con la aparición del virus de la tristeza. En aproximadamente un 40% de las nuevas plantaciones realizadas en España se utilizan patrones alternativos al “Carrizo” como, por ejemplo, el mandarino “Cleopatra”, que es



tolerante a tristeza y se adapta bien a suelos calizos. Pero su crecimiento y entrada en producción son muy lentos. Existen otros patrones como el naranjo amargo que presenta una excelente adaptación agronómica a diferentes condiciones ambientales, pero su elevada sensibilidad a la tristeza limita su empleo a las pocas regiones donde el virus no está presente. El “Alemow” (*C. macrophylla*, Wester) es un patrón que promueve una elevada y rápida entrada en producción y se adapta muy bien a suelos salinos y con elevado contenido de caliza, pero su sensibilidad a la tristeza, a las bajas temperaturas y el hecho de inducir la producción de frutos de una baja calidad limita su empleo.

Los objetivos de mejora de variedades también varían mucho dependiendo de la zona de producción y de la utilización que se da al producto. Para la fruta destinada al consumo en fresco de calidad la problemática es bastante generalizable. Las características cualitativas más importantes y buscadas en los cítricos para el consumo fresco son: elevada productividad, ausencia de semillas, época de maduración adecuada, tamaño relativamente grande (particularmente en mandarinos), facilidad de pelado, fácil separación de los segmentos, color de corteza atractivo, sabor y textura agradable, buena aptitud para la manipulación y el transporte.

En el grupo de los naranjos la estructura de variedades está razonablemente bien resuelta, ya que existen variedades de calidad que permiten la recolección desde la segunda quincena de octubre hasta principios de junio (en el hemisferio norte); se basa fundamentalmente en las variedades de los grupos Navel y Valencia.

En el grupo de las mandarinas existen importantes lagunas en la estructura varietal. Durante la primera parte de la campaña existen diversas variedades de satsumas y de clementinas que permiten una producción de aceptable calidad y sin semilla, aunque las clementinas tempranas podrían ser mejoradas sobre todo en lo que respecta a la calidad organoléptica y al tamaño de la fruta.

Las clementinas de media estación (que se recolectan entre principios de noviembre y finales de enero) son de excelente calidad, son autoincompatibles por lo cual no se polinizan entre ellas y la fruta no tiene semilla. No obstante tanto el polen como los óvulos son viables y pueden producirse polinizaciones cruzadas con otras especies.

Los híbridos tipo mandarino son las variedades introducidas en respuesta a la demanda de fruta tardía por los mercados internacionales. Las principales variedades cultivadas son “Fortune” (*C. clementina* x *C. tangerina*), “Nova” (*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)), “Ortanique” (*C. reticulata* x *C. sinensis*) y “Ellendale” (*C.*

*reticulata* x *C. sinensis*). Estas variedades tardías presentan calidades organolépticas inferiores a las de las clementinas y además son más difíciles de pelar. Aunque estos mandarinos son, al igual que las clementinas, autoincompatibles, tienen el grave inconveniente de permitir la polinización cruzada con las clementinas, provocando la formación de semillas en ambos grupos. Esto produce un gran problema comercial ya que los consumidores no aceptan frutos con semillas (Navarro 2005).

Por último la llegada a España del hongo *Alternaria alternata* ha producido graves daños a los cultivos de “Fortune” y ha obligado los agricultores a arrancar o sobreinjertar las plantaciones.

Las nuevas variedades de mandarinos híbridos “Nadorcot” (también conocida como “Afourer”) y “Moncada” han sido introducidas en España en los últimos años para sustituir a “Fortune”; éstas también inducen la formación de semillas, aunque presentan una mejor calidad de fruto.

Por todo ello la estructura varietal de los mandarinos no está resuelta y se hace necesaria la aplicación de programas de mejora adecuados (Navarro 2005).

España es el líder mundial en exportación de fruta fresca, gracias a la alta calidad de sus producciones. En los últimos años se ha observado una mejora en la calidad de las producciones en otros países productores, lo que unido a la mayor eficacia y rapidez de los medios de transporte y a la apertura de los mercados como consecuencia de los acuerdos sobre globalización y PAC (Política Agrícola Común), ha aumentado enormemente la competencia en los mercados internacionales. El mantenimiento de la hegemonía y competitividad de la citricultura española depende en gran medida de la disponibilidad de nuevas variedades y patrones. Muchas de las nuevas variedades seleccionadas están protegidas y resulta cada vez más complicado y oneroso poder disponer de ellas. La solución a esta problemática requiere la realización de programas de mejora genética que permitan colmar las importantes lagunas que existen en la colección de variedades y patrones disponibles para los agricultores.

La disponibilidad de material vegetal libre de virus y patógenos resulta de gran importancia para la citricultura de cualquier país. Los programas de saneamiento y cuarentena realizados en el IVIA y basados en técnicas de cultivo *in vitro* (Navarro y col. 1975; 1981; 2005) han permitido establecer un banco de germoplasma constituido por más de 550 genotipos que constituyen un recurso fitogenético muy importante para los programas de mejora genética. Entre los genotipos existentes en el banco de germoplasma están las variedades más utilizadas comercialmente, pertenecientes al

genero *Citrus*, así como también especies de géneros afines de la familia *Aurantioideae*. El conjunto de genotipos del banco de germoplasma ofrece un amplio recurso de genes o combinaciones de genes relacionados con resistencia a enfermedades, situaciones ambientales adversas, producción, calidad del fruto, etc., que facilita enormemente la realización de programas de mejora (Krueger & Navarro 2007).

## **5. MEJORA GENÉTICA CLÁSICA EN LOS CÍTRICOS.**

En todo el mundo se han adoptado y desarrollado programas de mejora genética con el fin de mejorar la calidad y cantidad de las producciones de cítricos. Entre las líneas de mejora tradicional empleadas en cítricos destacan: la selección clonal, la mutagénesis inducida y la hibridación sexual.

### **5.1 Selección clonal.**

La selección clonal ha sido el procedimiento que más resultados ha proporcionado en la obtención de nuevas variedades de cítricos. La aparición de mutaciones espontáneas en el campo es un evento relativamente frecuente en los cítricos, que indica una cierta inestabilidad genética de los mismos. Gracias a esto se han obtenido la gran mayoría de las variedades utilizadas comercialmente en el mundo. Cabe destacar la elevada frecuencia con la que surgen nuevas variedades en los grupos navel, clementinas y satsumas (Navarro 2005; Gmitter y col. 2007). Se ha propuesto que la inestabilidad genética de los cítricos se debe a la acción de elementos transponibles, que serían responsables de la aparición de mutaciones espontáneas (Breto y col. 2001).

### **5.2 Mutagénesis inducida.**

La mutagénesis inducida es una técnica con la cual se pretende variar uno o pocos caracteres de una variedad sin cambiar de forma significativa su fondo genético (Spiegel-Roy 1989). El tratamiento mutagénico se realiza sobre semillas o yemas axilares. La irradiación con rayos Gamma ha sido el agente mutante más utilizado en los programas de mejora de cítricos, aunque también se han utilizado otros tipos de radiaciones (X y UV) (Roose & Williams 2007).

La primera variedad de cítricos con interés comercial obtenida mediante el uso de esta técnica fue el pomelo “Star Ruby”. Se obtuvo irradiando semillas de pomelo “Hudson”. Posteriormente se obtuvo otra variedad de pomelo, la “Rio Red”, mediante irradiación del pomelo “Ruby Red” (Hensz 1971). Las características más destacables de estas variedades fueron por un lado su color rojo atractivo y por otro la ausencia de semillas, consecuencia de la aberración cromosómica producida por la rotura de cromosomas seguida de un apareamiento asimétrico de los extremos truncados (Froneman y col. 1996). Recientemente, gracias a los programas basados en la mutagénesis inducida, se han obtenido variedades de interés como la “Tango” (mutante de “Afourer” sin semilla) y la “Mor” (mutante de “Murcott” con número de semillas reducido) (Roose & Williams 2007). En España, irradiando ápices de la clementina “Clemenules” se ha obtenido la variedad “Nulessin” (Asins y col. 2002), este mutante se caracteriza por una fertilidad reducida. Actualmente en el IVIA se está llevando a cabo un programa de irradiación de varetas de diferentes variedades de mandarina tardío con la finalidad de obtener variedades que produzcan frutos sin semilla.

### 5.3 Hibridación sexual.

La hibridación sexual entre individuos diploides es la técnica que tradicionalmente se ha utilizado en los programas de mejora de cítricos. Sin embargo el número de genotipos de interés obtenidos con este tipo de mejora ha sido muy limitado. Este resultado es imputable, en parte, a factores que son comunes a todo tipo de especies leñosas, como por ejemplo el tiempo y el espacio necesario a desarrollar un programa de mejora de este tipo. Además, los cítricos poseen unas características específicas que dificultan aún más este tipo de mejora:

a) *Biología reproductiva compleja*: La esterilidad gamética (de polen y/u óvulos) de muchas de las variedades comerciales representa la principal barrera para el empleo de la mejora clásica por hibridación sexual. A ésta hay que añadir la auto-incompatibilidad gametofítica y la incompatibilidad cruzada que dificultan aún más el trabajo de hibridación (Frost & Soost 1968; Soost 1969; Soost & Cameroon 1975).

La apomixis o embrionía nucelar es un tipo de reproducción asexual que se produce a partir de la nucela de la semilla y permite la obtención de plantas idénticas a la planta madre. La apomixis es característica de la mayoría de los genotipos de cítricos e influye notablemente en la aplicación de métodos de mejora por hibridación. La

formación de embriones nucelares impide la formación y/o dificulta el desarrollo de los embriones sexuales, por lo que resulta difícil obtener poblaciones elevadas de genotipos recombinantes. La consecuencia de todo esto es que sólo es posible utilizar un número limitado de genotipos no apomícticos como parentales femeninos en las hibridaciones sexuales.

b) *Heterozigosis*: Diversos estudios han demostrado la elevada tasa de heterozigosis existente en los cítricos (Soost & Cameroon 1975; Ollitrault y col. 2003). Esto hace muy difícil reunir en un híbrido los caracteres deseados de los parentales. A esto se añade el problema de la depresión por endogamia que muchas veces se observa en la progenie híbrida (Torres 1936; Frost & Soost 1968; Barrett & Rhodes 1976).

c) *Desconocimiento genético básico*: No se conoce con suficiente profundidad el tipo de herencia de los caracteres agronómicos de interés, particularmente los que están relacionados con la calidad de la fruta. Esto impide la planificación de cruzamientos que permitan desarrollar un programa de mejora dirigido, adecuado y eficaz.

d) *Juvenilidad*: Los cítricos tienen un periodo de juvenilidad que dura entre 5 y 8 años, durante el cual no se produce floración ni fructificación (Soost & Cameroon 1975). Esto obliga a largos periodos de cultivo antes de poder analizar las poblaciones obtenidas e impide en la práctica la obtención de sucesivas generaciones segregantes en programas de retrocruzamiento.

e) *Escasez de marcadores moleculares ligados a caracteres de interés*: Existen pocos marcadores relacionados con caracteres de interés, por lo que no es posible realizar una mejora asistida por marcadores (MAS). Esto implica que se tarde mucho en la evaluación de los híbridos obtenidos.

Todo esto explica las dificultades que conlleva la aplicación de la hibridación sexual en la mejora de cítricos y el por qué es tan difícil dirigir la mejora hacia a los objetivos fijados. Entre los escasos éxitos obtenidos mediante la mejora clásica de patrones cabe citar los híbridos intergenéricos que originaron los citranges (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) o los citrumelos (*C. paradisi* x *P. trifoliata*). Recientemente se han obtenido nuevos híbridos de interés entre las especies de *Citrus* y *Poncirus* (Forner 2003). Otro de los logros de la hibridación sexual fue la obtención de híbridos interespecíficos que han tenido algún éxito como variedades de interés comercial. Entre estos destacan los híbridos tipo mandarino “Nova”, “Fortune” y “Moncada”.

## 6. MEJORA GENÉTICA MEDIANTE APROXIMACIONES BIOTECNOLÓGICAS.

La introducción de la biotecnología en la mejora genética vegetal ha permitido resolver algunos de los problemas de la mejora clásica y alcanzar objetivos de una forma menos aleatoria y más precisa, con un gran ahorro de tiempo y recursos. Técnicas como el cultivo de tejidos *in vitro* pueden mejorar el rendimiento de la mejora clásica y permitir aprovechar todo su potencial. Las técnicas biotecnológicas más aplicadas para la mejora genética de plantas, y en particular de los cítricos, están expuestas en los siguientes apartados.

### 6.1 Producción de triploides.

En el género *Citrus* y en los géneros relacionados (*Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Eremocitrus*, *Citropsis*, *Murraya*) el número de cromosomas gaméticos es  $x=9$ , y los individuos diploides son los más habituales. Sin embargo se han encontrado o inducido genotipos euploides y aneuploides, sobre todo tetraploides y triploides.

Los cambios en el nivel de ploidía modifican algunas características de la planta que pueden resultar favorables bajo un punto de vista agronómico.

En particular existe un gran interés para la selección de genotipos triploides por su posible empleo como variedades cultivadas. Los genotipos triploides son estériles y producen frutos sin semillas, además de no inducir la producción de semillas en otras variedades. Esta esterilidad se debe a que durante la meiosis de las plantas triploides se originan asociaciones multivalentes entre los cromosomas, originando la formación de gametos con distintas dotaciones cromosómicas que reducen la viabilidad de los mismos (Soost & Cameroon 1969).

Los métodos más utilizados para la obtención de variedades triploides se basan en tres diferentes tipos de cruzamientos (Cameroon & Frost 1968; Navarro y col. 2003; Recupero y col. 2005; Ollitrault y col. 2007):

a) *Cruzamientos entre parentales femeninos y masculinos diploides (2x con 2x).*

En este tipo de cruzamiento las plantas triploides se obtienen gracias a anomalías que se producen durante la meiosis y que llevan a la formación de gametos femeninos no reducidos (2x) que se fecundan con gametos masculinos

haploides dando lugar a híbridos triploides. La mayor limitación de este procedimiento es el escaso número de genotipos no apomícticos que producen gametos femeninos no reducidos con una incidencia suficiente para su utilización en programas de mejora.

- b) *Cruzamientos entre parentales femeninos diploides y masculinos tetraploides parentales (2x x 4x).*

Este cruzamiento es el método más clásico para obtener triploides. Los híbridos derivan de la fecundación de un óvulo haploide por parte de un grano de polen diploide que procede de la reducción de un parental tetraploide. La escasa disponibilidad de parentales tetraploides de calidad es la gran limitación de este tipo de cruzamiento.

- c) *Cruzamientos entre parentales femeninos tetraploides y parentales masculinos diploides (4x x 2x).*

En este tipo de cruzamiento los híbridos triploides se originan a partir de la fecundación de un gameto femenino reducido diploide (que procede de una planta tetraploide) y un gameto masculino haploide. La ventaja de este tipo de cruzamiento es que permite el uso de un gran número de parentales masculinos. El problema principal está en las enormes dificultades de conseguir parentales femeninos tetraploides no apomícticos de calidad.

Para todos los tipos de cruces interploides descritos existen algunas limitaciones que obstaculizan la obtención de híbridos triploides: la existencia de muy pocos parentales tetraploides, el aborto de la mayoría de las semillas que contienen embriones triploides y el análisis del nivel de ploidía de los híbridos obtenidos.

Los avances realizados durante los últimos años en el campo de la biotecnología aplicada a la mejora de cítricos han permitido encontrar soluciones que han facilitado notablemente la obtención de triploides. En primer lugar se ha incrementado la cantidad de parentales tetraploides disponibles. Aunque la duplicación del número de cromosomas puede ocurrir de forma espontánea (Cameroon & Frost 1968; Lee 1988) existen técnicas biotecnológicas que pueden favorecer la obtención de este tipo de plantas. Entre ellas el cultivo *in vitro* con colchicina de: óvulos inmaduros (Gmitter y col. 1991), brotes originados a partir de segmentos de epicotilo (Latado y col. 2007), protoplastos de callo embriogénico (Zeng y col. 2006) y también a través del tratamiento directo de brotes de un año (Wakana y col. 2005). Sin embargo, el tratamiento *in vivo* de yemas con colchicina genera muchas veces la formación de citoquimeras sin interés para la mejora (Barrett 1974; Oiyama & Okudai 1986; Jaskani y col. 2007). Para obviar este problema se ha puesto a punto otra técnica que usa ápices

meristemáticos de plantas adultas tratados con colchicina que son microinjertados *in vitro* para la regeneración de autotetraploides (Juárez y col. 2004; Aleza 2006). Esta técnica tiene la doble ventaja de utilizar material adulto, que produce flores rápidamente para poder ser utilizados en cruces sexuales, y además limita la formación de citoquimeras al tratar una porción de tejido tan reducida como puede ser un ápice meristemático. Por último, también la hibridación somática puede ser un recurso para la obtención de alotetraploides, que pueden ser empleados en hibridaciones interploides para obtener plantas triploides (Oiyama y col. 1991; Guo y col. 2000; Grosser y col. 2000; Tusa y col. 2002) (este aspecto se revisará con más detalle en el siguiente apartado 7 sobre la hibridación somática).

El rescate y sucesivo cultivo *in vitro* de embriones ha permitido obtener plantas a partir de las semillas abortadas y solucionar así otro de los grandes problemas en la obtención de híbridos triploides (Starrantino y col. 1981; Ollitrault y col. 1996; Navarro y col. 2002; Vilorio y col. 2005).

También se ha descrito la obtención de triploides a partir del cultivo *in vitro* de tejido de endospermo (único tejido triploide) (Gmitter y col. 1990; Thomas & Chaturvedi 2008) y a través de hibridaciones somáticas utilizando un parental haploide y uno diploide (Kobayashi y col. 1997; Ollitrault y col. 2000b). Estas últimas dos técnicas no se emplean habitualmente dado su escaso rendimiento.

La aplicación de la citometría de flujo para la determinación de los niveles de ploidía de las plantas ha permitido reducir enormemente el tiempo necesario para la identificación de híbridos triploides, que de otra forma podía realizarse solamente con estudios de tipo histológico (Ollitrault y col. 1992; Navarro y col. 2002).

Todos estos avances han permitido el desarrollo de programas de obtención de triploides por parte de diferentes grupos de investigación en España, Italia, EE.UU. y Japón. Algunos de los híbridos triploides obtenidos se han protegido o patentado y se están explotando comercialmente.

## 6.2 Variación somaclonal.

La variación somaclonal puede ser definida como la variación genética o epigenética heredable que aparece en las células y plantas regeneradas como consecuencia del cultivo *in vitro* (Díaz y col. 2004). Este proceso, que fue denominado



variación somaclonal por Larkin y Scowcroft (Larkin & Scowcroft 1981), incluye cambios en el ADN tanto a nivel nuclear como a nivel citoplasmático.

Los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal no han sido completamente dilucidados, pero entre sus causas se mencionan alteraciones en el cariotipo, mutaciones puntuales, recombinación somática e intercambio de cromátidas hermanas, reorganizaciones genéticas a nivel somático, elementos genéticos transponibles, amplificación y/o metilación del ADN o cambios en el ADN de los orgánulos citoplasmáticos (Díaz y col. 2004).

La frecuencia con la que actúan estos mecanismos depende también de factores extrínsecos al genotipo en cuestión, entre los cuales destacan la fuente de explanto, el tiempo en que el material ha estado cultivado *in vitro*, las condiciones de cultivo y la composición del medio de cultivo, o la vía de regeneración, donde la embriogénesis somática generaría menores alteraciones que la organogénesis adventicia (Díaz y col. 2004).

Los cambios producidos por la variación somaclonal son generalmente indeseables o suceden sin manifestarse en cambios morfológicos evidentes, pero la aparición ocasional de caracteres no encontrados en las poblaciones naturales y que representan una ventaja desde el punto de vista agronómico (tolerancia a algún tipo de estrés o enfermedad, cambios deseables en la calidad del fruto, etc.) permite utilizar este fenómeno en programas de mejora genética (Dewald & Moore 1987).

En los cítricos la variación somaclonal se está utilizando en Florida en un programa de mejora de naranjo dulce basado en la regeneración via embriogénesis (a partir de protoplastos y callos nucelares) u organogenesis (a partir de entrenudos de plantas de origen nucelar) de nuevas variedades. Este programa ha permitido obtener algunas variedades de interés comercial con cambios en la época de maduración, la calidad de la fruta y el contenido en semillas (Grosser y col. 2007).

### **6.3 Selección asistida por marcadores moleculares.**

La selección asistida por marcadores es un método de mejora que se basa en la identificación de marcadores polimórficos que estén asociados a genes de interés agronómico. La identificación de estos marcadores permitiría seleccionar de una forma rápida y eficaz todos los genotipos de una población segregante que presenten el

carácter de interés, resultando en una población reducida que facilitaría las evaluaciones posteriores.

El hecho de poder trabajar en campo con poblaciones no muy amplias aumenta la eficiencia de la selección y supone un importante ahorro de tiempo y recursos, sobretodo en plantas leñosas con largos periodos juveniles. La eficacia de este tipo de selección depende de la densidad del mapa de ligamiento, es decir, del número de marcadores y de su cercanía a los genes de interés que se desea transferir (Lande & Thompson 1990; Zhang & Smith 1993).

En cítricos se han desarrollado en los últimos años un elevado número de marcadores microsatélites que actualmente permiten la elaboración de mapas genéticos más precisos (Luro y col. 2008; Terol y col. 2008). Sin embargo resulta aún muy escaso el número de marcadores asociados a caracteres de interés. Solamente se conocen algunos marcadores asociados a genes de resistencia a la virus de tristeza identificados en el genoma de *Poncirus trifoliata* (Gmitter y col. 1996; Mestre y col. 1997; Fang y col. 1998). También se han identificados marcadores relacionados con genes que controlan la cantidad de ácido cítrico en los frutos (Fang y col. 1998), la embrionía nucelar (García y col. 1999), la tolerancia a nematodos (Ling y col. 2000) y la tolerancia a salinidad (Tozlu y col. 1999).

#### **6.4 Transformación genética.**

La transformación genética es una técnica que permite la incorporación de uno o pocos genes en un genotipo sin alterar su fondo genético. Esto significa que la transformación genética puede ser empleada para mejorar genotipos élite introduciendo genes que confieran caracteres deseables sin los inconvenientes de la hibridación sexual, aspecto fundamental en el caso de los cítricos dado su elevado nivel de heterocigosis. Además los genes incorporados no tienen que proceder necesariamente de otros cítricos, sino que pueden ser aislados a partir de otros organismos.

En cítricos es posible realizar la transformación de plantas vía embriogénesis somática (Hidaka y col. 1990; Vardi y col. 1990), aunque resulta más común la transformación via organogénesis a partir de diferentes tipos de explantes (como por ejemplo fragmentos de epicotilo de plántulas o entrenudos de brotes de plantas cultivadas en invernadero) (Moore y col. 1992; Kaneyoshi y col. 1994; Peña y col. 1995).

La selección de una cepa de *Agrobacterium* adecuada, la optimización de las condiciones de infección y co-cultivo, el uso de material vegetal en estado fisiológico óptimo, la aplicación de las técnicas de microinjerto de yemas o brotes al material vegetal transgénico, la identificación de las células competentes para la transformación y el uso de marcadores genéticos se consideran aspectos fundamentales para conseguir una alta frecuencia de transformación (Peña y col. 2004; Peña y col. 2007).

El desarrollo de técnicas para la transformación de material vegetal adulto puestas a punto en el IVIA han permitido reducir al máximo el intervalo de tiempo entre la transformación, la floración y la fructificación de las plantas, lo que supone una enorme ventaja en los programas de mejora genética de cítricos (Cervera y col. 1998).

La transformación genética está siendo empleada en cítricos para introducir genes que puedan generar resistencia a patógenos como la *Phytophthora* (Fagoaga y col. 2001), el virus del mosaico (Iwanami y col. 2004), la cancrrosis de los cítricos (Boscariol y col. 2006) y el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) (Dominguez y col. 2000; Ghorbel y col. 2000; Rai 2006).

Otros logros destacables son la introducción de genes implicados en el metabolismo de giberelinas para controlar el tamaño de las plantas (Fagoaga y col. 2003), la expresión constitutiva de los genes "leafy" y "apetala" para acortar el periodo de juvenilidad (Peña y col. 2001) y el desarrollo de procedimientos que permitan la eliminación de los genes de selección (Ghorbel y col. 1999; Dominguez y col. 2004; Ballester y col. 2008).

## 7. HIBRIDACIÓN SOMÁTICA DE CÍTRICOS.

### 7.1. Fundamentos de la técnica.

La hibridación somática o fusión de protoplastos es una herramienta biotecnológica que ha sido ampliamente empleada en la mejora genética de vegetales. La técnica se basa en el aislamiento y posterior unión de dos células no sexuales (somáticas) privadas de pared celular (protoplastos), para formar una única célula híbrida, denominada heterocarionte, a partir de la cual se puede regenerar una planta completa empleando técnicas de cultivo *in vitro*.

En la hibridación sexual los gametos (o células sexuales) se originan tras un proceso de meiosis que reduce a la mitad el número de cromosomas y además induce recombinación entre los cromosomas homólogos. La unión de los dos gametos (con número "x" de cromosomas) da origen a un nuevo individuo que presentará un número de cromosomas igual al de sus parentales (2x, diploide). La diferencia principal entre la hibridación sexual y la hibridación somática es que en esta última se suman los genomas de dos células somáticas, que no han sufrido la recombinación ni reducción previa. Esto significa que si los parentales de partida son diploides y cada uno de sus núcleos presenta 18 cromosomas (como es el caso de los cítricos), la planta híbrida obtenida tras la fusión de protoplastos será tetraploide (4x) y presentará un total de 36 cromosomas. Los híbridos así obtenidos contienen el genoma de ambos parentales y pueden expresar los caracteres de ambos; sin embargo muchas veces hay una expresión parcial o combinada de los dos genomas.

La técnica aprovecha uno de los principios básicos de la biología vegetal que es la totipotencia, definida como la capacidad que posee cualquier célula vegetal de regenerar una planta entera. En cítricos solamente se han desarrollado protocolos que permiten regenerar plantas a partir de células de callo embriogénico de origen nucelar (Vardi y col. 1982; Kobayashi y col. 1983). El callo es un tejido constituido por células indiferenciadas a partir de las cuales es posible inducir la formación de embriones (embriogénesis) u órganos diferenciados (organogénesis). El callo de cítricos con mejor capacidad embriogénica es el que se obtiene a partir del cultivo *in vitro* de la nucela. Este es un tejido esporofítico que rodea el saco embrionario y que constituye la parte fundamental de los óvulos; su función es la de sustentar el desarrollo de los embriones que se encuentran en la semilla. En especies apomícticas de cítricos los frutos recolectados entre 2 y 8 semanas tras la antesis contienen óvulos que una vez cultivados

*in vitro* producen embriones y pequeñas proliferaciones de callo a partir del tejido nucelar. Este callo es ideal para ser utilizado en programas de hibridación somática ya que es genéticamente idéntico al tejido nucelar, a partir del cual se ha regenerado, y además presenta una buena capacidad embriogénica *in vitro*.

En las hibridaciones somáticas de cítricos se suelen utilizar dos tipos de protoplastos: los que provienen de mesófilo foliar (para los cuales no se dispone de protocolos de regeneración y embriogénesis *in vitro*) y los que se obtienen a partir de callo embriogénico mantenido en forma de suspensión celular o en cultivo sobre placa. La capacidad de regeneración se mantiene en las células híbridas obtenidas tras la fusión, por lo que es posible regenerar plantas enteras a partir de ellas.

### **7.1.1 Hibridación simétrica.**

Se denominan híbridos somáticos simétricos aquellos que se generan a partir de la suma completa de los genomas nucleares de dos parentales, y tienen la particularidad de expresar los caracteres de ambos en una única planta.

La aplicación de la hibridación somática en la mejora de cítricos ha permitido la obtención de muchos genotipos tetraploides con finalidades diferentes. Sin embargo son muy pocos los híbridos somáticos que producen frutos de buena calidad, y que podrían ser utilizados directamente como variedades cultivadas. En el Citrus Research and Education Center (CREC, Florida, EEUU) se está realizando la evaluación en campo de algunos de estos híbridos para poder definir su valor como variedad cultivada (Guo y col. 2004b; Grosser y col. 2000a; Grosser & Gmitter 2005).

Las principales aplicaciones de los híbridos somáticos simétricos son:

a) *Mejora de patrones:*

La hibridación somática ofrece la posibilidad de sumar los caracteres favorables de dos genotipos en una única planta, sin los inconvenientes relacionados con la heterozigosis y la segregación. Para ello se han llevado a cabo programas de mejora utilizando parentales complementarios que sean tolerantes a estreses bióticos (producidos por hongos, bacterias, virus, etc.) y abióticos (como salinidad, alcalinidad, bajas temperaturas, etc.) (Grosser & Gmitter 2005; Medina-Urrutia y col. 2004). Además, las plantas poliploides presentan un mayor nivel de tolerancia a salinidad y estrés hídrico (Mouhaya y col. 2008; Saleh y col. 2008) y también permiten reducir el crecimiento de la planta sin alterar la calidad de la producción (Schwarz 2001).

b) *Parentales tetraploides para programas de obtención de triploides:*

Una de las principales aplicaciones de los híbridos somáticos tetraploides en la mejora de variedades de cítricos es su utilización como parentales para la obtención de híbridos triploides. La fusión de protoplastos permite obtener híbridos tetraploides fértiles a partir de variedades estériles o apomícticas como navel y satsuma, que de otra forma no podrían ser utilizadas como parentales. El aumento del número de parentales disponibles (tanto autotetraploides como alotetraploides) ha facilitado el desarrollado en todo el mundo de programas de mejora dirigidos a la obtención de variedades triploides (sin semilla) (Oiyama y col. 1991; Tusa y col. 1992; Grosser y col. 2000a; Navarro y col. 2003; Grosser & Gmitter 2005; Vilorio & Grosser 2005).

c) *Obtención directa de triploides:*

En el ámbito de la mejora de variedades existe un gran interés por la aplicación de la hibridación somática en la obtención directa de híbridos triploides. Mediante la fusión de protoplastos de un parental haploide con protoplastos de otro diploide es posible obtener plantas triploides sin que haya recombinación meiótica entre los genotipos parentales, aunque con muy bajo rendimiento (Kaneyoshi y col. 1997; Ollitrault et al. 1997; Ollitrault y col. 2000b). La producción de plantas y líneas celulares haploides de cítricos se puede realizar a través del cultivo de anteras (Germana y col. 1994; Germanà 2007) y la ginogénesis (Oiyama & Kobayashi 1993; Ollitrault y col. 1996, Aleza y col en prensa). La obtención de líneas haploides sigue siendo la principal limitación para la aplicación de esta técnica. Por ello algunos grupos de investigación han estudiado la posibilidad de realizar hibridaciones gameto-somáticas para suplir esta deficiencia (Deng y col. 1992; XiuXin y col. 1995) aunque sin éxito hasta el momento.

### **7.1.2 Hibridación asimétrica.**

Los híbridos somáticos asimétricos son aquellos que poseen toda la información genética de uno de los dos parentales y solamente una parte del otro. Estos se pueden generar de forma espontánea o inducida y generalmente se dividen en tres grupos en función del material genético que se trasfiere de una variedad a la otra.

a) *Híbridos obtenidos por transferencia de fragmentos cromosómicos:*

Para poder transferir fragmentos de cromosomas es necesario realizar una irradiación de los protoplastos del parental donante que genere una ruptura en las cadenas de ADN. Esto se realiza mediante el empleo de rayos X,  $\gamma$  o UV. Existen

estudios que demuestran que el tamaño de los fragmentos generados depende de la dosis de irradiación empleada (Forsberg y col. 1998a). La aplicación de esta técnica en cítricos está siendo investigada por diferentes grupos, y los primeros resultados obtenidos parecen apoyar su utilización (Xu y col. 2007). Sin embargo no está aún claro cuál sea el efecto de la irradiación sobre la biología de las células tratadas ni tampoco está bien definida la dosis óptima para producir híbridos somáticos asimétricos.

b) *Híbridos obtenidos por transferencia de un número reducido de cromosomas:*

Se basa en la fusión entre protoplastos enteros y microprotoplastos, que solamente contienen un número reducido de cromosomas. Para la formación de los microprotoplastos es necesario promover la fragmentación del núcleo a través la aplicación de herbicidas, tal y como se ha demostrado en otras especies vegetales (Morejohn y col. 1987; Verhoeven y col. 1990; Ramulu y col. 1994). Louzada y col. han desarrollado un método para producir microprotoplastos en cítricos, la mayoría de ellos con un número de cromosomas entre 1 y 4 (Louzada y col. 2002). La fusión entre microprotoplastos y protoplastos enteros de tejidos diploides solamente ha permitido regenerar callos y embriones que presentaban cromosomas foráneos (Louzada y col. 2002).

c) *Híbridos obtenidos por transferencia del citoplasma (cíbridos):*

Este tipo de híbridos asimétricos presentan el núcleo de uno de los dos parentales y el citoplasma del otro (o el resultante de la reorganización de los dos citoplasmas parentales). A este tipo de híbridos se le denomina híbridos somáticos citoplasmáticos o cíbridos y tienen un gran interés en la mejora genética ya que permiten modificar solamente los caracteres que están controlados por el genoma citoplasmático o que dependen de la interacción núcleo-citoplasma, sin modificar los caracteres regulados exclusivamente por el genoma nuclear.

Para la producción de cíbridos es posible utilizar diferentes métodos; en cítricos uno de los primeros métodos utilizado fue la fusión entre protoplastos de un parental donante, irradiados para inactivar su núcleo, con protoplastos de un parental receptor, tratados con iodoacetato para inactivar sus orgánulos citoplasmáticos (Vardi y col. 1987). En la elección de los parentales es importante tener en cuenta que las mitocondrias presentes en el citoplasma de los protoplastos de callo son las que confieren a las células la capacidad de regeneración (Moreira y col. 2000; Cabasson y col. 2001). Por esto es imprescindible que los protoplastos del parental donante procedan de callo embriogénico, mientras que los protoplastos del parental receptor

pueden proceder de mesófilo foliar; lo cual es una gran ventaja, pues permite obtener cíbridos de variedades monoembriónicas (como las clementinas), a partir de las cuales no es posible obtener callo nucelar embriogénico. El análisis molecular de la composición del citoplasma de los cíbridos regenerados siguiendo este método ha puesto en evidencia procesos de reorganización genética entre los genomas citoplasmáticos fusionados.

Se ha descrito otro método para la generación de cíbridos, que se basa en la fusión entre protoplastos procedentes de mesófilo con protoplastos privados del núcleo (citoplastos) que se separan a partir de una suspensión de protoplastos de callo mediante ultracentrifugaciones en gradiente discontinuo (Xu y col. 2006). Utilizando esta técnica solamente se han conseguido líneas de callo cíbrido, pero a partir de ellas no se han regenerados embriones ni plantas enteras.

En cítricos, la producción de cíbridos puede ocurrir también de forma espontánea en fusiones simétricas, tal y como se ha descrito por varios autores (Kobayashi y col. 1988; Ohgawara y col. 1989; Tusa y col. 1990; Saito y col. 1993; Yamamoto & Kobayashi 1995; Grosser y col. 1996; Moriguchi y col. 1996; Ollitrault 1996; Moreira y col. 2000; XiuXin y col. 2000; Cabasson y col. 2001; Olivares-Fuster y col. 2005). Algunos de ellos han intentado dar una explicación a este fenómeno pero nadie lo ha hecho de forma concluyente. Moreira y col. (Moreira y col. 2002) han avanzado la hipótesis de que el mayor número de mitocondrias presentes en los protoplastos aislados a partir del callo favorece la regeneración; de forma que la fusión de los citoplasmas de los dos parentales permitiría la regeneración de cíbridos. En este caso no hay una explicación sobre lo que ocurre a los núcleos de los protoplastos procedentes del callo. Guo y col. afirman que la producción espontánea de cíbridos podría depender de los genotipos de los dos parentales, y que la probabilidad de obtener cíbridos aumenta cuanto más alta es la cantidad de protoplastos procedente de mesófilo respecto a los procedentes de callo (Guo y col. 2004a). Sin embargo ninguna de estas hipótesis ha sido aún confirmada. Solamente se ha demostrado que la presencia de las mitocondrias procedentes de parental embriogénico (el callo) es un requisito necesario para la regeneración de plantas con núcleo procedente de protoplastos de mesófilo.



### 7.1.3 Ventajas de la hibridación somática.

El desarrollo de nuevas tecnologías como la hibridación somática ha permitido en los últimos años abordar objetivos de mejora que parecían inalcanzables a través de la aplicación de técnicas de mejora tradicional.

Las principales ventajas que ofrece el uso de la hibridación somática con respecto a la hibridación sexual son:

a) *Posibilidad de utilizar un mayor número de parentales.*

La posibilidad de obtener híbridos utilizando parentales estériles o sexualmente incompatibles ha sido uno de los principales logros de la hibridación somática. A través de esta técnica es posible obtener híbridos interespecíficos y también híbridos entre individuos de géneros afines (sexualmente incompatibles), superando así las barreras de la biología reproductiva (Grosser y col. 1988a; Grosser y col. 1990c; Grosser y col. 1990a).

En las hibridaciones sexuales dirigidas realizadas en los programas de mejora, es preferible utilizar parentales no apomícticos para así facilitar el proceso de selección y rescate de los embriones híbridos, lo cual limita mucho el número de variedades que es posible utilizar. En la hibridación somática esto no representa ninguna limitación, y en teoría cualquier parental puede ser empleado.

La posibilidad de utilizar un mayor número de parentales ha permitido aumentar la variabilidad dentro del grupo de los cítricos así como la introducción de caracteres de interés desde las especies no cultivadas a las domesticadas. Este hecho es de fundamental importancia para los programas de mejora genética.

b) *Suma de los caracteres de ambos parentales.*

En los híbridos somáticos siempre se transmiten los genes dominantes de ambos parentales, por lo cual es posible combinar genotipos complementarios que resulten más adaptados a las condiciones de cultivo. Al no tener lugar ningún mecanismo de recombinación meiótica no hay que enfrentarse a problemas de heterozigosis (descritos anteriormente en el apartado 5.3). Además se evita la aparición de genes recesivos deletéreos que podrían expresarse en los casos de depresión por endogamia, como ocurre en la hibridación sexual.

La poliploidía ha sido siempre asociada a una disminución del vigor de la planta que implica una reducción en su tamaño (Soost & Cameroon 1969; Lee y col. 1990) lo que resulta más evidente en los autotetraploides; sin embargo existen algunos

alotetraploides que parecen superar esta falta de vigor (Lee 1988; Grosser 1993; Schwarz 2001; Guo & Grosser 2005). La reducción en el tamaño de las plantas es un carácter que podría tener un impacto positivo en campo en el caso de los patrones, ya que permitiría aumentar el número de plantas por superficie y así la productividad.

c) *Posibilidad de modificar los caracteres determinados por el genoma citoplasmático.*

La hibridación somática es la única técnica que permite modificar de forma relativamente sencilla el genoma citoplasmático de la planta. Los genomas mitocondrial y cloroplástico juegan un papel importante en la determinación directa de algunos caracteres de interés y también en la regulación de caracteres resultantes de la interacción núcleo-citoplasma. En la hibridación sexual el citoplasma siempre proviene del parental femenino, por lo que si se deseara su transferencia de un individuo a otro siguiendo los esquemas de mejora clásica se necesitarían larguísimos programas de retrocruzamiento (Kihara y col. 1982; Tsunewaki y col. 1988). En cítricos, con largos periodos de juvenilidad, se hace imposible la aplicación de este tipo de programas. Contrariamente a lo que ocurre con la hibridación sexual, el citoplasma de los híbridos somáticos obtenidos tras la fusión de protoplastos es el resultado de la unión o reorganización de los citoplasmas de los dos parentales. Además mediante la obtención de híbridos es posible transferir el citoplasma de un parental a otro de una forma relativamente rápida y sencilla y sin modificar los caracteres determinados por el genoma nuclear del parental receptor.

## **7.2. Obtención y mantenimiento de callo embriogénico.**

La obtención de un callo con buena capacidad embriogénica es indispensable para la aplicación de un programa de mejora de cítricos basado en la hibridación somática. El callo que mejor se presta para este uso y de hecho el único que se utiliza, es el que resulta de la evolución de los tejidos de la nucela contenida en los óvulos de frutos inmaduros.

La obtención de estas líneas celulares es un proceso largo y errático cuya eficiencia depende del genotipo (Engelmann y col. 1994). La obtención de una línea de callo embriogénico conlleva la extracción y el cultivo de un gran número de óvulos. Los medios habitualmente empleados son el MT (Murashige & Tucker 1969) o el MS (Murashige & Skoog 1962) con algunas modificaciones (Perez y col. 1998b). Hasta el

momento no ha sido posible la obtención de callo nucelar embriogénico a partir de variedades no apomíticas ni del *Poncirus trifoliata* o sus híbridos.

La conservación de las líneas celulares se puede realizar mediante subcultivos mensuales, aunque para prevenir la pérdida de material vegetal (por contaminaciones u otros errores humanos) y para reducir los costes de mantenimiento resulta más conveniente la crioconservación (Durán-Vila y col. 2005). Sin embargo, la mayor ventaja de este sistema de conservación es que permite mantener inalterada la capacidad embriogénica del callo, a diferencia de lo que ocurre al realizar un elevado número de pases del cultivo (Engelmann y col. 1994).

El IVIA cuenta con un banco de germoplasma de callos embriogénicos nucleares crioconservados (Perez y col. 1997) obtenidos mediante el cultivo de óvulos de unos 40 genotipos (Durán-Vila y col. 2005) incluidos en el Banco de Germoplasma de cítricos del IVIA. La disponibilidad de estos callos embriogénicos ha permitido el desarrollo de un programa de mejora genética basado en la hibridación somática.

### **7.3. Aislamiento de protoplastos y regeneración de plantas.**

El primer paso en el protocolo de obtención de híbridos somáticos es el aislamiento de protoplastos a partir de tejidos vegetales. En cítricos se suelen utilizar protoplastos aislados a partir de mesófilo foliar y de callo nucelar embriogénico, pues uno de los dos parentales tiene que ser embriogénico para poder regenerar embriones híbridos.

El primer aislamiento controlado y repetible de protoplastos vegetales fue realizado por Cocking (1960) y desde entonces se han aislado protoplastos a partir de numerosas especies y a partir de numerosos tipos de tejidos vegetales.

En cítricos, el desarrollo de un sistema de aislamiento de protoplastos, cultivo y regeneración de plantas fue abordado ya al principio de los años 70, cuando Kochba y col. pusieron a punto la regeneración de plantas a partir de callo de origen nuclear (Kochba y col. 1972). Sucesivamente se utilizó este mismo protocolo de regeneración aplicándolo a protoplastos de callo para obtener embriones (Vardi y col. 1975) y luego plantas enteras de la variedad “Shamouti” (*C. sinensis*) (Vardi y col. 1977). Una vez puesto a punto este sistema se aplicó a otras especies de cítricos como naranjo amargo, limoneros, pomelos y mandarinos (Vardi 1981; Vardi y col. 1982; Kobayashi y col. 1983).

El protocolo de aislamiento de protoplastos de cítricos ha sufrido numerosas revisiones y cambios que han permitido mejorar los rendimientos en la mayoría de las especies de interés. El protocolo más empleado es el descrito por Grosser y Gmitter (Grosser & Gmitter 1990b). En el IVIA se han establecido protocolos de aislamiento de protoplastos a partir de callos embriogénicos y de hojas de cítricos (Galiana 1995; Li 1997), así como de regeneración de plantas a partir de callo de distintas especies de cítricos y algunas especies de géneros afines (Pérez y col. 1998b; Li 1997). Sin embargo existen aún especies recalcitrantes a partir de las cuales resulta difícil el aislamiento de protoplastos. En el caso de las clementinas y muchas mandarinas, que son monoembrionarias, no es posible producir callo embriogénico a partir de ellas y la única fuente de protoplastos es el mesófilo foliar.

Para inducir la embriogénesis somática en callo nucelar de cítricos existen diferentes estrategias. Las más comunes son la modificación en el contenido de sacaridos, la utilización de reguladores de crecimiento o la regulación de los nutrientes minerales (Button 1978; Kochoba y col. 1978; Pérez y col. 1998a; Tomaz y col. 2001). El protocolo de regeneración puesto a punto y aplicado en el IVIA (Galiana 1995; Pérez y col. 1998a), está basado en la sustitución de la sacarosa por la maltosa como fuente de carbono en los medios de cultivo.

#### **7.4. Métodos de fusión.**

Los métodos empleados para inducir la fusión de protoplastos se clasifican en tres categorías: los que se basan en el uso de agentes químicos, los que utilizan campos de corriente eléctrica y métodos mixtos que utilizan los agentes químicos combinados con la corriente eléctrica.

Para que un método de hibridación somática funcione con eficacia es necesario optimizar los parámetros físicos y/o químicos que determinan la fusión de las membranas plasmáticas. Entre estos parámetros los más relevantes son el pH, la temperatura, el potencial osmótico del medio, la fuerza centrífuga, la densidad de células, el tamaño de los protoplastos, la presencia de iones  $\text{Ca}^{++}$  y la conductividad del medio (si se utiliza la corriente eléctrica para favorecer la fusión de los protoplastos) (Gleba & Sytnik 1984; Pelletier & Chupeau 1984; Hidaka & Omura 1992; Ollitrault y col. 2000a).

### *Método químico*

Los métodos químicos aprovechan la capacidad que tienen algunos compuestos para modificar el potencial de membrana de los protoplastos favoreciendo así la fusión de las células. Los agentes químicos más empleados son el polietilenglicol (PEG) (Kao & Michayluk 1974; Wallin y col. 1974), el dextrano (Kameya y col. 1979), el polivinil alcohol (Nagata y col. 1978), el dimetilsulfóxido (DMSO) y los iones calcio (Kéller y col. 1973).

El conocimiento de los parámetros físicos y de los fenómenos fisiológicos que posibilitan la fusión de las membranas ha permitido combinar varios de estos agentes químicos para obtener un método de fusión química eficiente, empleando conjuntamente el PEG, el DMSO, los iones calcio y optimizando los parámetros físicos antes mencionados (Menczel y col. 1981).

En el primer trabajo de hibridación somática descrito en cítricos los autores utilizaron el método de fusión químico para obtener híbridos somáticos intergenéricos mediante la fusión de protoplastos de callo embriogénico de naranjo “Trovia” (*C. sinensis*) y protoplastos de mesófilo de hoja de *Poncirus trifoliata* (Ohgawara y col. 1985). Tras este trabajo la técnica fue utilizada en otros muchos laboratorios, donde se obtuvieron tanto híbridos interespecíficos (Grosser y col. 1989; Kobayashi & Ohgawara 1988; Tusa y col. 1990) como híbridos intergenéricos (Grosser y col. 1988; Kobayashi & Ohgawara 1988; Ohgawara y col. 1989; Deng y col. 1992; Louzada y col. 1993). Actualmente la técnica sigue empleándose de forma rutinaria en muchos laboratorios. En el IVIA se ha adaptado la técnica para aumentar la eficacia del método en nuestras condiciones de trabajo (Olivares 1998). El grupo americano dirigido por el Dr. Grosser ha conseguido regenerar más de 130 híbridos somáticos usando este método (Grosser & Gmitter 2005).

Entre las ventajas que conlleva el uso del método de fusión químico destacan su simplicidad y relativa eficiencia, además el hecho de que no se necesita ningún equipamiento específico para realizarlo. En el aspecto negativo se encuentra la toxicidad celular de los agentes químicos empleados. En el caso del PEG, su toxicidad puede ser reducida mediante un proceso de desionización, y debe de ser eliminado totalmente del medio tras la fusión mediante lavados sucesivos (Kao & Saleem 1986). Aún así el uso del PEG reduce la viabilidad de las células cultivadas dificultando la regeneración del callo (Mercer & Schlegel 1979). También la eficiencia del proceso de hibridación

parece ser más baja con respecto a los otros métodos descritos a continuación (Olivares 1998; Assani y col. 2005).

#### *Método eléctrico*

El método eléctrico utiliza una fuente eléctrica que proporciona corriente alterna y continua, creando campos eléctricos. Para la aplicación de este método los protoplastos se resuspenden en un medio líquido de baja conductividad y cuando se someten a un campo de corriente alterna se mueven por dielectroforesis formando hileras de células que siguen los campos de corriente. Una vez las células están en contacto unas con otras se aplican pulsos de corriente continua que inducen la fusión de las membranas celulares. La corriente continua ejerce un doble efecto en las células, pues induce la formación de poros reversibles a nivel de la membrana plasmática además de físicamente empujar las células unas contra otras. La intensidad de los campos eléctricos y la duración del pulso de corriente son los dos parámetros que más influyen en el proceso de fusión eléctrica (Bates 1985; Tempelaar & Jones 1985; Nea & Bates 1987).

Algunos autores destacan la alta eficiencia del método eléctrico basándose en el porcentaje de células heterocariones obtenidas, alrededor del 10-15% utilizando protoplastos de cítricos (Hidaka & Omura 1992).

El pulso de corriente continua activa los procesos de división celular, promoviendo así la embriogénesis somática (Gilmour y col. 1989; vonKeller y col. 1997). La aplicación de este método resulta muy simple y reproducible además de facilitar un control directo sobre los parámetros de fusión, lo que permite obtener un mayor número de fusiones (Bates 1985; Bates 1990), aunque es necesario disponer de un equipo de fusión capaz de transmitir tanto corriente alterna como continua, así como de electrodos específicos.

El método eléctrico fue aplicado por primera vez en cítricos por un grupo de investigadores japoneses que consiguieron híbridos somáticos utilizando genotipos del género *Citrus* y otros géneros afines sexualmente incompatibles (Hidaka & Omura 1992). Actualmente este método se sigue utilizando para la mejora de cítricos por diferentes grupos de investigación entre los cuales destacan el grupo japonés, que ha desarrollado una cámara propia de electrofusión (Hidaka y col. 1995), y un grupo de investigadores franceses (Ollitrault y col. 1996), que también han conseguido adaptar el método eléctrico a sus condiciones de trabajo. El número de trabajos es de cualquier

forma relativamente escaso y el método hay que adaptarlo a los diferentes genotipos y condiciones de trabajo.

#### *Método quimioeléctrico*

Es un método híbrido donde se emplean conjuntamente algunos agentes químicos (el PEG, los iones calcio y el DMSO) y pulsos de corriente eléctrica continua. El PEG se emplea a menor concentración que en el método químico, con lo que actúa principalmente como agente aglutinante de las células, aumentando la superficie de contacto entre los protoplastos antes de la electrofusión. Los iones calcio facilitan la adhesión de las células estabilizando las membranas, ya que neutralizan las cargas superficiales y reducen la fluidez de las mismas (Nea & Bates 1987; Tempelaar y col. 1987). Sin embargo elevadas concentraciones de iones calcio pueden influir negativamente en el proceso de fusión al aumentar en exceso la conductividad (Nea & Bates 1987). Una vez los protoplastos se encuentran aglutinados, se aplican una serie de pulsos de corriente continua a fin de promover la fusión de las membranas adyacentes.

Respecto al método químico, el quimioeléctrico tiene la ventaja de utilizar concentraciones de PEG más bajas por lo cual resulta menos tóxico para los protoplastos. Además la forma en la que se aplica el PEG (alrededor de los protoplastos y no encima de ellos) facilita su eliminación tras la fusión (Olivares-Fuster y col. 2005). Su mayor ventaja con respecto al método eléctrico es la posibilidad de emplear equipos de fusión y electrodos más sencillos y económicos, dado que sólo se necesitan pulsos de corriente continua. Este método tiene la peculiar característica de promover la formación de cíbridos, además de híbridos somáticos simétricos cuando se aplica a protoplastos de cítricos (Olivares-Fuster y col. 2005).

Este tercer método ha sido principalmente desarrollado y aplicado en el IVIA a partir del procedimiento descrito para la obtención de híbridos somáticos de *Digitalis* (Vela 1996). Su puesta a punto ha permitido utilizarlo en programas de mejora de forma rutinaria para la obtención de híbridos somáticos y cíbridos de cítricos (Olivares-Fuster y col. 2005). El método ha sido aplicado con éxito también en la fusión de protoplastos de *Cucumis melo L.* y *Lycopersicon pennelli* (Corr. D'arcy) (V. Moreno y A. Atares comunicación personal).

El hecho de que cada grupo de investigación utilice un método de fusión diferente puede atribuirse a la dificultad que conlleva la adaptación de un protocolo a diferentes

condiciones de trabajo y diferente material vegetal. En muy pocos laboratorios se utilizan diferentes métodos de fusión, por lo cual resulta difícil poder realizar una comparación objetiva entre ellos. Al parecer cada grupo de investigación ha elegido el procedimiento de hibridación somática que les ha proporcionado mejores resultados o aquél que han podido adaptar en función de los costes económicos, pero no se ha demostrado la superioridad de ningún método sobre los demás.

#### **7.5. Selección de los híbridos somáticos.**

Para incrementar la eficiencia de los programas de hibridación somática es necesario utilizar un esquema de selección que permita, durante el proceso de regeneración, seleccionar las células híbridas y descartar los productos de autofusión o las células de parentales no fusionados (Waara & Glimelius 1995).

Las diferentes estrategias que existen para la selección de los híbridos somáticos se suelen dividir en cuatro grupos (Díaz y col. 2004):

***Selección en base a caracteres morfológicos:*** cuando existen diferencias morfológicas entre los híbridos y los parentales, como por ejemplo variaciones en el color del callo híbrido.

***Selección por caracteres fisiológicos:*** se basa en características fisiológicas intrínsecas y exclusivas de los callos híbridos; se da en los casos en que los parentales no poseen capacidad de regeneración en las condiciones de cultivo empleadas, mientras que los híbridos sí.

***Selección por complementación:*** cuando los protoplastos de ninguno de los dos parentales son capaces de desarrollarse y multiplicarse sin la aportación y la complementación del otro; por lo tanto solamente a partir de los híbridos se podrán regenerar individuos completos. Se subdividen a su vez en:

1) ***Complementación génica:*** Empleando por ejemplo dos parentales con defectos genéticos determinados por caracteres recesivos; la fusión produce una célula híbrida en la que los defectos se anulan al expresarse los alelos dominantes procedentes de cada parental.

2) ***Complementación metabólica:*** Cuando se dispone de parentales que expresan caracteres dominantes (como resistencia a antibióticos o herbicidas) es posible utilizar medios de cultivo selectivos ya que el híbrido simétrico expresará los caracteres dominantes de ambos parentales (Wang y col. 1993; Kisaka & Kameya 1994).



La limitación a este tipo de selección está en la carencia de líneas mutantes que expresen marcadores útiles.

**Selección mecánica por aislamiento de las células híbridas:** Consiste en el aislamiento y sucesivo cultivo selectivo de los heterocariones. La selección puede realizarse mediante:

1) *Selección mecánica directa utilizando técnicas de micromanipulación:* cuando los heterocariones poseen caracteres morfológicos que los distinguen de los parentales a nivel celular, de forma que se puedan diferenciar al microscopio (Gilmour y col. 1989).

2) *Selección mediante citometría de flujo:* los protoplastos de los parentales se marcan con dos colorantes fluorescentes distintos de manera que las células híbridas resultarán doblemente marcadas (Galbraith y col. 1984; Lucretti y col. 1994).

La selección mecánica es difícil de implementar por las dificultades encontradas en el cultivo selectivo de los heterocariones a baja densidad. Además la selección de los productos híbridos sigue siendo la mayor limitación para muchos sistemas, incluso aquellos en que se ha conseguido la regeneración a partir de protoplastos individuales (Waara & Glimelius 1995).

Utilizando diferentes esquemas de selección es posible favorecer la regeneración de los productos de fusión deseados.

En el caso de los cítricos se emplea un esquema de selección mixto. La selección fisiológica se basa en que sólo uno de los dos parentales empleados es capaz de expresar su capacidad embriogénica en los medios de cultivo empleados, por lo que solamente se podrán regenerar plantas a partir de las células híbridas o de las células de callo, pero no a partir de las células procedentes del mesófilo. Así mismo se emplea un medio parcialmente selectivo para el desarrollo de los aloploides, que permite reducir o eliminar la regeneración a partir de protoplastos del parental embriogénico no fusionados. Esta selección se basa en la diferente molaridad óptima para el desarrollo de los parentales y los híbridos (Ohgawara y col. 1985).

En cítricos las diferencias morfológicas entre protoplastos de hoja (presencia de cloroplastos) y de callo (presencia de cuerpos de almidón) permite distinguir visualmente los heterocariones justo después de la fusión, y por lo tanto evaluar con facilidad la tasa de hibridación que se consigue.

Existe también un tipo de marcador visual que, aunque no es necesario en las primeras fases del proceso de fusión (pues existen diferencias morfológicas entre los

parentales), puede ser de gran utilidad en fases avanzadas del desarrollo del callo y durante la embriogénesis para la selección *in vivo* de los tejidos híbridos. Para realizar este tipo de selección se utilizan protoplastos aislados a partir de mesófilo de plantas transgénicas que expresan de forma constitutiva el gen green fluorescent protein (GFP). La fusión entre estos protoplastos y los del otro parental, aislados a partir de callo embriogénico, permite la regeneración de tejidos híbridos que expresan también el gen GFP. La puesta a punto de este tipo de marcador visual ha sido realizada en el IVIA para su utilización en la hibridación somática de cítricos (Olivares-Fuster y col. 2002).

También se ha estudiado la posibilidad de emplear, en cítricos, plantas transgénicas resistentes a antibióticos aminoglicósicos para seleccionar los productos de fusión. Se fusionaron protoplastos aislados a partir de mesófilo de una planta transgénica que incorporaba el gen de resistencia a Kanamicina o Paramomicina con protoplastos aislados a partir de callo embriogénico. En las pruebas realizadas no ha sido posible ejercer ningún tipo de selección ya que la presencia de antibióticos, incluso a bajas concentraciones, resultó tóxica para los protoplastos (Olivares-Fuster 1998).

Vardi y colaboradores (Vardi y col. 1987) pusieron a punto un esquema de selección para la obtención de cíbridos donde los dos parentales se complementan para poder regenerar embriones y plantas. El método definido como donante-receptor consiste en inhibir la división nuclear en los protoplastos del parental donante mediante la irradiación con rayos X o  $\gamma$ . Por otro lado se inactiva el citoplasma del otro parental (parental receptor) a través un tratamiento químico con iodoacetato. Así es posible regenerar cíbridos que presentan el citoplasma del parental donante y el núcleo del parental receptor. Sin embargo este esquema de selección no ha sido muy utilizado por los cambios que se suelen producir en el citoplasma de los cíbridos.

#### **7.6. Caracterización de los híbridos somáticos.**

El objetivo de la fusión de protoplastos es la regeneración de embriones y plantas que deriven de la unión simple entre dos células, cada una procedente de un parental distinto; sin embargo se puede producir la regeneración a partir de protoplastos de parentales no fusionados, de autofusiones entre protoplastos del mismo parental o de fusiones múltiples de los dos parentales. Incluso utilizando un esquema de selección son necesarias herramientas para verificar el carácter híbrido de las plantas obtenidas.

Para ello se pueden estudiar caracteres morfológicos (por ejemplo las hojas trifoliadas del parental *Poncirus*), evaluar el nivel de ploidía, o analizar con marcadores moleculares las plantas obtenidas. Utilizando la citometría de flujo o los marcadores moleculares es posible realizar una selección precoz de los híbridos somáticos ya en la fase de cultivo *in vitro*. La combinación de diferentes tipos de análisis resulta fundamental para una caracterización completa y detallada de los híbridos obtenidos.

Los rasgos morfológicos que identifican a cada parental pueden servir para la identificación de híbridos somáticos si se encuentran bajo el control de genes dominantes o codominantes. Así por ejemplo la morfología, tamaño o color de las hojas, el tamaño, forma o grosor del pecíolo, y muchos otros caracteres pueden ser de ayuda para la identificación temprana de los híbridos.

La determinación del número de cromosomas en las plantas regeneradas se realiza habitualmente mediante citometría de flujo, que es un método más rápido y efectivo que los cariotipados tradicionales, aunque en ocasiones estos son necesarios para confirmar el resultado generado por el citómetro de flujo. La técnica permite cuantificar el ADN nuclear, teñido con un fluorocromo específico, en función de la cantidad de fluorescencia emitida por los núcleos tras ser excitados con una lámpara de mercurio. La relación entre la luz de excitación y la emitida por cada núcleo es directamente proporcional al tamaño del genoma analizado. La citometría permite determinar el número de cromosomas que presentan los tejidos analizados al ser comparados con una muestra de ploidía conocida. El citómetro analiza en pocos minutos entre  $10^4$  y  $10^6$  células a partir de muestras muy pequeñas de la planta, por lo que es muy conveniente en los análisis rutinarios de material *in vitro* (Ollitrault & Michaux-Ferriere 1992).

Otras técnicas empleadas para el conteo de los cromosomas son la tinción con hematoxilina de ‘chromosome squash’ (Sass 1985; Gmitter y col. 1990), con orceína (Oiyama 1981) o con Dapi (Dhont y col. 1996). La complejidad de estas técnicas limita mucho su empleo de una forma rutinaria, y se emplean más como confirmación de los resultados obtenidos por el citómetro en aquellos casos en que el índice de ploidía obtenido no es el esperado.

Diferentes técnicas de biología molecular permiten una identificación genética más exhaustiva de los híbridos somáticos tanto a nivel nuclear como a nivel citoplasmático.

Una de las primeras técnicas utilizadas fue los RFLP, análisis de restricción de zonas concretas del genoma, que se empleó para la identificación del primer híbrido

somático de cítricos obtenido (Ohgawara y col. 1985) y otros más (Takayanagi y col. 1992; Miranda y col. 1997). El desarrollo de las técnicas de amplificación del ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha hecho que esta técnica fuera substituida por otras más rápidas o que fuera aplicada a fragmentos amplificados mediante PCR.

Los isoenzimas han sido muy utilizados y aún se consideran un método de caracterización fácil de emplear y eficaz. Los isoenzimas más empleados en la caracterización de híbridos somáticos de cítricos son la peroxidasa (Tusa y col. 1990; Deng y col. 1992; Grosser y col. 1992), la fosfogluco-mutasa (Grosser y col. 1992; Tusa y col. 1992) y la fosfogluco-isomerasa (Tusa y col. 1990; Tusa y col. 1992). La principal desventaja que presenta el análisis con isoenzimas es el limitado número de isoenzimas porlimórficos conocidos, por lo que muchos híbridos intraespecíficos y algunos interespecíficos no se pueden distinguir de sus parentales.

Los progresos en el ámbito de la biología molecular han llevado a la utilización de nuevos marcadores más polimórficos que los RFLP y los isoenzimas. Los RAPDs han sido empleados en la caracterización de muchos híbridos somáticos de cítricos (Grosser y col. 1996a; Kobayashi y col. 1997; Shi y col. 1998; Guo y col. 2000). La aplicación de esta técnica al ADN ribosomal también ha permitido identificar híbridos somáticos y sexuales de cítricos (Miranda y col. 1997; Moriguchi y col. 1997; Motomura y col. 1996).

Los marcadores microsatélites (o SSRs) son de gran interés para la caracterización de los híbridos somáticos por su el elevado grado de polimorfismo (Luro y col. 2001) y por la amplia disponibilidad de secuencias de la que se dispone actualmente (Kijas y col. 1997; Froelicher y col. 2007; Luro y col. 2008). Otros de los marcadores más utilizados para caracterizar los híbridos somáticos son aquellos que permiten analizar simultáneamente diferentes regiones del genoma. Entre estos destacan: RAPD (Forsberg y col. 1998b), SSRs (Harding & Millam 2000; Cheng y col. 2002), ISSRs (Scarano y col. 2002) y AFLP (Tian & Rose 1999; Guo y col. 2002). Sin embargo para el análisis de loci específicos se prefiere emplear marcadores que estén mapeados y que puedan relacionarse con cada uno de los cromosomas. Para ello los marcadores RFLP y SSR son los más aptos para la caracterización de cítricos.

En el IVIA se utilizan los microsatélites para la caracterización rutinaria de los híbridos somáticos obtenidos. Esta técnica ha permitido, además, detectar que en

algunos de los híbridos que se obtienen no hay una integración completa de los genomas de los parentales (Olivares-Fuster 1998).

Existen también otros marcadores que pueden proporcionar información sobre la posible recombinación que ocurre en los híbridos. La técnica denominada “genomic *in situ* hybridization” (GISH) permite visualizar con diferentes colores la aportación genómica de cada uno de los dos parentales (Choi y col. 2002). En cítricos las dificultades en la identificación de los cromosomas (que son muy pequeños), su coloración incompleta y el reducido tamaño del genoma obstaculizan la aplicación de la técnica (Ollitrault y col. 2007b).

En la gran mayoría de los trabajos que describen la caracterización de híbridos somáticos se utiliza un número muy reducido de marcadores moleculares para confirmar el origen del nuevo híbrido. Esto impide que se identifiquen posibles cambios del genoma del híbrido con respecto a sus parentales, los cuales podrían modificar las características agronómicas de los híbridos.

La caracterización de los citoplasmas de los híbridos somáticos resulta cada día de mayor importancia, sobre todo para el estudio y la identificación de los híbridos. Este tipo de caracterización resulta más compleja que la que se realiza a nivel nuclear por el escaso número de marcadores identificados en el genoma citoplasmático. En primer lugar esto es debido al reducido tamaño de este genoma, respecto al nuclear, lo cual dificulta la identificación de polimorfismos; además el genoma citoplasmático, en hibridaciones sexuales, se suele heredar a partir del parental femenino en la mayoría de plantas (Daniell y col. 2002; Barr y col. 2005). Ya que no hay recombinación este genoma está muy conservado y se detecta poca variabilidad en el mismo.

Para la caracterización del citoplasma de cítricos se han empleado en principio los marcadores RFLP (Kobayashi y col. 1991; Yamamoto y col. 1993; Grosser y col. 1996b; Ollitrault y col. 1996; Moriguchi y col. 1997; Cabasson y col. 2001); aunque actualmente resulta mucho más común la utilización de técnicas basadas en PCR. Entre estas técnicas las de CAPS (Ollitrault y col. 2000; Lotfy y col. 2003), microsatélites (Cheng y col. 2005) y SSCP (Olivares-Fuster y col. 2007) son las que mejores resultados han aportado.

### 7.7 Estado actual y perspectivas futuras de la hibridación somática.

Desde hace casi dos décadas la hibridación somática vía fusión de protoplastos forma parte integral de los programas de mejora genética de cítricos. Durante este periodo se han generado híbridos a partir de más de 250 diferentes combinaciones de parentales (Grosser & Gmitter 2005) intentando combinar los genotipos de mejor calidad.

Una de las principales exigencias de la citricultura española y mundial es la disponibilidad de nuevos patrones con mejores características de los que se utilizan actualmente (como por ejemplo el citrange “Carrizo” que hoy en día se utiliza en el 61% de las nuevas plantaciones en España). Por ello, en muchos programas de mejora se ha empleado la hibridación somática para obtener nuevos genotipos tetraploides entre parentales con características complementarias. Por un lado existe la exigencia de disponer de patrones con buenas características agronómicas (como por ejemplo el naranjo amargo o el *C. macrophylla*) y por otro lado la exigencia de que los nuevos patrones sean resistentes a las enfermedades más comunes (como el “Carrizo” y el *Poncirus trifoliata* que son resistentes al virus de la tristeza).

En Florida se está llevando a cabo un programa de mejora de patrones basado en la fusión de protoplastos que ha permitido identificar algunos híbridos de interés para la citricultura de EE.UU.; entre ellos los híbridos más prometedores son: naranjo amargo + lima “Rangpur”, naranjo amargo + “lima dulce de Palestina”, naranjo amargo + citrange “Carrizo”, mandarino “Cleopatra” + *Poncirus trifoliata* y algunas combinaciones de mandarinos + citranges.

En el área mediterránea los esfuerzos invertidos en la mejora de patrones han sido mucho más reducidos y solamente se ha obtenido un híbrido de interés entre *C. deliciosa* + *Poncirus trifoliata* (CIRAD, Montpellier, Francia; (revisado en Grosser y col. 2000a).

También existe un interés para los patrones obtenidos a través la hibridación somática de mandarinos + zamboas (Grosser y col. 2004). Los dos parentales han sido elegidos porque en estudios preliminares se ha demostrado que estas dos especies dieron origen al naranjo amargo, que es uno de los patrones con mejores características agronómicas (Nicolosi y col. 2000). Escogiendo zamboas con una elevada resistencia a CTV y mandarinos seleccionados por estar adaptados a distintas condiciones de cultivo, se espera producir un patrón con las características agronómicas del naranjo amargo y

resistente al CTV (revisado en Grosser & Gmitter 2005; Ollitrault y col. 2007b). No obstante, esta estrategia de mejora ha suscitado muchas dudas ya que el genotipo del naranjo amargo es el resultado de la segregación de los caracteres de sus parentales, por lo que parece improbable la obtención de un genotipo con características parecidas a través de la hibridación somática.

Otro de los objetivos en el ámbito de la mejora de patrones es la obtención de híbridos tetraploides entre individuos sexualmente incompatibles; esto permite ampliar los recursos genéticos, ofreciendo así la posibilidad de incorporar caracteres de interés a partir de géneros afines. Para ello se han realizado muchas hibridaciones interespecíficas y intergenéricas (Grosser y col. 1996b).

La gran mayoría de los híbridos somáticos de interés en el ámbito de la mejora de patrones están aún en fase de evaluación. Sin embargo, existen aún combinaciones de genotipos que no han sido obtenidas y que albergan gran potencialidades ya que podrían resolver problemas específicos en determinadas áreas de cultivo.

Los híbridos somáticos constituyen un material óptimo de partida para la obtención de nuevas variedades triploides mediante cruces interploides. La disponibilidad de nuevos híbridos allotetraploides de calidad ha permitido desarrollar programas de mejora basados en cruces interploides utilizando un parental masculino tetraploide y un parental femenino diploide no apomíctico. Esta estrategia ha sido seguida para conseguir plantas triploides de zamboa / pomelo, frutos ácidos (lima / limón) y mandarinas (Grosser & Chandler 2000; Grosser & Chandler 2004). La utilización de un parental allotetraploide en las hibridaciones interploides contribuye a que el nivel de heterocigosis de la progenie sea muy elevado. Esto por un lado representa una ventaja ya que nos da la posibilidad de obtener genotipos muy diferentes entre ellos, aunque por otro lado el trabajo de selección resulta más complejo por la mayor dispersión de caracteres.

En el IVIA desde el año 1996 se viene desarrollando un programa de mejora de mandarinas basado en la obtención de triploides; por tanto la disponibilidad de nuevos parentales allotetraploides a partir de variedades muy específicas representa una de las prioridades para la continuación de este programa de mejora.

Si por un lado la hibridación somática simétrica se presta más para la obtención de nuevos patrones y también de parentales para las hibridaciones interploides, la hibridación asimétrica ofrece la posibilidad de incorporar directamente caracteres foráneos en variedades de calidad sin alterar su fondo genético. Esta estrategia podría

ser empleada para introducir, por ejemplo, resistencia a enfermedades a partir de especies relacionadas con el género *Citrus* que son incompatibles sexualmente o que producen híbridos somáticos no viables. Además la hibridación asimétrica podría favorecer la diversificación del germoplasma de especies como la zamboa o la naranja dulce, donde no es posible emplear métodos de hibridación convencionales.

Entre los híbridos asimétricos destacan los híbridos citoplasmáticos por su gran importancia tanto en estudios de carácter básico como por su aplicación en el ámbito de la mejora. Los cíbridos ofrecen la posibilidad única de determinar cuáles son los caracteres agronómicos controlados por el genoma citoplasmático o por la interacción núcleo-citoplasma. La hibridación somática permite transferir de una variedad a otra los caracteres citoplasmáticos reduciendo enormemente el tiempo que se necesitaría en un programa de mejora convencional, y además sin alterar las características generales controladas por el núcleo.

El interés por la producción de cíbridos creció de forma espectacular desde que se relacionó el carácter de la esterilidad masculina con el ADN mitocondrial (Watson y col. 1977). En cítricos se han realizado diferentes estudios que han confirmado que este carácter está controlado en algunas variedades por el ADN mitocondrial (Kumar & Cocking 1987; Yamamoto y col. 1997). Las mandarinas del grupo “Satsuma” y las naranjas del grupo “Navel” están entre las variedades en las que se ha identificado este tipo de esterilidad masculina citoplasmática (CMS). La posibilidad de utilizar la hibridación somática para transferir dicha esterilidad a variedades de elevado valor comercial, que pueden presentar semillas tras autopolinización o polinización cruzada, ha hecho que diferentes grupos de investigación se interesaran en la producción de cíbridos.

A excepción de la esterilidad masculina se sabe muy poco sobre otros caracteres agronómicos determinados por el genoma citoplasmático. Se han realizado evaluaciones en campo de algunos cíbridos que han puesto en evidencia la influencia del citoplasma sobre la activación de mecanismos de resistencia a enfermedades (como por ejemplo el “malsecco”) (Tusa y col. 2000), el retraso en la maduración de los frutos (Ollitrault y col. 2007), la disminución en el número de semillas (Ollitrault y col. 2007b) y también sobre el contenido de compuestos aromáticos (Fanciullino y col. 2005). Además, la implicación de las mitocondrias en la regeneración a partir de callos embriogénicos, en los mecanismos energéticos de las células y en la resistencia a algunos patógenos (como



por ejemplo la *Alternaria*) (Ohtani y col. 2002) permiten suponer que existen muchos más caracteres que pueden estar controlados por el genoma citoplasmático.

## OBJETIVOS

La hibridación somática es una herramienta biotecnológica que puede ser aplicada a la mejora de cítricos para la obtención de nuevas variedades y patrones de interés. En el Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del IVIA se vienen desarrollando, desde hace más de quince años, programas de mejora de cítricos basados en técnicas alternativas a la mejora tradicional, entre ellas la hibridación somática.

Como parte de estos programas de mejora, los objetivos de esta tesis son los que se presentan a continuación:

### **1. Obtención de patrones de interés para la citricultura española.**

La hibridación somática ofrece la posibilidad de combinar los caracteres favorables de dos genotipos en una única planta, sin los inconvenientes relacionados con la hibridación sexual. Los objetivos planteados para la mejora de patrones en esta tesis han sido:

- 1.1. Puesta a punto de un método de fusión eléctrica que permita obtener híbridos somáticos de una forma eficiente.
- 1.2. Comparación del método de fusión eléctrica con los métodos de fusión química y quimio-eléctrica, que se utilizan rutinariamente en nuestro laboratorio.
- 1.3. Aplicación de los resultados para la obtención de híbridos somáticos entre citrange “Carrizo” y *Citrus macrophylla* que puedan ser utilizados como patrones.
- 1.4. Caracterización detallada de los híbridos mediante análisis del nivel de ploidía, observación morfológica, análisis molecular del genoma nuclear y análisis molecular del genoma citoplasmático.

### **2. Estudios preliminares para la aplicación de la hibridación somática asimétrica en cítricos.**

Entre las aplicaciones de la hibridación somática existe la posibilidad de introducir caracteres foráneos en variedades de interés comercial sin alterar su fondo genético (hibridación asimétrica). Para ello es necesario realizar una irradiación de los protoplastos del parental donante que produzca la fragmentación del ADN. Posteriormente los fragmentos se incorporan en el genoma del parental receptor

mediante fusión de protoplastos. Para conseguir aplicar esta técnica es necesario realizar un estudio preliminar sobre:

- 2.1. Estudio de los efectos de la radiación UV sobre protoplastos aislados a partir de callo embriogénico y de mesófilo foliar.
- 2.2. Determinación de la influencia de la radiación UV sobre viabilidad, multiplicación y regeneración de protoplastos.
- 2.3. Identificación de los tamaños de los fragmentos que se producen en los protoplastos tratados con dosis diferentes de UV.
- 2.4. Determinación de la relación existente entre la dosis de UV y los efectos que se observan en los protoplastos tratados.

### **3. Mejora de mandarinos basada en la hibridación somática.**

Los híbridos somáticos alotetraploides tienen una aplicación directa en la mejora de mandarinos ya que pueden ser utilizados como parentales en cruzamientos interploides para la obtención de triploides. También la hibridación somática ofrece la posibilidad de transferir el genoma citoplasmático (que controla caracteres de interés, como por ejemplo la esterilidad masculina) de un genotipo a otro sin modificar los caracteres controlados por el genoma nuclear. Sobre esta tecnología los objetivos específicos de este apartado han sido:

- 3.1. Puesta a punto de un protocolo de aislamiento de protoplastos de clementinas que permita aplicar la hibridación somática de forma rutinaria en la mejora de las variedades de este grupo de cítricos.
- 3.2. Obtención de híbridos alotetraploides entre clementinas y otras variedades del grupo de las mandarinas que puedan ser utilizados como parentales en cruzamientos interploides.
- 3.3. Obtención de híbridos que presenten el núcleo procedente de clementina y el citoplasma procedente de satsuma. El objetivo final es transferir a las clementinas el carácter de esterilidad masculina que presentan las variedades del grupo satsuma, y que está controlado por el ADN mitocondrial.
- 3.4. Caracterización de los híbridos obtenidos mediante análisis de ploidía y análisis molecular. Puesta a punto de un nuevo procedimiento para incrementar el nivel de polimorfismo en marcadores microsatélites.

## **CAPÍTULO 1: Obtención de patrones de interés para la citricultura española mediante hibridación somática.**

### **1.1 INTRODUCCIÓN.**

La utilización de patrones es esencial para el cultivo de los cítricos ya que confieren al árbol resistencia, tolerancia o susceptibilidad a estreses bióticos y abióticos y tienen una elevada influencia en el vigor, la productividad, la calidad de la fruta y la longevidad de la planta. Las enfermedades más importantes relacionadas con los patrones son la Tristeza (causada por el *Citrus tristeza virus*, CTV), el enanismo del citrange (causado por el *Tatter leaf virus*), la Exocortis (causada por el *Citrus exocortis viroid*), la Xyloporosis (causada por el *Citrus hop stunt viroid*), la Muerte súbita (asociada al *Citrus sudden death associated virus*), la Gomosis (causada por el oomiceto *Phytophthora* sp.) y el Blight (causada por un agente transmisible por injerto no identificado). También son importantes las enfermedades producidas por nematodos, particularmente por *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. Los estreses abióticos más importantes son los producidos por suelos ácidos, alcalinos o salinos, las sequías o inundaciones y las heladas.

El número de patrones de interés comercial existentes en el mundo es muy escaso y además su utilización está limitada por las condiciones de cultivo específicas de las distintas áreas geográficas. La gran mayoría de los patrones con utilización comercial significativa son especies silvestres o híbridos naturales muy antiguos. Por ejemplo, el *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., es extensamente utilizado en varios países asiáticos y algunos de Sudamérica debido a su tolerancia a las bajas temperaturas, resistencia a *Phytophthora* sp. y al CTV y producción de fruta de alta calidad en la variedad injertada. La lima “Rangpur” (*Citrus limonia* Osb.) está extensamente utilizada en Brasil debido a su tolerancia a CTV, tolerancia a sequía y elevada productividad de la variedad injertada; aunque induce baja calidad organoléptica de los frutos de la variedad injertada, esto no tiene importancia para la producción de fruta para zumo, que es el principal uso de los cítricos en este país. Otros patrones son utilizados a menor escala en distintos países, como el naranjo amargo (*C. aurantium* L.), el mandarino “Cleopatra” (*C. reshni* Hort. ex Tan.), el limonero “Rugoso” (*C. jambhiri* Lush.), el *C. volkameriana* (Ten. & Pasq.) y el *C. macrophylla* Wester también son híbridos

antiguos originados en el Sudeste Asiático que en la taxonomía de Tanaka tienen rango de especies.

Los únicos patrones ampliamente utilizados originados en programas de mejora genética son los citranges “Troyer” y “Carrizo” (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) y el citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *P. trifoliata*). Proceden de cruzamientos realizados en la primera década del siglo XX en EE.UU. en un programa que tenía como objetivo la introducción en naranjos dulces y pomelos del carácter de tolerancia a bajas temperaturas presente en *P. trifoliata*. Aunque los híbridos obtenidos no eran comestibles, descubrieron accidentalmente que alguno de ellos podían utilizarse como patrón. Los citranges “Troyer” y “Carrizo”, que son prácticamente idénticos y de acuerdo con los datos existentes son dos propagaciones de un híbrido original (Savage & Gardner 1965), son altamente tolerantes a CTV y a *Phytophthora* sp. Su utilización comercial se inició en EE.UU. en los años sesenta del pasado siglo y actualmente se utilizan ampliamente en EE.UU. y en España. El citrumelo “Swingle” tiene un buen comportamiento como patrón de pomelos y se utiliza desde mediados de la década de los setenta del siglo pasado, fundamentalmente en Florida y Sudáfrica.

Programas más modernos de mejora han producido algunos patrones de interés potencial en España (Forner y col. 2003), EE.UU. o Israel, pero aun no han alcanzado una utilización comercial significativa.

La escasez de resultados de los programas tradicionales de mejora genética de patrones de cítricos se debe a la compleja biología reproductiva de los cítricos. La mayoría de los genotipos son apomícticos y sus semillas producen embriones adventicios, originados en células de la nucela, que limitan o impiden el desarrollo de los embriones cigóticos y en consecuencia dificultan enormemente la obtención de poblaciones grandes de híbridos. La mayoría de las especies de cítricos tienen una elevada heterocigosis (Herrero y col. 1996; Ollitrault & Faure, 1992), lo que ocasiona una gran segregación genética en la progenie, por lo que hay una baja probabilidad de obtener descendientes con las complejas combinaciones genéticas deseadas y obliga a evaluar un gran número de híbridos. Además, hay un gran desconocimiento sobre el modo de herencia de la mayoría de los caracteres agronómicos de interés, lo que impide una adecuada planificación de las estrategias para elegir los cruzamientos más adecuados. Los marcadores moleculares existentes ligados a caracteres de interés son escasos y de poca aplicabilidad general para programas de mejora asistida por marcadores. Por último los cítricos tienen un largo periodo juvenil y la mayoría de las

especies requieren 5-8 años para iniciar la floración y fructificación. Esto dificulta enormemente la posibilidad de obtener varias generaciones segregantes. Debido a estas limitaciones, la obtención y evaluación de nuevos patrones de cítricos requiere una elevada inversión debido a las enormes necesidades de parcelas experimentales y personal, las probabilidades de incorporar los caracteres deseables en los nuevos genotipos son escasas y el periodo mínimo desde la polinización hasta el inicio de la propagación comercial está entorno a los 30-40 años. Todo ello explica el escaso éxito de los programas tradicionales de mejora de patrones de cítricos.

Los patrones condicionaron fuertemente el origen y desarrollo de la citricultura española y claramente serán un factor clave en la evolución futura de la misma. En 1882 ya existían unas 4.000 hectáreas de plantaciones comerciales de cítricos, fundamentalmente naranjos dulces cultivados sobre sus propias raíces o injertados sobre distintos patrones como limoneros (*C. limon* (L.) Burm f.), naranjos dulces (*C. sinensis* (L.) Osb.), cidro o poncifero (*C. medica* L.) y naranjo amargo (*C. aurantium* L.). En ese año hay escritos que describen la aparición de una enfermedad, muchos más años después identificada como gomosis producida por el oomiceto *Phytophthora* sp., que progresivamente en 10-15 años causó la muerte de todos los árboles, excepto los que estaban injertados sobre naranjo amargo, que es tolerante al patógeno. Desde entonces todos los árboles se injertaron sobre naranjo amargo, que es un patrón con excelentes características agronómicas, lo que conllevó una fuerte expansión del cultivo.

A principios del siglo XX ya existían unas 18,000 ha y una parte importante de la producción se exportaba a diversos países europeos. La rentabilidad y expectativas del cultivo hicieron que en el periodo 1910-1930 se realizase la importación de variedades de diversos países que permitieron una importante renovación varietal y una producción más adaptada a la demanda. Sin embargo, estas importaciones se realizaron sin controles sanitarios, entre otras razones porque en esa época se desconocía la presencia en cítricos de enfermedades causadas por virus y otros patógenos transmisibles por injerto. En 1930 ya se describen los primeros síntomas de algunas virosis y en 1956, cuando había unas 90.000 hectáreas, se observaron las primeras muertes de árboles causadas por el *Citrus tristeza virus* (CTV), que se transmite por pulgones y causa la muerte de naranjos y mandarinos injertados sobre naranjo amargo. La enfermedad se difundió rápidamente causando daños muy importantes en las plantaciones y a finales de la década de los años 60 la amenaza de un grave desastre socioeconómico se hizo

muy evidente. En esa época la exportación de cítricos era la principal fuente de divisas para el país, lo que añadía una problemática adicional.

La citricultura estaba tan seriamente amenazada que para paliar en lo posible esta situación a partir del 1968 se adoptaron diversas medidas legales, que cambiaron drásticamente los sistemas de propagación y producción de plantas de vivero. Se prohibió la utilización de naranjo amargo como patrón de naranjos y mandarinos en las nuevas plantaciones y se introdujeron diversos patrones tolerantes a la tristeza.

Inicialmente se realizaron ensayos con los patrones que en base a los datos existentes en otros países se consideraba que podrían tener un comportamiento adecuado para la citricultura española. Tan sólo el citrange “Troyer” y el mandarino “Cleopatra” dieron resultados satisfactorios, ya que además de su tolerancia a tristeza producían fruta de elevada calidad. El citrange “Troyer” es susceptible a la Exocortis de los cítricos, causada por el *Citrus exocortis viroid*, por lo que no podía usarse con la gran mayoría de las variedades españolas que estaban afectadas por esta enfermedad; además tiene una baja tolerancia a caliza, por lo que no puede usarse en una parte considerable de los suelos de la citricultura española. El mandarino “Cleopatra” en cambio es tolerante a Exocortis y tiene un buen comportamiento en suelos con elevado contenido de caliza, aunque tiene una lenta entrada en producción y un difícil establecimiento en el campo, entre otras razones por su moderada sensibilidad a *Phytophthora* sp.

A finales de los años 70 la utilización de patrones estaba fuertemente influenciada por la presencia de Exocortis en todas las variedades españolas y la existencia de muy pocas variedades sanas importadas de otros países. El 64% de los plantones de las variedades sanas se propagaban sobre citrange “Troyer” y el 35% sobre mandarino “Cleopatra”. En cambio, la práctica totalidad de los plantones de las variedades españolas infectadas se propagaban sobre mandarino “Cleopatra”.

La realización de un programa de obtención de plantas libres de patógenos mediante la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (Navarro 1976,1992; Navarro & Juárez 2007; Navarro y col. 1975, 2002, 2005) permitió obtener plantas libres de patógenos de todas las variedades españoles e importar variedades de otros países a través de la estación de cuarentena de cítricos y su distribución a todos los viveros de cítricos. Desde principios de los años 80 todas las variedades propagadas por los viveros de cítricos estaban libres de patógenos, por lo que estos no limitaban la utilización de patrones, excepto el CTV que al ser transmitido por pulgones seguía

impidiendo la utilización del naranjo amargo. A principios de los años 90 la utilización de patrones estaba bastante normalizada y se utilizaban los patrones citrange (la denominación “Carrizo” había prácticamente sustituido a “Troyer” aunque son el mismo genotipo) en un 77% de las nuevas plantaciones y el mandarino “Cleopatra” en un 19%. La experiencia negativa acumulada sobre algunos aspectos agronómicos de este último patrón obligó a buscar alternativas para plantaciones en terrenos con altos contenidos de caliza y salinidad y se introdujo el *C. volkameriana*, que se utilizaba en el 4% de las plantaciones, a pesar de que inducía baja calidad organoléptica de los frutos de la variedad injertada.

El *C. macrophylla* se utilizaba como patrón de limoneros desde mediados de los años 70, con excelentes resultados agronómicos en suelos salinos y con altos contenidos de caliza. Su utilización para mandarinos y naranjos estaba descartada porque la información disponible indicaba que era sensible a CTV y que inducía frutos de baja calidad organoléptica en la variedad injertada. No obstante, a principios de los años 90 se iniciaron experimentos para comprobar en plantaciones a escala comercial su comportamiento en este tipo de suelos con naranjos y mandarinos. Los resultados indicaron que la sensibilidad a CTV era menor de la que se había descrito en otros países, debido fundamentalmente a que la mayoría de las razas de CTV presentes en España son relativamente suaves (Moreno y col. 2008). Algunos árboles tenían un crecimiento menor y mostraban síntomas de acanaladuras en el tronco típicas de la tristeza, pero con poco impacto en la producción. La adaptación a los suelos ensayados era muy buena y la reducción de la calidad de la fruta era menor de la esperada. Además, los árboles presentaban una rapidísima entrada en producción y una cosecha abundante, lo que permitía unos rápidos retornos de la inversión realizada para la plantación.

Como consecuencia de estas observaciones, a partir de mediados de los años 90 se inició la propagación comercial de naranjos y mandarinos sobre *C. macrophylla* que ha aumentado de forma continua. En la actualidad se estima que el 61% de las plantaciones se realizan sobre patrones citrange, el 26% sobre *C. macrophylla*, el 6% sobre mandarino “Cleopatra” y el 7% restante sobre diversos patrones minoritarios entre los que se encuentran el *C. volkameriana* y el citrumelo “Swingle”.

La problemática de los patrones en la citricultura está muy lejos de resolverse, particularmente en el contexto de crisis actual que requiere plantaciones con elevada productividad de frutos de alta calidad que permitan abaratar costos para competir



eficientemente en los mercados internacionales. Todos los patrones utilizados actualmente tienen ventajas e inconvenientes. El patrón citrange “Carrizo” es altamente tolerante a CTV, produce fruta de buena calidad y tienen una productividad alta, pero no se adapta a suelos calizos y salinos que cada vez son más abundantes, tienen una entrada en producción media (5-6 años desde la plantación) y la fruta madura aguanta en buenas condiciones muy poco tiempo en el árbol, lo que limita el periodo de comercialización. El otro patrón mayoritario, el *C. macrophylla*, tiene características complementarias, ya que se adapta muy bien a suelos calizos y salinos, tiene una entrada en producción muy rápida (2-3 años), una productividad muy alta y los frutos se mantienen durante más tiempo en el árbol después de alcanzar la maduración, pero la calidad organoléptica de la fruta producida es claramente inferior para la mayoría de las variedades y es algo susceptible a razas débiles de CTV, susceptible a razas severas y es sensible a bajas temperaturas.

Un nuevo patrón que reuniese las características favorables del citrange “Carrizo” y el *C. macrophylla* sería de gran importancia para la citricultura española. Sin embargo, la obtención del mismo mediante mejora genética convencional es prácticamente imposible por las dificultades mencionadas de la biología reproductiva de los cítricos, particularmente por la elevada heterocigosidad que obliga a ensayar un elevadísimo número de híbridos.

La hibridación somática simétrica o complementaria ofrece sin embargo la posibilidad de obtener híbridos somáticos combinando dos parentales diploides que presentan características complementarias, de forma que el híbrido presenta las ventajas de ambos genotipos. La recombinación de los genomas nucleares de los parentales es indetectable o muy baja, anulándose el problema de heterocigosis propio de la hibridación sexual, lo que implica que sólo es necesario evaluar uno o muy pocos híbridos de cada combinación de parentales. Siguiendo esta estrategia se han conseguido más de 70 híbridos, algunos de ellos de potencial interés agronómico (Grosser & Gmitter 2005).

Para el desarrollo de nuestro programa de mejora de patrones hemos elegido la estrategia de la hibridación complementaria entre *C. macrophylla* y citrange “Carrizo”, con la finalidad de intentar obtener un nuevo patrón que reúna las características de interés de ambos parentales.

La hibridación somática de cítricos requiere que los protoplastos de al menos uno de los parentales proceda de callo embriogénico (Grosser & Gmitter 1990b). Hasta

el momento no se han podido obtener callos embriogénicos de ningún genotipo trifoliado, como es el caso del citrange “Carrizo”, y la obtención de callos de genotipos con frutos ácidos, como el *C. macrophylla*, es muy difícil. El IVIA posiblemente dispone de la colección más amplia de callos embriogénicos del mundo, que se mantienen criocongelados como parte de la colección del Banco de Germoplasma de Cítricos (Duran-Vila y col. 2005), pero no se disponía de callos de *C. macrophylla*. Por ello antes de abordar la fusión de protoplastos fue necesario obtener callos embriogénicos de este genotipo.

Para intentar obtener el híbrido entre *C. macrophylla* y “Carrizo”, se planteó aplicar los métodos de fusión química (Grosser & Gmitter 1990b) y químio-eléctrica (Olivares-Fuster y col. 2005), ya que ambos se utilizan de forma rutinaria en nuestro laboratorio. Sin embargo, la aplicación de estos métodos proporcionó resultados muy pobres, ya que el número de plantas producidas fue muy bajo o nulo. Por ello, se abordó la puesta a punto del procedimiento de fusión eléctrica y la comparación por primera vez de los tres métodos de fusión aplicados a un mismo cruzamiento. También se comprobó la eficiencia del método de fusión eléctrica con otros genotipos de interés. Las plantas obtenidas se analizaron para comprobar su nivel de ploidía y su carácter híbrido.

## 1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1.2.1 Obtención de una línea de callo embriogénico de *C. macrophylla*.

Se recolectaron frutos 2-8 semanas tras la antesis de plantas de *C. macrophylla* Webster, pertenecientes al Banco de Germoplasma de cítricos del IVIA. Los frutos se desinfectaron por inmersión en una solución acuosa de hipoclorito sódico al 1% (v/v) con 0,1% de Tween 20 durante 10 minutos. Se extrajeron 850 óvulos inmaduros que se cultivaron en medio MS (Murashige & Skoog 1962) con las modificaciones descritas por Pérez y col. (Pérez y col. 1998b).

El callo inicial originado a partir de los óvulos se cultivó en medio MT (Murashige & Tucker 1969) con 40 gr/l de sacarosa para la proliferación del mismo. Posteriormente fue crioconservado siguiendo el protocolo que se emplea rutinariamente en nuestro laboratorio (Pérez y col. 1997). Para ello se depositaron 180 mg de callo en crioviales estériles y se añadieron 1,8 ml del mismo medio utilizado para el cultivo de óvulos pero sin agar y con un 10% de DMSO (Dimetilsulfoxido). La congelación del callo se llevó a cabo utilizando un congelador criogénico programable Minicool 40 PC (Air Liquide®, Francia) que funciona con inyección de nitrógeno líquido. En la primera fase de congelación se reduce la temperatura del material vegetal de forma gradual hasta alcanzar  $-40^{\circ}\text{C}$  en un tiempo aproximado de 90 minutos, de esta forma se evita dañar los tejidos vegetales. En la segunda fase de congelación el descenso de temperatura es más rápido pasando de  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta  $-150^{\circ}\text{C}$  en tan solo 5 minutos.

Los callos congelados se mantuvieron a una temperatura de  $-150^{\circ}\text{C}$  en un congelador CFC  $-152$  (Sanyo®, Japan).

La descongelación de los callos se realizó mediante inmersión de los crioviales en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se cultivaron en medio EME con sacarosa (anejo) durante un mes a una temperatura de  $23^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa del 50%, iluminación de  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y con ciclo de luz de 16 horas. Cuando se reactivaron los procesos de multiplicación celular, los callos se mantuvieron en forma de suspensión celular en medio líquido H&H (anejo) en agitación constante de 150 rpm, y realizando subcultivos cada 15 días para mantener activa la multiplicación celular.

### 1.2.2 Aislamiento de protoplastos.

Para el aislamiento y la purificación de los protoplastos se utilizó el protocolo puesto a punto por Grosser y Gmitter (Grosser & Gmitter 1990b).

Se recolectaron hojas a partir de brotes de 3 ó 4 semanas con lamina foliar completamente expandida de plantas de citrange “Carrizo” (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) procedentes del Banco de Germoplasma de Cítricos del IVIA y mantenidas en el invernadero a temperatura entre 23° y 27°C, luz reducida con malla y humedad entre 60 y 90%.

Las hojas se esterilizaron mediante inmersión en una solución de hipoclorito sódico al 10% con 0,1% de detergente Tween-20 durante 10 minutos y a continuación se lavaron tres veces con agua estéril. Las hojas se cortaron perpendicularmente al nervio central. Los fragmentos de hoja se colocaron en matraces de vidrio de 25 ml que contenían 5 ml de medio BH3 0,6 M (anejo) y 3 ml de solución enzimática SE-1 (anejo).

Para el aislamiento de protoplastos de callo se utilizaron las líneas celulares procedentes de callos crioconservados de *C. macrophylla* Webster. Para el aislamiento se transfirieron 3 ml de la suspensión celular a una placa Petri de 5 cm de diámetro “Corning Untreated Polystyrene Suspension Culture Dishes” (Corning-Costar®, Cambridge, MA, USA) y se eliminó el medio líquido por medio de una pipeta Pasteur estéril. Inmediatamente se añadieron 2,5 ml de medio de cultivo BH3 0,7 M (anejo) y 1,5 ml de la solución enzimática SE-1 (anejo).

Tanto los matraces utilizados para la digestión de las hojas, como las placas Petri utilizadas para la digestión del callo, se mantuvieron 18 horas en agitación a una velocidad de 35 rpm, en oscuridad y a una temperatura de 23°C.

A continuación se procedió a la purificación de los protoplastos mediante separación en gradiente de manitol y sacarosa (Grosser & Gmitter 1990b). Primero se filtró la mezcla de maceración a través de una malla estéril de 45 µm de luz con el fin de separar los protoplastos del resto de material no digerido. La suspensión celular se depositó en tubos de vidrio de 10 ml con fondo cónico que se centrifugaron a 900 rpm durante 9 minutos en una centrífuga Megafuge 1.0 (Heraeus Sepatech® GMBH, Alemania). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 2 ml de una solución de manitol 13% (anejo), que fue depositada cuidadosamente encima de 5 ml de una solución de sacarosa 25% (anejo) en tubos de vidrio de 10 ml.

Los tubos se centrifugaron a 900 rpm durante 9 minutos de modo que los protoplastos enteros se quedaran en la interfase de las dos soluciones mientras que los restos celulares precipitaron al fondo del tubo. Los protoplastos se rescataron con una pipeta Pasteur estéril y se depositaron en tubos para su lavado. Se volvieron a centrifugar a 800 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en una solución de manitol al 13% antes de proceder a la evaluación del rendimiento.

### **1.2.3 Fusión química.**

La fusión química de protoplastos se realizó según el protocolo descrito por Olivares-Fuster (Olivares-Fuster 1998) y Grosser Gmitter (Grosser&Gmitter 1990a). Se empleó PEG 1500 MW previamente desionizado por contacto con una resina de intercambio iónico AG 501-X8 (D) (Bio-Rlad Laboratories®, USA). Para ello se añadió 1g de la resina a 50 ml de una solución PEG 1500 al 50%, y se mantuvo en agitación durante 15-20 minutos. Para separar la resina del PEG se filtró la solución con papel de filtro Whatman 43 (Whatman®, England). A partir de esta solución se prepararon las diluciones a emplear en el proceso de fusión.

Los protoplastos de hoja y de callo se resuspendieron en medio BH3 a una concentraciones respectivas de 1,5 millones de pp/ml y 1 millón de pp/ml. Se juntaron volúmenes iguales de las dos suspensiones y se depositaron alrededor de 300 µl de la mezcla en el centro de placas de 5 cm de diámetro “Corning® Untreated Polystyrene Suspension Culture Dishes”.

Inmediatamente después se añadieron por encima de la mezcla de protoplastos dos gotas de PEG al 40% para conseguir aglutinar los protoplastos antes de que sedimentaran, puesto que la mayor velocidad de sedimentación de los protoplastos de callo crearía una descompensación en la concentración de los mismos (Grosser 1994).

Tras 8 minutos de incubación con la solución de PEG se añadieron alrededor de los protoplastos tres gotas de una mezcla 9:1 de las soluciones A (caracterizada por contener 10% de DMSO) y B (compuesta por glicina y con pH 10) (anejo). De esta forma se consigue estabilizar las membranas celulares y completar el proceso de fusión iniciado gracias a la acción del PEG.

Trascurridos 12 minutos se procedió a la eliminación progresiva de los agentes fusógenos (tóxicos para las células) mediante lavados con medio BH3 0,6 M. Para ello se añadieron 12 gotas de medio en la periferia de la mezcla de fusión y después de 5

minutos se utilizó una pipeta Pasteur para eliminar aproximadamente 0,5 ml de líquido de la periferia, intentando no afectara los protoplastos que se encuentran suspendidos. El proceso de lavado se repitió tres veces.

Finalmente se añadieron 12 gotas de medio BH3 para el cultivo de los protoplastos y se depositaron 5 gotas de medio en el contorno de la placa, con el fin de mantener un elevado nivel de humedad en el interior de la misma. Por último se sellaron las placas y se cultivaron a 28°C en oscuridad.

#### **1.2.4 Fusión quimio-eléctrica.**

La fusión quimio-eléctrica de protoplastos se realizó siguiendo el protocolo puesto a punto por Olivares-Fuster (Olivares-Fuster y col. 2005). Los protoplastos con una concentración de  $1 \times 10^6$  pp/ml para los de callo y  $1,5 \times 10^6$  pp/ml para los de hoja se resuspendieron en una solución de manitol 0,8 M y  $\text{CaCl}_2$  0,05 M.

Se depositaron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de protoplastos en el centro de placas Petri “Corning Untreated Polystyrene Suspension Culture Dishes” de 5 cm de diámetro y las células se dejaron sedimentar durante 10 minutos. A continuación se añadieron tres gotas de una solución 20% de PEG 1500 MW en la periferia de la suspensión de protoplastos para favorecer la aglutinación de los mismos. Trascorridos 10 minutos se aplicaron a la suspensión de protoplastos 2 pulsos de corriente continua a 1500 V/cm. Para ello se utilizaron electrodos de titanio distanciados 0,5 cm entre sí y conectados a una fuente Jouan GHT 1287B (Jouan, Thermo Fisher Scientific Inc.®, USA). Los electrodos se esterilizaron previamente mediante inmersión en etanol 70% durante 5 minutos y etanol 90% durante 2 minutos. Antes de emitir los pulsos se puso especial atención en asegurar que los electrodos hicieran contacto con la suspensión celular.

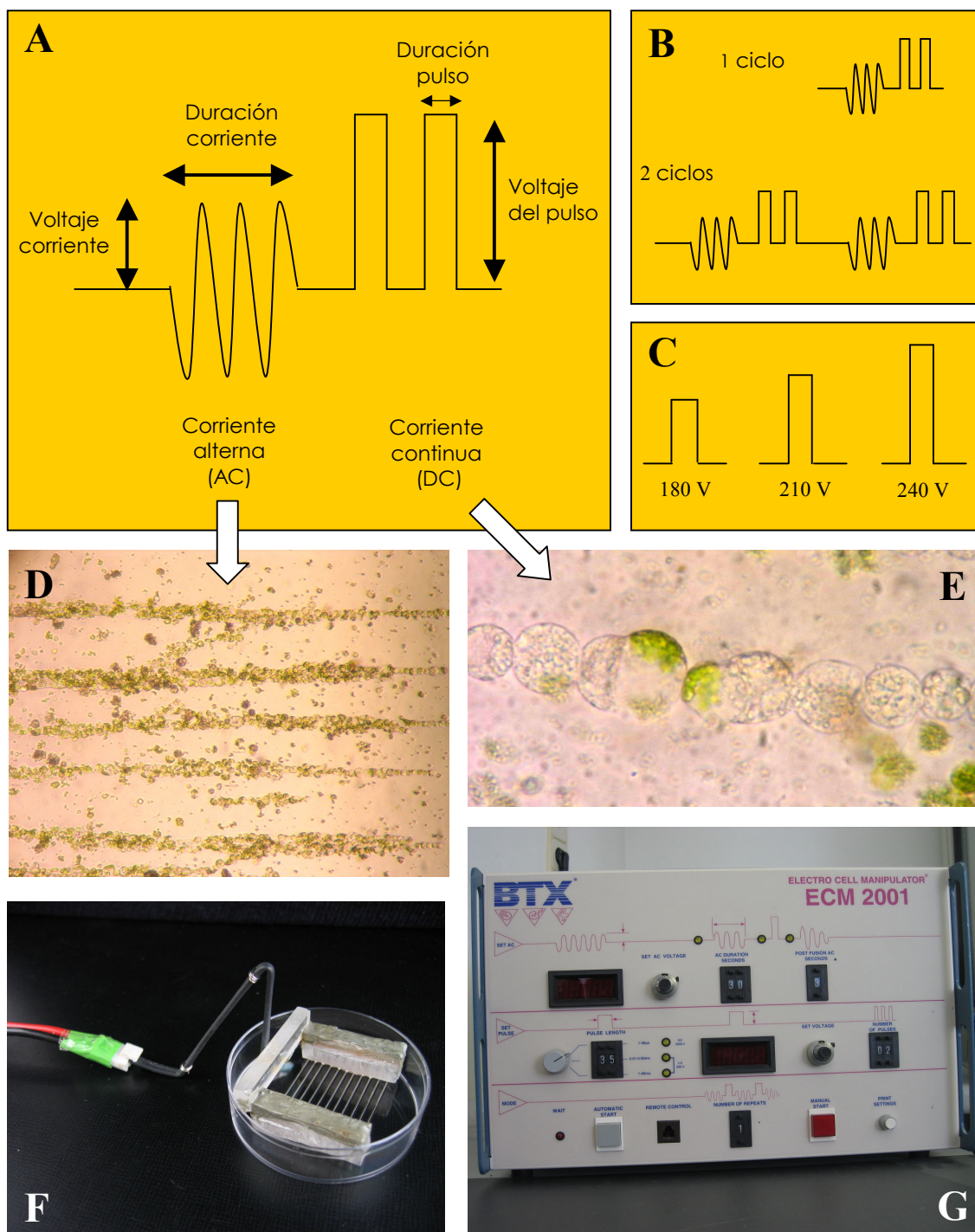
Tras esperar 8 minutos para que las membranas celulares se estabilizaran, se añadieron 4 gotas de la mezcla 9:1 de las soluciones A y B (las mismas utilizadas en la fusión química, anejo) para completar el proceso de fusión. Después de 12 minutos se añadieron 12 gotas de medio BH3 y se procedió al lavado siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente para la fusión química.

Completados tres lavados, se añadieron 12 gotas de medio BH3 encima de los protoplastos y 6 gotas en el contorno de la placa, se sellaron con parafilm y se cultivaron a 28°C en condiciones de muy baja luminosidad.

### 1.2.5 Fusión eléctrica.

Los protoplastos aislados se resuspendieron en una solución de manitol 0,7M y  $\text{CaCl}_2$  0,25 mM a una concentración de  $0,45 \times 10^6$  pp/ml para los protoplastos de hoja y  $0,55 \times 10^6$  pp/ml para los de callo (Ollitrault y col. 1996). Se mezclaron volúmenes iguales de las suspensiones de protoplastos de callo y hoja y se depositaron 0,5 ml de la mezcla en placas Petri de 5 cm de diámetro. A continuación se utilizó la cámara de fusión artesanal mostrada en la figura 1.1.F y constituida por 11 electrodos distanciados entre sí 0,2 cm; el tamaño de la cámara se había adaptado a las placas Petri de 5 cm de diámetro utilizadas en las fusiones. La cámara de fusión se esterilizó mediante inmersión en dos soluciones de etanol al 70% durante 5 minutos y al 90% durante 2 minutos. A continuación se situaron 0,5 ml de la mezcla de protoplastos dentro de la cámara de fusión y se inició un programa automático de fusión eléctrica (figura 1.1.A) mediante un manipulador eléctrico de células ECM 2001 (BTX®, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) (figura 1.1.G). Cada ciclo de fusión consta de una primera fase de alineamiento de los protoplastos mediante la emisión de corriente alterna (figura 1.1.D), y de una segunda fase en la cual la emisión de pulsos de corriente continua facilita la unión de las membranas celulares (figura 1.1.E). Para la primera fase del proceso de fusión se utilizó siempre un voltaje de 20 V durante un tiempo de 30 segundos (Hidaka & Omura 1992; Ollitrault y col. 1996; Guo y col. 1998). En la segunda fase del proceso se ensayaron tres voltajes diferentes para el pulso de corriente continua: 180 V, 210 V y 240 V (figura 1.1.B). Cada pulso tuvo una duración de 35  $\mu\text{s}$  (Ollitrault y col. 1996) y se repitió dos veces en cada ciclo; en el ensayo realizado se comparó el efecto de 1 y 2 ciclos con cada uno de los voltajes indicados (figura 1.1.C). Estas seis condiciones de fusión se repitieron en 10 placas en tres aislamientos diferentes de protoplastos, lo que hace un total de 30 placas por condición.

Una vez terminado el proceso de fusión se añadieron 12 gotas de medio BH3 encima de los protoplastos y 6 gotas en el contorno de las placas, que se sellaron con parafilm y se cultivaron a 28°C en condiciones de muy baja luminosidad ( $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ).



**Figura 1.1** A) Representación gráfica de las diferentes fases del proceso de fusión eléctrica. B-C) Variantes analizadas para la puesta a punto del proceso de fusión eléctrica; el número de ciclos y voltaje del pulso de corriente continua. D) Protoplastos alineados por medio de corriente alterna durante el proceso de fusión eléctrica. E) Protoplastos en fase de fusión sometidos a pulsos de corriente continua. F) Cámara de fusión artesanal empleada para el proceso de fusión eléctrica. G) Manipulador eléctrico de células ECM 2001 (BTX®).

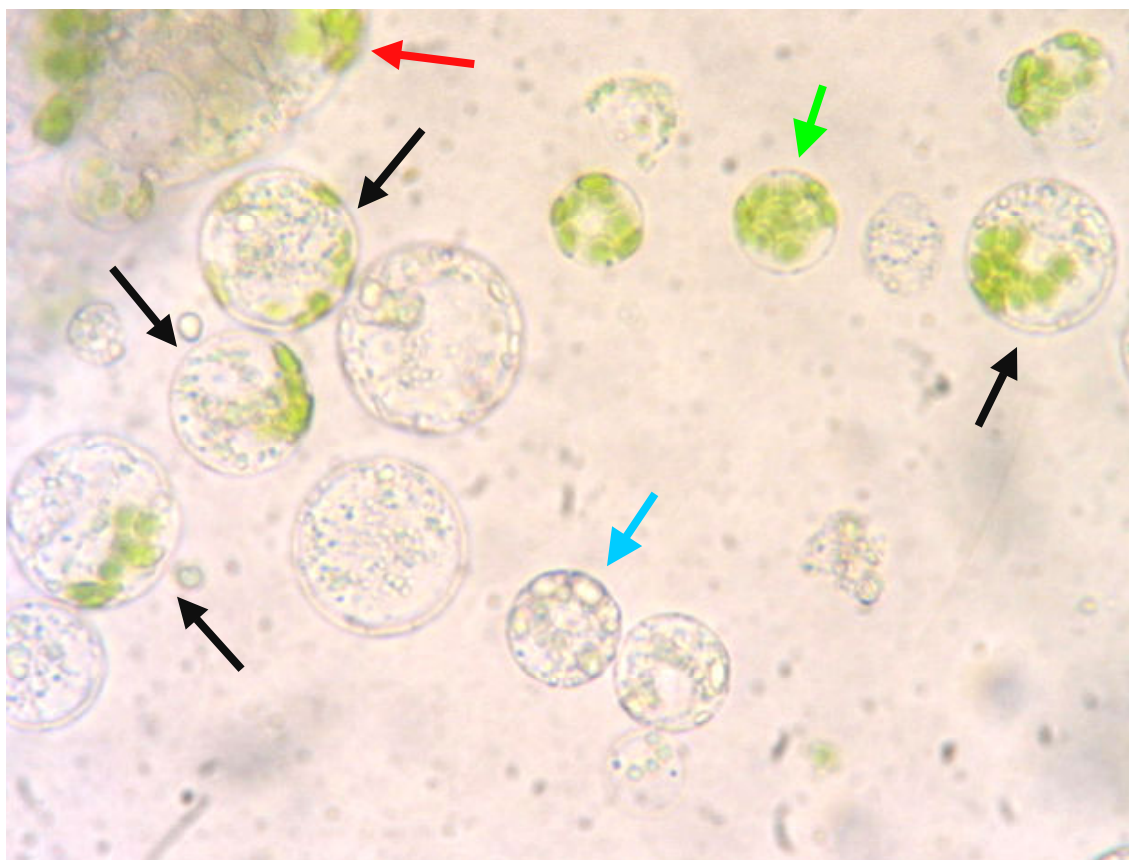


### 1.2.6 Evaluación de la tasa de fusión.

El porcentaje de heterocariones y de fusiones entre múltiples células (o multifusiones) se utilizó como parámetro para cuantificar los resultados obtenidos con las distintas condiciones de fusión examinadas.

La identificación de las células heterocariones fue posible gracias a la diferente morfología de los protoplastos procedentes de los dos parentales. En los protoplastos aislados a partir de mesófilo es evidente la presencia de cloroplastos mientras que los protoplastos aislados a partir de callo son de color blanco y presentan un elevado número de gránulos de almidón (figura 1.2).

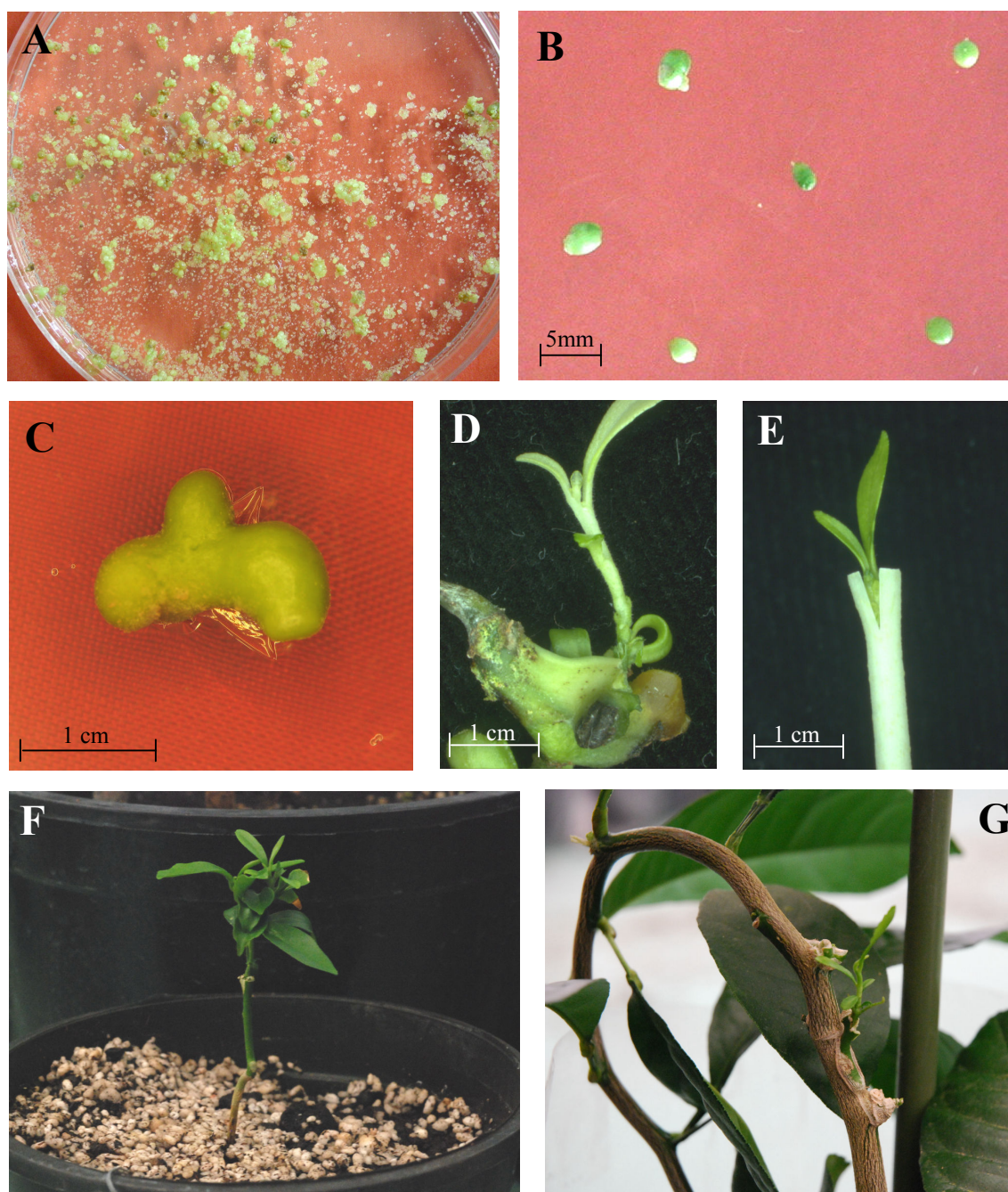
El porcentaje de heterocariones y multifusiones se determinó mediante conteo de las células presentes en 100 campos diferentes de microscopio para cada una de las condiciones ensayadas. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente aplicando un modelo lineal mixto generalizado y asumiendo que la variable dependiente se distribuye de forma binomial.



**Figura 1.2.** Ejemplo de conteo de células heterocariones (flechas negras) y multifusiones (flecha roja) obtenidos tras la fusión eléctrica (180 V y 2 ciclos) entre protoplastos procedentes de mesófilo de hojas de plantas de citrange “Carrizo” (flecha verde) y protoplastos procedentes de callo embriogénico de *C. macrophylla*. (flecha azul).

### **1.2.7 Regeneración de híbridos.**

Las suspensiones celulares se cultivaron en medio líquido BH3 durante cuatro semanas para la formación de microcolonias y a continuación el contenido de cada placa fue transferido a placas Petri 90 x 15 mm con medio EME maltosa 0,4 M (anejo). Las placas se mantuvieron en cámaras de cultivo a una temperatura de 26°C, y bajo un flujo fotosintético de 40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . En estas condiciones se produjo la embriogénesis somática de las colonias a partir de la cuarta semana de cultivo (figura 1.3.A). Los embriones formados se separaron del callo cuando se encontraban en la fase de desarrollo globular y tenían un tamaño de 2-3 mm (figura 1.3.B). Tras su conteo los embriones se pasaron a un medio 1500 donde permanecieron entre tres y cuatro semanas. Los embriones que alcanzaron un tamaño de aproximadamente 0,5-1 cm (figura 1.3.C) se contaron y se traspasaron a otro medio de cultivo (B+, anejo), con 1 ppm de GA<sub>3</sub> y 0,02 ppm de NAA para favorecer su germinación y la diferenciación de los órganos. Los embriones que solamente diferenciaron brotes (figura 1.3.D) o que no presentaron una adecuada conexión vascular entre tallo y raíz, no fueron capaces de sobrevivir al trasplante a invernadero por lo que fue necesario realizar el minijerto de ápices sobre patrones de citrage “Troyer” cultivados in vitro para obtener plantas completas (figura 1.3.E) (Navarro y col. 1975; Navarro 1992; Navarro & Juárez 2007). Las plantas injertadas se cultivaron durante un mes en medio líquido MS (Murashige & Skoog 1962) con 0,2 mg/l de clorhidrato de tiamina, 1mg/l de clorhidrato de piridoxina, 1mg/l de ácido nicotínico y 75 g/l de sacarosa. Este medio favorece por un lado la brotación de la yema injertada y por otro lado el desarrollo de un adecuado aparato radicular, indispensable para el trasplante a maceta.



**Figura 1.3** A) Embriogénesis somática inducida mediante el cultivo de las colonias de minicallos en medio con maltosa tras 4-5 semanas de cultivo. B) Embriones en fase de desarrollo globular, cultivados en medio EME 1500. C) Embrión en crecimiento no normalizado (pseudobulbo) justo antes de ser pasados a medio B+. D) Embrión con brote diferenciado, cuyo ápice fue utilizado para realizar mininjertos y obtener una planta completa. E) Mininjerto de un ápice originado a partir de un embrión híbrido F) Planta obtenida tras el mininjerto *in vitro* y trasplantada a maceta. G) Planta mininjertada *in vitro* y luego sobreinjertada sobre un patrón adulto para acelerar su crecimiento.

### **1.2.8 Trasplante.**

Tras un mes de cultivo *in vitro*, las plantas desarrolladas a partir del mininjerto se trasplantaron a macetas (figura 1.3.F) que contenían un sustrato compuesto por una mezcla de tres partes de turba (negra/rubia, mezcla 1:1) por una parte de perlita y esterilizado por vapor de agua a 100°C durante 1 hora.

Algunas de las plantas se volvieron a injertar (figura 1.3.G) sobre patrones procedentes de semilla y cultivados durante seis meses en invernadero. Este sobreinjerto permite un desarrollo más rápido de las plantas obtenidas *in vitro* reduciendo en más de dos meses el tiempo necesario para el crecimiento de la planta antes de su caracterización.

### **1.2.9 Comparación de los tres métodos de fusión.**

Se realizó una comparación de los tres métodos de fusión utilizados para la hibridación somática de cítricos. Para ello se llevaron a cabo tres aislamientos de protoplastos independientes y en cada uno de ellos se emplearon los tres métodos de fusión tal y como se describen en los apartados anteriores. Para la aplicación del método eléctrico se escogieron los parámetros de fusión que permitieron obtener los mejores resultados en los experimentos anteriores. El voltaje del pulso de corriente continua fue de 180 V y el ciclo fue repetido dos veces.

Tras la fusión se comparó el rendimiento de cada método estimando el porcentaje de heterocariones y multifusiones obtenidos, siguiendo el mismo procedimiento ya descrito en el apartado 1.2.6. Se realizó el conteo de los embriones regenerados y del número de plantas obtenidas con cada método. Posteriormente se caracterizaron las plantas mediante citometría de flujo y análisis molecular.

### **1.2.10 Caracterización de las plantas regeneradas.**

#### **1.2.10.1 Determinación del nivel de ploidía.**

La evaluación del nivel de ploidía se realizó mediante un citómetro de flujo Ploidy Analyzer II (PA) (Partec®, Munster, Germany) equipado con una lámpara de mercurio HBO 100W y filtros KG1 y BG38. Para determinar el nivel de ploidía de las plantas regeneradas se analizaron hojas de éstas conjuntamente con fragmentos de hoja

de una planta control diploide. Se trocearon finamente los fragmentos de hojas con la ayuda de una cuchilla y unas gotas de tampón de extracción de núcleos (High resolution DNA kit type P, solution A; Partec®). Se añadió 1 ml del mismo tampón y se filtró la muestra a través una malla de 35 µm; después se añadieron 5 ml de colorante DAPI (High resolution DNA kit type P, solution B; Partec®). El histograma de intensidad de fluorescencia obtenido se evaluó mediante el uso del programa informático DPAC v 2.0 (Partec®), incorporado en el propio citómetro. Para cada análisis este programa determina la posición relativa de los picos, el coeficiente de variación del análisis y el índice de ploidía relativo de las muestras analizadas.

#### 1.2.10.2 Conteo cromosómico.

El conteo cromosómico se realizó según la metodología descrita por D'Hont y col. (1996) basada en la fijación de los tejidos, maceración de los mismos y posterior tinción con DAPI (High resolution DNA kit type P, solution B, Partec®, Munster, Germany). Se recolectaron ápices meristemáticos procedentes de brotes vegetativos en crecimiento activo de las plantas regeneradas. El material vegetal se sumergió en una solución de 8-hidroxiquinoleína durante 8 h (4h a temperatura ambiente y 4 h a 4°C) y se fijó durante 48 h en una solución de etanol y ácido acético (3:1). Finalmente los ápices se depositaron en una solución de etanol al 70% a 4°C, para su conservación. Los tejidos se lavaron 2 veces con agua destilada durante 10 minutos y a continuación se sumergieron en ácido clorhídrico 5 N durante 10 minutos para su maceración. Tras un nuevo lavado de 10 minutos en agua destilada, se aisló el meristemo con 2-3 primordios foliares y se depositó sobre un portaobjetos con una gota de DAPI; se cubrió con un cubre sobre el que se realizó el squash. Para la observación de los tejidos teñidos se utilizó un microscopio Eclipse E 800 (Nikon®, Japan) equipado con luz ultravioleta y filtros adecuados.

#### 1.2.10.3 Caracterización molecular.

El análisis molecular inicial de las plantas se realizó empleando los marcadores microsatélite SSRs nucleares TAA 15 y CAC 23 (Kijas y col. 1997) y el marcador citoplasmático *ccmp6* (Cheng y col. 2003). Para ello se recolectaron hojas de las plantas

regeneradas a partir de los diferentes eventos de fusión y se extrajo el ADN genómico siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta y col. (1983).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador Termocycler Ep Gradient S (Eppendorf®, Hamburgo, Germany) en un volumen final de 17 µl. Cada reacción estaba compuesta por tampón de reacción 750 mM tris HCl (pH 9) 50 mM KCl 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0001% BSA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP premezclados, 0,2 µM de cada cebador, 0,8 unidades de Taq polimerasa y 10 ng de ADN.

El programa de PCR utilizado constó de una fase de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos y 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 30 segundos de la temperatura de anillamiento específica de cada cebador y 72°C durante 1 minuto; finalmente se programó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

La separación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de acrilamida / bis-acrilamida al 6%, urea 7M y tampón de electroforesis TBE 0,5X (Tris, ácido bórico y EDTA 0,5 M, pH 8) en cubetas DCode™ de Biorad®. Las condiciones de electroforesis fueron 350 V, 90 mA y temperatura de 55°C durante 2 horas.

Los fragmentos amplificados se detectaron mediante tinción con plata según el protocolo descrito por Benbouza et al. (2006). El gel se fijó mediante inmersión en una solución de etanol al 10% y ácido acético al 0,5% durante 5 minutos, después se pasó a una solución de AgNO<sub>3</sub> al 0,15% y formaldehído durante 7 minutos; se realizó un lavado con agua destilada y sucesivamente el gel permaneció en una solución de NaOH al 15% y formaldehído 0,15% durante 5-10 minutos y se finalizó el proceso de tinción dejando el gel 3 minutos en la solución inicial.

### **1.2.11 Aplicación del método de fusión eléctrica a otros genotipos.**

Para comprobar la eficacia del método de fusión eléctrica puesto a punto en este estudio se realizaron fusiones utilizando otros genotipos y el protocolo optimizado (voltaje del pulso de corriente continua de 180 V y dos ciclos de fusión).

Se realizaron fusiones entre limón “Rugoso”, *Citrus jambhiri* (Lush.), y el híbrido de mandarina “Encore” (*C. nobilis* x *C. deliciosa*); el primero se escogió por dar buenos rendimientos en protoplastos a partir de la digestión de sus hojas, y el segundo porque los protoplastos de callo de esta variedad tienen unas características físicas que facilita

su fusión (tamaño pequeño y pocas vacuolas). La comparación entre los resultados obtenidos con la hibridación *C. macrophylla* + “Carrizo” y “Encore” + “Rugoso” pueden ser útiles para definir las potencialidades del método eléctrico al emplear una combinación con mejor aptitud para la fusión.

Además se realizaron fusiones entre protoplastos de callo de *C. macrophylla* y protoplastos de hoja de *C. taiwanica*. Los resultados de esta fusión comparados con los de la fusión entre *C. macrophylla* y citrange “Carrizo” permitirán evaluar la eficiencia del proceso de fusión utilizando el mismo parental embriogénico (*C. macrophylla*) y diferente parental procedente de mesófilo. Otra de las razones por la cual se escogieron estos genotipos fue que el *C. taiwanica* es un patrón que favorece la producción de frutos de elevada calidad, al contrario que el *C. macrophylla*, por lo que sería de elevado interés estudiar el comportamiento agronómico de este híbrido.

### **1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

#### **1.3.1 Obtención de una línea de callo embriogénico de *C. macrophylla*.**

Ochenta y ocho de los 850 óvulos cultivados produjeron embriones y solo 2 óvulos produjeron callo que fue posible multiplicar. Como es evidente la frecuencia de obtención de callo fue muy baja (0,2%) en comparación con la de otras variedades y líneas obtenidas en nuestro laboratorio (por ejemplo, 19% con la variedad de naranja dulce “Pineapple”) (Perez y col. 1998a). La regeneración del callo se produjo tras 4-5 semanas de cultivo de los óvulos y el callo obtenido a partir de estos presentó un buen aspecto, de tipo friable y no compacto, condición indispensable para la regeneración de embriones.

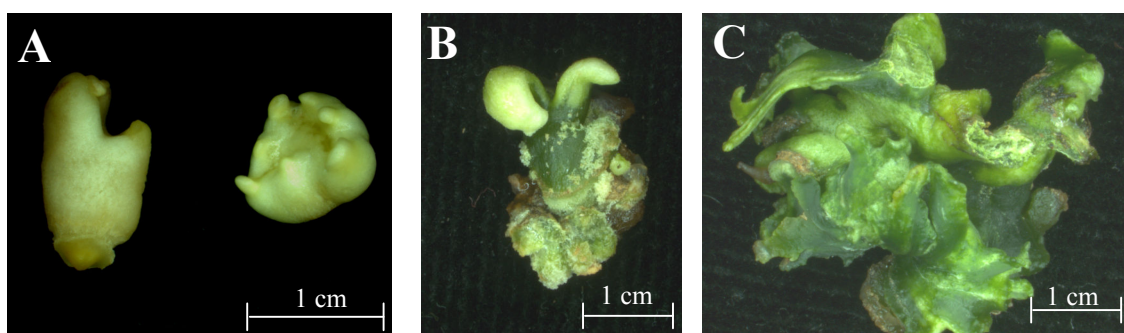
El callo fue congelado con éxito y mantenido a  $-150^{\circ}\text{C}$ . Cuando se descongeló para su utilización se evaluó su capacidad embriogénica; para ello se cultivó en un medio EME con maltosa (anejo) durante un mes.

A partir de la 4<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> semana de cultivo se obtuvieron embriones globulares y se pudo comprobar que el callo presentaba una buena tasa de regeneración (datos no mostrados). Los embriones se cultivaron en un medio de crecimiento (EME 1500) donde permanecieron hasta alcanzar un tamaño entre 0,5 y 1 cm. En esta fase de cultivo los embriones deberían pasar por distintas fases de desarrollo hasta alcanzar la fase de desarrollo cotiledonario, que es lo que sucede con la mayoría de genotipos. Sin embargo

fueron muy pocos los embriones que presentaron esta morfología. Además, fenómenos de pardeamiento (figura 1.4.A) provocaron la pérdida de numerosos embriones.

En la siguiente fase de crecimiento se estimuló la germinación mediante el cultivo en un medio enriquecido con hormonas (medio B+). De esta forma los embriones deberían alcanzar la fase de desarrollo de torpedo y germinan formando brotes y raíces. Sin embargo muchos embriones presentaron una germinación parcial produciendo solamente el brote o la raíz. Además la producción de embriones con cotiledones fasciculados (figura 1.4.B) y embriones multicotiledonarios (figura 1.4.C) redujo la tasa de germinación, que finalmente fue muy baja, dificultando la regeneración de plantas.

En estas circunstancias la aplicación del miniinjerto resulta un instrumento muy útil para la obtención de plantas completas a partir de los brotes formados.



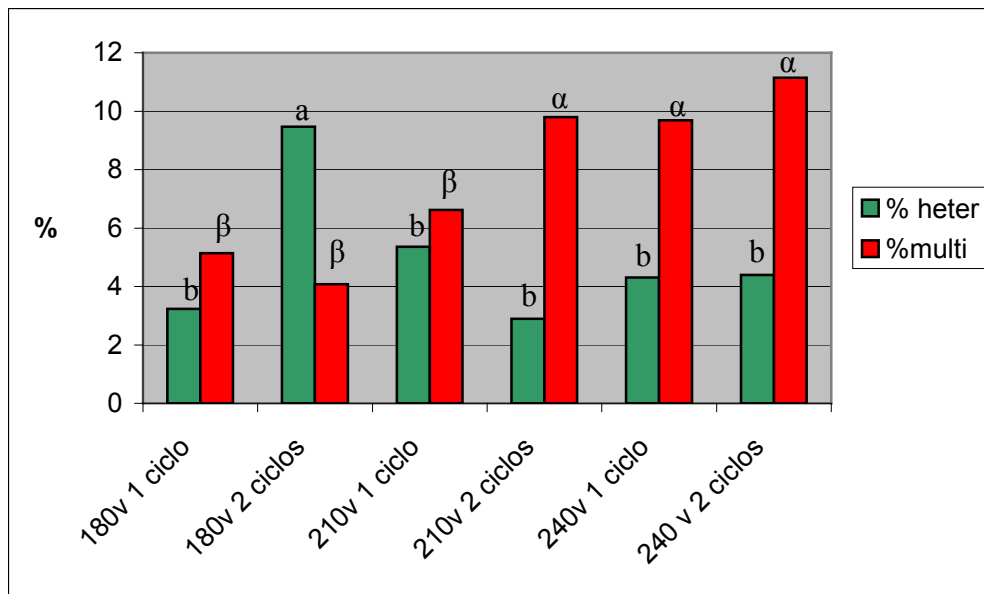
**Figura 1.4** A) Embriones pardeados de *C. macrophylla* que no pudieron seguir su normal desarrollo. B) Embrión con cotiledones fasciculados que no consiguió germinar. C) Embrión multicotiledonario.

En la bibliografía consultada no hay constancia de la obtención de callo embriogénico del genotipo *C. macrophylla*, lo que puede estar motivado por la baja eficiencia del proceso de obtención. Por ello los resultados aquí expuestos se pueden considerar de relevante importancia dado que abre la posibilidad a la utilización de este genotipo en la mejora de cítricos por hibridación somática. La inexistencia previa de callo de este genotipo justifica que solamente se haya obtenido un híbrido somático utilizando protoplastos de hojas de *C. macrophylla* (fusionados con protoplastos de callo de *C. amblycarpa*) (Grosser & Gmitter 2005). Esto indica que no se han explorado aún las potencialidades del *C. macrophylla* como parental para la obtención de híbridos somáticos, a pesar de que sea uno de los patrones más utilizado en España por tener características agronómicas de interés.



### 1.3.2 Optimización del método de fusión eléctrica.

La figura 1.5 muestra una representación grafica del porcentaje de heterocariones y multifusiones obtenidos con las distintas combinaciones de fusión ensayadas.



**Figura 1.5.** Porcentajes de heterocariones y multifusiones obtenidos con diferentes condiciones de fusión entre protoplastos de citrange “Carrizo” y *C. macrophylla*. Los resultados son la media de tres experimentos diferentes. Las letras a-b y  $\alpha$ - $\beta$  muestran las diferencias significativas que existen respectivamente entre los porcentajes de heterocariones y de multifusiones aplicando las diferentes condiciones de fusión. Con letras distintas existe más del 95% de probabilidad que las diferencias sean significativas.

El mayor porcentaje de heterocariones (9,5%) se consiguió utilizando un voltaje de 180 V y repitiendo dos veces el ciclo de fusión (un total de 4 pulsos). Este resultado es significativamente diferente a todos los demás. Por otro lado con estas mismas condiciones de fusión se consigue el porcentaje de multifusiones más bajo (4%).

La utilización de un voltaje de 180 V y un solo ciclo no es suficiente para generar un adecuado número de heterocariones (solamente un 3,5%); al contrario la aplicación de dos ciclos aumenta notablemente el número de células híbridas. Con voltajes bajos también el porcentaje de multifusiones resulta bastante reducido.

Al aumentar el voltaje de los pulsos o el número de ciclos es más frecuente la formación de multifusiones y se reduce el número de heterocariones. Con 210 V se reduce notablemente el número de heterocariones mientras que aumenta el número de multifusiones, especialmente si se utilizan dos ciclos. Con 240 V el porcentaje de

heterocariones se reduce a un 4% y el de mutlifusiones alcanza su valor máximo de 11%, por lo que este voltaje se puede considerar excesivo.

Estos resultados son similares a los conseguidos por otros grupos que aplican un sistema de fusión eléctrica que obtienen entre un 5% y un 15% de heterocariones (Hidaka & Omura 1992; Ollitrault y col. 1996; Guo y col. 1998). Sin embargo los resultados obtenidos por estos grupos muestran también un porcentaje de multifusiones muy superior (más del 10%) al que se ha obtenido en nuestras condiciones óptimas. La variabilidad en los resultados obtenidos por los diferentes grupos puede ser imputable a factores como los genotipos usados o las condiciones de trabajo. También algunos autores creen que la metodología utilizada para estimar la tasa de fusión influye notablemente sobre los resultados obtenidos, ya que estimando el porcentaje de heterocariones mediante citometría de flujo se obtienen valores más bajos respecto a las estimaciones realizadas por conteo con microscopio (Ollitrault y col. 1996).

La determinación de los mejores parámetros de fusión es un aspecto muy importante para conseguir una buena eficiencia en el proceso de hibridación somática. Sin embargo estos parámetros no pueden ser generalizables y utilizables en todas las fusiones. La eficiencia del proceso puede variar de manera relevante dependiendo de los genotipos empleados, del tamaño y densidad de las células y de muchos otros factores (Hidaka & Omura 1992). La posibilidad de adaptar los parámetros de fusión a todos estos factores es también una de las principales ventajas del método eléctrico, que permite obtener un porcentaje de células híbridas tan elevado.

Se ha valorado la capacidad embriogénica de los callos obtenidos a partir de cada una de las seis condiciones de fusión empleadas. La figura 1.6 muestra el número de embriones en fase globular que se han regenerado a partir de cada condición tras el cultivo de los minicallos en el medio sólido EME maltosa.

Las condiciones de fusión con voltajes más elevados o un mayor número de ciclos han permitido obtener un número más elevado de embriones. En particular aplicando pulsos de corriente continua de 240 V y dos ciclos se han conseguido regenerar más de 250 embriones globulares. Al contrario con los voltajes más bajos, 180 V, para las dos condiciones ensayadas (1 ciclo y 2 ciclos) el número de embriones regenerados ha sido aproximadamente de 80.

Este resultado se puede atribuir al efecto de la corriente eléctrica y de los campos magnéticos a ella relacionados; diferentes estudios han demostrado que la corriente eléctrica tiene la capacidad de estimular la multiplicación celular de los cultivos y la

regeneración de embriones (Gilmour y col. 1989; Negrutiu y col. 1986; Filek y col. 2005). La mayoría de los embriones regenerados se consiguieron en las primeras semanas de cultivo. Más de la mitad del total se regeneraron a la quinta semana tras la puesta en cultivo de los minicallos en medio EME con maltosa.

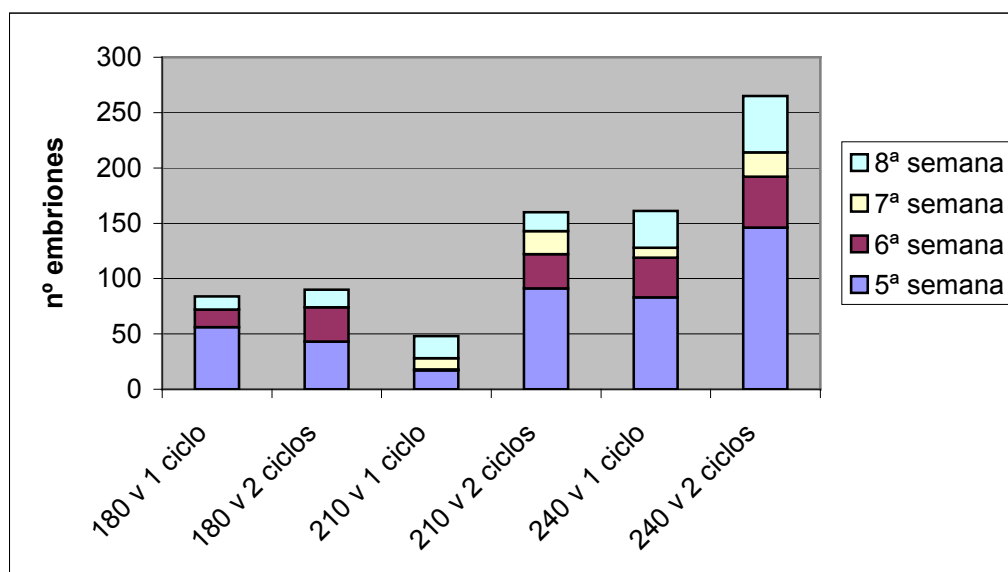
Los embriones se cultivaron en medio EME 1500 hasta alcanzar un tamaño entre 0,5 y 1 cm. Poco más de la mitad de los embriones regenerados consiguieron alcanzar este tamaño, los restantes se perdieron debido principalmente a problemas de oxidación y pardeamiento (figura 1.4.A).

En la figura 1.7 se muestra el número de embriones que alcanzaron la siguiente fase de cultivo y que se transfirieron a un medio B+ para estimular su germinación. La mayoría de estos embriones no consiguieron germinar, por la formación de embriones multicotiledonarios (figura 1.4.C) o con cotiledones fasciculados (figura 1.4.B). El mayor número de embriones que alcanzaron esta fase de desarrollo se obtuvo con los voltajes más elevados (240 V 1 y 2 ciclos), alrededor de 150 embriones. Con los voltajes más bajos los embriones obtenidos fueron alrededor de 50.

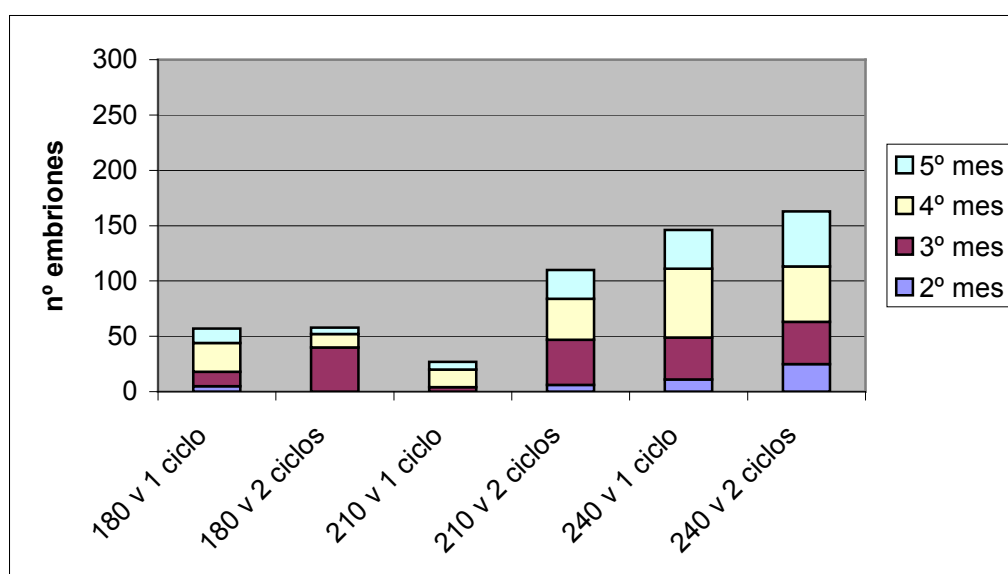
Un bajo porcentaje de embriones consiguieron producir brotes diferenciados y pudieron ser injertados in vitro; las plántulas fueron sucesivamente trasplantadas a maceta para completar su crecimiento.

La tabla 1.1 muestra todas las plantas que se regeneraron a partir de las fusiones realizadas. Se consiguieron plantas con todas las condiciones ensayadas, pero el mayor número (11 plantas) se consiguió con las condiciones de 180 V y 2 ciclos. Incluso con las condiciones de fusión que presentaron una mejor tasa de embriogénesis (como por ejemplo con 210 y 240 V) se obtuvo un número más reducido de plantas.

La diferencia drástica entre el número de plantas obtenidas y los embriones regenerados es seguramente imputable al uso de *C. macrophylla* como parental embriogénico. Los problemas encontrados en el proceso de regeneración, ya descritos en el apartado 1.3.1, han impedido obtener un mayor número de plantas. Por otro lado la elevada mortalidad de los embriones también podría ser debida a que los embriones formados tengan un nivel de ploidía elevado. La alta tasa de multifusiones registrada con algunas de las condiciones de fusión ensayadas (por ejemplo con la condición de 2 ciclos y 240 V o 210 V) apoya esta hipótesis; estos embriones presentarían dificultades para seguir su normal desarrollo.



**Figura 1.6.** Numero de embriones en estado de desarrollo globular regenerados tras el cultivo de los minicallos en medio con maltosa. Los valores que aparecen son la suma de tres experimentos de fusión de protoplastos de citrange “Carrizo” y *C. macrophylla* empleando las diferentes condiciones de fusión.



**Figura 1.7.** Número de embriones que han alcanzado un tamaño de aproximadamente 0,5-1 cm y que han sido transferido al medio de germinación. Los valores que aparecen son la suma de tres experimentos de fusión de protoplastos de citrange “Carrizo” y *C. macrophylla* empleando diferentes condiciones de fusión.

**Tabla 1.1.** Plantas regeneradas aplicando las seis condiciones diferentes de fusión eléctrica ensayadas.

	180 v 1 ciclo	180 v 2 ciclos	210 v 1 ciclo	210 v 2 ciclos	240 v 1 ciclo	240 v 2 ciclos
híbridos 4x	2	8	0	0	4	3
Cíbridos 2x		3				
Híbridos con otros niveles de ploidía			2 (7x)	1 (5x)		1 (3-6x)
nº total de plantas	2	11	2	1	4	4

### 1.3.2.1 Análisis de ploidía

El análisis del nivel de ploidía de todas las plantas regeneradas se determinó mediante citometría de flujo (figura 1.8.A, C, E, G). Los resultados de este análisis se presentan en la tabla 1.1. Se destacan algunas plantas que presentaron un nivel de ploidía de 7x, 5x y una mixoploide 3-6x. También se obtuvieron 3 plantas diploides morfológicamente semejantes a las plantas de citrange “Carrizo” (parental del que se aislaron protoplastos de mesófilo).

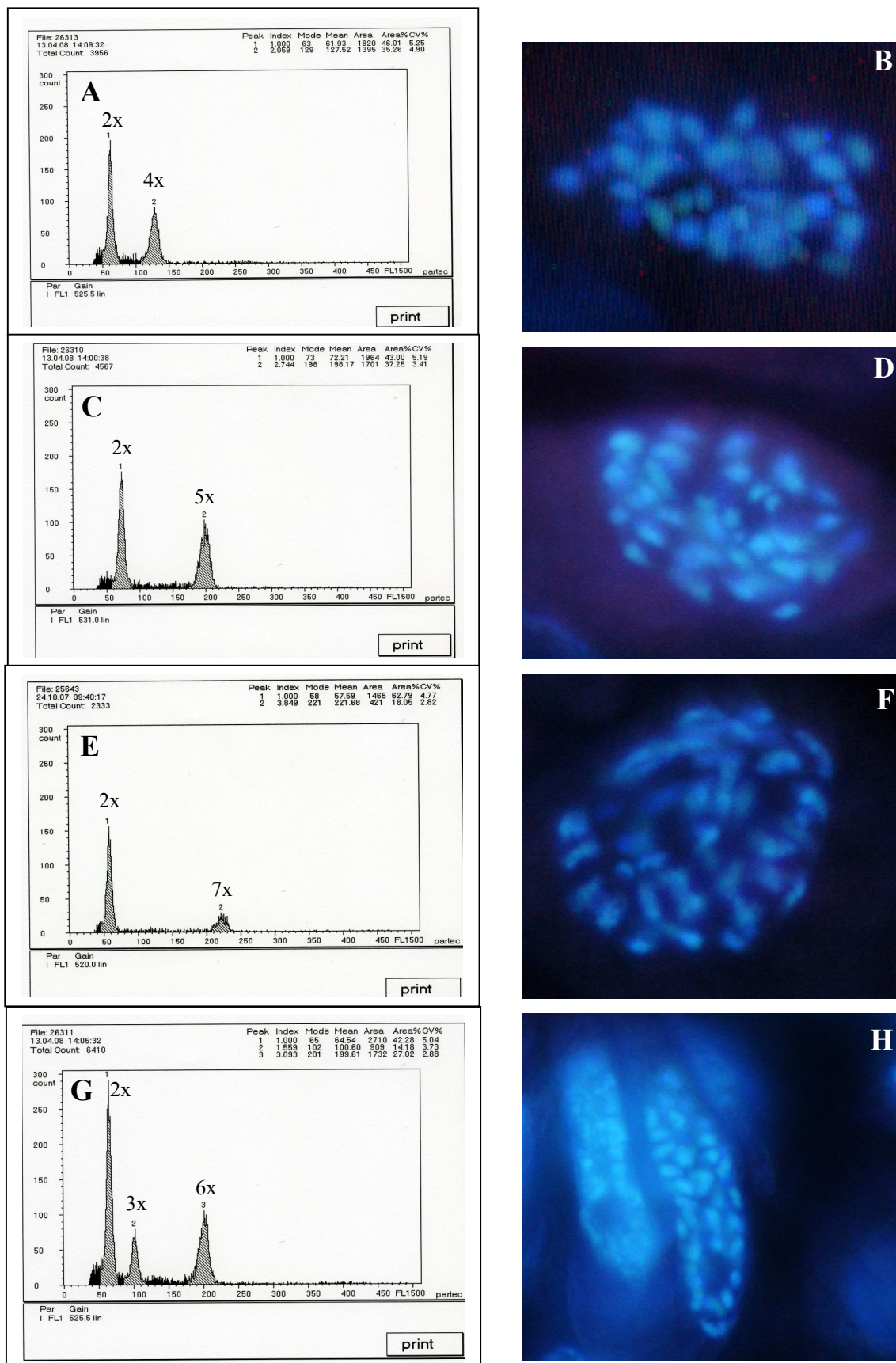
Para el híbrido quimérico con índice de ploidía de 3-6x el análisis se repitió con tejidos recolectados a partir de diferentes partes de la planta. Los resultados mostraron que la planta era uniformemente mixoploide ya que en todas sus partes se detectó el mismo nivel de ploidía.

Además del análisis por citometría se realizó el conteo directo de cromosomas teñidos con DAPI, lo cual permitió establecer una correlación entre los resultados obtenidos con el citómetro y los obtenidos con el cariotipado (figura 1.8.B, D, F, H).

La obtención de plantas mixoploides, como la obtenida en nuestras hibridaciones (3-6x), es un evento que se ha registrado en otras especie al aplicar protocolos de fusión asimétrica (Fehér y col. 1992; Rasmussen y col. 1997). En cítricos solamente hay constancia de la regeneración de híbridos somáticos mixoploides utilizando rayos X para inducir la fusión asimétrica (Liu & Deng 2002), por lo que resulta de difícil explicación la obtención de estas plantas sin el uso de agentes que indujeran asimetría.

La obtención de plantas con niveles de ploidía de 5x y 7x, utilizando parentales 2x, es un evento poco común en la hibridación somática de cítricos, solamente Grosser y colaboradores (Grosser y col. 2000) han obtenidos otros híbridos 5x utilizando los parentales “Murcott”, “Nova” y “Cleopatra” fusionados con el citrange “Cohen”; sin embargo se trataba de plantas muy poco viables que no sobrevivieron al injerto y a la aclimatación en invernadero. La regeneración de plantas con elevados niveles de ploidía (5x y 7x) puede ser el resultado de una distribución no homogénea del ADN durante la multiplicación del microcallo a partir del cual se ha regenerado el embrión (Derks y col. 1992). Otra posible hipótesis que justifique la regeneración de plantas poliploides es que estas se hayan originado a partir de eventos de multifusión y sucesivas deleciones. El hecho de que estas plantas sólo se hayan producido con los voltajes más elevados (210 V y 240 V), que suelen producir un mayor porcentaje de multifusiones, apoya esta hipótesis.

El hecho de que las plantas presenten un nivel de ploidía uniforme en todas sus partes indica que los cambios en el contenido de ADN ocurren en las primeras fases de multiplicación de los protoplastos, antes de que se forme el embrión. Estudios más detallados sobre la estructura genética de estas plantas podrían ser útiles para determinar su origen.



**Figura 1.8.** A, C, E, G, Histogramas correspondientes a una planta control diploide (2x) y a los híbridos somáticos obtenidos (*C.macrophylla* + “Carrizo”). El análisis de los picos arriba a la derecha de cada histograma muestra la posición relativa de los picos, el coeficiente de variación y el índice de ploidía relativo de las muestras analizadas. En las fotos a la derecha se muestran células en metafase de híbridos 4x (B), 5x (D), 7x (F) y 3-6x (H), donde se evidencian los cromosomas teñidos con DAPI.

### 1.3.2.2 Análisis morfológico.

Las plantas regeneradas presentaron una morfología muy diferente entre ellas (figura 1.9). Estas diferencias son imputables en primer lugar a los diferentes niveles de ploidía de las plantas regeneradas. Como se puede observar en la figura 1.9.E las plantas con niveles de ploidía más elevados (5x, 7x, 6-3x) tuvieron un crecimiento mucho más reducido, determinado en parte por la formación de entrenudos más cortos, tal y como se evidencia en la figura 1.9.E. La planta 7x (figura 1.9.B) presentó un crecimiento más reducido que la planta 3-6x y esta a su vez de la 5x. También las hojas presentaron una lamina más reducida y más espesa al aumentar el número de cromosomas de la planta (figura 1.9.C).

También se encontraron diferencias morfológicas muy evidentes entre las plantas con nivel de ploidía 4x (figura 1.9.A). Alrededor del 60% de ellas presentaron entrenudos muy cortos, hojas muy pequeñas y arrugadas como se muestra en las figuras 1.9.C y D; todo esto dificultó el crecimiento y el desarrollo de estas plantas.

Las diferencias morfológicas encontradas entre todas las plantas regeneradas resultan bastante inusuales en la fusión simétrica de protoplastos. Deberían obtenerse plantas idénticas dado que estos híbridos son el resultado de la suma del genoma de los parentales y dada la ausencia de recombinación en los procesos de hibridación somática. Los resultados observados obligan a la realización de un análisis molecular detallado, que se describe en el capítulo 2.

La morfología de las hojas fue también indicativa del carácter híbrido de las plantas 4x regeneradas, ya que en una misma planta se encontraron tanto hojas trifoliadas (al igual que el citrange “Carrizo”), como unifoliadas (al igual que el *C. macrophylla*) y bifoliadas.

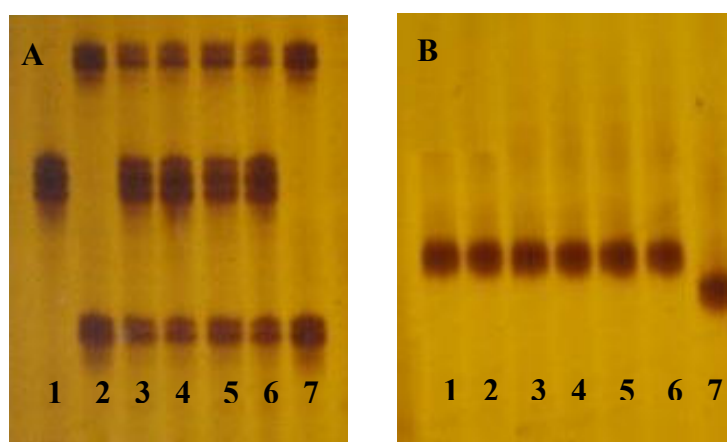




**Figura 1.9.** Plantas regeneradas a partir de la fusión entre protoplastos de *C. macrophylla* y "Carrizo". A) comparación entre plantas tetraploides con diferente morfología; B) híbrido 7x; C) hojas de los híbridos regenerados en comparación con los parentales citrange "Carrizo" (C) y *C. macrophylla* (M); D) híbrido 4x con morfología anormal; E) plantas con diferentes niveles de ploidía.

### 1.3.2.3 Análisis genético con marcadores moleculares.

El análisis molecular realizado por medio de marcadores microsatélites localizados en el genoma nuclear (figura 1.10.A) y citoplasmático (figura 1.10.B) nos ha permitido demostrar que todas las plantas regeneradas eran híbridos somáticos. Las plantas diploides regeneradas se analizaron con marcadores microsatélites nucleares y presentaron el mismo perfil de bandas que la planta de “Carrizo”; sin embargo cuando se analizaron estas mismas plantas con marcadores citoplasmáticos el perfil resultó idéntico al del parental embriogénico (*C. macrophylla*) por lo que queda demostrado que se trata de cíbridos.



**Figura 1.10 A y B.** Ejemplo de análisis molecular realizado sobre las plantas regeneradas. A) análisis del genoma nuclear utilizando el cebador TAA 15. B) análisis del genoma citoplasmático realizado con el marcador *ccmp 6*. Carriles: 1 *Macrophylla*, 2 Cíbrido (2x), 3-6 Híbridos somáticos (4x), 7 “Carrizo”.

Finalmente, con las condiciones de 180 V 2 ciclos no solamente se ha conseguido una tasa más elevada de fusiones útiles (nº heterocariones, figura 1.5) sino también un mayor número de plantas tetraploides (tabla 1.1), objetivo principal de la fusión de protoplastos planteada. También estas condiciones de fusión han permitido obtener cíbridos que tienen un elevado interés tanto para la mejora de los cítricos como para estudios sobre los caracteres determinados por el genoma citoplasmático.

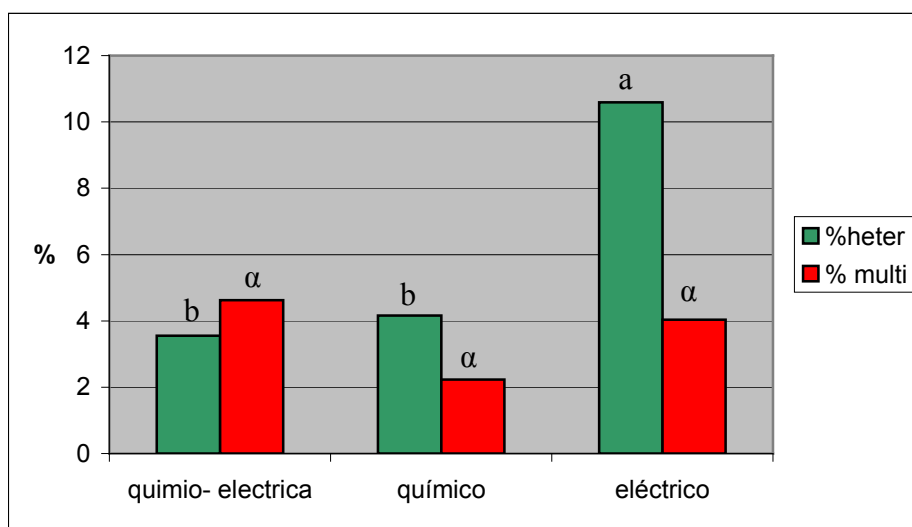
Estos resultados indican que 180 V y 2 ciclos son los mejores ajustes para nuestras condiciones de fusión y para los genotipos elegidos.

Entre los parámetros utilizados para estudiar la eficiencia del proceso de fusión el porcentaje de heterocariones ha resultado ser el más útil para predecir los resultados finales de una fusión. Al contrario, la tasa de embriogénesis ha resultado ser poco indicativa ya que las condiciones en que se han registrado tasas elevadas de regeneración no han sido las que finalmente han dado los mejores resultados en cuanto a obtención de plantas. La estimación del porcentaje de heterocariones es relativamente

sencilla y permite optimizar las condiciones de fusión eléctrica para cada pareja de parentales antes de abordar los largos y costosos experimentos de fusión para obtener híbridos somáticos.

### 1.3.3 Comparación de los tres métodos de fusión.

Se ha comparado la eficiencia de los métodos de fusión química, quimio-eléctrica y eléctrica calculando el porcentaje de heterocariones y multifusiones registrado con cada uno de ellos. La figura 1.11 muestra un resumen de los resultados obtenidos.



**Figura 1.11.** Porcentajes de heterocariones y multifusiones obtenidos con diferentes métodos de fusión entre protoplastos de citrange “Carrizo” y *C. macrophylla*. Los resultados son la media de tres experimentos diferentes. Las letras a-b y  $\alpha$ - $\beta$  muestran las diferencias significativas que existen respectivamente entre los porcentajes de heterocariones y de multifusiones. Con letras distintas existe más del 95% de probabilidad que las diferencias sean significativas.

Con el método eléctrico se ha conseguido un porcentaje de heterocariones alrededor del 10% (similar al obtenido en el experimento descrito en el apartado 1.3.2), que es significativamente superior al registrado con los otros dos métodos. En cuanto al porcentaje de multifusiones no hay diferencias significativas entre los tres métodos, aunque los métodos eléctrico y quimio-eléctrico parecen favorecer más la formación de uniones múltiples, que son el 4% de las células observadas.

Utilizando las fusiones quimio-eléctrica y química se han descrito porcentajes de formación de heterocariones del 5 y 6%, respectivamente (Olivares-Fuster y col. 2005; Grosser & Gmitter 1990b), por lo que los resultados observados en nuestros experimentos son coherentes con los que aparecen en la bibliografía.

El método eléctrico permitió regenerar el mayor número de embriones (180) seguido por el método químico (105) y el quimio-eléctrico (figura 1.12). Además la

mayoría de los embriones regenerados con el método eléctrico se suelen formar en la quinta semana de cultivo (más de la mitad del total) mientras que con los otros dos métodos la mayor tasa de regeneración se registra una semana más tarde.

La tabla 1.2 muestra las plantas que se han conseguido regenerar con cada uno de los métodos aplicados. También en este aspecto el método eléctrico ha resultado más eficiente comparado con los otros dos, ya que ha permitido obtener un total de 14 plantas, mientras que se consiguieron 7 con el método químico-eléctrico y 2 con el químico.

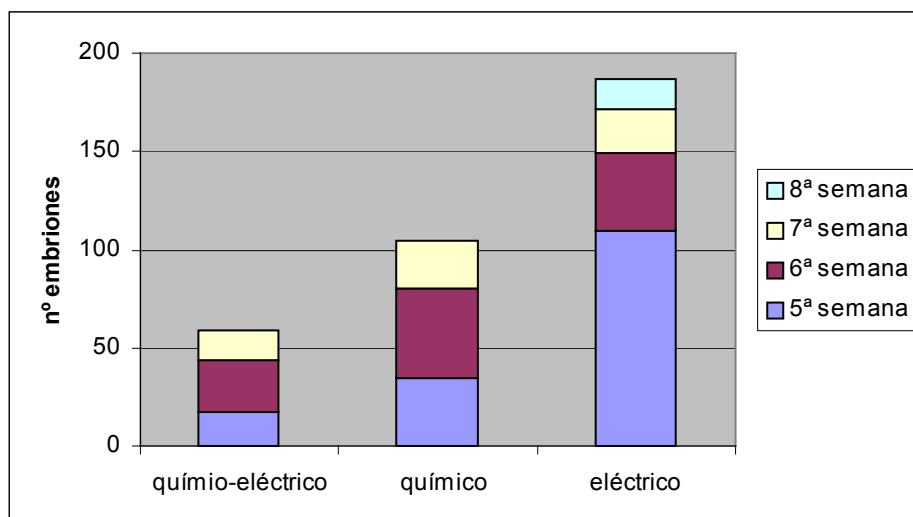
Las plantas regeneradas se analizaron por citometría de flujo para determinar su nivel de ploidía. Esto ha permitido identificar entre las plantas regeneradas individuos tetraploides y un individuo diploide (tabla 1.2). Para corroborar el carácter híbrido de las plantas regeneradas se realizó un análisis molecular utilizando dos diferentes marcadores microsatélites, uno nuclear y otro citoplasmático tal y como se hizo con las plantas del apartado 1.3.2. Los resultados obtenidos permitieron confirmar que las plantas tetraploides regeneradas eran híbridos somáticos y que la planta diploide era un cíbrido. También entre las plantas tetraploides regeneradas en este apartado se pudieron observar diferencias morfológicas tal y como descrito en el apartado 1.3.2.2.

Todos los parámetros analizados han puesto en evidencia la mayor eficiencia del método eléctrico para la obtención de híbridos somáticos. Con este método se ha conseguido un mayor porcentaje de células heterocariontes y un mayor número de embriones y plantas. Algunos de estos resultados se pueden relacionar con la mayor actividad mitótica que se suele generar al aplicar pulsos de corriente eléctrica en la fusión de protoplastos (Assani y col. 2005); por otro lado la utilización de un producto tóxico, como es el PEG, en los protocolos de fusión química y químico-eléctrica puede afectar la viabilidad de las células y consecuentemente la embriogénesis, incluso si se realizan lavados para su eliminación (Mercer & Schlegel 1979). Aplicando el método de fusión químico el PEG suele tener un mayor impacto sobre la viabilidad celular debido a que se utiliza en concentración elevada (40%) y además se aplica en contacto directo con los protoplastos. Al contrario en la fusión químico-eléctrica resulta más fácil la eliminación del PEG ya que se emplea una solución menos concentrada (20%) y se aplica solamente alrededor de las células para favorecer su aglutinación (Olivares-Fuster y col. 2005). Resulta bastante extraña la baja tasa de embriogénesis obtenida con la fusión químico-eléctrica; sin embargo el mayor número de plantas obtenidas con respecto al método químico (tabla 1.2) evidencia una mayor eficiencia del método

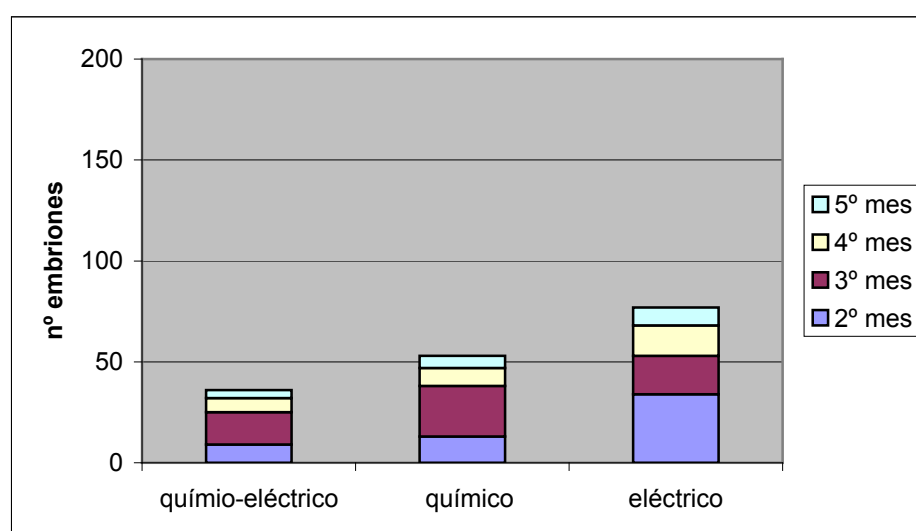
quimio-eléctrico y además indica que la morfología y fisiología de cada genotipo influye de manera determinante sobre los resultados observados.

Olivares-Fuster y col. (2005) han descrito que el método quimio-eléctrico puede inducir la obtención de cíbridos en cítricos; sin embargo en nuestros experimentos el método de fusión eléctrica ha sido el único a partir del cual se han regenerados cíbridos (ver tabla 1.1 y 1.2). Estos resultados sugieren que la aptitud de un método u otro para la regeneración de cíbridos está íntimamente influenciada por los genotipos empleados, que en este caso específico parecen presentar un comportamiento diferente respecto a otros genotipos estudiados (ver capítulo 5 apartado 5.3).

La posibilidad de poder variar los voltajes de fusión proporciona una gran adaptabilidad del método eléctrico a los genotipos usados como parentales, lo cual no es posible con los otros métodos. Con el método quimio-eléctrico se pueden aportar solo pequeñas modificaciones al protocolo (variando el voltaje de fusión), aunque no ha sido posible aumentar de forma relevante el número de heterocariones producidos para el cruzamiento entre *C. macrophylla* y citrange “Carrizo”. El uso del PEG parece comprometer la multiplicación celular y sobre todo la embriogénesis en este cruzamiento, tanto con el método quimio-eléctrico como con el químico. Por último cabe destacar que el protocolo de fusión eléctrica, al estar parcialmente automatizado, resulta más fácil de aplicar que los otros dos métodos, donde el éxito del proceso está íntimamente relacionado con la habilidad del operador.



**Figura 1.12.** Número de embriones en estadio de desarrollo globular regenerados tras el cultivo de los minicallos en medio con maltosa. Los valores que aparecen son la suma de tres experimentos de fusión de protoplastos de citrange “Carrizo” y *C. macrophylla* empleando los tres métodos estudiados.



**Figura 1.13.** Número de embriones que han alcanzado un tamaño de aproximadamente 0,5-1cm y que han sido transferidos al medio de germinación. Los valores que aparecen son la suma de tres experimentos de fusión de protoplastos de citrange “Carrizo” y *C. macrophylla* empleando los tres métodos estudiados.

**Tabla 1.2.** Plantas regeneradas aplicando los tres métodos de fusión diferentes.

	método químio-eléctrico	método químico	método eléctrico
híbridos 4x	7	2	13
cíbridos 2x	-	-	1
nº total de plantas	7	2	14

### 1.3.4 Aplicación del método de fusión eléctrica a otros genotipos

Se ha aplicado el método eléctrico a otros genotipos con el fin de corroborar su eficiencia y al mismo tiempo obtener nuevos híbridos de potencial interés para la mejora. En la tabla 1.3 se muestra el número de plantas obtenidas a partir de las dos combinaciones de genotipos utilizados.

**Tabla 1.3.** Híbridos somáticos obtenidos aplicando el método de fusión eléctrico a otros genotipos.

Genotipos	Nº de plantas
<i>C. macrophylla</i> + <i>C. taiwanica</i>	2 (4x)
mandarina “Encore” + limón “Rugoso”	12 (4x)

Solamente se han obtenido dos plantas a partir de la fusión realizada entre los genotipos *C. macrophylla* y *C. taiwanica*; mientras que con el genotipos “Encore” y “Rugoso” se han obtenido un total de 12 plantas. No se detectaron diferencias en la morfología de las plantas obtenidas con una misma combinación de parentales, diversamente a cuanto se observado con la combinación citrange “Carrizo” y *C. macrophylla*.

El análisis por citometría de flujo ha permitido determinar que todas las plantas regeneradas en ambas fusiones eran tetraploides.

También se ha realizado un análisis molecular con marcadores microsatélites localizados en el genoma nuclear. Todas las plantas regeneradas han resultado ser híbridos somáticos ya que presentaron los alelos de ambos parentales (figura 1.14).

La diferencia entre el número de plantas obtenidas utilizando las dos combinaciones de genotipos puede estar relacionada con el callo embrogénico utilizado como fuente de protoplastos en la fusión. Con el callo de *C. macrophylla* se consigue una baja eficiencia de regeneración, similar a la descrita en los apartados 1.3.2 y 1.3.3. Al contrario el callo de “Encore” se presta mucho más a ser utilizado como parental para la obtención de híbridos somáticos, ya que permite conseguir un buen número de plantas con un solo experimento de fusión.

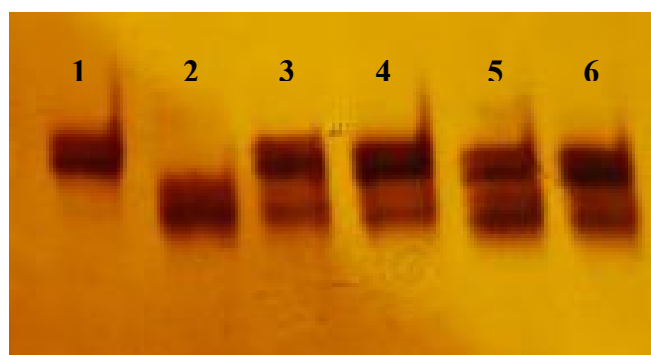
Los ajustes escogidos para la realización de la fusión eléctrica han sido aplicados con éxito para la obtención de híbridos somáticos con otros parentales, diferentes a los utilizados en la puesta a punto del método. El uso de un parental embriogénico de

buenas características como el “Encore” ha permitido demostrar que es posible obtener una mejor eficiencia del proceso de fusión eléctrica utilizando los genotipos adecuados.

El híbrido obtenido entre los parentales *C. macrophylla* y *C. taiwanica* pueden ser de elevado interés para la mejora de patrones ya que prácticamente no existen otros híbridos somáticos obtenidos utilizando cualquiera de estos parentales (solamente se ha descrito uno de *C. amblycarpa* con *C. macrophylla* (Grosser & Gmitter 2005).

Teniendo en cuenta las características agronómicas del *C. taiwanica*, este nuevo híbrido podría mejorar algunos aspectos desfavorables del *C. macrophylla*. Entre las características del *C. taiwanica* se destaca la resistencia al hongo *Armillaria mellea*, que está causando graves daños en muchos de los cultivos de cítricos en España. También la obtención de este híbrido podría incrementar la tolerancia a bajas temperaturas, tristeza y mejorar la calidad de la fruta que se observa en las variedades injertadas sobre *C. macrophylla*.

El híbrido obtenido entre mandarino “Encore” y limonero “Rugoso” podría ser útil en el estudio de la patogenia del hongo *Alternaria alternata*. Hay estudios que demuestran que la susceptibilidad a este hongo del limonero rugoso está relacionada con la sensibilidad de las mitocondrias a la toxina ACR (Ohtani y col. 2002). Disponer de un híbrido que presenta mitocondrias procedente de otro genotipo permitiría profundizar más en la patología de este hongo.



**Figura 1.14.** Caracterización de algunos de los híbridos obtenidos entre mandarina “Encore” y limón “Rugoso” con el marcador TAA 15. 1 “Encore”, 2 limón “Rugoso”, 3-6 híbridos 4x.



#### 1.4 CONCLUSIONES.

- Por primera vez se ha obtenido una nueva línea de callo embriogénico a partir del cultivo de óvulos de *C. macrophylla*. El callo ha mostrado una buena tasa de regeneración aunque los embriones presentaron algunas dificultades en la germinación.

- Se ha optimizado el método de fusión eléctrico, comparando condiciones de fusión diferentes en cuanto a voltaje del pulso y número de ciclos de fusión empleados. Para ello se han evaluado el porcentaje de heterocariones y multifusiones, la tasa de embriogénesis y el número de híbridos obtenidos. Los resultados han demostrado que 180 V y 2 ciclos son las condiciones más adecuadas para la obtención de híbridos somáticos con los genotipos utilizados y en nuestras condiciones de trabajo.

- Se ha determinado que la formación de heterocariones es el factor más importante para predecir la eficiencia del proceso de fusión.

- Se han comparado por primera vez los tres métodos de fusión descritos para la obtención de híbridos somáticos de cítricos. El método eléctrico ha resultado ser más eficiente que el método químico y el quimio-eléctrico con los parentales empleados, ya que ha permitido obtener un mayor porcentaje de heterocariones, una mayor tasa de embriogénesis y también un mayor número de híbridos somáticos.

- Se han obtenido por primera vez híbridos somáticos entre el citrange “Carrizo” y el *C. macrophylla*. Estos híbridos potencialmente tienen un elevado interés para la citricultura española dadas las características complementarias que presentan sus parentales.

- El análisis con marcadores moleculares ha permitido verificar el carácter híbrido de todas las plantas regeneradas.

- El análisis por citometría de flujo ha permitido identificar, entre los híbridos regenerados, plantas con diferentes niveles de ploidía (2x, 4x, 3-6x, 5x y 7x). El conteo cromosómico ha permitido corroborar los resultados obtenidos con el citómetro.

- Se ha detectado una gran variabilidad en la morfología de los híbridos somáticos regenerados. Esta variabilidad es en parte debida a los diferentes niveles de ploidía de las plantas regeneradas (2x, 4x, 3-6x, 5 x y 7x), aunque también se ha observado entre plantas con el mismo nivel de ploidía (4x). Un análisis molecular más detallado es necesario para determinar la estructura genética de estas plantas y la causa de esta variabilidad.

- El método de fusión eléctrico se ha aplicado con éxito a otros genotipos. Se han obtenido por primera vez híbridos somáticos utilizando los parentales *C. taiwanica* + *C. macrophylla* y mandarina “Encore” + limón “Rugoso”. Estos híbridos pueden ser de interés para el estudio de la patogenicia de hongos como la *Armillaria mellea* y la *Alternaria alternata*.

## **CAPÍTULO 2**

### **VARIABILIDAD MOLECULAR EN LOS HÍBRIDOS SOMÁTICOS OBTENIDOS TRAS LA FUSIÓN DE PROTOPLASTOS DE CITRANGE CARRIZO Y DE *C. MACROPHYLLA* .**

#### **2.1 INTRODUCCIÓN.**

La fusión de protoplastos tiene como objetivo principal la formación de células híbridas y la regeneración de plantas a partir de estas; sin embargo durante el proceso de fusión se puede producir la unión de protoplastos procedentes del mismo parental o la formación de multifusiones. En cítricos la regeneración a partir de la suspensión de protoplastos se realiza sin una presión de selección por lo que es bastante frecuente la regeneración a partir de protoplastos de parentales sin fusionar del parental embriogénico.

Todo esto obliga a una detallada caracterización de las plantas regeneradas con el fin de identificar aquellos que realmente son híbridos somáticos entre los dos parentales.

Para la identificación inicial de las plantas regeneradas es posible utilizar caracteres morfológicos característicos de los parentales, como por ejemplo la morfología de las hojas (Grosser & Gmitter 1990b). Sin embargo resulta más eficiente caracterizar las plantas con marcadores moleculares o isoenzimas, ya que la morfología de los híbridos puede variar con respecto a la de los parentales. La técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) fue utilizada para la caracterización de los primeros híbridos somáticos obtenidos en cítricos (Ohgawara y col. 1985). Sucesivamente la aplicación de los isoenzimas tuvo una gran difusión por su fiabilidad y su facilidad de empleo (Tusa y col. 1990; Deng y col. 1992). También los marcadores tipo RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) han sido ampliamente utilizado para la caracterización de los híbridos somáticos obtenidos en cítricos (Grosser y col. 1996; Kobayashi y col. 1997), sobre todo en aquellos casos en que los marcadores co-dominantes RFLP o isoenzimas no mostraron ningún tipo de polimorfismo entre los parentales.

El espectacular aumento durante los últimos años del número de marcadores microsatélite disponibles para cítricos (Barkley y col. 2006; Froelicher y col. 2008; Luro y col. 2008; Chen y col. 2006) y las ventajas que conlleva el uso de estos marcadores (elevado polimorfismo, codominancia, elevada reproducibilidad, etc.) han

facilitado su empleo para la caracterización de híbridos somáticos de cítricos. Recientemente Ollitrault y col. (Ollitrault y col. 2008) han publicado un mapa genético de marcadores microsatélite que permite caracterizar las diferentes regiones del genoma de los cítricos. Esto ha permitido analizar con más detalle la composición genética el genoma de los híbridos somáticos regenerados tras el proceso de fusión y verificar la posible inestabilidad del genoma nuclear. Este tipo de inestabilidad se ha observado en híbridos somáticos obtenidos en otras especies como: *Brassica*, *Hordeum vulgare*, *Daucus carota*, *Solanum tuberosum*, etc. donde se ha constatado la existencia de una correlación entre la distancia genética de los dos parentales y la pérdida de cromosomas durante el proceso de fusión (Sundberg & Glimelius 1991; Kisaka y col. 1997; Oberwalder y col. 1998). Los largos periodos de cultivo *in vitro* necesarios para la regeneración de plantas completas también pueden favorecer los cambios en el genoma nuclear de los híbridos somáticos (Guo & Deng 1999). Por último el uso prolongado de líneas de callo embriogénico también se considera una fuente de inestabilidad genética por la variabilidad intrínseca que puede acumularse en las células que constituyen el callo.

En la gran mayoría de los trabajos que describen la obtención y caracterización de híbridos somáticos se suele utilizar un número limitado de marcadores, para corroborar el carácter híbrido de las plantas. Aunque hasta la fecha este tipo de análisis se ha considerado suficiente, la utilización de un elevado número de marcadores distribuidos en diferentes grupos de ligación proporcionaría un cuadro más completo del genoma de los híbridos y comprobar si existe algún tipo de reorganización en la forma de integración de los genomas de los parentales. Para este fin la disponibilidad de un analizador genético automático puede ser de gran ayuda ya que facilita y acelera enormemente el trabajo de caracterización con respecto al uso de técnicas de electroforesis convencionales. Estos equipos permiten analizar un número de muestras muy elevado, además de que su precisión para estimar el tamaño de los fragmentos permite distinguir con facilidad todos los alelos existentes para un determinado locus.

El trabajo descrito en este apartado está centrado en analizar, con un elevado número de marcadores, algunos híbridos obtenidos en nuestro laboratorio y verificar la correspondencia genética de estos híbridos con respecto a sus parentales. La gran variabilidad morfológica detectada entre los híbridos obtenidos utilizando los parentales citrange “Carrizo” y *C. macrophylla* obliga a realizar una caracterización detallada de estas plantas.

Este tipo de análisis lo consideramos imprescindible para la selección de los genotipos que se utilizarán en una fase posterior de evaluación en campo de sus características agronómicas.

## 2.2 MATERIALES Y METODOS.

### 2.2.1 Material vegetal.

Se escogieron híbridos somáticos obtenidos tras la fusión de protoplastos de callo embriogénico de *C. macrophylla* y protoplastos de mesófilo de hoja de citrange “Carrizo”. Estas plantas se obtuvieron en diferentes eventos de fusión descritos en el capítulo 1, aplicando diferentes parámetros de fusión eléctrica (1/2 ciclos y 180/210/240 V) y diferentes métodos de fusión (químico, eléctrico y quimio-eléctrico). Se escogieron algunas de las plantas que presentaban niveles de ploidía 4x (una planta por cada voltaje de pulsos y método de fusión ensayados) y que mostraron morfologías distintas (figura 1.9, apartado 1.3.2.2). También se analizaron las plantas que presentaban niveles de ploidía inusuales, como son las plantas 5x, 7x y 3-6x, con el fin de estudiar su origen y su composición genética. En la siguiente tabla se resumen las plantas escogidas para el análisis.

**Tabla 2.1.** Híbridos somáticos obtenidos a partir de la fusión entre citrange “Carrizo” y *C. macrophylla*, seleccionados para su análisis masivo con marcadores moleculares tipo microsatélites

<i>Denominación</i>	<i>Ploidía</i>	<i>Tipo de Fusión</i>
Híbrido 5x	5x	Eléctrica (210 V 2 ciclos)
Híbrido 7x	7x	Eléctrica (210 V 1 ciclo)
Híbrido 3-6x	3-6x	Eléctrica (240 V 2 ciclos)
Híbrido 4x A	4x	Eléctrica (240 V 2 ciclos)
Híbrido 4x B	4x	Eléctrica (210 V 2 ciclos)
Híbrido 4x C	4x	Eléctrica (180 V 2 ciclos)
Híbrido 4x D	4x	Quimio-eléctrica
Híbrido 4x E	4x	Química

También se analizó uno de los híbridos 4x obtenidos a partir de la fusión entre *C. macrophylla* y *C. taiwanica*, por su relativo interés potencial como patrón.

### 2.2.2 Análisis genético con marcadores nucleares.

El análisis molecular de las plantas se realizó por medio de marcadores microsatélite SSRs. La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta y col. (Dellaporta y col. 1983). Para el análisis de las plantas se escogieron 34 marcadores (tabla 2.2) entre los descritos por diferentes autores (Kijas y col. 1997; Froelicher y col. 2008; Luro et al., 2008), de forma que presentaran una amplia distribución en el mapa genético descrito por Ollitrault (Ollitrault y col. 2008) (figura 2.1).

Se utilizó un analizador genético automático CEQ-800 (Beckman, Coulter), que emplea electroforesis capilar y lectura de fluorescencia por láser (EC-LIF), lo cual permite la resolución de una base en fragmentos de hasta 500 nucleótidos (nt). El CEQ-800 consta de dos fuentes láser con diodos de 650 y 750 nm que excitan cuatro dideoxi terminadores fluorescentes, generando electroferogramas que muestran picos definidos, en el eje de abscisas, por el tiempo en minutos en el que el fragmento de ADN fue detectado, y en el eje de ordenadas por la intensidad de la fluorescencia del mismo.

El análisis de loci microsatélite con el CEQ-800 requiere un producto de PCR generado mediante un cebador directo marcado con un fluoróforo mientras que el cebador reverso queda intacto. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador Termocycler Ep Gradient S (Eppendorf, Hamburgo, Germany) con un volumen final de 17  $\mu$ l. Cada reacción estaba compuesta por tampón de reacción 750 mM tris HCl (pH 9) 50 mM KCl 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,0001% BSA, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de cada dNTP premezclados, 0,2  $\mu$ M de cada cebador, 0,8 unidades de Taq polimerasa y 10 ng de ADN.

El programa de PCR utilizado constaba de una fase de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 30 segundos de la temperatura de anillamiento específica de cada cebador y 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 10 minutos. Los cebadores estaban marcados con tres fluoróforos diferentes (Dye 2, 3 y 4) con frecuencias de emisión distintas; por esto el producto de PCR obtenido se diluyó 40X, 80X y 160X en SLS (GenomeLab™ Sample Loading Solution), para el Dye 2, Dye 3, Dye 4 respectivamente. El marcador de tamaño molecular utilizado fue el GenomeLab™ DNA Size Standard Kit 400. Las condiciones de electroforesis empleadas fueron: desnaturalización a 90°C durante 2 min, voltaje de inyección 2,0 Kv durante 30 s, voltaje de separación 6,0 Kv durante 35 min a

temperatura constante de 50°C, correspondiente al método fragment 3 incorporado por el aparato. El tampón de electroforesis utilizado fue el GenomeLab™ Separation Buffer.

**Tabla 2.2.** Secuencias de los cebadores utilizados para el análisis molecular del genoma nuclear de los híbridos somáticos obtenidos entre los parentales citrange “Carrizo” + *C. macrophylla* y *C. taiwanica* + *C. macrophylla*.

Target	Nombre	Reverse Primer	Secuencia (5'-3')	Forward Primer	Secuencia (5'-3')	T°C hibridación
DNA	CI04H06		CAAAGTGGTGAAACCTG		GGACATAGTGAGAAGTTGG	55°
DNA	CI01D10		ATGGGGATGGGTGATGAAT		AAGCGACGGAAATAGAGAG	55°
DNA	CI03C08		GCTTCTTACATTCTCAAA		CAGAGACAGCCAAGAGA	55°
DNA	CI05A05		CCTCTTCCCTTCCATT		ATACCTGTGAGCGTGAG	55°
DNA	CI06B07		TGGGCTTGTAGACAGTTA		CGGAACAACAAAACAAT	50°
DNA	mest291		TCAATCAAGAAAAGAAAAGTCAGC		CGCACTTGGCTTTCACAT	50°
DNA	mest256		GAGCAAGTGC GTTGTGTGT		CATTAATAATCCGTGCCGC	50°
DNA	cac23		TTGCCATTGTAGCATGTTGG		ATCACAATTACTAGCAGCGCC	45°
DNA	CI02E08		TGATTAGCATGTTGCCG		GGTTTGTGGGAGGTG	50°
DNA	CI06A12		TTTTTATTTGGTCTCCTT		CCCAACAACTCAAACCTC	50°
DNA	CI02F12		TAAGTGAAGGATTGGTTT		GGCCATTTCTCTGATG	55°
DNA	CI02B11		CAAAGTAAATAGGGTGTGAG		GTATTTGGCGTGATGAA	55°
DNA	CI01C06		TGGAGACACAAAGAAGAA		GGACCACAACAAAGACAG	50°
DNA	mest123		AAGAAAGATTTGCTGGCAGAG		GGGATGGACTCCCAGTGTTA	50°
DNA	CI02G02		TGGTAGAGAAACAGAGGTG		CAATAAGAAAACGCAGG	55°
DNA	mest86		CCTCTCTGGCTTCTGGATTG		CCAAGTACTGACTAATCCTCTTC	50°
DNA	CI06B05		ATGTTGATTACGAGACCTT		GAACGATGGAATGAAGTG	55°
DNA	taa15		CTTCCCAGCTGCACAAGC		GAAAGGGTTACTTGACCAGGC	55°
DNA	mest109		TCAAAAACCCAGATCCCAAC		CCAGTCACCACAACCATCAC	50°
DNA	CI07D06		TCAATTCCTCTAGTGTGTGT		CCTTTTCACAGTTTGCTAT	55°
DNA	CI02D04b		AGCAAACCCACAAC		CTCTCTTTCCCATTAGA	50°
DNA	CI07C09		GTGGCTGTTGAGGGGTTG		GACCCTGCCTCCAAAGTATC	55°
DNA	CI07F11		GAAGAAACAAGAAAAAAAAT		ACTATGATTACTTTGCTTTGAG	50°
DNA	CI03D12a		CCCACAACCATCACC		GCCATAAGCCCTTTCT	50°
DNA	mest107		CCCCATCCTTTCAACTGTG		GCTGAGATGGGGATGAAAGA	50°
DNA	CI03B07		TGAGGGACTAAACAGCA		CACCTTTCCCTTCCA	55°
DNA	mest121		CAATAATGTTAGGCTGGATGGA		TCCCTATCATCGGCAACTTC	50°
DNA	CI02D09		ACCCATCACAAAACAGA		AATGATGAGGGTAAAGATG	55°
DNA	mest46		GGTGAGCATCTGGACGACTT		GAACCAGAATCAGAACCCGA	50°
DNA	mest192		CTTGGCACCATCAACACATC		CGCGGATCATCTAGCATAACA	50°
DNA	mest431		CATACCTCCCCGTCCATCTA		GAGCTCAAACAATAGCCGC	50°
DNA	CI01G11		TCGCTTTCTTATTTCACTCACC		ACTGTTGCTGCTGCTGCTGCT	55°
DNA	mest56		GGTGCAAAGAGAGCGAGAG		AGTCCGCCTTTGCTTTTCT	50°
DNA	mest101		AAGGGGCTGTTTCTCTCTCTG		TTTGCCAACTCCCAAATCTC	50°

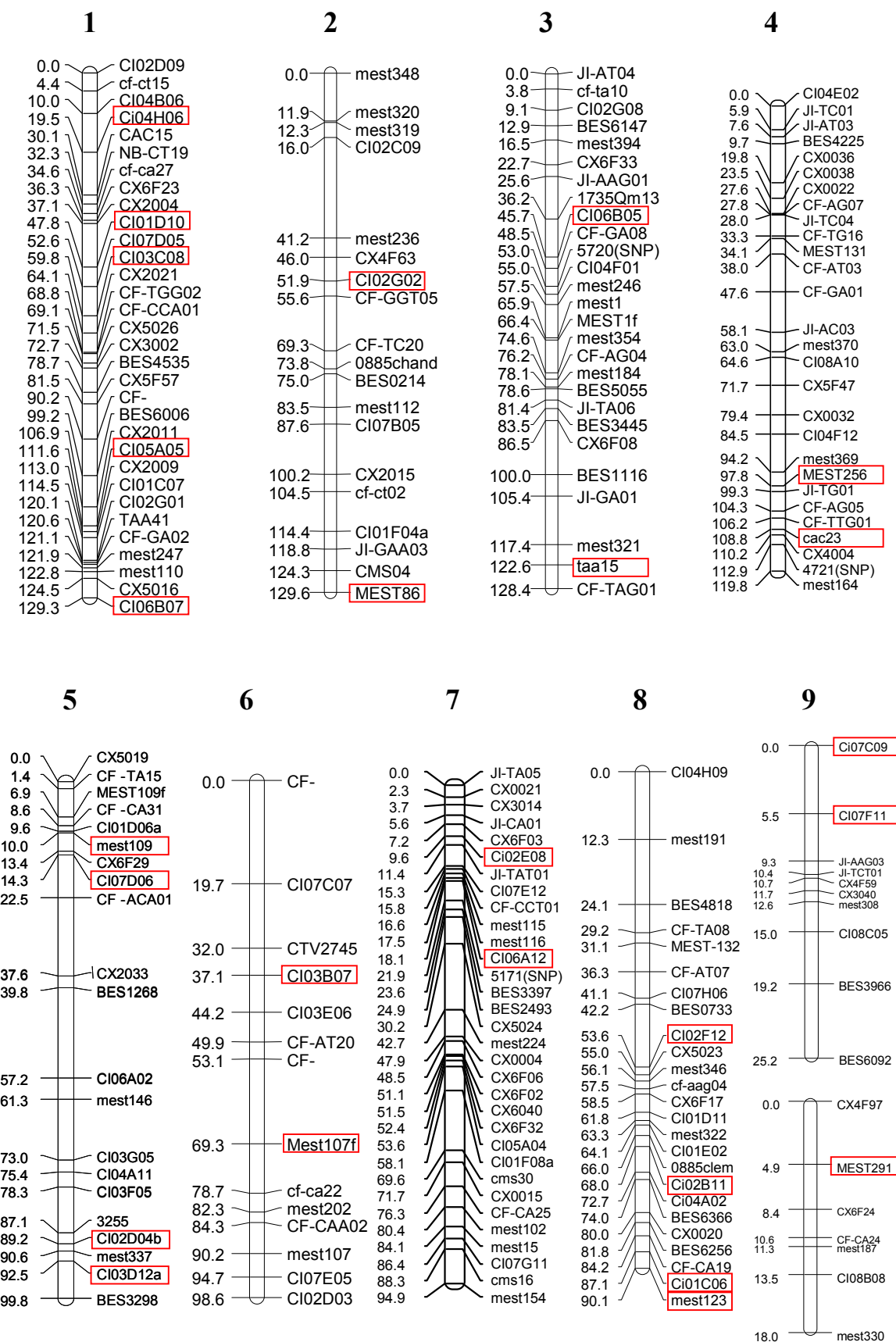


Figura 2.1. Mapa genético realizado a partir de un cruce entre clementina y zamboa (Ollitrault, 2008). En rojo están marcados los cebadores utilizados para caracterizar los híbridos somáticos estudiados.



### 2.2.3 Análisis de los electroferogramas.

Los electroferogramas obtenidos a partir de cada muestra se analizaron con el software GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter®) que determina el tamaño, la altura y el área correspondiente a cada fragmento detectado y permite identificar los alelos correspondientes a cada locus microsatélite.

Tanto el área como la intensidad del pico son dos parámetros que se emplearon para cuantificar el número de copias del alelo (o dosis alélica) detectado por el analizador.

Para el análisis de las dosis alélicas de los híbridos regenerados se tomó como referencia la dosis media detectada en dos híbridos tetraploides previamente seleccionados, los cuales presentaban todos los alelos detectados en los parentales. Estas dosis alélicas se compararon con las de los otros híbridos obtenidos. A la dosis de referencia de cada alelo se asignó un valor de 25 (si era heterocigoto en los parentales) o 50 (si era homocigoto) y se observó la variación de este valor en los híbridos obtenidos.

El análisis se repitió con dos extracciones diferentes para cada uno de los genotipos y de los cebadores utilizados.

### 2.2.4 Análisis genético con marcadores citoplasmáticos.

El citoplasma de los híbridos regenerados se caracterizó por medio de marcadores que amplifican secuencias específicas del genoma mitocondrial y cloroplástico. Los marcadores escogidos para la caracterización del genoma cloroplástico de los híbridos fueron *ccmp1*, *ccmp2*, *ccmp6* y *ntcp7*, descritos por (Cheng y col. 2003) (tabla 2.3). Para la caracterización del genoma mitocondrial se utilizaron los marcadores *nad2/ 3-4* y *nad7/ 1-2* (Froelicher, datos no publicados) (tabla 2.3). La reacción de PCR se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones definidas anteriormente en el apartado 1.2.10.3. La separación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida al 6%, urea 7 M y tampón de electroforesis TBE 0,5X (Tris, ácido bórico y EDTA 0,5 M, pH 8) en cubetas DCode™ de Biorad®. Las condiciones de electroforesis fueron 350 V, 90 mA y temperatura de 55°C durante 2 horas.

Los fragmentos amplificados se detectaron mediante tinción con plata según el protocolo descrito por Benbouza y col. (2006). El gel se fijó mediante inmersión en una

solución de etanol al 10% y ácido acético al 0,5% durante 5 minutos, después se pasó a una solución de AgNO<sub>3</sub> al 0,15% y formaldehído durante 7 minutos; se realizó un lavado con agua destilada y sucesivamente el gel permaneció en una solución de NaOH al 15% y formaldehído 0,15% durante 5-10 minutos. El proceso de tinción se finalizó dejando el gel 3 minutos en la solución inicial.

**Tabla 2. 3.** Secuencia de los cebadores utilizados para el análisis molecular del citoplasma de los híbridos somáticos regenerados.

Target	Nombre	Reverse Primer	Secuencia (5'- 3')	Forward Primer	Secuencia (5'-3')	T°C hibridación
cpDNA	ccmp1	ccmp1 R	CCGAAGTCAAAGAGCGATT	ccmp1 F	CAGGTAAACTTCTCAACGGA	50°C
cpDNA	ccmp2	ccmp2 R	ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	ccmp2 F	GATCCCGGACGTAATCCTG	50°C
cpDNA	ccmp6	ccmp6 R	CATTACGTGCGACTATCTCC	ccmp6 F	CGATGCATATGTAGAAAGCC	50°C
cpDNA	ntcp7	ntcp7 R	CGAATCCCTCTCTTTCCG	ntcp7 F	TGATCCCGGACGTAATCC	50°C
mtDNA	nad2/3-4	nad2/4	GACCTTCACCTCAAATCA	nad2/3	TTCAGATAACACGCACC	50°C
mtDNA	nad7/1-2	nad7/2	TTGATATAGGCTCGCT	nad7/1	GGAACATAGCATAGGG	50°C

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 2.3.1 Caracterización molecular de los híbridos mediante marcadores nucleares.

Se realizó un análisis molecular detallado con el objetivo de caracterizar los híbridos somáticos regenerados y definir el origen y la estructura genética de las plantas obtenidas.

El análisis con 34 marcadores microsatélite del genoma nuclear ha permitido identificar los alelos que caracterizan los híbridos somáticos estudiados. Además se determinaron las aportaciones de cada uno de los parentales, tanto en el caso de que estos fueran homocigotos como heterocigotos para el locus considerado (figura 2.2). Al ser el citrange “Carrizo” un híbrido sexual de *Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*, ha sido posible determinar el origen de los alelos presentes en los híbridos somáticos, como se muestra en la tabla 2.4. En esta misma tabla se muestran las dosis alélicas obtenidas con el analizador de secuencias a partir de cada uno de los genotipos estudiados.

La dosis alélicas son proporcionales al área de los picos que aparecen en el electroferograma. Sin embargo estos valores se pueden alterar por la presencia de artefactos en los productos de PCR. Existen dos tipos diferentes de procesos que pueden alterar las dosis alélicas registradas: la PCR selectiva y las variaciones casuales (producidas durante los primeros ciclos de la PCR). Con el término “PCR selectiva” se hace referencia a todos aquellos mecanismos que favorecen la amplificación de unas secuencias u otras dependiendo de las propiedades del gen que se está amplificando, de las regiones flanqueantes o del genoma que se está estudiando (Wagner y col. 1994; Polz y col. 1998). Este tipo de artefacto puede ser más determinante para analizar los alelos detectados en un híbrido alotetraploide, ya que este reúne genomas de diferente origen (Caruso y col. 2008).

En los *loci* heterocigotos de plantas diploides las dosis de los dos alelos detectados suelen ser muy parecidas. En los híbridos somáticos tetraploides las dosis de dos alelos procedentes del mismo parental también suelen ser muy parecidas. Sin embargo puede haber diferencias entre las dosis de alelos procedentes de parentales diferentes (figura 2.2). Por esto se escogió una dosis alélica como referencia y se le asignó un valor de 25 (50 si homocigoto), como se ha descrito en el apartado 2.2.4 de materiales y métodos.

Si se observan los datos que aparecen en la tabla 2.4 se puede ver cómo las dosis alélicas de los híbridos tetraploides resultan muy parecidas a las de referencia,

determinando que la dosis aportada por cada parental sea próxima a 50. Este resultado indica que en los híbridos tetraploides analizados la mitad de su genoma procede de un parental y la otra mitad del otro, y que por lo tanto contiene una sola copia del genoma de cada parental. Solamente se ha observado alguna variación puntual a este respecto, que podrían ser debidas a artefactos en los productos de PCR.

Como muestra la figura 2.2 el perfil generado por los híbridos somáticos suele ser el resultado de la suma de los perfiles generados por los parentales; sin embargo en algunos casos se ha evidenciado la ausencia de algunos picos que sí están presentes en el electroferograma de los parentales.

En la tabla 2.5 se muestra un resumen de los análisis moleculares realizados con los marcadores SSR que han permitido detectar alelos ausentes. En más del 40% de ellos ha sido posible detectar la ausencia de al menos un pico entre los 8 híbridos analizados. Esto significa que parte de la información genética procedente de los parentales se pierde durante el proceso de hibridación somática. El hecho de que el mismo resultado se haya observado en las dos repeticiones realizadas, y empleando diferentes extracciones de ADN del mismo híbrido, lleva a dos conclusiones. En primer lugar la ausencia de picos no está relacionada con fallos en la técnica aplicada (sería muy improbable que se repitiera con dos extracciones diferentes), y en segundo lugar las plantas analizadas presentan un genoma uniforme en todas sus partes. Esta uniformidad indica, también, que la pérdida de información genética ocurre antes de que la célula heterocarionte empiece a multiplicarse, y por lo tanto durante las primeras fases del proceso de hibridación somática y reorganización nuclear.

El análisis molecular de las plantas tetraploides ha puesto en evidencia la ausencia de 4 alelos en el híbrido 4x A, 1 alelo en el híbrido 4x C y 5 alelos en el híbrido 4x D. Todos estos alelos ausentes procedían del parental embriogénico (*C. macrophylla*).

El análisis molecular del callo de *C. macrophylla*, utilizado en los procesos de fusión no ha mostrado ninguna diferencia alélica con respecto al genotipo del árbol original, perteneciente al banco de germoplasma del IVIA y a partir del cual se obtuvo este callo. Por ello, la hipótesis más lógica es que se produzca una exclusión y/o reorganización del material genético durante el proceso de fusión y regeneración de los híbridos somáticos. En todo caso las variaciones parecen quedar a nivel subcromosómico, ya que por un lado el análisis por citometría de flujo no ha mostrado diferencias en el número de cromosomas con respecto a otros híbridos tetraploides y por otra parte el análisis de ploidía del callo parental no ha mostrado diferencia alguna tras

múltiples repeticiones. Sin embargo no se puede excluir totalmente la hipótesis de que preexistan variaciones en el contenido alélico de la población celular del callo embriogénico. Si este fuera el caso, dichas variaciones no se podrían detectar mediante el análisis molecular por PCR, ya que podrían afectar solo a una pequeña parte de la población de células que constituyen el callo.

Se ha estudiado la distribución en el mapa genético construido a partir del cruce entre clementina y pummelo (Ollitrault y col. 2008) de los alelos ausentes detectados en los híbridos tetraploides (figura 2.1, materiales y métodos). Se ha observado que cuando hay más de un alelo que desaparece en un mismo híbrido estos suelen coincidir en los mismos grupos de ligamiento, como se observa en los híbridos 4x A y 4x D en el grupo de ligamiento 8 (tabla 2.6). Esta pérdida no afecta a todos los marcadores de un mismo grupo de ligamiento, lo cual indica que las variaciones en el material genético afectan solamente a fragmentos sub-cromosómicos. También esto nos da una indicación sobre el origen de estas variaciones, pues parecen ser imputables más a fenómenos de delección que a variaciones puntuales de unos pocos nucleótidos.

Si se compara la morfología de los híbridos tetraploides con los datos obtenidos en el análisis genético se puede ver cómo los dos híbridos que no presentan delecciones (híbridos 4x B y 4x E, tabla 2.5 y 2.6) tienen una morfología bastante anormal (entrenados muy cortos, hojas pequeñas y arrugadas) mientras que los tres híbridos que presentan delecciones de algunos alelos (híbridos 4x A, 4x C, 4x D) tienen un crecimiento normal. Esto podría indicar que existe una cierta incompatibilidad entre los genomas de los dos parentales y que los fenómenos de delección representan un mecanismo utilizado por la planta para que pueda desarrollarse con normalidad.

Se analizaron los híbridos 5x, 7x y 3-6x regenerados a partir de las fusiones simétricas entre citrange “Carrizo” y *C. macrophylla*. Comparando las dosis alélicas de estos híbridos con las de referencia se puede ver un aumento de las dosis correspondientes a los alelos procedentes del parental *C. macrophylla* (tabla 2.4). Esto parece indicar que estos híbridos resultan de la unión de más de una célula de callo embriogénico y una única célula procedente del mesófilo. Esto se repite de forma sistemática en la gran mayoría de los loci analizados, por lo que se puede descartar que se trate de artefactos en los productos de PCR.

En el híbrido mixoploide 3-6x no se ha detectado la ausencia de ninguno de los alelos; esto podría indicar que esta planta se haya originado por la suma de dos

protoplastos de *C. macrophylla* y uno de citrange “Carrizo” y una sucesiva reducción (de 6 a 3x) del genoma de algunas de sus células.

Al contrario, en los híbridos 5x y 7x se ha revelado la ausencia de muchos más alelos que en los híbridos tetraploides (tabla 2.5). Exactamente se detectó la ausencia de 15 alelos en el híbrido 5x y de 8 alelos en el híbrido 7x. Tal y como se observó anteriormente en las plantas tetraploides, los loci donde faltan alelos suelen estar reunidos en los mismos grupo de ligamiento (tabla 2.6). A diferencia de lo observado para los tetraploides, en estos híbridos las deleciones afectan exclusivamente a alelos procedentes del parental no embriogénico, el citrange “Carrizo”. Cabe destacar que de los 23 alelos ausentes 19 procedían de *Poncirus trifoliata* (parental sexual del citrange “Carrizo”).

El hecho de que las deleciones observadas tanto en las plantas 5x y 7x como en las tetraploides afecten preferentemente a los alelos de uno u otro parental, así como que afecten con más frecuencia a unos locus más que a otros, induce a pensar que este fenómeno no ocurre completamente al azar. Incluso en plantas obtenidas en eventos de fusión independientes (como es el caso de las plantas 5x y 7x), los alelos faltantes suelen pertenecer al mismo locus y proceder del mismo parental; si la eliminación fuera al azar sería más probable encontrar deleciones en ambos parentales y en locus diferentes al de otros híbridos.

La relación entre morfología y ausencia de alelos que se ha establecido para los híbridos tetraploides parece indicar que la eliminación de algunas partes del genoma es imputable a fenómenos de incompatibilidad.

Tanto la reorganización y la recombinación de los genomas como la pérdida de cromosomas son fenómenos bastante comunes en la hibridación somática simétrica sobre todo si se trata de hibridaciones intergenéricas o interespecíficas (revisado en Liu y col. 2005).

Variaciones parecidas a las observadas en estos híbridos somáticos han sido observadas en diferentes especies como por ejemplo patata (Gavrilenko y col. 1999), tomate (Chen & Adachi 1998), ajo (Chen & Adachi 1998), etc. En algunos casos se ha observado que hasta el 79% de los híbridos regenerados han perdido uno o dos cromosomas, lo que nos da una idea de la frecuencia con la que ocurren estos fenómenos (Wolters y col. 1994).

En cítricos se han detectado variaciones a nivel sub-cromosómico en diferentes híbridos somáticos (Froelicher 1999; Olivares 1998; Guo y col. 2007). Sin embargo su

identificación necesita una atenta caracterización molecular, que en la mayoría de los casos no se realiza tras la obtención de híbridos somáticos. Por esto muchas de las variaciones de este tipo quedan probablemente ocultas.

Variaciones en el número de cromosomas se han observado en híbridos somáticos obtenidos entre citrange y tangerina (Guo y col. 2007) o entre *C. sinensis* "Hamlin" y *Severina Buxifolia* (Grosser y col. 1992a; Grosser y col. 1992b). Sin embargo los híbridos encontrados siempre presentaron un número de cromosomas inferior a 36 (característico de las plantas tetraploides). Las únicas plantas pentaploides fueron regeneradas utilizando los parentales "Murcott", "Nova" y "Cleopatra" fusionándolos con el citrange "Cohen" (Grosser y col. 2000). También se obtuvieron híbridos pentaploides a partir de una fusión entre *Fortunella hindsii* tetraploide y *Poncirus trifoliata* diploide (Miranda y col. 1997). Menos frecuente aún es la obtención de plantas mixoploides ya que solamente se han regenerado a partir de una fusión asimétrica aplicando rayos X (Liu & Deng 2002).

En general se puede afirmar que la aparición de plantas con elevados niveles de ploidía no es un evento común en la hibridación somática de cítricos por la reducida viabilidad que presentan estos genotipos. La escasa bibliografía encontrada confirma este aspecto.

Sobre las causas que inducen la formación de estas plantas algunos autores apuntan a que los largos periodos de cultivo *in vitro* a los cuales están sometidos los callos entre la fusión y la regeneración (entre seis meses y un año), pueden favorecer la pérdida de cromosomas o su reorganización (Guo & Deng 1999; Oberwalder y col. 1998). También la distancia genética entre los parentales o los elevados niveles de ploidía que se obtienen en algunas células tras el proceso de fusión se han indicado cómo posibles causas de la pérdida de cromosomas (Miranda y col. 1997; Sundberg & Glimelius 1991).

El reducido número de plantas con niveles de ploidía 5x y 7x que se han analizado en este estudio no permite confirmar ninguna de las hipótesis indicadas, pero las plantas aquí obtenidas pueden ser un material de partida único para este tipo de investigación.

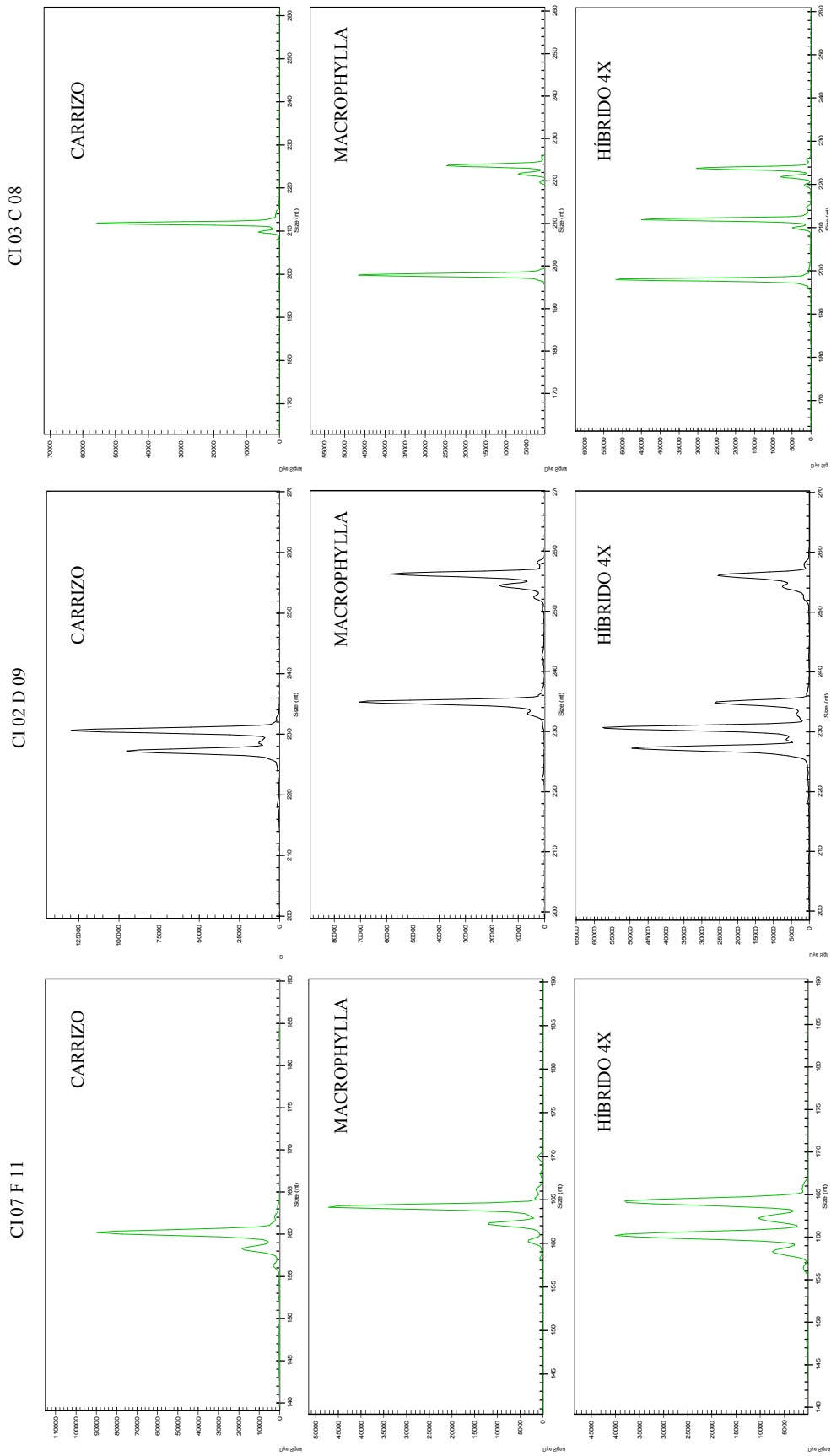
En conclusión podemos afirmar que los híbridos obtenidos mediante la fusión de protoplastos no siempre son el resultado de la simple unión de los genotipos de los parentales. A veces pueden ocurrir variaciones tanto a nivel cromosómico como a nivel sub-cromosómico. Por esto el estudio realizado permite reflexionar sobre la importancia de una caracterización detallada de los híbridos somáticos; no todos los híbridos son

idénticos y la falta de unos pocos alelos puede determinar cambios en la morfología y probablemente en la fisiología de la planta.

La disponibilidad de marcadores moleculares localizados en todos los grupos de ligación y el uso de técnicas moleculares que permitan realizar un análisis de diferentes regiones del genoma, en un tiempo reducido, resulta de fundamental importancia en la caracterización de los híbridos que se deseen analizar a nivel agronómico.

Los estudios realizados serán determinantes para seleccionar los híbridos somáticos que se evaluarán en campo para comprobar sus características agrnómicas.





**Figura 2.2.** Electroferograma correspondiente al análisis genético realizado de uno de los híbridos 4x y sus parentales “Carrizo” y C. *Macrophylla* con los cebadores: Ci07F11, Ci02D09, Ci03C08.

**Tabla 2.4.** Análisis genético de los híbridos regenerados y de los parentales. Los números corresponden a la dosis alélica detectadas para cada alelo en función del área de los picos que aparecen en el electroferograma. En las últimas dos columnas a la derecha aparecen respectivamente la suma de las dosis de los alelos procedentes del citrange “Carrizo” y del *C. macrophylla*.

Genotipo	Primer	Carrizo		Macrophylla		Carrizo	Macrophylla
		Poncirus	Navel	alelo a	alelo b		
Híbrido 5x	Ci 03 C 08	34,5		29,8	35,7	34,5	65,5
Híbrido 7x	Ci 03 C 08	27,0		30,9	42,1	27,0	73,0
Híbrido 3-6x	Ci 03 C 08	31,1		24,3	44,6	31,1	68,9
Híbrido 4x-A	Ci 03 C 08	53,6		20,8	25,6	53,6	46,4
Híbrido 4x-B	Ci 03 C 08	52,7		20,3	27,0	52,7	47,3
Híbrido 4x-C	Ci 03 C 08	52,2		19,6	28,2	52,2	47,8
Híbrido 4x-D	Ci 03 C 08	51,1		19,4	29,6	51,1	48,9
Híbrido 4x-E	Ci 03 C 08	52,7		18,6	28,8	52,7	47,3
Híbrido 5x	Ci 06 A 12	35,6		64,4		35,6	64,4
Híbrido 7x	Ci 06 A 12	37,7		62,3		37,7	62,3
Híbrido 3-6x	Ci 06 A 12	38,0		62,0		38,0	62,0
Híbrido 4x-A	Ci 06 A 12	51,6		48,4		51,6	48,4
Híbrido 4x-B	Ci 06 A 12	49,1		50,9		49,1	50,9
Híbrido 4x-C	Ci 06 A 12	65,8		34,2		65,8	34,2
Híbrido 4x-D	Ci 06 A 12	64,9		35,1		64,9	35,1
Híbrido 4x-E	Ci 06 A 12	50,7		49,3		50,7	49,3
Híbrido 5x	Mest 431	16,3	14,2	29,7	39,8	30,4	69,6
Híbrido 7x	Mest 431	14,5	11,7	34,2	39,6	26,2	73,8
Híbrido 3-6x	Mest 431	12,9	11,6	38,8	36,7	24,5	75,5
Híbrido 4x-A	Mest 431	26,0	23,8	23,6	26,6	49,8	50,2
Híbrido 4x-B	Mest 431	25,5	24,4	25,3	24,8	49,9	50,1
Híbrido 4x-C	Mest 431	25,2	26,7	22,8	25,3	51,9	48,1
Híbrido 4x-D	Mest 431	25,2	25,7	22,5	26,5	51,0	49,0
Híbrido 4x-E	Mest 431	25,5	25,5	23,8	25,2	51,0	49,0
Híbrido 5x	Mest 107	20,4	51,7		27,9	46,3	53,7
Híbrido 7x	Mest 107	20,9	44,0		35,1	42,9	57,1
Híbrido 3-6x	Mest 107	32,7	40,7		26,6	53,0	47,0
Híbrido 4x-A	Mest 107	24,7	54,9		20,4	52,2	47,8
Híbrido 4x-B	Mest 107	19,8	48,6		31,6	44,1	55,9
Híbrido 4x-C	Mest 107	23,5	46,5		30,0	46,7	53,3
Híbrido 4x-D	Mest 107	21,3	50,3		28,5	46,4	53,6
Híbrido 4x-E	Mest 107	25,4	41,7		32,9	46,3	53,7
Híbrido 5x	Mest 109	79,4	20,6	ponc		47,0	53,0
Híbrido 7x	Mest 109	79,9	20,1	ponc		46,7	53,3
Híbrido 3-6x	Mest 109	73,5	26,5	ponc		51,0	49,0
Híbrido 4x-A	Mest 109	77,2	22,8	ponc		48,5	51,5
Híbrido 4x-B	Mest 109	75,3	24,7	ponc		49,8	50,2
Híbrido 4x-C	Mest 109	73,7	26,3	ponc		50,9	49,1
Híbrido 4x-D	Mest 109	80,4	19,6	ponc		46,4	53,6
Híbrido 4x-E	Mest 109	77,1	22,9	ponc		48,6	51,4
Híbrido 5x	Ci 02 E 08	73,7		16,3	10,0	73,7	26,3
Híbrido 7x	Ci 02 E 08	45,7		31,0	23,3	45,7	54,3
Híbrido 3-6x	Ci 02 E 08	33,6		31,6	34,8	33,6	66,4
Híbrido 4x-A	Ci 02 E 08	37,7		35,0	27,3	37,7	62,3
Híbrido 4x-B	Ci 02 E 08	48,8		26,0	25,2	48,8	51,2
Híbrido 4x-C	Ci 02 E 08	52,6		23,7	23,7	52,6	47,4
Híbrido 4x-D	Ci 02 E 08	55,0		22,5	22,5	55,0	45,0
Híbrido 4x-E	Ci 02 E 08	50,9		23,9	25,2	50,9	49,1

**Tabla 2.4. (continuación)** Análisis genético de los híbridos regenerados y de los parentales. Los números corresponden a la dosis alélica detectadas para cada alelo en función del área de los picos que aparecen en el electroferograma. En las últimas dos columnas a la derecha aparecen respectivamente la suma de las dosis de los alelos procedentes del citrange “Carrizo” y del *C. macrophylla*.

Genotipo	Primer	Carrizo		Macrophylla		Carrizo	Macrophylla
		Poncirus	Navel	alelo a	alelo b		
Híbrido 5x	Mest 56	20,5	14,3	65,2		34,8	65,2
Híbrido 7x	Mest 56	20,8	18,0	61,1		38,9	61,1
Híbrido 3-6x	Mest 56	19,1	16,5	64,4		35,6	64,4
Híbrido 4x-A	Mest 56	18,9	16,1	64,9		35,1	64,9
Híbrido 4x-B	Mest 56	25,5	24,2	50,3		49,7	50,3
Híbrido 4x-C	Mest 56	22,4	22,3	55,3		44,7	55,3
Híbrido 4x-D	Mest 56	26,3	21,0	52,8		47,2	52,8
Híbrido 4x-E	Mest 56	25,9	23,9	50,2		49,8	50,2
Híbrido 5x	Ci 02 B 11	75,7		24,3		50,5	49,5
Híbrido 7x	Ci 02 B 11	74,5		25,5		49,6	50,4
Híbrido 3-6x	Ci 02 B 11	72,2		27,8		48,2	51,8
Híbrido 4x-A	Ci 02 B 11	72,2		27,8		48,1	51,9
Híbrido 4x-B	Ci 02 B 11	68,7		31,3		45,8	54,2
Híbrido 4x-C	Ci 02 B 11	72,0		28,0		48,0	52,0
Híbrido 4x-D	Ci 02 B 11	83,1		16,9		55,4	44,6
Híbrido 4x-E	Ci 02 B 11	83,1		16,9		55,4	44,6
Híbrido 5x	Ci 04 H 06	34,0		66,0		34,0	66,0
Híbrido 7x	Ci 04 H 06	38,1		61,9		38,1	61,9
Híbrido 3-6x	Ci 04 H 06	36,3		63,7		36,3	63,7
Híbrido 4x-A	Ci 04 H 06	38,1		61,9		38,1	61,9
Híbrido 4x-B	Ci 04 H 06	50,0		50,0		50,0	50,0
Híbrido 4x-C	Ci 04 H 06	46,5		53,5		46,5	53,5
Híbrido 4x-D	Ci 04 H 06	49,5		50,5		49,5	50,5
Híbrido 4x-E	Ci 04 H 06	50,0		50,0		50,0	50,0
Híbrido 5x	Ci 02 G 02	14,8	15,1	70,1		29,9	70,1
Híbrido 7x	Ci 02 G 02	15,9	15,9	68,2		31,8	68,2
Híbrido 3-6x	Ci 02 G 02	23,0	23,8	53,2		46,8	53,2
Híbrido 4x-A	Ci 02 G 02	23,6	23,5	53,0		47,0	53,0
Híbrido 4x-B	Ci 02 G 02	12,2	19,0	68,8		31,2	68,8
Híbrido 4x-C	Ci 02 G 02	27,4	28,9	43,7		56,3	43,7
Híbrido 4x-D	Ci 02 G 02	29,3	31,3	39,3		60,7	39,3
Híbrido 4x-E	Ci 02 G 02	29,6	29,7	40,7		59,3	40,7
Híbrido 5x	Mest 86	31,6		37,1	31,3	31,6	68,4
Híbrido 7x	Mest 86	31,0		40,6	28,5	31,0	69,0
Híbrido 3-6x	Mest 86	32,0		37,8	30,3	32,0	68,0
Híbrido 4x-A	Mest 86	31,0		55,3	13,7	31,0	69,0
Híbrido 4x-B	Mest 86	47,9		29,2	22,9	47,9	52,1
Híbrido 4x-C	Mest 86	50,1		24,5	25,3	50,1	49,9
Híbrido 4x-D	Mest 86	41,5		39,0	19,5	41,5	58,5
Híbrido 4x-E	Mest 86	49,9		24,6	25,4	49,9	50,1
Híbrido 5x	Ci 06 B 05	42,9	57,1	ponc	navel	50,0	50,0
Híbrido 7x	Ci 06 B 05	47,7	52,3	ponc	navel	50,0	50,0
Híbrido 3-6x	Ci 06 B 05	41,7	58,3	ponc	navel	50,0	50,0
Híbrido 4x-A	Ci 06 B 05	38,4	61,6	ponc	navel	50,0	50,0
Híbrido 4x-B	Ci 06 B 05	49,0	51,0	ponc	navel	50,0	50,0
Híbrido 4x-C	Ci 06 B 05	42,9	57,1	ponc	navel	50,0	50,0
Híbrido 4x-D	Ci 06 B 05	52,4	47,6	ponc	navel	50,0	50,0
Híbrido 4x-E	Ci 06 B 05	52,6	47,4	ponc	navel	50,0	50,0

**Tabla 2.4. (continuación)** Análisis genético de los híbridos regenerados y de los parentales. Los números corresponden a la dosis alélica detectadas para cada alelo en función del área de los picos que aparecen en el electroferograma. En las últimas dos columnas a la derecha aparecen respectivamente la suma de las dosis de los alelos procedentes del citrange “Carrizo” y del *C. macrophylla*.

Genotipo	Primer	Carrizo		Macrophylla		Carrizo	Macrophylla
		Poncirus	Navel	alelo a	alelo b		
Híbrido 5x	TAA 15	18,1	14,9	32,7	34,3	33,0	67,0
Híbrido 7x	TAA 15	19,5	19,3	35,0	26,1	38,8	61,2
Híbrido 3-6x	TAA 15	17,9	11,8	33,5	36,8	29,7	70,3
Híbrido 4x-A	TAA 15	20,9	19,9	32,4	26,8	40,8	59,2
Híbrido 4x-B	TAA 15	23,9	27,8	24,6	23,7	51,7	48,3
Híbrido 4x-C	TAA 15	25,7	23,8	25,1	25,4	49,5	50,5
Híbrido 4x-D	TAA 15	23,1	27,7	24,8	24,4	50,7	49,3
Híbrido 4x-E	TAA 15	25,8	24,3	24,4	25,5	50,1	49,9
Híbrido 5x	Ci 07 F 11	33,6		66,4		33,6	66,4
Híbrido 7x	Ci 07 F 11	34,6		65,4		34,6	65,4
Híbrido 3-6x	Ci 07 F 11	38,3		61,7		38,3	61,7
Híbrido 4x-A	Ci 07 F 11	50,9		49,1		50,9	49,1
Híbrido 4x-B	Ci 07 F 11	49,7		50,3		49,7	50,3
Híbrido 4x-C	Ci 07 F 11	51,6		48,4		51,6	48,4
Híbrido 4x-D	Ci 07 F 11	52,9		47,1		52,9	47,1
Híbrido 4x-E	Ci 07 F 11	51,1		48,9		51,1	48,9
Híbrido 5x	Ci 01 G 11	20,8	17,6	31,1	30,5	38,4	61,6
Híbrido 7x	Ci 01 G 11	21,2	18,6	29,6	30,5	39,8	60,2
Híbrido 3-6x	Ci 01 G 11	19,8	16,4	31,1	32,7	36,3	63,7
Híbrido 4x-A	Ci 01 G 11	21,2	18,8	29,9	30,1	40,0	60,0
Híbrido 4x-B	Ci 01 G 11	24,1	25,8	24,3	25,8	49,9	50,1
Híbrido 4x-C	Ci 01 G 11	28,3	23,8	32,1	15,8	52,1	47,9
Híbrido 4x-D	Ci 01 G 11	25,3	25,9	22,7	26,0	51,3	48,7
Híbrido 4x-E	Ci 01 G 11	25,5	24,7	24,8	24,9	50,2	49,8
Híbrido 5x	Ci 01 D 10	81,2		18,8		54,1	45,9
Híbrido 7x	Ci 01 D 10	77,2		22,8		51,5	48,5
Híbrido 3-6x	Ci 01 D 10	71,9		28,1		47,9	52,1
Híbrido 4x-A	Ci 01 D 10	80,9		19,1		53,9	46,1
Híbrido 4x-B	Ci 01 D 10	78,9		21,1		52,6	47,4
Híbrido 4x-C	Ci 01 D 10	57,3		42,7		38,2	61,8
Híbrido 4x-D	Ci 01 D 10	83,8		16,2		55,9	44,1
Híbrido 4x-E	Ci 01 D 10	66,9		33,1		44,6	55,4
Híbrido 5x	Mest 101	72,4		27,6		48,2	51,8
Híbrido 7x	Mest 101	71,3		28,7		47,5	52,5
Híbrido 3-6x	Mest 101	74,4		25,6		49,6	50,4
Híbrido 4x-A	Mest 101	70,4		29,6		46,9	53,1
Híbrido 4x-B	Mest 101	75,2		24,8		50,1	49,9
Híbrido 4x-C	Mest 101	74,1		25,9		49,4	50,6
Híbrido 4x-D	Mest 101	76,0		24,0		50,6	49,4
Híbrido 4x-E	Mest 101	75,8		24,2		50,5	49,5
Híbrido 5x	Ci 03 B 07	13,6	13,3	36,9	36,3	26,9	73,1
Híbrido 7x	Ci 03 B 07	16,9	17,5	36,3	29,3	34,4	65,6
Híbrido 3-6x	Ci 03 B 07	17,6	12,9	33,3	36,3	30,4	69,6
Híbrido 4x-A	Ci 03 B 07	16,2	17,6	38,9	27,4	33,7	66,3
Híbrido 4x-B	Ci 03 B 07	24,0	22,6	27,5	25,8	46,6	53,4
Híbrido 4x-C	Ci 03 B 07	24,8	26,7	25,7	22,8	51,5	48,5
Híbrido 4x-D	Ci 03 B 07	24,2	26,6	25,6	23,6	50,8	49,2
Híbrido 4x-E	Ci 03 B 07	25,4	27,1	23,0	24,5	52,5	47,5

**Tabla 2.5.** Análisis genético de los híbridos somáticos seleccionados realizado mediante los marcadores microsatélite que han evidenciado la ausencia de algunos alelos (marcados en verde). Los números corresponden al tamaño de los fragmentos amplificados por PCR.

Genotipo	Primer	Carrizo		Macrophylla		Genotipo	Primer	Carrizo		Macrophylla	
		Poncirus	Navel	alelo a	alelo b			Poncirus	Navel	alelo a	alelo b
Híbrido 5x	Ci 01 C 06		159	165	167	Híbrido 5x	Ci 06 B 07		105		100
Híbrido 7 x	Ci 01 C 06		159	165	167	Híbrido 7 x	Ci 06 B 07		105		100
Híbrido 3-6x	Ci 01 C 06	146	159	165	167	Híbrido 3-6x	Ci 06 B 07	108	105	95	100
Híbrido 4x-A	Ci 01 C 06	146	159	165		Híbrido 4x-A	Ci 06 B 07	108	105	95	100
Híbrido 4x-B	Ci 01 C 06	146	159	165	167	Híbrido 4x-B	Ci 06 B 07	108	105	95	100
Híbrido 4x-C	Ci 01 C 06	146	159	165	167	Híbrido 4x-C	Ci 06 B 07	108	105	95	100
Híbrido 4x-D	Ci 01 C 06	146	159	165		Híbrido 4x-D	Ci 06 B 07	108	105		100
Híbrido 4x-E	Ci 01 C 06	146	159	165	167	Híbrido 4x-E	Ci 06 B 07	108	105	95	100
Híbrido 5x	Ci 02 F 12		122	130		Híbrido 5x	Mest 46		212		218
Híbrido 7 x	Ci 02 F 12		122	130		Híbrido 7 x	Mest 46		212		218
Híbrido 3-6x	Ci 02 F 12	114	122	130		Híbrido 3-6x	Mest 46	231	212		218
Híbrido 4x-A	Ci 02 F 12	114	122			Híbrido 4x-A	Mest 46	231	212		218
Híbrido 4x-B	Ci 02 F 12	114	122	130		Híbrido 4x-B	Mest 46	231	212		218
Híbrido 4x-C	Ci 02 F 12	114	122	130		Híbrido 4x-C	Mest 46	231	212		218
Híbrido 4x-D	Ci 02 F 12	114	122			Híbrido 4x-D	Mest 46	231	212		218
Híbrido 4x-E	Ci 02 F 12	114	122	130		Híbrido 4x-E	Mest 46	231	212		218
Híbrido 5x	Ci07 D 06		188	167	172	Híbrido 5x	Ci 05 A 05		153	169	
Híbrido 7 x	Ci07 D 06	162	188	167	172	Híbrido 7 x	Ci 05 A 05		153	169	
Híbrido 3-6x	Ci07 D 06	162	188	167	172	Híbrido 3-6x	Ci 05 A 05	158	153	169	
Híbrido 4x-A	Ci07 D 06	162	188	167	172	Híbrido 4x-A	Ci 05 A 05	158	153	169	
Híbrido 4x-B	Ci07 D 06	162	188	167	172	Híbrido 4x-B	Ci 05 A 05	158	153	169	
Híbrido 4x-C	Ci07 D 06	162	188	167	172	Híbrido 4x-C	Ci 05 A 05	158	153	169	
Híbrido 4x-D	Ci07 D 06	162	188	167	172	Híbrido 4x-D	Ci 05 A 05	158	153	169	
Híbrido 4x-E	Ci07 D 06	162	188	167	172	Híbrido 4x-E	Ci 05 A 05	158	153	169	
Híbrido 5x	Mest 291			158	194	Híbrido 5x	Ci 03 D 12		261	243	
Híbrido 7 x	Mest 291	177		158	194	Híbrido 7 x	Ci 03 D 12	247	261	243	
Híbrido 3-6x	Mest 291	177		158	194	Híbrido 3-6x	Ci 03 D 12	247	261	243	
Híbrido 4x-A	Mest 291	177		158	194	Híbrido 4x-A	Ci 03 D 12	247	261	243	
Híbrido 4x-B	Mest 291	177		158	194	Híbrido 4x-B	Ci 03 D 12	247	261	243	
Híbrido 4x-C	Mest 291	177		158	194	Híbrido 4x-C	Ci 03 D 12	247	261	243	
Híbrido 4x-D	Mest 291	177		158	194	Híbrido 4x-D	Ci 03 D 12	247	261	243	
Híbrido 4x-E	Mest 291	177		158	194	Híbrido 4x-E	Ci 03 D 12	247	261	243	

**Tabla 2.5. (continuación)** Análisis genético de los híbridos somáticos seleccionados realizado mediante los marcadores microsatélite que han evidenciado la ausencia de algunos alelos (marcados en verde). Los números corresponden al tamaño de los fragmentos amplificados por PCR.

Genotipo	Primer	Carrizo		Macrophylla		Genotipo	Primer	Carrizo		Macrophylla	
		Poncirus	Navel	alelo a	alelo b			Poncirus	Navel	alelo a	alelo b
Híbrido 5x	Mest 123			251	258	Híbrido 5x	Mest 121	200		182	
Híbrido 7 x	Mest 123			251	258	Híbrido 7 x	Mest 121	200	180	182	
Híbrido 3-6x	Mest 123	246		251	258	Híbrido 3-6x	Mest 121	200	180	182	
Híbrido 4x-A	Mest 123	246		251		Híbrido 4x-A	Mest 121	200	180	182	
Híbrido 4x-B	Mest 123	246		251	258	Híbrido 4x-B	Mest 121	200	180	182	
Híbrido 4x-C	Mest 123	246		251	258	Híbrido 4x-C	Mest 121	200	180	182	
Híbrido 4x-D	Mest 123	246		251		Híbrido 4x-D	Mest 121	200	180	182	
Híbrido 4x-E	Mest 123	246		251	258	Híbrido 4x-E	Mest 121	200	180	182	
Híbrido 5x	CAC 23	245		ponc	251	Híbrido 5x	Ci 02 D 04		210	237	
Híbrido 7 x	CAC 23	245	248	ponc	251	Híbrido 7 x	Ci 02 D 04	195	210	237	
Híbrido 3-6x	CAC 23	245	248	ponc	251	Híbrido 3-6x	Ci 02 D 04	195	210	237	
Híbrido 4x-A	CAC 23	245	248	ponc	251	Híbrido 4x-A	Ci 02 D 04	195	210	237	
Híbrido 4x-B	CAC 23	245	248	ponc	251	Híbrido 4x-B	Ci 02 D 04	195	210	237	
Híbrido 4x-C	CAC 23	245	248	ponc	251	Híbrido 4x-C	Ci 02 D 04	195	210	237	
Híbrido 4x-D	CAC 23	245	248	ponc	251	Híbrido 4x-D	Ci 02 D 04	195	210	237	
Híbrido 4x-E	CAC 23	245	248	ponc	251	Híbrido 4x-E	Ci 02 D 04	195	210	237	
Híbrido 5x	Mest 192	226		211	228	Híbrido 5x	Ci 02 D 09		230	234	256
Híbrido 7 x	Mest 192	226		211	228	Híbrido 7 x	Ci 02 D 09		230	234	256
Híbrido 3-6x	Mest 192	226		211	228	Híbrido 3-6x	Ci 02 D 09	227	230	234	256
Híbrido 4x-A	Mest 192	226			228	Híbrido 4x-A	Ci 02 D 09	227	230	234	256
Híbrido 4x-B	Mest 192	226		211	228	Híbrido 4x-B	Ci 02 D 09	227	230	234	256
Híbrido 4x-C	Mest 192	226		211	228	Híbrido 4x-C	Ci 02 D 09	227	230	234	256
Híbrido 4x-D	Mest 192	226			228	Híbrido 4x-D	Ci 02 D 09	227	230	234	256
Híbrido 4x-E	Mest 192	226		211	228	Híbrido 4x-E	Ci 02 D 09	227	230	234	256
Híbrido 5x	Ci 07 C 09	244	256	248	250	Híbrido 5x	Mest 256			237	
Híbrido 7 x	Ci 07 C 09	244	256	248	250	Híbrido 7 x	Mest 256	225		237	
Híbrido 3-6x	Ci 07 C 09	244	256	248	250	Híbrido 3-6x	Mest 256	225		237	
Híbrido 4x-A	Ci 07 C 09	244	256	248	250	Híbrido 4x-A	Mest 256	225		237	
Híbrido 4x-B	Ci 07 C 09	244	256	248	250	Híbrido 4x-B	Mest 256	225		237	
Híbrido 4x-C	Ci 07 C 09	244	256	248		Híbrido 4x-C	Mest 256	225		237	
Híbrido 4x-D	Ci 07 C 09	244	256	248	250	Híbrido 4x-D	Mest 256	225		237	
Híbrido 4x-E	Ci 07 C 09	244	256	248	250	Híbrido 4x-E	Mest 256	225		237	

**Tabla 2.6.** Distribución de los alelos deleccionados en los diferentes grupos de ligamiento para cada uno de los híbridos somáticos estudiados.

Locus	Grupo de ligamiento	Posición	hibrido 5x	hibrido 7 x	hibrido 3-6x	hibrido 4x A	hibrido 4x B	hibrido 4x C	hibrido 4x D	hibrido 4x E
Ci04H06	1	19,45								
Ci01D10	1	47,77								
Ci03C08	1	59,78								
Ci05A05	1	111,24	X	X						
Ci06B07	1	130,07	X	X					X	
Ci02G02	2	51,91								
MEST86	2	129,58								
Ci06B05	3	45,68								
TAA15	3	122,55								
MEST256	4	97,83	X							
CAC23	4	108,78	X							
MEST109	5	9,96								
Ci07D06	5	14,26	X							
Ci02D04b	5	89,23	X							
Ci03D12a	5	92,49	X							
Ci03B07	6	37,08								
MEST107f	6	69,32								
Ci02E08	7	9,61								
Ci06A12	7	18,13								
Ci02F12	8	53,23	X	X		X			X	
Ci02B11	8	67,68								
Ci01C06	8	86,73	X	X		X			X	
MEST123	8	89,70	X	X		X			X	
Ci07C09	9a	0,00						X		
Ci07F11	9a	5,45								
MEST291	9b	4,93	X							
MEST121	no map		X							
Ci02D09	no map		X	X						
MEST46	no map		X	X						
MEST192	no map					X			X	
MEST431	no map									
Ci01G11	no map									
MEST56	no map									
MEST101	no map									

### 2.3.2 Caracterización molecular de los híbridos mediante marcadores citoplasmáticos.

Se han utilizados seis marcadores citoplasmáticos que han permitido diferenciar los parentales, cuatro de ellos específicos para cpDNA y otros dos para mtDNA.

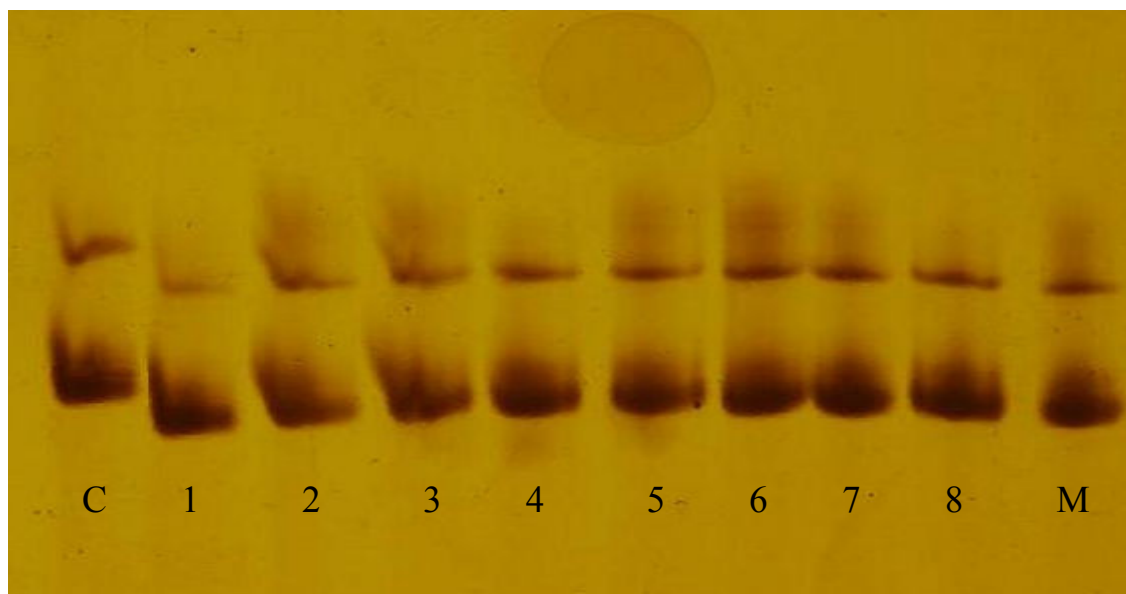
El análisis realizado con los marcadores seleccionados ha revelado que todos los híbridos han heredado el ADN mitocondrial procedente del parental embriogénico, en nuestro caso el de *C. macrophylla*; véanse cómo ejemplo los resultados obtenidos con el marcador *Nad2* (figura 2.3). Los trabajos de caracterización citoplasmática realizados anteriormente con híbridos somáticos de cítricos coinciden en considerar la heredabilidad de las mitocondrias como no casual, pues siempre proceden del parental embriogénico (Cabasson y col. 2001; Guo y col. 2004). Todo esto se puede relacionar con la implicación de las mitocondrias del callo en los procesos de regeneración y embriogénesis.

A diferencia del genoma mitocondrial, el genoma cloroplástico de los híbridos somáticos suele proceder aleatoriamente de uno de los dos parentales o una combinación de ambos (Guo y col. 2007). El análisis de los loci *Ccmp1*, *Ccmp2*, *Ccmp6* y *Ntcp7* nos permitió determinar que los híbridos tetraploides 4x C y 4x E heredaron el genoma citoplasmático del citrange “Carrizo” mientras que todo el resto de híbridos analizados lo heredaron del *C. macrophylla*. En la figura 2.4 se muestran, por ejemplo, los alelos detectados en el locus *Ntcp7*.

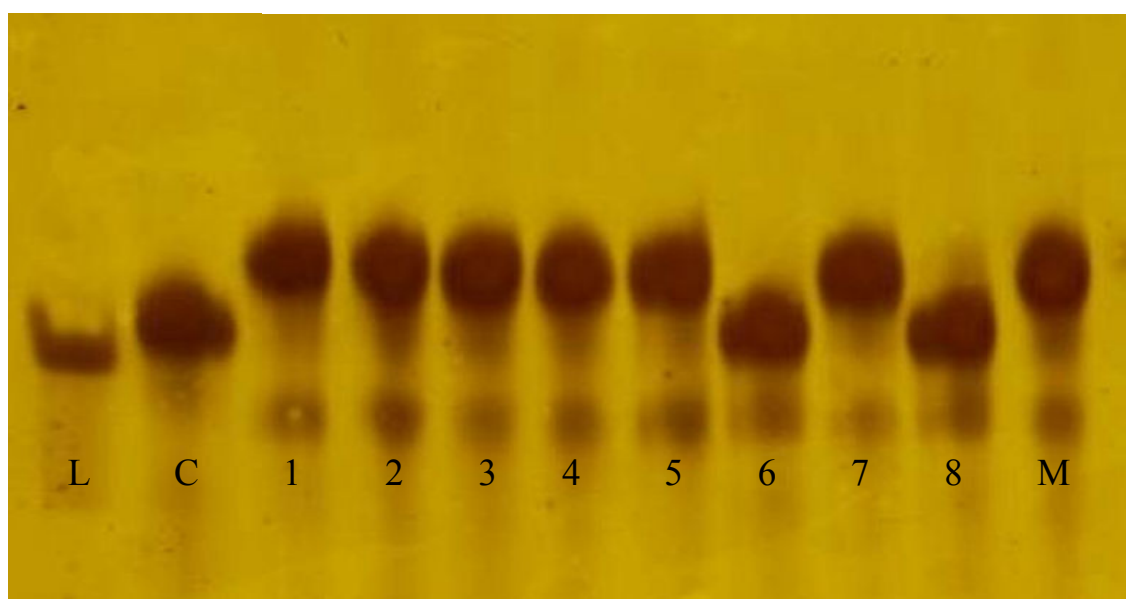
Las únicas excepciones se observaron con el genoma cloroplástico de los híbridos 5x y 7x analizado con los cebadores *Ccmp1* y *Ccmp2*; en estos casos específicos se observaron unos perfiles diferentes a los de ambos parentales (figura 2.5). La identificación de estos cambios permite suponer que existe una inestabilidad también a nivel del genoma cloroplástico, determinada por la reorganización del genoma citoplasmático (Ozias-Atkins 1988) o por la interacción del cpDNA con el nuevo genoma nuclear generado tras la fusión (Cheng y col. 2003; Hartmann 1992).

Suponemos que un análisis más detallado de las secuencias de las bandas que aparecen en los perfiles de estos dos híbridos podría determinar el origen de estos cambios.

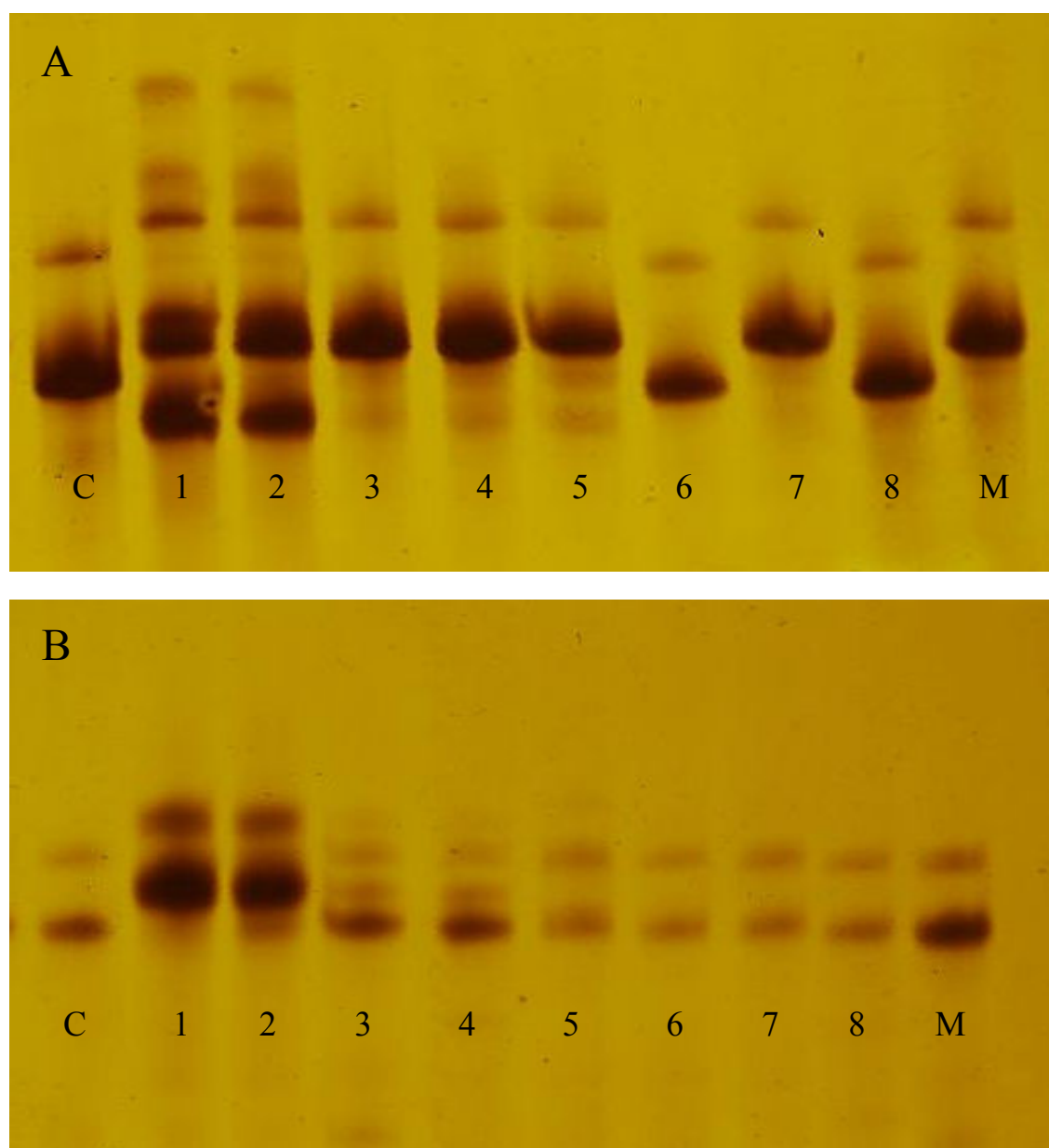




**Figura 2.3.** Análisis genético del ADN mitocondrial de los híbridos somáticos del locus *Nad2*. *C* citrange “Carrizo”; *1* híbrido 5x; *2* híbrido 7x; *3* híbrido 3-6x; *4* híbrido 4xA; *5* híbrido 4xB; *6* híbrido 4xC; *7* híbrido 4xD; *8* híbrido 4xE; *M* *C. macrophylla*.



**Figura 2.4.** Análisis genético del ADN cloroplástico de los híbridos somáticos, del locus *Ntcp 7*. *L* marcador de peso (180 bp). *C* citrange “Carrizo”; *1* híbrido 5x; *2* híbrido 7x; *3* híbrido 3-6x; *4* híbrido 4xA; *5* híbrido 4xB; *6* híbrido 4xC; *7* híbrido 4xD; *8* híbridos 4xE; *M* *C. macrophylla*.



**Figura 2.5. A, B.** Análisis genético del ADN cloroplástico de los híbridos somáticos del locus *Ccmp2* (A) *Ccmp1* (B). *C* citrange “Carrizo”; *1* híbrido 5x; *2* híbrido 7x; *3* híbrido 3-6x; *4* híbrido 4xA; *5* híbrido 4xB; *6* híbrido 4xC; *7* híbrido 4xD; *8* híbrido 4xE; *M* *C. macrophylla*.

### 2.3.3 Caracterización nuclear de un híbrido somático entre *C. macrophylla* y *C. taiwanica*.

El análisis molecular de un híbrido obtenido a partir de la fusión entre *C. macrophylla* y *C. taiwanica* está resumida en la tabla 2.7. El híbrido presenta los alelos de ambos parentales en 27 de los 34 loci analizados. En los restante 7 loci se observa la ausencia de al menos un alelo. Al igual de lo observado en el análisis molecular de los híbridos somáticos entre *C. macrophylla* y citrange “Carrizo”, los alelos ausentes proceden preferentemente de uno de los dos parentales, en este caso específico del *C. taiwanica*. Solamente con el marcador Mest 256 se ha observado la ausencia de alelos procedentes del parental embriogénico (*C. macrophylla*).

Estos resultados permiten evidenciar una vez más que en los híbridos somáticos puede haber una pérdida del material genético procedente de los parentales y que por lo tanto los híbridos no son la suma perfecta de los dos genotipos de partida. Por esto la caracterización molecular de los híbridos obtenidos es muy importante y tiene que realizarse de una forma exhaustiva ya que la pérdida de material genético puede ser un fenómeno más frecuente de lo que se creía hasta el momento.

El hecho de que casi todos los alelos ausentes procedan del mismo parental, en este caso específico del parental no embriogénico, apoya la hipótesis formulada en el apartado 2.3.1 de que la eliminación de fragmentos cromosómicos podría no ser del todo al azar.

Por último cabe destacar que la distancia genética existente entre los dos genotipos parentales podría ser un factor determinante en la pérdida de material genético vistos los resultados observados a lo largo de estos trabajos (ver apartados 2.3.1 y 5.3).

**Tabla 2.7.** Análisis genético del híbrido alotetraploide entre *C. macrophylla* y *C. taiwanica*. Los números corresponden al tamaño de los fragmentos amplificados por PCR. En verde están evidenciados los alelos ausentes.

variedad	primer					variedad	primer				
		alelo a	alelo b	alelo c	alelo d			alelo a	alelo b	alelo c	alelo d
taiwanica	Ci 01 C 06	131	158			taiwanica	Ci 05 A 05	153	153		
Hibrido 4x	Ci 01 C 06	131	158	165	167	Hibrido 4x	Ci 05 A 05	153	153		
macrophylla	Ci 01 C 06			165	167	macrophylla	Ci 05 A 05	153	153		
taiwanica	Ci 02 F 12	122	122			taiwanica	Mest 192		222	222	
Hibrido 4x	Ci 02 F 12		122	130		Hibrido 4x	Mest 192	210	222		228
macrophylla	Ci 02 F 12			130	130	macrophylla	Mest 192	210			228
taiwanica	Ci 07 D 06		170		196	taiwanica	Ci 06 B 05	185	185		
Hibrido 4x	Ci 07 D 06	167	170	172	196	Hibrido 4x	Ci 06 B 05		185	187	
macrophylla	Ci 07 D 06	167		172		macrophylla	Ci 06 B 05		185	187	
taiwanica	Ci 06 A 12			96	102	taiwanica	TAA 15	165	165		
Hibrido 4x	Ci 06 A 12		85	96	102	Hibrido 4x	TAA 15		165	167	
macrophylla	Ci 06 A 12	85	85			macrophylla	TAA 15		165	167	
taiwanica	Ci 03 C 08		214	223		taiwanica	Ci 01 A 07	216	216		
Hibrido 4x	Ci 03 C 08	197	214	223		Hibrido 4x	Ci 01 A 07		216	221	
macrophylla	Ci 03 C 08	197		223		macrophylla	Ci 01 A 07			221	221
taiwanica	Ci 03 D 12			253	261	taiwanica	Ci 07 E 12			121	125
Hibrido 4x	Ci 03 D 12		243	253	261	Hibrido 4x	Ci 07 E 12	104	106	121	125
macrophylla	Ci 03 D 12	243	243			macrophylla	Ci 07 E 12	104	106		
taiwanica	Ci 02 D 04	200	210			taiwanica	Ci 04 H 06	189	189		
Hibrido 4x	Ci 02 D 04	200	210	237		Hibrido 4x	Ci 04 H 06		189	192	
macrophylla	Ci 02 D 04			237	237	macrophylla	Ci 04 H 06			192	192
taiwanica	Mest 121		182	188		taiwanica	Ci 07 C 09			261	261
Hibrido 4x	Mest 121		182	188		Hibrido 4x	Ci 07 C 09	248	250		
macrophylla	Mest 121	182	182			macrophylla	Ci 07 C 09	248	250		
taiwanica	Ci 02 D 09	227	234			taiwanica	Ci 01 G 11	100	105		
Hibrido 4x	Ci 02 D 09		234	256		Hibrido 4x	Ci 01 G 11	100	105		
macrophylla	Ci 02 D 09		234	256		macrophylla	Ci 01 G 11	100	105		
taiwanica	Mest 431	331	343			taiwanica	Mest 291		180	186	
Hibrido 4x	Mest 431	331	343	345	348	Hibrido 4x	Mest 291	158	180		194
macrophylla	Mest 431			345	348	macrophylla	Mest 291	158			194
taiwanica	Mest 123		258	268		taiwanica	CAC 23		248	248	
Hibrido 4x	Mest 123	251	258	268		Hibrido 4x	CAC 23	245	248		251
macrophylla	Mest 123	251	258			macrophylla	CAC 23	245			251
taiwanica	Ci 02 G 02			121	121	taiwanica	Ci 02 B 11	231	247		
Hibrido 4x	Ci 02 G 02		108	121		Hibrido 4x	Ci 02 B 11	231	247	249	
macrophylla	Ci 02 G 02	108	108			macrophylla	Ci 02 B 11	231		249	
taiwanica	Mest 46		215		226	taiwanica	Mest 56	135	151		
Hibrido 4x	Mest 46	212	215	218	226	Hibrido 4x	Mest 56	135	151	164	
macrophylla	Mest 46	212		218		macrophylla	Mest 56			164	164
taiwanica	Ci 06 B 07			107	107	taiwanica	Mest 101		220	220	
Hibrido 4x	Ci 06 B 07		100	107		Hibrido 4x	Mest 101	215	220		
macrophylla	Ci 06 B 07	95	100			macrophylla	Mest 101	215	220		
taiwanica	Mest 86		113	119		taiwanica	Ci 03 B 07	265	277		
Hibrido 4x	Mest 86	110	113		122	Hibrido 4x	Ci 03 B 07	265		270	273
macrophylla	Mest 86	110			122	macrophylla	Ci 03 B 07			270	273
taiwanica	Ci 02 E 08	258		264		taiwanica	Mest 103	205	223		
Hibrido 4x	Ci 02 E 08	258	262	264	282	Hibrido 4x	Mest 103	205	223		
macrophylla	Ci 02 E 08		262	282		macrophylla	Mest 103	205	223		
taiwanica	Mest 109			140	140	taiwanica	Mest 256	206	227		
Hibrido 4x	Mest 109		138	140		Hibrido 4x	Mest 256	206	227		
macrophylla	Mest 109	138	138			macrophylla	Mest 256			237	237

## 2.4 CONCLUSIONES.

- El análisis molecular de los híbridos somáticos tetraploides ha demostrado que la dosis de los alelos procedentes de cada parental es próxima al 50%; esto significa que cada parental aporta siempre la misma dosis en los híbridos analizados y que por lo tanto los híbridos presentan la mitad del genoma procedente de un parental y la otra mitad procedente del otro.

- El análisis molecular de los híbridos con niveles de ploidía 5x, 7x y 3-6x ha demostrado que tienen una mayor dosis de los alelos procedentes del parental embriogénico, lo cual induce a pensar que estas plantas se hayan formado por la unión de más de un protoplasto de callo con un único protoplasto procedente de mesófilo de hoja.

- En el 40 % de los loci analizados se ha detectado la ausencia de al menos un alelo entre los 8 híbridos analizados, lo cual indica la pérdida de parte del genoma de los híbridos durante el proceso de fusión y regeneración. La frecuencia con la que se produce este fenómeno parece ser más alta de lo que se creía hasta el momento.

- La pérdida de alelos se puede correlacionar con la pérdida de fragmentos sub-cromosómicos, ya que los alelos procedían preferentemente de un parental (*C. macrophylla* para los híbridos 4x y citrange Carrizo para los híbridos 5x y 7x) y que los loci donde se han detectados se encuentran asociados a un mismo grupo de ligamiento.

- La eliminación de fragmentos cromosómicos podría no ocurrir del todo al azar, teniendo en cuenta la procedencia de los alelos ausentes (preferentemente de un parental u otro según su nivel de ploidía) y que estos alelos se encuentran siempre en los mismos loci, incluso en híbridos regenerados en diferentes experimentos.

- En las plantas 4x en que se han detectado alelos ausentes la morfología ha resultado normal, al contrario que en las plantas donde se han detectado todos los alelos. Esto podría indicar la existencia de una cierta incompatibilidad entre los genomas de los dos parentales y que por tanto la delección de parte del genoma representa un mecanismo utilizado por la planta para normalizar su crecimiento. La pérdida

preferencial de alelos pertenecientes a uno de los parentales (*Poncirus trifoliata*) podría apoyar esta posible incompatibilidad.

- El análisis molecular del híbrido somático obtenido entre *C. taiwanica* y *C. macrophylla* también ha demostrado la ausencia de alelos, confirmando que la pérdida de material genético se produce de forma frecuente, sobre todo si se utilizan parentales genéticamente distantes.

- Se ha comprobado que el genoma mitocondrial de los híbridos somáticos siempre procede del parental embriogénico, mientras que el genoma cloroplástico presenta una procedencia aleatoria.

- Se han detectado cambios en dos de los seis loci analizados en el genoma cloroplástico de las plantas 5x y 7x, la aparición de estos cambios resulta un evento bastante inusual.

---

## CAPÍTULO 3

### ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE PROTOPLASTOS DE CÍTRICOS

#### 3.1 INTRODUCCIÓN.

La hibridación somática es una de las herramientas biotecnológicas más utilizada en la mejora vegetal de cítricos para la obtención de nuevas variedades y patrones (Grosser & Gmitter 1990). A partir de una fusión de protoplastos es posible obtener diferentes tipos de híbridos:

*Híbridos simétricos*, que tienen toda la información genética nuclear completa de los dos parentales reunidos en una única planta.

*Híbridos citoplasmáticos*, que contienen los cromosomas de uno de los dos parentales y los orgánulos citoplasmáticos procedentes del otro parental (o una combinación de ambos). Este tipo de híbridos tienen gran interés porque ofrecen la posibilidad de añadir a una variedad con buenas características agronómicas otros caracteres que están regulados por el citoplasma del otro parental.

*Híbridos asimétricos*, si la contribución de los dos parentales es desigual; uno de los dos parentales (receptor) aporta su información genética completa (tanto nuclear como citoplasmática) mientras que el otro parental (donante) contribuye con un fragmento de su genoma nuclear.

La hibridación asimétrica tiene un gran interés para la mejora genética ya que permite obtener plantas que se parecen mucho a la planta receptora y que tienen solamente unos pocos caracteres procedentes de la planta donante. A nivel práctico la hibridación somática asimétrica puede ser empleada, por ejemplo, para transferir a una variedad de interés comercial determinados caracteres de resistencia a patógenos. Si el gen que controla dicho carácter no ha sido clonado o no es posible transferirlo por transformación genética (debido a su excesivo tamaño), la hibridación somática asimétrica representa una vía alternativa, ya que permite la introducción de grandes fragmentos cromosómicos procedentes de otro genoma. Con esta finalidad la hibridación somática asimétrica se ha llevado a cabo con éxito en especies como: *Nicotiana* (Dudits y col. 1987; Bates 1990; Pinto y col. 1993; Dragoeva y col. 1997), *Festuca* (Creemersmolenaar y col. 1992), *Brassica* (Gerdemannknorck y col. 1995;

Wang y col. 2003), trigo (Yue y col. 2001), tomate (Wijbrandi y col. 1990), leguminosas (Tian & Rose 1999), arroz (Finch y col. 1990; Xin y col. 1997, Liu y col. 1999), algodón (Yang y col. 2007) y patata (Schoenmakers y col. 1994).

También hay estudios que demuestran la aplicabilidad de la hibridación somática asimétrica en el mapeo genético. La frecuencia con la que se generan rupturas en regiones cromosómicas delimitadas por marcadores puede ser útil para definir la distancia genética entre ellos y constituir así mapas físicos (Zhou y col. 2006).

En cítricos, la hibridación asimétrica podría aplicarse por ejemplo a la introducción de resistencia a tristeza en patrones sensibles que tienen un buen comportamiento agronómico. Se ha demostrado que el gen de resistencia a tristeza, que caracteriza especies como el *Poncirus trifoliata*, se encuentra delimitado en una región de aproximadamente 300kb, que ha sido luego restringida a 180kb a través de un mapeo más específico (Yang y col. 2003). Mediante la hibridación somática asimétrica sería posible transferir fragmentos que contengan los genes de interés de una variedad a otra sin modificar sus características generales. Para ello habría que investigar la fragmentación que es posible generar mediante la radiación, y también ver si es posible transferir estos fragmentos de un genoma a otro.

Los híbridos asimétricos normalmente se obtienen por medio de tratamientos específicos realizados sobre los protoplastos del parental donante antes de su fusión con los protoplastos del parental receptor. La metodología comúnmente empleada para la obtención de híbridos asimétricos consiste en tratar las células del parental donante con rayos X (Dudits y col. 1980; Imamura y col. 1987; Pinto y col. 1993; Gerdemannknorck y col. 1995), rayos gamma ( $\gamma$ ) (Bates y col. 1987; Dudits y col. 1987; Schoenmakers y col. 1994; Tian & Rose 1999) o rayos ultravioleta (UV) (Atanassov y col. 1991; Vlahova y col. 1997; Yue y col. 2001; Xia y col. 2003; Xiang y col. 2003; Wang y col. 2003; Cheng y col. 2003; Cheng y col. 2006; Yang y col. 2007; Xu y col. 2007). Estas radiaciones producen una fragmentación del ADN nuclear en los protoplastos del parental donante de forma que cuando se fusionan con los protoplastos del receptor se produce una exclusión masiva del DNA fragmentado del donante en el heterocarionte, y sólo pequeñas porciones del genoma del donante se integran en el genoma nuclear del receptor, generalmente mediante recombinación homóloga o por transcripción insercional.

En algunos casos se ha demostrado que el nivel de asimetría que se obtiene en los híbridos depende de la dosis de radiación a la que se someten los protoplastos, ya que



una dosis mayor contribuye a la eliminación de una mayor cantidad de material genético del donante (Wijbrandi y col. 1990; Melzer & Oconnell 1992; Kovtun y col. 1993; Trick y col. 1994; Forsberg y col. 1998a). Sin embargo la relación entre dosis y nivel de asimetría no siempre es de tipo lineal, como se ha demostrado en algunos trabajos (Kisaka & Kameya 1994; McCabe y col. 1993).

Entre los agentes utilizados para generar asimetría los rayos  $\gamma$  y X han sido utilizados con éxito, sobre todo en los primeros trabajos realizados sobre la hibridación somática asimétrica. Mas adelante, los estudios realizados por Hall y col. (Hall y col. 1992a; Hall y col. 1992b) sobre los efectos de la luz UV en protoplastos de *Beta vulgaris* promovieron la utilización de este tipo de radiación para generar fragmentación en el genoma de las células sin causar su muerte súbita. Estos resultados abrieron el camino para la aplicación de la radiación UV en hibridaciones asimétricas.

En un estudio de comparación entre radiaciones X y UV, aplicada a protoplastos de *Brassica napus* y *Arabidopsis Thaliana* (Forsberg y col. 1998b), se ha demostrado que no hay gran diferencia entre ellas en cuanto a eficiencia en la fragmentación del genoma de células tratadas. Únicamente se ha observado una menor frecuencia de regeneración utilizando la radiación UV. Por otro lado la radiación UV ofrece la gran ventaja de ser fácil de utilizar, más económica y menos peligrosa de manejar que las radiaciones X y  $\gamma$ .

El primer trabajo realizado para la obtención de híbridos somáticos asimétricos utilizando la radiación UV fue desarrollado por Atanassov y col. (1991), quienes consiguieron transferir un fragmento de cromosoma que contenía el gen de resistencia al virus del bronceado del tomate (TSWV) desde un genotipo resistente de *N. tabacum* a otro sensible. También se ha demostrado la eficiencia de esta técnica para transferir el T-DNA de plantas de tomate a otras solanáceas (McCabe y col. 1993). Más recientemente (Yue y col. 2001) consiguieron transferir genes de tolerancia a estrés salino desde *Aeluropus littorulis sinensis* al trigo (*Triticum aestivum* L.). La luz UV ha sido utilizada para la obtención de híbridos somáticos asimétricos entre diferentes tipos de plantas modelo, como por ejemplo entre *A. thaliana* y *B. napus* (Forsberg y col. 1998a), *N. plumbalgifolia* y *Lycopersicon esculentum* (Vlahova y col. 1997), *Triticum aestivum* y *Agropyron elongatum* (Xia y col. 2003), *Gossypium hirsutum* y *G. klozschianum* (Yang y col. 2007).

Existe un solo trabajo realizado con cítricos donde se describe la aplicación de radiación UV para la obtención de híbridos somáticos asimétricos entre *C. unshiu* y *C.*

*sinensis* (Xu y col. 2007). Los protoplastos aislados a partir de callos de satsuma se trataron con dosis de  $38 \text{ J/cm}^2$  de radiación UV. Se regeneraron embriones pero a partir de estos solamente se obtuvieron brotes con diferentes niveles de ploidía (2x, 4x y valores intermedios), sin embargo no se consiguió regenerar ninguna planta entera. El análisis molecular realizado con marcadores de tipo RAPD sobre los brotes no permitió confirmar con claridad el carácter híbrido de las plantas regeneradas. Solamente aplicando la técnica de AFLP y mediante un único par de cebadores se pudieron observar bandas específicas del parental donante, lo cual parece bastante raro en plantas que supuestamente presentan un cierto número de cromosomas procedentes del parental donante.

Este trabajo previo se realizó aplicando la luz UV a protoplastos de callo; sin embargo las dificultades en generar líneas embriogénicas a partir de todos los genotipos de interés para la mejora resulta un factor limitante para la aplicación de este tipo de hibridación asimétrica. El *Poncirus trifoliata*, por ejemplo, es uno de los genotipos de mayor interés (por su resistencia al virus de la tristeza y a *Phytophthora* sp.), pero hasta el momento no se ha conseguido generar líneas de callo embriogénico. Por esto sería necesario investigar el comportamiento de los protoplastos de mesófilo de hojas sometidos a luz UV, ya que estas son una fuente de material vegetal mucho más fácil de conseguir.

Se han realizado algunos trabajos para estudiar el efecto que la radiación UV tiene sobre los protoplastos obtenidos a partir de tejidos vegetales de varias especies como *Beta vulgaris* (Hall y col. 1992a), *A. thaliana* (Danon y col. 2004), *Cucumis sativus* (Navratilova y col. 2008) y *N. plumbaginifolia* (Abas y col. 2007). Algunos estudios sugieren que los efectos que sufren las células tratadas con rayos UV son similares a las alteraciones observadas en células animales durante el proceso de muerte celular programada (o apoptosis) (Danon & Gallois 1998). Durante este proceso las células sufren una condensación de la cromatina y posteriormente una fragmentación del núcleo y del ADN contenido en él, que conllevan la muerte de la célula. Durante la fase de condensación de la cromatina se producen fragmentos de ADN con peso molecular de 50 Kbp aproximadamente. En la segunda fase el ADN se degrada produciendo fragmentos del tamaño de un nucleosoma, unos 200 bp. Las células en apoptosis no mueren todas al mismo tiempo, sino que van muriendo a lo largo del tiempo.

En el proceso de apoptosis inducido mediante radiación con UV se ha demostrado que el número de células que presentan fragmentación del ADN es proporcional a la

dosis de radiación empleada y va aumentando en las horas siguientes al tratamiento (Danon & Gallois 1998). En muchos de los estudios realizados sobre el proceso de apoptosis es posible observar fragmentación del ADN nuclear mediante electroforesis en geles de agarosa, citometría de flujo y “tunnel” (Walker y col. 1993; Gong y col. 1994; Darzynkiewicz y col. 1997; Yamada y col. 2006).

Como paso previo a la posible puesta a punto de métodos de hibridación somática asimétrica, el objetivo de este trabajo es la evaluación de los efectos de la radiación UV sobre protoplastos de cítricos, tanto a nivel biológico como genético. El estudio del daño biológico está dirigido a evaluar todos los cambios que la radiación UV puede generar a nivel de viabilidad, multiplicación y regeneración de los protoplastos tratados. El estudio del daño genético está dirigido al análisis de lo que ocurre a nivel del ADN nuclear de los protoplastos tratados, fundamentalmente mediante el análisis cuantitativo y cualitativo de la fragmentación del ADN que es posible generar con la radiación UV, relacionándolo con la dosis de irradiación empleada y con el tiempo transcurrido tras ella. Este tipo de estudio se ha realizado empleando algunas de las técnicas utilizadas en la valoración del proceso de apoptosis en células animales, como por ejemplo la citometría de flujo y la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos tras la irradiación (Gong y col. 1994). Ambas técnicas permiten valorar los cambios que sufren las células cuando se ven implicadas en el proceso de apoptosis y por esto se usan para evaluar el estado de las células afectadas.

Tanto en el estudio realizado a nivel biológico como a nivel genético se ha intentado comparar los efectos de la radiación UV sobre protoplastos procedentes de callo nucelar embriogénico y procedentes de mesófilo de hojas. Este tipo de comparación podría ser clave para la optimización del proceso de hibridación somática asimétrica.

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **3.2.1 Material vegetal.**

Los protoplastos de callo se aislaron a partir de suspensiones celulares obtenidas a partir de callos nucelares de los genotipos “Chios” (*Citrus deliciosa*, Blanco, cultivo cedido por el CIRAD) y naranjo amargo “Sevillano” (*C. aurantium* (L.) Blanco, procedente de la colección crioconservada del Banco de Germoplasma de cítricos del IVIA). Los cultivos se mantuvieron en medio H&H (anejo) (Grosser & Gmitter, 1990) en agitación a 125 rpm, temperatura de 25°C, humedad relativa del 50% y fotoperiodo de 16 h. Las suspensiones fueron subcultivadas cada 15 días mediante el trasvase de 25 ml de células a matraces estériles con 25 ml de medio fresco H&H.

Los protoplastos de mesófilo se aislaron a partir de hojas de las variedades “Washington Navel” (*C. sinensis* (L.), Osb.) y “Pomeroy” (*P. trifoliata* (L.), Raf.), ambas procedentes del Banco de Germoplasma de Cítricos del IVIA. Las plantas se cultivaron en invernadero a una temperatura media de 27°C, humedad media del 70% y luminosidad reducida con malla. Se seleccionaron hojas totalmente expandidas de brotes de 3-5 semanas.

### **3.2.2 Aislamiento de protoplastos.**

El aislamiento de protoplastos a partir de callos embriogénicos y de mesófilo foliar se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Grosser y Gmitter (Grosser & Gmitter 1990b) y tal como se ha descrito en el apartado 1.2.2. Los protoplastos purificados fueron resuspendidos en una solución de manitol 0,8 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM y pH 5,7 a una concentración de  $8 \cdot 10^5$  pp/ml.

### **3.2.3 Tratamiento con luz Ultravioleta.**

Para la irradiación de los protoplastos se empleó una lámpara que emite radiación de tipo UV-C (aproximadamente 254 nm longitud de onda) con una intensidad de  $30 \text{ J} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  a una distancia alrededor de 30 cm desde la fuente luminosa (modelo xx-15s; UVP®, Inc. Upland, CA, USA).

Para el estudio se emplearon dosis entre 0 y 40 KJ·m<sup>-2</sup>, en función del experimento realizado; esto corresponde a una exposición máxima de 22 minutos, 5 KJ·m<sup>-2</sup> corresponden a 2 minutos y 45 segundos de exposición.

### 3.2.4 Cultivo de protoplastos tratados con UV.

Se utilizaron exclusivamente protoplastos de callo de las variedades de mandarina “Chios” y naranjo amargo “Sevillano”, ya que los protoplastos de mesófilo de hojas de cítricos no tienen capacidad de regeneración.

Los protoplastos purificados se trataron con las siguientes dosis de UV: 0-1,25-2,50 - 3,75 - 5 - 10 - 20 - 40 KJ·m<sup>-2</sup>. Después de la irradiación, se cultivaron 0,5 ml de la suspensión de protoplastos en placas Petri de 6 cm de diámetro suplementadas con 300 µl de medio BH<sub>3</sub> 0,6 M. En cada experimento se cultivaron cinco placas por cada dosis de radiación, y se realizaron tres réplicas del experimento.

Los cultivos se mantuvieron durante 21 días a 28°C, fotoperíodo de 16 h y humedad del 50%. Terminado este periodo se cuantificó el número de colonias celulares regeneradas mediante el conteo de 10 campos aleatorios de microscopio por placa, empleando un microscopio invertido TMS-F (Nikon®, Japan).

Los datos se analizaron estadísticamente mediante el programa Statgraphics Plus 5.1 (Microsoft®, USA) utilizando el modelo ANOVA.

### 3.2.5 Viabilidad de protoplastos tratados con UV.

Para este estudio se emplearon protoplastos de callo de la variedad naranjo amargo “Sevillano” y protoplastos de mesófilo de hoja de *Poncirus trifoliata*. Las dosis empleadas fueron: 0 - 5 - 10 - 20 y 40 KJ·m<sup>-2</sup>.

Se utilizaron dos marcadores de viabilidad para teñir los protoplastos irradiados. El Trypan Blue (Invitrogen®, Eugene, Oregon, USA) fue utilizado para los protoplastos de callo y el diacetato de fluoresceína (FDA) (Invitrogen®) para los protoplastos de hoja. Tras la irradiación los protoplastos de callo se tiñeron añadiendo 10 µl de una solución de colorante Trypan Blue 0,4% en un volumen de 100 µl de la suspensión de protoplastos irradiados (8·10<sup>5</sup> pp/ml). Se dejó actuar el colorante durante 10 minutos y a continuación se depositaron los protoplastos sobre un porta de cristal para la observación al microscopio.

Para la coloración de los protoplastos con FDA se añadieron 3  $\mu$ l de una solución de FDA al 10% y 3  $\mu$ l de Bromuro de yodo 1 M en 100  $\mu$ l de la suspensión de protoplastos irradiados ( $8 \cdot 10^5$  pp/ml). Los protoplastos se incubaron durante 2 minutos en oscuridad y a continuación se depositaron sobre un porta para la observación al microscopio.

El análisis de viabilidad de ambos tipos de protoplastos se realizó contando los protoplastos con un microscopio Eclipse E800 (Nikon®, Japan), usando luz fluorescente y filtros adecuados. Para cada muestra se realizaron 5 fotos en diferentes campos visibles seleccionados aleatoriamente y se calculó el porcentaje de células vivas sobre el total de células observadas. Utilizando el colorante blue trypan las células muertas se tiñen de azul, mientras que las membranas de las células vivas no permiten que el colorante penetre. En la coloración con FDA las células vivas emiten fluorescencia, mientras que las células muertas aparecen de color rojo por la presencia del bromuro.

Los análisis de viabilidad se repitieron tres veces para cada variedad. Los datos generados con este tipo de experimentos se definen como longitudinales porque son observaciones registradas en los mismos individuos a través del tiempo. Para el análisis estadístico de este tipo de datos se ha aplicado un modelo lineal mixto generalizado, que permite analizar de forma separada la variación que se produce a nivel de individuo (variación en el tiempo de cada dosis de UV) y a nivel de grupos (variación entre las dosis).

### **3.2.6 Análisis por citometría de flujo de los protoplastos tratados con UV.**

Para este estudio se emplearon protoplastos de las variedades “Sevillano” (callo) y “Pomeroy” (hoja) y se emplearon las siguientes dosis de radiación UV: 0, 5, 10, 20 y 40  $\text{Kj} \cdot \text{m}^{-2}$ . El análisis en el citómetro de los protoplastos irradiados se realizó a tres tiempos diferentes para cada variedad: 0, 8 y 24 horas después de la irradiación. Todos los experimentos se repitieron tres veces empleando tres aislamientos de protoplastos independientes.

Los protoplastos tratados se resuspendieron en 1 ml de solución buffer para la extracción de núcleos (CyStain UV Precise P, Nuclei extraccion Buffer; Partec®, Münster, Germany) y luego se tiñeron con 4 ml de solución de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (CyStain UV Precise P, Staining Buffer; Partec®).

Cada muestra fue analizada dos veces utilizando un citómetro Ploidy Analyser (Partec®). El primer análisis se realizó pasando cada muestra individualmente, mientras que en el segundo se introdujo en la muestra un control que consistía en un fragmento de hoja procedente de una planta de ploidía conocida (diploide, de la variedad “Clemenules”). Para todos los análisis se utilizó el nivel de ganancia 570.

Los datos se analizaron estadísticamente mediante el programa Statgraphics Plus 5.1 (Microsoft®, USA) utilizando el modelo ANOVA.

### **3.2.7 Análisis de la fragmentación del genoma por electroforesis en gel de agarosa.**

Para este ensayo se emplearon protoplastos de callo de la variedad “Sevillano” y de mesófilo de hoja de la variedad “Pomeroy”, tratados con las siguientes dosis de luz UV: 0, 5, 10, 20 y 40 KJ·m<sup>-2</sup>.

El ADN de cada muestra se extrajo mediante el protocolo de J. Gong y col. (1994) con pequeñas modificaciones. Se utilizó 1 ml de la solución de protoplastos tratados y se centrifugó a 1300 rpm. Los protoplastos se resuspendieron en 50 µl de tampón EB (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoetanol, 3% SDS) dejando las muestras a 37°C durante 30 minutos. A continuación se centrifugaron a 1300 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf nuevos. Se añadieron 3 µl de Triton x100 (25 µg/ml) y 3 µl de RNase (1 mg/ml) y las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos. A continuación se añadieron 3 µl de Proteinase K (1 mg/ml) y se mantuvieron en baño a 37°C durante 30 minutos.

A cada muestra se añadieron 6 µl de tampón de carga (0,25% bromophenol blue, 0,25% xylen cyanol, 30% glicerol) y 30 µl de las muestras se analizaron en un gel de agarosa LM-CGT 0,8% (Pronadisa-Conda®, Madrid, Spain) con un voltaje de 2 V/cm durante 16 h. Los geles se tiñeron con SYBR-green (Invitrogen®) durante 30 minutos y se tomaron imágenes utilizando el Las 3000 (Fujifilm Corporation®, Japan).

Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el programa Multi Gauge V 3.0 (Fujifilm Corporation®). El análisis se repitió tres veces con tres diferentes aislamientos de protoplastos para cada una de las variedades elegidas.

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1 Cultivo de protoplastos tratados con UV.

El estudio realizado ha proporcionado información sobre los efectos a largo plazo que la radiación UV tiene sobre las células.

La irradiación con luz UV tiene un efecto negativo sobre la multiplicación celular y sobre el número de colonias y minicallos desarrollados con todas las dosis y con los dos genotipos ensayados (figuras 3.1, 3.2, 3.3, 3.4).

La dosis más baja utilizada, 1,25 Kj, redujo en más de la mitad la capacidad de multiplicación de las células en cultivo, mientras que dosis superiores a 20 kj impidieron la proliferación celular completamente. Existe una relación entre la dosis empleada y la multiplicación celular (Figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4), ya que al aumentar la dosis disminuye el número de minicallos producidos.

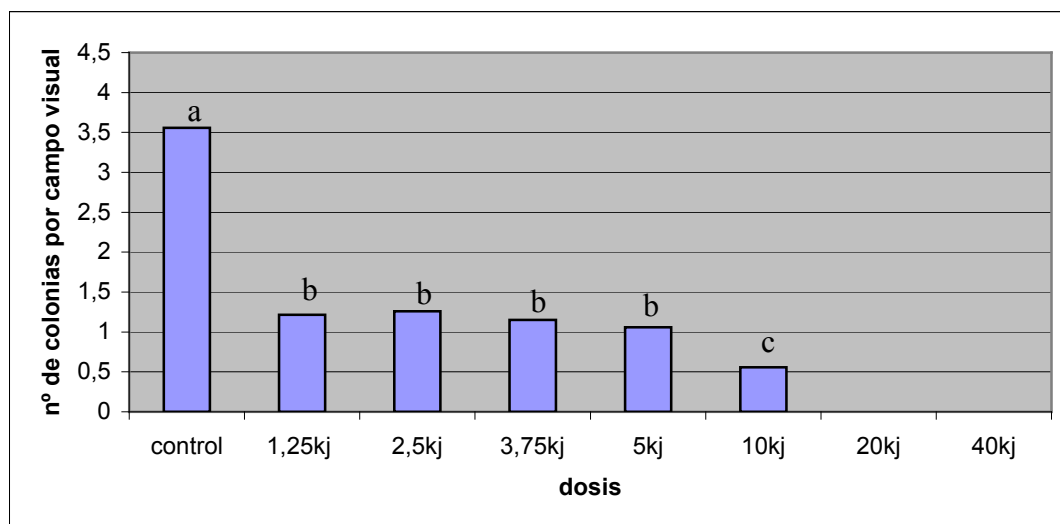
Se han encontrado diferencias significativas entre los controles y todas las dosis empleadas aunque las dos variedades han respondido de forma diferente al tratamiento con UV. La variedad “Chios” parece ser más sensible a la irradiación, ya que con dosis de 1,25 Kj el número de minicallos se reduce más que con la variedad “Sevillano”. En la variedad “Chios” no se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos con dosis bajas (entre 1,25 y 5 Kj), aunque habían diferencias con el resto de las dosis estudiadas (entre 10 y 40 Kj) (figura 3.1). En la variedad “Sevillano” se encontraron diferencias significativas entre las dosis 1.25 y las del intervalo 2,5 – 5 Kj (figura 3.2).

Los callos obtenidos a partir del cultivo de protoplastos tratados con UV no han conseguido regenerar embriones, al contrario que los controles (figura 3.5), por lo que podemos suponer que la irradiación limita de alguna forma la capacidad embriogénica de los mismos. En otras especies se ha demostrado que las células irradiadas suelen sobrevivir durante un periodo máximo de dos semanas antes de morir (Navratilova y col. 2008). Esto podría explicar el porqué en las primeras semanas de cultivo se observa la formación de algunas colonias y minicallo, pero luego las células no siguen su desarrollo normal y no se obtiene regeneración a partir de ellas.

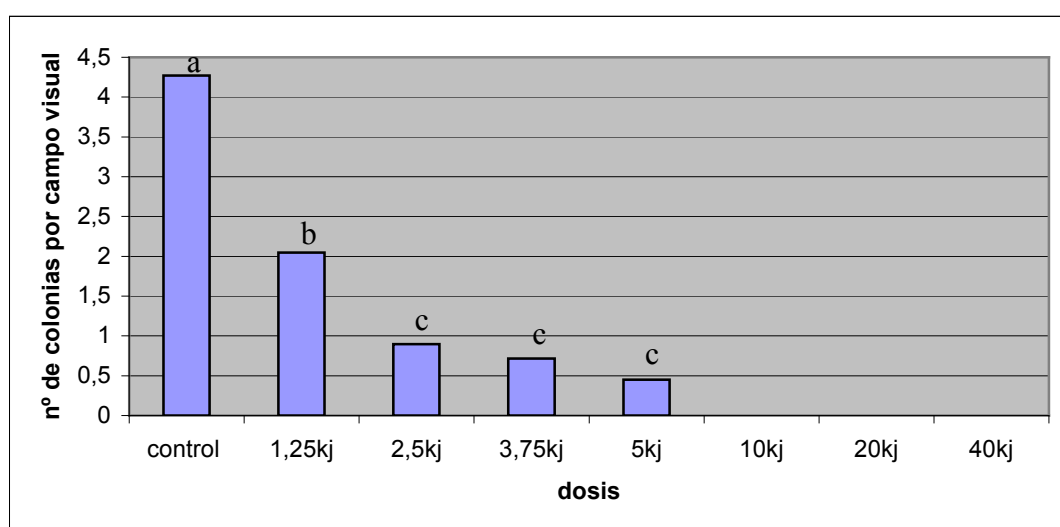
El hecho de que bajas dosis de radiación de UV puedan ser muy comprometedoras para el desarrollo del cultivo nos indica que no es conveniente utilizar protoplastos de callo como parental donante en una fusión callo-hoja, aunque sí se podrían utilizar en



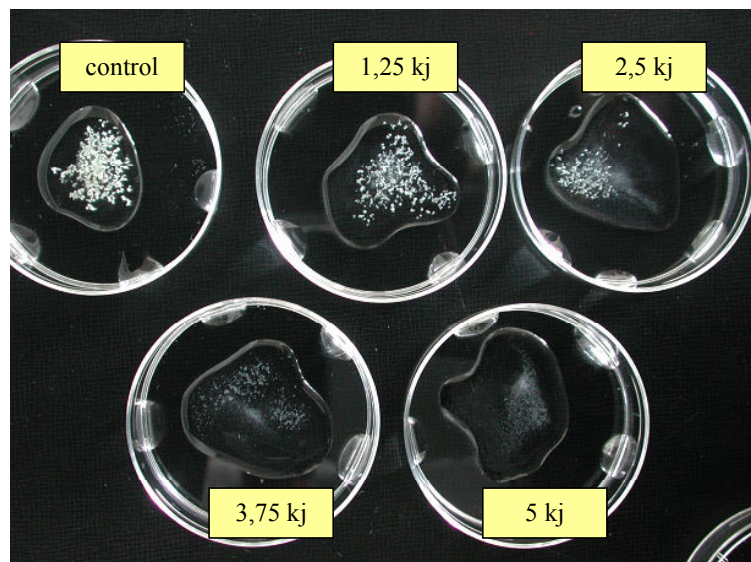
fusiones callo-callos (donde uno solo de los dos parentales es tratado con UV). El hecho de que pequeñas dosis de UV sean capaces de inactivar el núcleo de las células tratadas (bloqueando la multiplicación celular) podría ser útil para obtener híbridos con núcleo procedente de protoplastos de mesófilo y citoplasma procedente de células de callos irradiados, ya que las mitocondrias no deberían ser dañadas por la irradiación (Liu y col. 2005).



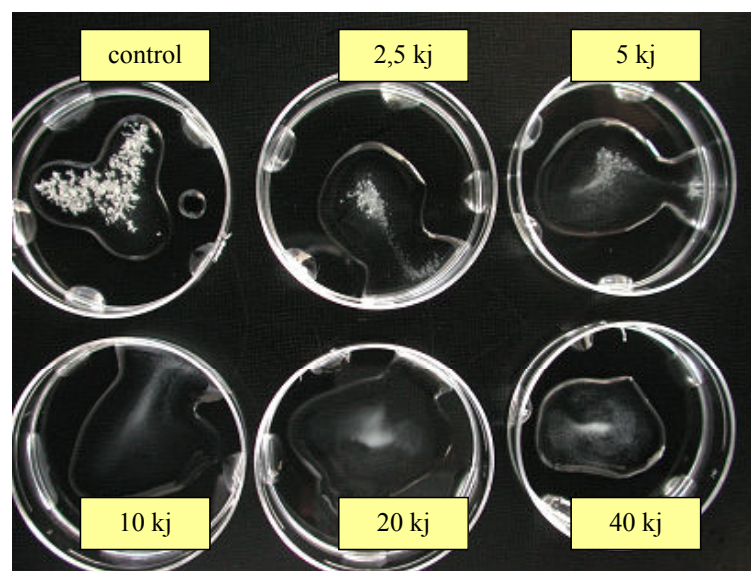
**Figura 3.1** Número medio de colonias por campo visual regenerado tras 21 días de cultivo de los protoplastos de mandarina común “Chios” irradiados con dosis diferentes de UV. Letras diferentes indican diferencias significativas con un margen de error del 5%.



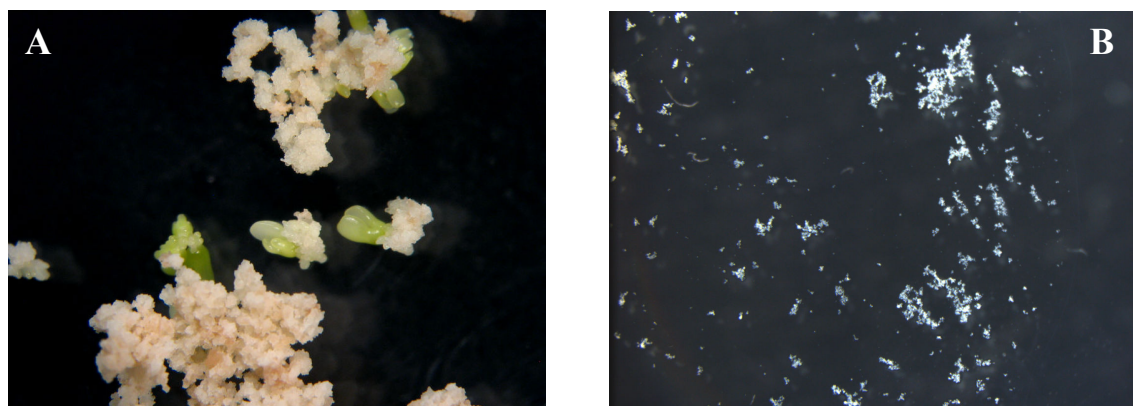
**Figura 3.2.** Número medio de colonias por campo visual regenerado tras 21 días de cultivo de los protoplastos de naranjo amargo “Sevillano” irradiados con dosis diferentes de UV. Letras diferentes indican diferencias significativas con un margen de error del 5%.



**Figura 3.3.** Colonias de naranjo amargo “Sevillano” regeneradas a partir de protoplastos de callo tratados con dosis diferentes de UV (0 - 1,25 - 2,5 - 3,75 - 5 Kj) tras 21 días de cultivo.



**Figura 3.4.** Colonias de naranjo amargo “Sevillano” regeneradas a partir de protoplastos de callo tratados con dosis diferentes de UV (0 - 2,5 - 5 - 10 - 20 - 40 Kj) tras 21 días de cultivo.



**Figura 3.5.** A) Regeneración de embriones a partir de los callos control de la variedad de naranjo amargo “Sevillano”, B) callos de “Sevillano” irradiados con dosis de 2,5 Kj que no han sido capaces de regenerar embriones.

### 3.3.2 Viabilidad de protoplastos tratados con UV.

Los resultados obtenidos en el estudio de viabilidad de los protoplastos de callo tratados con UV y teñidos con Blue Trypan, están representados en las Figuras 3.6 y 3.9. Los protoplastos muertos aparecen de color azul ya que su membrana no es capaz de evitar la penetración del colorante (al contrario que en las células vivas); esto provoca el colapso de las células y la rotura completa de la membrana (figura 3.9). La radiación UV provoca una disminución de la viabilidad en todas las dosis ensayadas. Como era de esperar, cuanto más alta es la dosis empleada, menor es el porcentaje de células vivas. Hay diferencias estadísticamente significativas entre todas las dosis empleadas excepto entre las dosis de 5 KJ/m<sup>2</sup> y 10 KJ/m<sup>2</sup>, entre las que no se aprecian diferencias. También se puede observar cómo, a lo largo del tiempo, con dosis bajas (control, 5 KJ/m<sup>2</sup> y 10 KJ/m<sup>2</sup>) la viabilidad no sufre cambios significativos mientras que con las dosis más altas (20 KJ/m<sup>2</sup> y 40 KJ/m<sup>2</sup>) decae de forma significativa. Existen diferencias en la forma como disminuye la viabilidad, ya que con la dosis más alta (40 KJ/m<sup>2</sup>) lo hace justo después de la irradiación, mientras que con dosis de 20 KJ/m<sup>2</sup> decae de forma gradual con el paso del tiempo.

Los resultados relativos a la viabilidad de protoplastos de mesófilo de hoja tratados con UV están resumidos en las Figuras 3.7 y 3.10; en este caso la tinción se realizó con FDA. Este tipo de colorante es más adecuado para el estudio de viabilidad con protoplastos de hojas porque facilita la distinción entre células vivas (de color verde fluorescente) y muertas (de color rojo debido a la presencia de bromuro de yodo en el núcleo), mientras que usando el Blue Trypan con luz visible resulta más difícil distinguir las células muertas teñidas de azul de las células vivas de color verde (conferido por los cloroplastos). También con protoplastos de hoja se puede observar que la radiación UV tiene una influencia negativa sobre la viabilidad y que entre las dosis ensayadas hay diferencias significativas. Además, se puede observar cómo la viabilidad decrece en función del tiempo. Empleando dosis altas (20 y 40 KJ/m<sup>2</sup>) la viabilidad decae muy rápidamente y con la dosis máxima (40 KJ/m<sup>2</sup>) es cercana a cero desde prácticamente el tiempo cero. Con dosis más bajas la viabilidad decae de forma significativa solamente a largo plazo (entre 8 y 24 horas).

Estos resultados están de acuerdo con los observados en otros trabajos realizados irradiando protoplastos de cítricos (Xu y col. 2007), *Arabidopsis* (Danon & Gallois 1998) y *Cucumis* (Navratilova y col. 2008), donde la viabilidad de las células tratadas

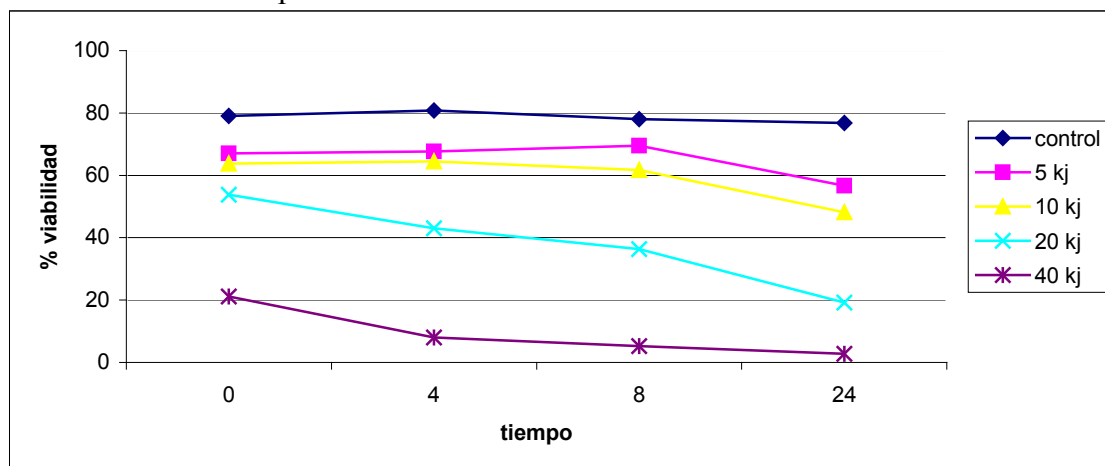
decae en función de la dosis empleada y del tiempo transcurrido tras la radiación. Comparando entre sí las Figuras 3.6 y 3.7 se pueden apreciar diferencias entre el comportamiento de los protoplastos de hoja y de callo tratados con UV, sobre todo en la forma en la que disminuye la tasa de viabilidad a lo largo del tiempo y en el número de protoplastos vivos después de 24 horas. Estas diferencias indican una mayor resistencia de los protoplastos de callo a la irradiación, sobre todo frente a las dosis más altas. Por contra, con los protoplastos de hoja hay un decaimiento de la viabilidad más rápido y que ocurre con todas las dosis empleadas, e incluso con los protoplastos no irradiados.

Se ha analizado la viabilidad de los protoplastos de callo con el colorante FDA (figura 3.8.), con el fin de corroborar que las diferencias encontradas entre la viabilidad de los dos tipos de protoplastos no dependen del tipo de tinción utilizado (FDA para hoja y Blue Trypon para callo). Los resultados obtenidos indican que los datos de viabilidad no están influenciados por el tipo de colorante utilizado, y que las diferencias encontradas son imputables a la diferente respuesta de los protoplastos de callo y de hoja tratados con rayos UV. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la capacidad de regeneración y multiplicación característica de los protoplastos de callo en nuestras condiciones de cultivo; la activación de procesos de reparación del ADN podrían conferir una mayor resistencia en el tiempo a este tipo de células (Abas y col. 2007). Por otro lado los protoplastos de hoja no son capaces de dividirse en nuestras condiciones de cultivo, con lo que podrían activarse procesos de apoptosis, que aceleran y facilitan la muerte celular.

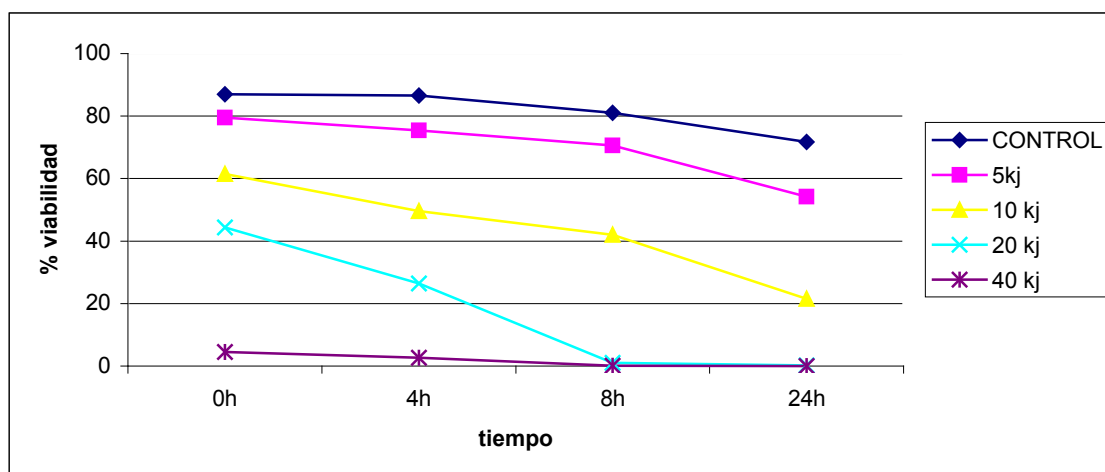
El estudio de viabilidad realizado no puede darnos ningún dato real sobre el nivel de fragmentación que afecta a los protoplastos; sin embargo nos da una idea del número de células afectadas por la radiación ultravioleta y de los límites entre los cuales debemos irradiar los protoplastos para la obtención de híbridos asimétricos, así como el tiempo de espera adecuado entre la irradiación y la fusión.

Los resultados obtenidos sugieren que sería conveniente utilizar dosis de UV diferentes según los protoplastos que se quisiera irradiar con el fin de obtener híbridos asimétricos. Los protoplastos de callo (fusiones callo + callo) han resultado menos sensibles a la radiación UV y por esto sería conveniente utilizar dosis de 10 y 20 Kj/m<sup>2</sup>, que resultan letales para casi el 50% de las células tratadas. Esto garantizaría tener protoplastos con ADN fragmentado sin que las células estén completamente destruidas. Para obtener híbridos asimétricos en fusiones hoja + callo, sería conveniente irradiar

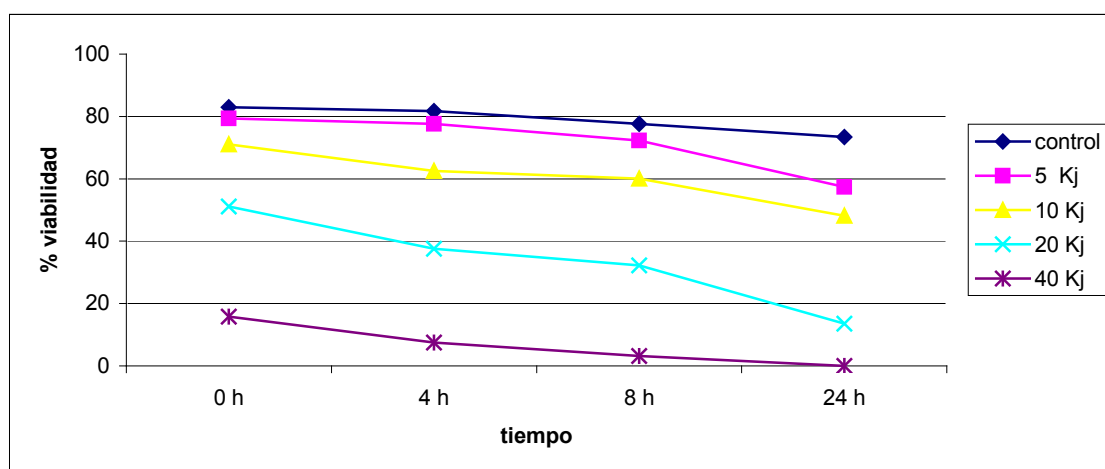
protoplastos de hoja con dosis entre 5 y 10 KJ/m<sup>2</sup> como máximo, vista la mayor sensibilidad de este tipo de células.



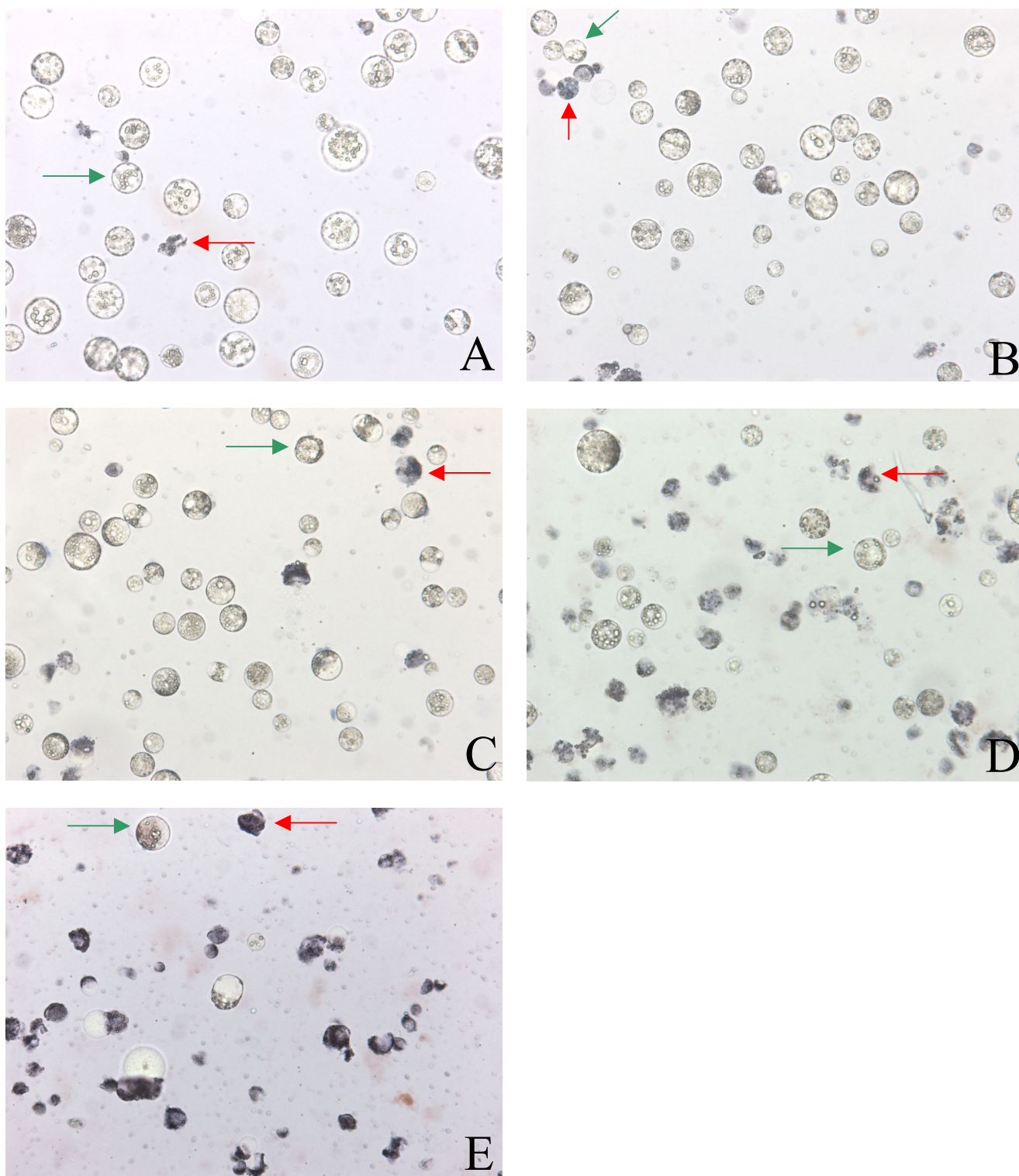
**Figura 3.6.** Viabilidad de protoplastos de callo de la variedad naranjo amargo “Sevillano” tratados con dosis diferentes de luz UV, la viabilidad se estimó mediante tinción con Blue trypon.



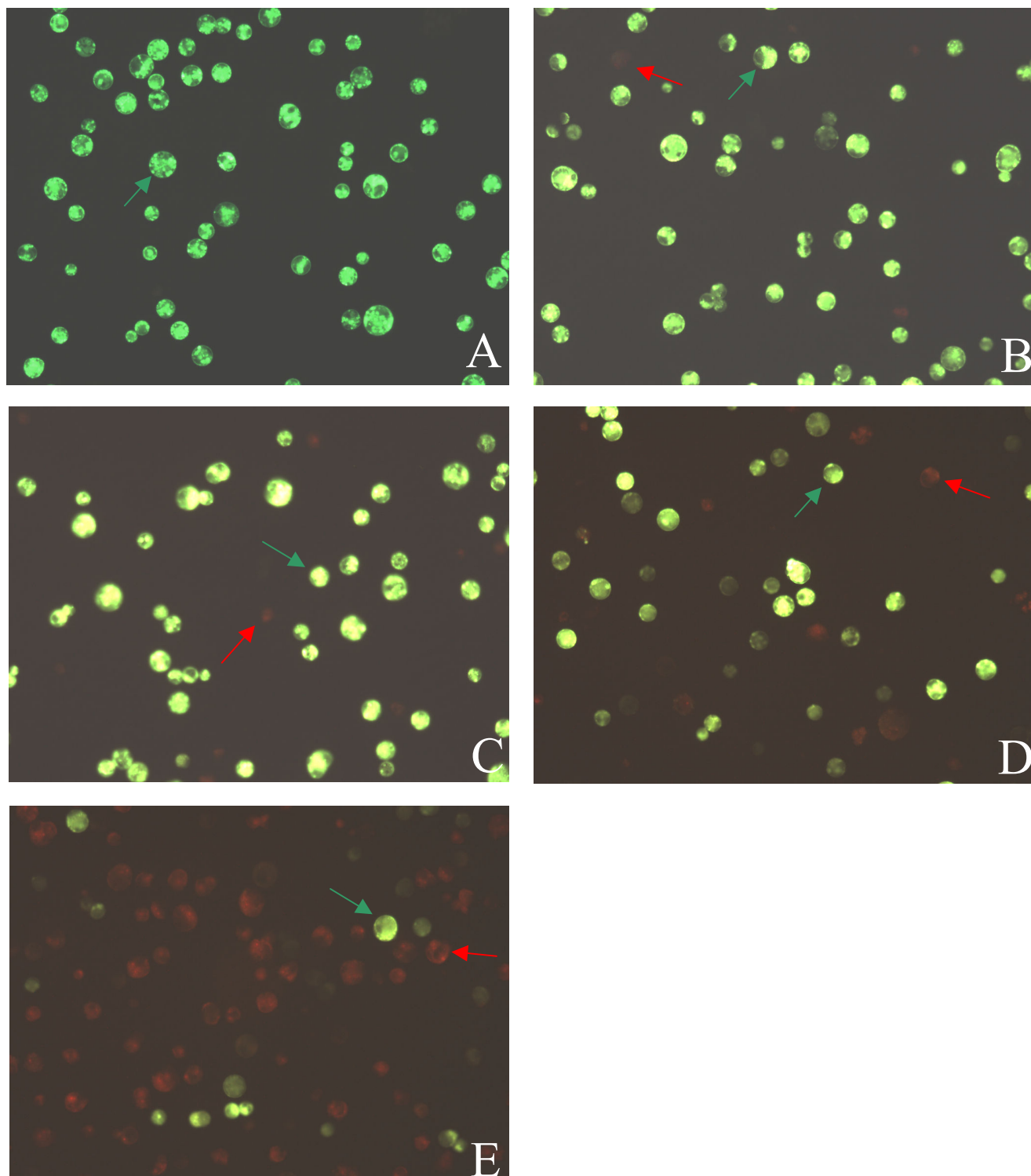
**Figura 3.7.** Viabilidad de protoplastos de mesófilo de hoja de *Poncirus trifoliata* tratados con dosis diferentes de luz UV, la viabilidad se estimó mediante tinción con FDA.



**Figura 3.8.** Viabilidad de protoplastos de callo de la variedad naranjo amargo “Sevillano” tratados con dosis diferentes de luz UV, la viabilidad se estimó mediante tinción con FDA.



**Figura 3.9.** Protoplastos de callo de naranjo amargo “Sevillano” irradiados con dosis diferentes de UV y teñidos con Blue Trypan. A) protoplastos control no irradiados. B) protoplastos irradiados con 5 KJ de UV. C) protoplastos irradiados con 10 KJ de UV. D) protoplastos irradiados con 20 KJ de UV. E) protoplastos irradiados con 40 KJ de UV. Con flechas verdes se indican las células vivas (sin colorante) y con la flechas rojas se indican las células muertas donde el colorante ha conseguido penetrar la pared celular.



**Figura 3.10.** Protoplastos de hoja de *Poncirus trifoliata* irradiados con dosis diferentes de UV y teñidos con FDA. A) protoplastos control no irradiados. B) protoplastos irradiados con 5 Kj de UV. C) protoplastos irradiados con 10 Kj de UV. D) protoplastos irradiados con 20 Kj de UV. E) protoplastos irradiados con 40 Kj de UV. Con flechas verdes se indican las células vivas (donde la fluoresceína puede actuar y conferir el color verde a las células) y con la flechas rojas se indican las células muertas donde el colorante (bromuro de yodo) ha conseguido penetrar la pared celular tiñendo de rojo las células.

### 3.3.3 Análisis por citometría de flujo de los protoplastos tratados con UV.

Las figuras 3.11 y 3.12 muestran un ejemplo de los múltiples histogramas obtenidos analizando con citometría de flujo los protoplastos irradiados. En las gráficas presentadas las abscisas definen el nivel de absorbancia de las partículas analizadas (en nuestro caso los núcleos de los protoplastos irradiados y teñidos con DAPI), que es proporcional al tamaño del genoma analizado. En ordenadas se indica el número de núcleos con el mismo nivel de absorbancia. El análisis realizado por el programa DPAC v2.0 de Partec® define los picos, o sea grupos de partículas con absorbancia parecida, y proporciona algunos parámetros representativos como por ejemplo la media de absorbancia del pico, la moda, etc. En las figuras 3.11 y 3.12 los picos vienen definidos automáticamente por el citómetro y evidenciados en blanco, mientras que el ruido de fondo o lo que no pertenece a ningún pico está coloreado en azul.

Como se puede observar en las figuras 3.11 y 3.12, el perfil detectado por el citómetro en protoplastos de callo y de hoja no tratados y analizados justo después de la irradiación es bastante estrecho. Esto indica que las células analizadas emiten la misma fluorescencia y por lo tanto tienen la misma cantidad de ADN condensado en sus núcleos. Aumentando la dosis de UV y el tiempo entre irradiación y observación, la base de los picos se va ensanchando (con protoplastos de hoja ya con 10 KJ/m<sup>2</sup> y 24 h, mientras que con protoplastos de callo se puede observar con 20 KJ/m<sup>2</sup> y 24 h), hasta llegar a un punto en que el aparato ya no detecta ningún pico (como en la condición de 40 KJ/m<sup>2</sup> y 24 h con protoplastos de callo y 20 KJ/m<sup>2</sup> y 24 h con protoplastos de hoja). Esto significa que el nivel de absorbancia de los núcleos analizados por el citómetro varía mucho después de tratar los protoplastos con radiaciones ultravioleta; a más radiación corresponde más variabilidad en la absorbancia. Este cambio en el perfil puede depender del estado de degradación y fragmentación en que se encuentra el ADN nuclear tras la irradiación (Yamada y col. 2006) y también del estado de condensación de la cromatina presente en el núcleo, que puede verse afectado por el tratamiento con luz UV (Danon & Gallois 1998).

Otro aspecto relevante es el aumento del ruido de fondo al aumentar la dosis y el tiempo tras la irradiación; este fenómeno también podría estar relacionado con el nivel de degradación del ADN contenido en los núcleos analizados (Yamada y col. 2006). El aumento del ruido de fondo no se aprecia de la misma forma en protoplastos de callo y



de hoja. Con los protoplastos de callo resulta más evidente sobre todo si se observa en la figura 3.11 el histograma de 20 Kj/m<sup>2</sup> y 24h ó 40 Kj/m<sup>2</sup> y 8 h.

El resultado más significativo de este estudio es que se ha observado un desplazamiento del perfil generado por el citómetro en función de la dosis de irradiación UV empleada. A dosis más altas el perfil se acerca más a cero (región sub-G1), indicando una disminución de la fluorescencia emitida por los núcleos.

Las figuras 3.13, 3.14, 3.15 y 3.16 son la representación gráfica de los valores de absorbancia media de cada pico. Los datos que aparecen son la media de tres experimentos diferentes realizados con cada una de las variedades elegidas.

Analizando estos datos resulta evidente que al aumentar la dosis de UV disminuye el nivel de absorbancia (figuras 3.14 y 3.16).

El límite mínimo de absorbancia que puede captar el citómetro es de 50 por lo cual cuando la absorbancia baja de este nivel es imposible identificar un pico; esto ocurre en protoplastos de callo con dosis de 40 Kj/m<sup>2</sup> tras 24 h (figura 3.11) y con protoplastos de hoja con 20 Kj/m<sup>2</sup> tras 24 h y con 40 Kj/m<sup>2</sup> a todas las horas (figura 3.12)

Con dosis muy altas además de ver un desplazamiento del pico en función de la radiación UV es posible también ver un desplazamiento en función del tiempo transcurrido tras el tratamiento (figuras 3.13-3.14 y 3.15-3.16). Con dosis más bajas no existe este desplazamiento en el tiempo y la absorbancia media se queda constante o aumenta.

Comparando las graficas 3.13 y 3.15 se pueden observar cómo con una dosis de 20 Kj/m<sup>2</sup> la absorbancia de los protoplastos de callo se desplaza menos que la de los de hoja. Tanto si el desplazamiento está relacionado con la degradación del ADN nuclear cómo por su condensación (paso previo al la muerte celular), se confirmarían los datos obtenidos con el estudio de viabilidad, según los cuales la luz ultravioleta afecta más a los protoplastos de hoja que a los de callo.

Es difícil poder dar una explicación clara a las observaciones realizadas, entre otras razones porque no existen estudios similares publicados en la literatura, por lo tanto solo podemos plantear algunas hipótesis.

La primera hipótesis es que la irradiación UV puede que promueva la formación de fragmentos de tamaño variable (mayoritariamente de gran tamaño) que emiten una fluorescencia similar a la correspondiente a la región sub-G1 del núcleo diploide y que por lo tanto no sea distinguible.

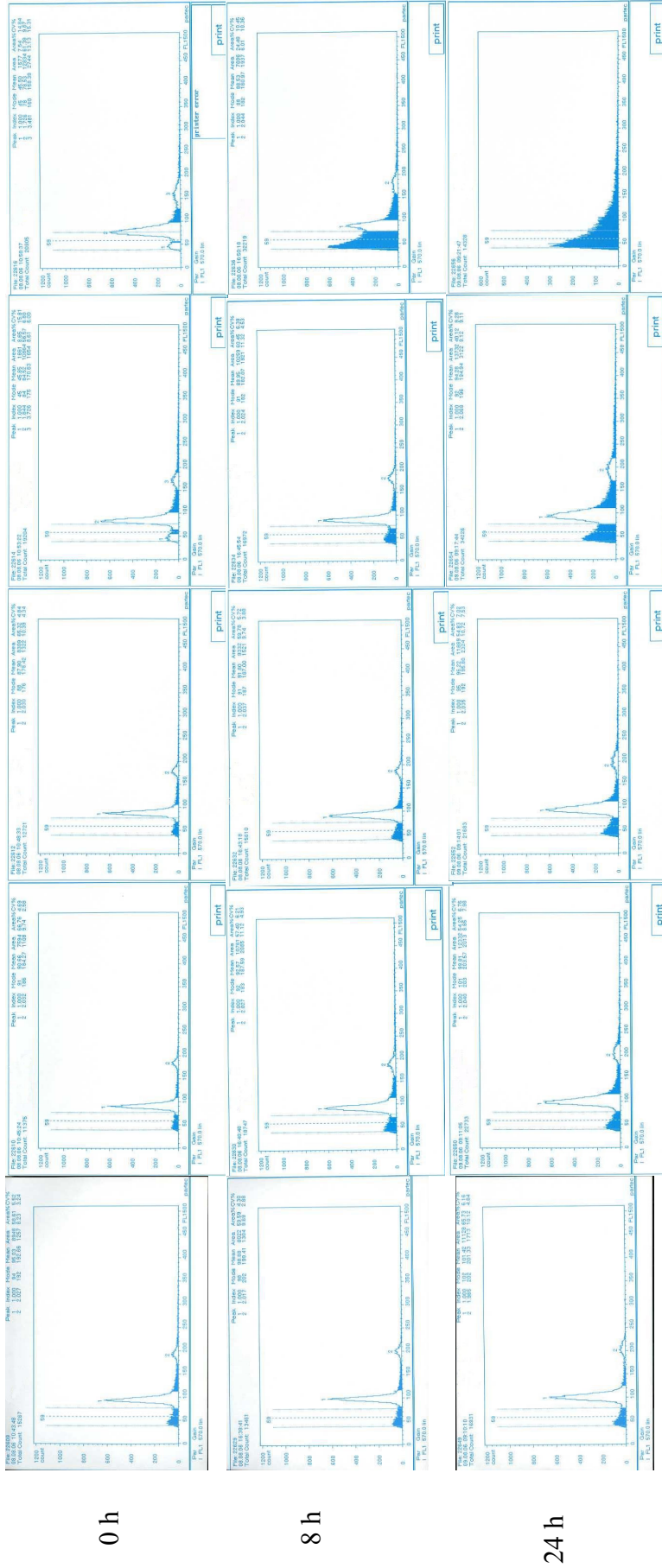
Aumentando la dosis los fragmentos generados se hacen más pequeños y esto nos lleva a obtener un perfil como el que se genera con una radiación de 40 KJ/m<sup>2</sup> (figuras 3.11 y 3.12). Si observamos la evolución en el tiempo del perfil generado con una dosis de 20 KJ/m<sup>2</sup> y 40 KJ/m<sup>2</sup> con protoplastos de callo, se puede ver cómo disminuye el área del pico, que suponemos que está relacionada con los protoplastos que se han visto afectados por la irradiación, mientras de la misma forma aumentan las partículas en la región sub-G1 (que suponemos que son los fragmentos sub-cromosómicos generados). Veinticuatro horas tras la irradiación, no es posible identificar ningún pico de absorbancia en los protoplastos de callo con 40 KJ/m<sup>2</sup>, seguramente por la gran cantidad de pequeños fragmentos generados y la reducción del pico.

Otra de las hipótesis que se puede plantear estaría relacionada con el proceso de apoptosis que afectaría a las células tras la irradiación con UV. Estudios sobre la apoptosis en células animales han demostrado que el aumento del nivel de fragmentación del ADN está directamente relacionada con la reducción de fluorescencia del ADN (Tounekti y col. 1995).

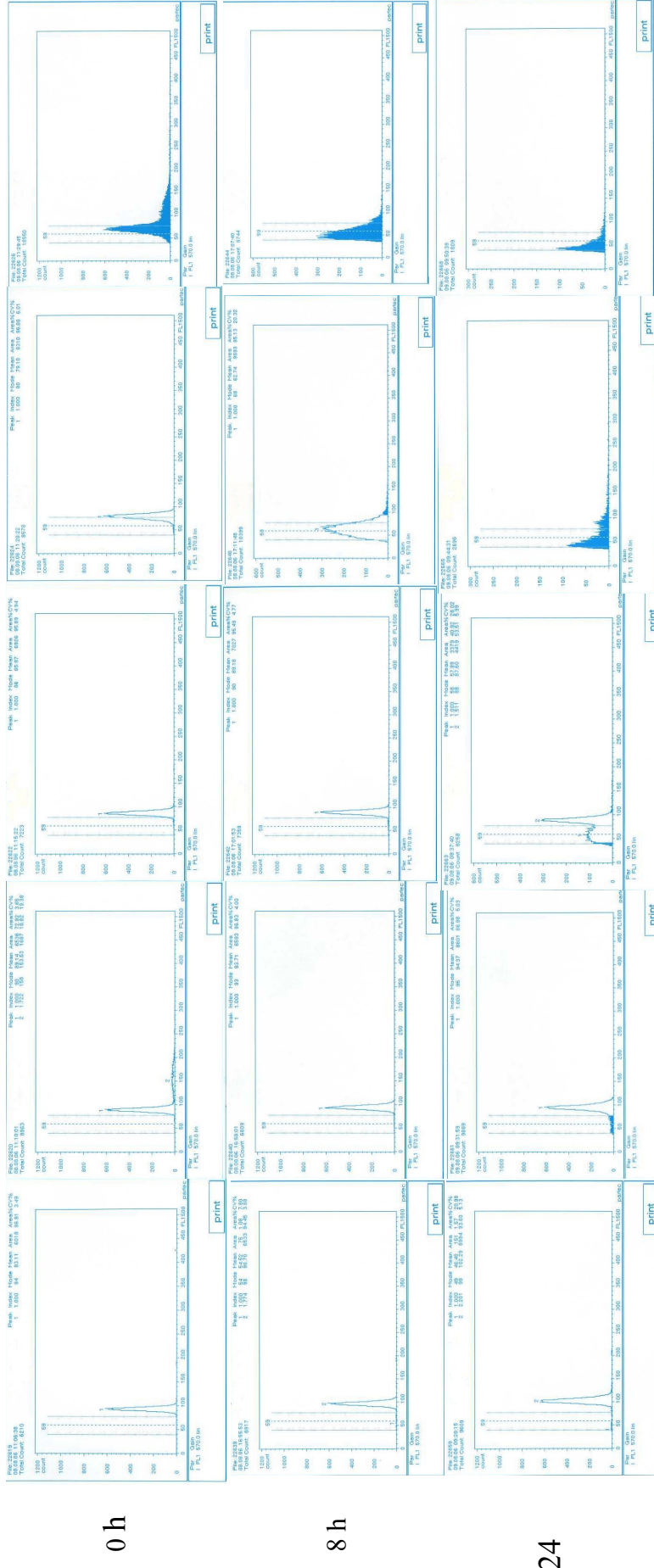
Uno de los eventos característicos del proceso de muerte celular programada es la división del ADN de las células en sub-unidades (llamadas cuerpos apoptóticos) justo después de la fase de condensación de la cromatina (Wyllie y col. 1984). La membrana citoplasmática permanece íntegra, pero el núcleo se divide y la cromatina puede quedar repartida en sub-unidades separadas (Darzynkiewicz y col. 1997). En este caso la emisión de fluorescencia en la región sub-G1 demostraría la división de la cromatina en cuerpos apoptóticos que emiten una fluorescencia inferior a la de núcleos intactos, y que es función de la dosis de irradiación UV y de la fase de la apoptosis en que se encuentran las células.

Sin embargo se pueden observar algunas diferencias entre los resultados obtenidos analizando con citometría de flujo los protoplastos tratados con UV y las células animales en apoptosis. En las células en apoptosis se suele generar un pico en la región sub-G1 mientras que el pico G1 mantiene el mismo nivel de absorbancia (Darzynkiewicz y col. 1997) y no se desplaza, como se ha observado en nuestro estudio. Por otro lado existen semejanzas con las observaciones realizadas con citometría de flujo en el proceso de apoptosis descrito por Yamada y col. (Yamada y col. 2006) en pétalos de *Antirrhium*, *Argyranthemum* y *Petunia*; en particular se observa un desplazamiento del pico y un aumento de señal en la región sub-G1 muy parecidos a los observados tratando los protoplastos de cítricos con radiación UV.

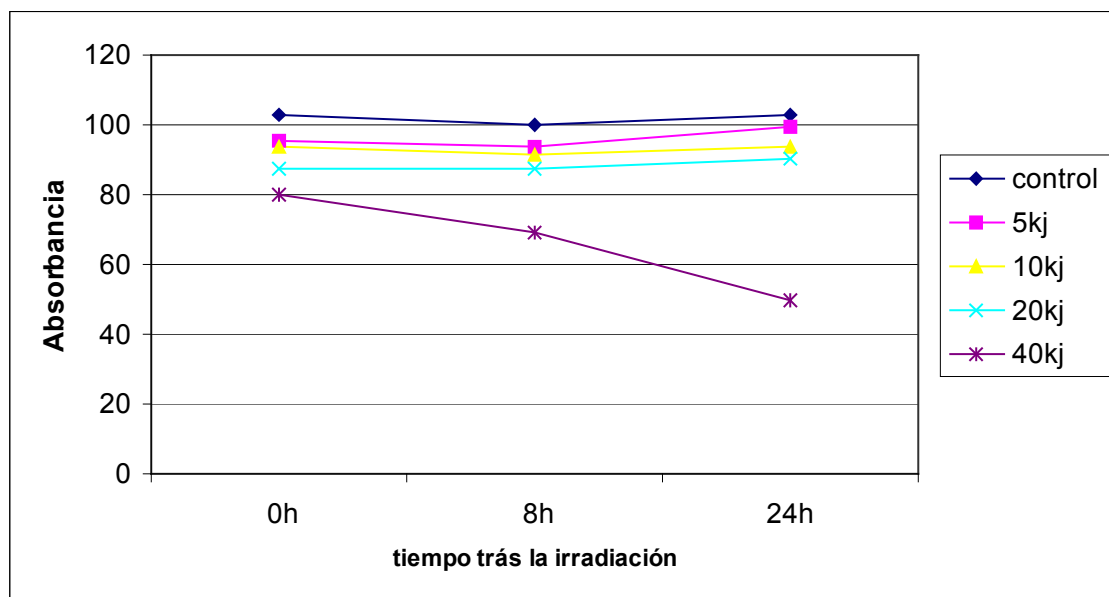
La última de las explicaciones posibles para el desplazamiento del perfil observado en el citómetro es que la radiación UV sea responsable de la oxidación de bases nitrogenadas (Kvam & Tyrrell 1997). Si esto fuera así se explicaría que disminuyeran los sitios de fijación del DAPI y los perfiles observados con el citómetro se desplazarían hacia la región sub-G1. La oxidación y sucesiva pérdida de bases nitrogenadas (y en consecuencia de nucleótidos) originaría rupturas de la doble cadena, por lo cual se originaría fragmentación del ADN que, finalmente, es lo que queremos conseguir con la irradiación. No hay que descartar la posibilidad de que más de una de las hipótesis planteadas sean reales y que ocurran al mismo tiempo según la dosis empleada y el tiempo transcurrido tras la irradiación.



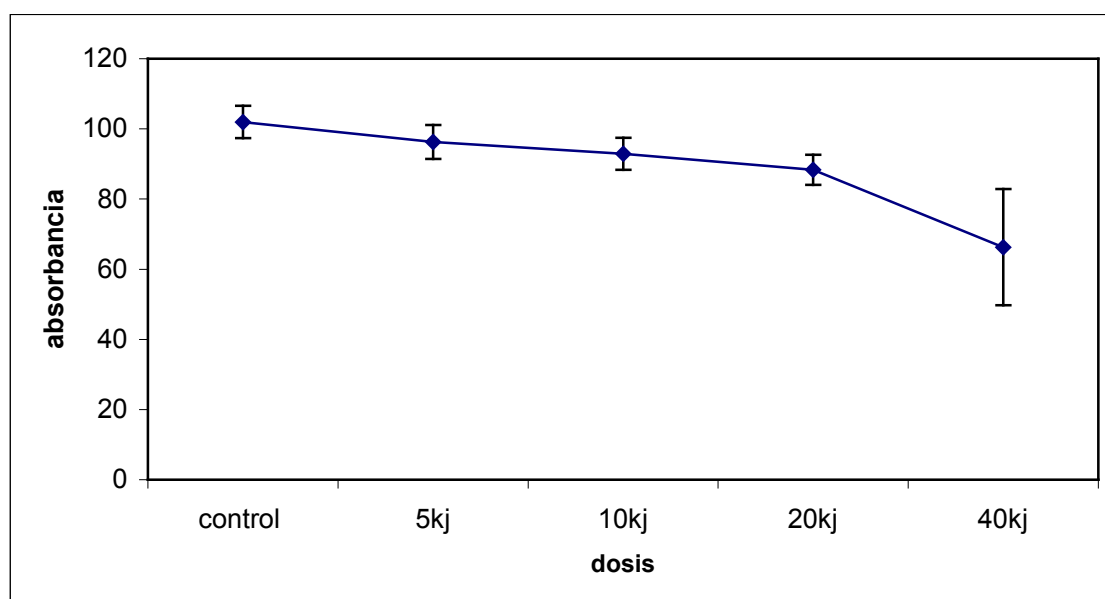
**Figura 3.11.** Histogramas generados tras el análisis con citometría de flujo de protoplastos de callo de la variedad naranja amargo “Sevillano” tratados con distintas dosis de UV y analizados a distintos tiempos tras la irradiación.



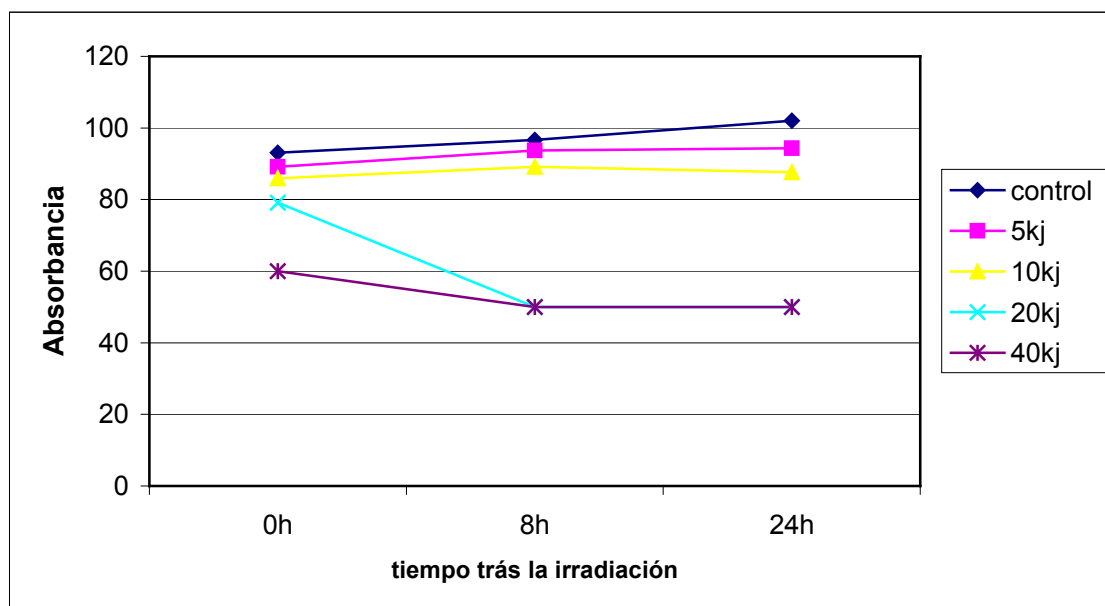
**Figura 3.12.** Histogramas generados tras el análisis con citometría de flujo de protoplastos de hoja de *Poncirus trifoliata* tratados con distintas dosis de UV y analizados a distintos tiempos tras la irradiación.



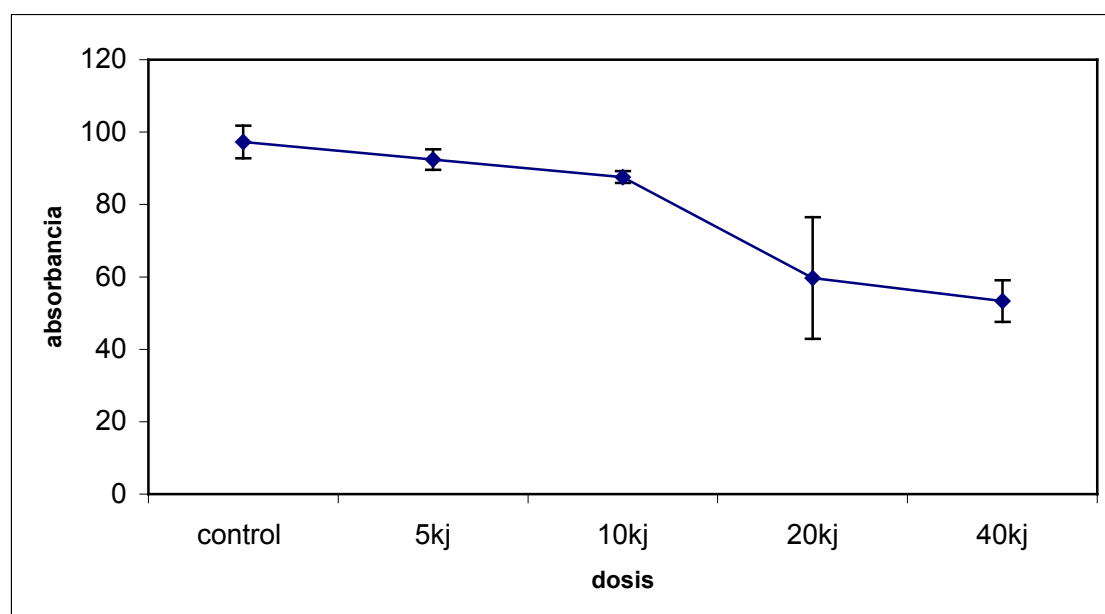
**Figura 3.13.** Absorbancia media de los picos generados con protoplastos de callo de naranjo amargo “Sevillano” irradiados con distintas dosis de UV y analizados mediante citometría de flujo en distintos momentos tras la irradiación (0 h, 8 h, 24 h).



**Figura 3.14.** Absorbancia media registrada en las tres observaciones (0 h, 8 h y 24 h) mediante citometría de flujo por cada dosis utilizada con protoplastos de callo de la variedad de naranjo amargo “Sevillano”.



**Figura 3.15.** Absorbancia media de los picos generados con protoplastos de mesófilo de mesófilo de hojas de *Poncirus trifoliata* irradiados con distintas dosis de UV y analizados mediante citometría de flujo en distintos momentos tras la irradiación (0 h, 8 h, 24 h).



**Figura 3.16.** Absorbancia media registrada en las tres observaciones (0 h, 8 h y 24 h) mediante citometría de flujo por cada dosis utilizada con protoplastos de mesófilo de hoja de la variedad *Poncirus trifoliata*.

### **3.3.4 Análisis de la fragmentación del genoma por electroforesis en gel de agarosa.**

Los análisis de fragmentación realizados con geles de agarosa muestran importantes diferencias entre los resultados obtenidos con los protoplastos de hoja y con los de callo (figura 3.17). La intensidad de la banda correspondiente al ADN genómico extraído a partir de protoplastos de callo va disminuyendo al aumentar la dosis de irradiación UV. Esto se observa de forma más marcada si han transcurrido 24h entre la irradiación y la extracción de ADN. Tras las 24h es posible observar también un mayor grado de fragmentación, sobre todo con las dosis más elevadas. Usando dosis bajas se observa la formación de fragmentos de gran tamaño (superior a 2000 bp); con dosis de 20 Kj/m los fragmentos tienen un tamaño muy variable mientras que con dosis de 40 Kj/m prevalecen los fragmentos de tamaño inferior a 1500 bp.

Si observamos la evolución del ADN de protoplastos de hoja, tras 24h podemos ver cómo se genera fragmentación en casi todas las muestras analizadas, incluso en el control negativo. Con dosis de 10 Kj/m desaparece notablemente la banda de ADN genómico que no ha sido afectado por la irradiación y lo único que se observa son fragmentos de un tamaño inferior a 2000 bp. Con dosis de 0, 5 y 10 Kj/m se genera una fragmentación del ADN donde prevalecen los fragmentos de tamaños determinados, múltiplos de 200 bp (correspondiente al tamaño de un nucleosoma) (Figura 3.17 y 3.18). Este tipo de fragmentación del ADN es característico de células en apoptosis (Walker y col. 1993; Cohen y col. 1994; Tounekti y col. 1995), lo cual parece indicar que los protoplastos de hoja (que no son capaces de multiplicarse en las condiciones de cultivo empleadas) podrían estar sometidos a este proceso independientemente de la irradiación UV, aunque es posible que la irradiación con UV acelere la entrada de las células de mesófilo en apoptosis.

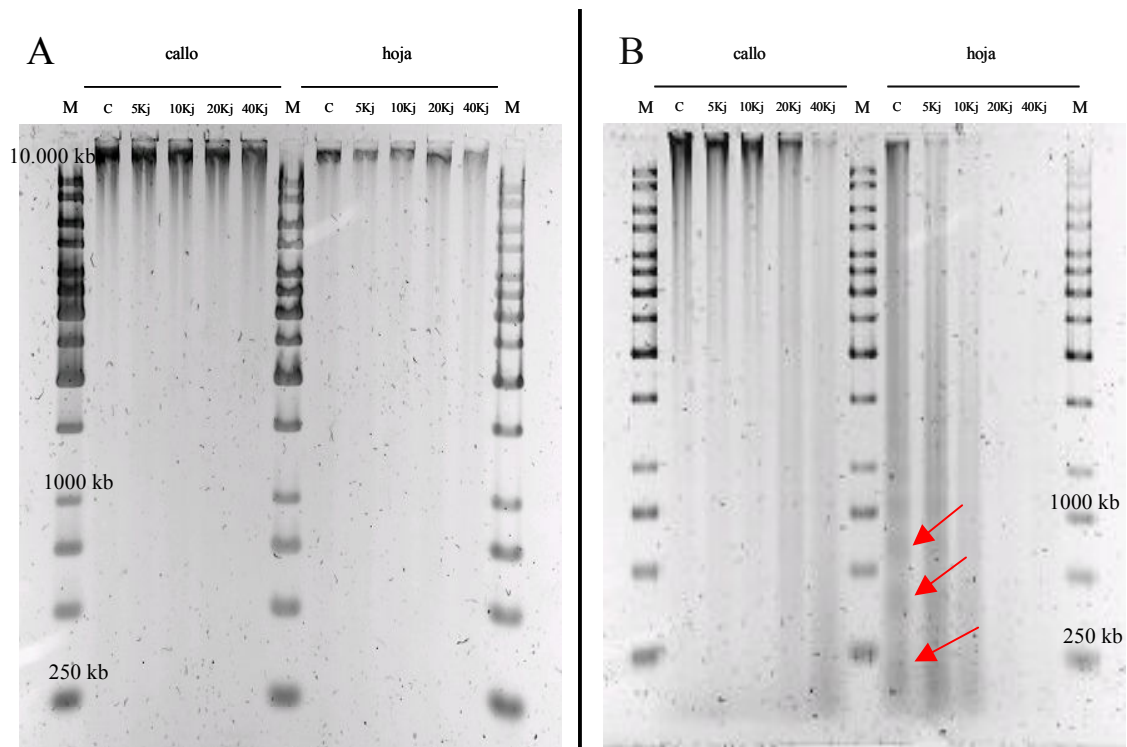
Cuantificando por medio del programa Multi Gauge las bandas representativas de la cantidad de ADN entero, se puede observar de una forma más exacta la disminución de éste en función de la irradiación. Si tomamos como referencia la banda correspondiente al ADN genómico no irradiado de la muestra control, y le damos un valor del 100, el análisis relativo de los otros perfiles da lugar a los resultados que se muestran en las Figuras 3.19 y 3.20.

Con protoplastos de callo la disminución del ADN genómico es más gradual respecto a la que se observa con protoplastos de hoja. Con una dosis de 5 Kj/m y justo

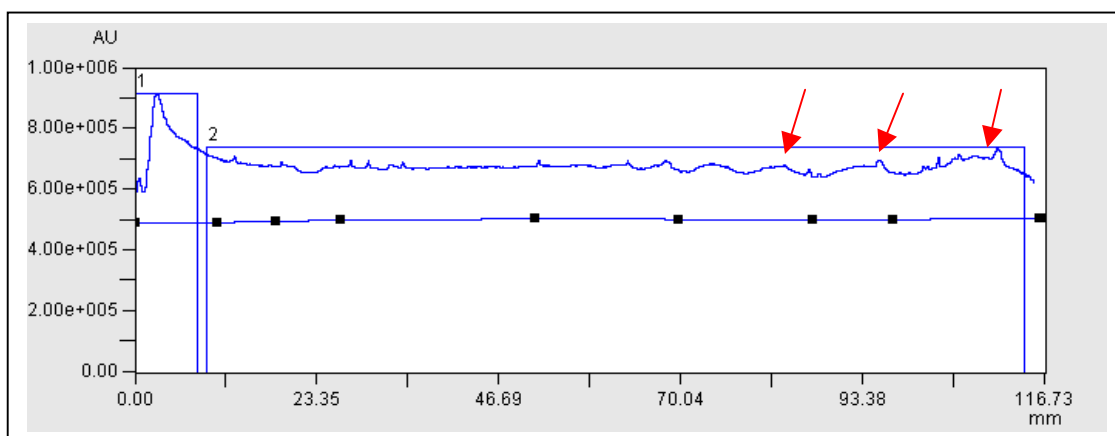


después de la irradiación, en los protoplastos de callo se fragmenta alrededor del 10% del ADN, mientras que en los protoplastos de hoja se fragmenta casi un 40%. Algo parecido sucede si utilizamos dosis de 10 Kj/m, mientras que con dosis más elevadas (20 y 40 Kj/m) las diferencias entre hoja y callo se reducen. También se reducen las diferencias si observamos los histogramas obtenidos 24 h después de la irradiación donde los porcentajes de ADN no entero (fragmentado) son muy parecidos. Esto nos sugiere que con dosis más bajas la radiación UV tiene un impacto más inmediato sobre la fragmentación del ADN en los protoplastos de hoja.

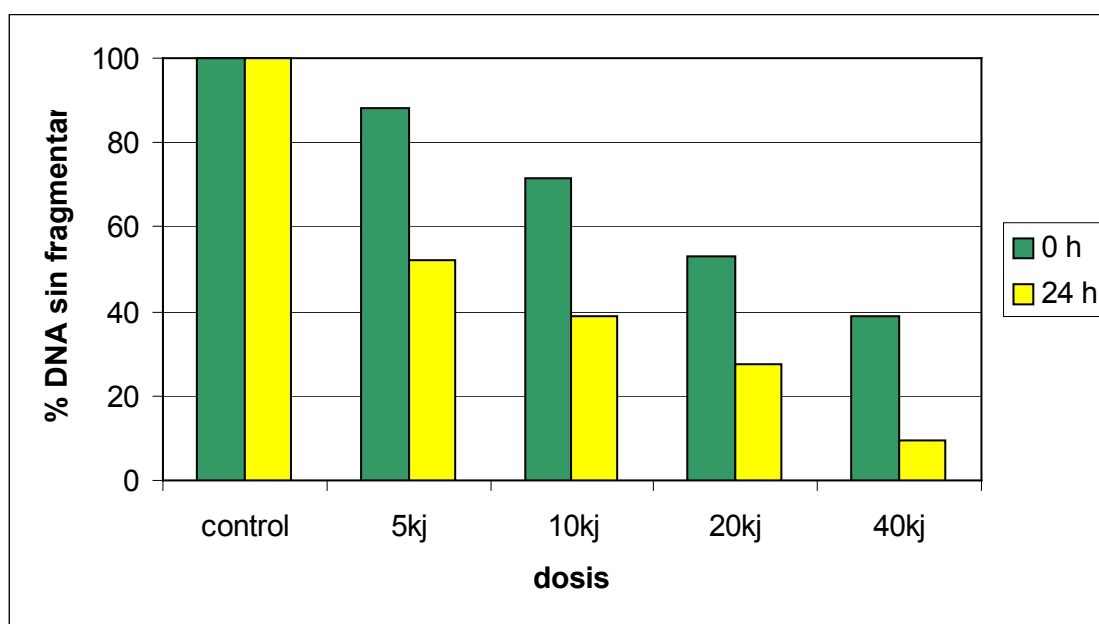
Observando los datos relativos a los protoplastos de hoja tras 24 h hay que tener en cuenta que los protoplastos de hoja no irradiados están sufriendo una fragmentación espontánea por lo cual si damos el valor 100 al control a las 24 h, los datos relacionados con este valor resultarán sobreestimados. Por esto las gráficas parecen indicar que el porcentaje de ADN entero tras 24 h en protoplastos de hoja sea superior a lo de callo, sin embargo no es así. Si observamos la figura 2.17 podemos ver que en realidad es muy baja la cantidad de ADN que se queda entero en los protoplastos de hoja que han sido irradiados con dosis superior a 5 Kj/m .



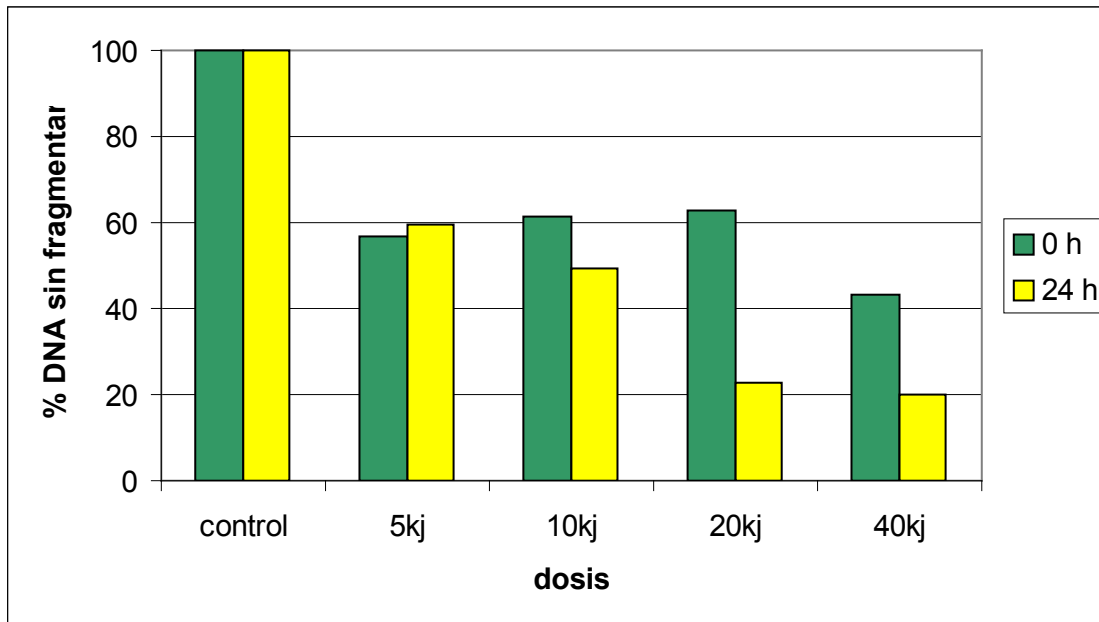
**Figura 3.17.** Comparación de la fragmentación observada en protoplastos de callo de naranjo amargo “Sevillano” y de mesófilo de hojas de *Poncirus trifoliata* irradiados con diferentes dosis de UV y analizados justo después de la irradiación (A) y tras 24 horas (B). Las flechas muestran los fragmentos múltiples de 200 bp (aproximadamente el tamaño de un nucleosoma) que se suelen formar durante la apoptosis de las células de hoja. M) marcador de peso molecular, C) células control sin irradiar.



**Figura 3.18.** Análisis de la electroforesis de protoplastos de hoja sin irradiar (carril C figura 3.17.B), realizado mediante el programa Multi Gauge.



**Figura 3.19.** Porcentaje relativo de ADN sin fragmentar en protoplastos de callo de la variedad de naranjo amargo “Sevillano” irradiados con diferentes dosis de UV. La cantidad de ADN se estimó mediante cuantificación con el programa Multi Gauge de las bandas que aparecen en los geles de agarosa. El valor 100 se da al ADN de protoplastos de callo sin irradiar (control).



**Figura 3.20.** Porcentaje relativo de ADN sin fragmentar en protoplastos de mesófilo de hoja de *Poncirus trifoliata* irradiados con diferentes dosis de UV. La cantidad de ADN se estimó mediante cuantificación con el programa Multi Gauge de las bandas que aparecen en los geles de agarosa. El valor 100 se da al ADN de protoplastos de callo sin irradiar (control).

### 3.4 CONCLUSIONES.

- En todos los experimentos realizados se ha observado una relación entre la dosis de UV empleada y los efectos producidos sobre los protoplastos.

- La radiación ultravioleta es capaz de producir fragmentación del ADN y esto podría favorecer la pérdida de parte de los cromosomas en las células tratadas.

- Los protoplastos de callo se ven menos afectados por la irradiación con luz UV que los protoplastos de hoja; esto sugiere la hipótesis de que los procesos de reparación del ADN podrían no actuar en protoplastos de hoja y hacerlo en los de callo, donde las mitocondrias están en mayor número y actúan de una forma más eficiente.

- En los protoplastos de hoja podrían activarse procesos de apoptosis de forma espontánea, como sugieren los resultados obtenidos en el estudio de la fragmentación con geles de agarosa, aunque la luz UV podría facilitar la activación de procesos similares en las células tratadas.

- Para la obtención de híbridos asimétricos, teniendo en cuenta la dificultad de regenerar embriones a partir de callos irradiados, es más conveniente tratar con luz UV los protoplastos de callo solamente en fusiones callo – callo utilizando dosis entre 10 y 20 kj. Si se quieren realizar fusiones callo - hoja será más conveniente irradiar los protoplastos de hoja con dosis más bajas, entre 5 y 10 kj. También existe la posibilidad de inactivar el núcleo de los protoplastos de callo con radiación UV y fusionarlos con protoplastos procedentes de hoja para obtención de cíbridos.

## **CAPÍTULO 4**

### **AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE MESÓFILO DE HOJAS DE CLEMENTINAS Y OTROS HÍBRIDOS DE MANDARINAS**

#### **4.1 INTRODUCCIÓN**

Los programas de mejora genética de mandarinos y clementinas que se están desarrollando tanto en España como en muchos de los otros países productores están centrados en conseguir variedades que no produzcan semillas y presenten maduración tardía. La obtención de variedades con estas características permitiría alargar el calendario de recolección ofreciendo un producto de calidad homogéneo durante un mayor periodo del año, evitando así la concentración de producción típica de las clementinas.

En la actualidad la mayoría de los programas de mejora para el grupo de mandarinas están basados en la obtención de híbridos triploides y en la obtención de mutantes inducidos en el laboratorio. La hibridación somática mediante fusión de protoplastos también puede contribuir de forma importante a la mejora de mandarinas, ya que permite alcanzar objetivos específicos de forma relativamente sencilla y directa. Aunque los híbridos alotetraploides pueden producir frutos sin semilla (Guo y col. 2004), son muy pocos los que presentan buenas características organolépticas y adecuados para la producción comercial. Sin embargo los híbridos alotetraploides están siendo utilizados en cruzamientos interploides para la obtención de nuevos híbridos triploides sin semillas (Grosser & Gmitter 2005).

La hibridación somática también se puede utilizar para transferir nuevos caracteres de interés agronómico controlados por el genoma citoplasmático a variedades élite mediante la obtención de cíbridos. Uno de los caracteres citoplasmáticos de mayor interés agronómico es la esterilidad masculina (CMS, “cytoplasmic male sterility”) que está controlada por el ADN mitocondrial (Yamamoto y col. 1997). La transferencia de dicho carácter mediante la obtención de cíbridos ha permitido obtener variedades parcialmente o completamente androestériles en otras especies, como por ejemplo tomate (Akagi y col. 1995), patata (Golmirzaie y col. 1991), arroz (QingZhong & Earle 1995) y tabaco (Zubko y col. 1996).

Hasta la fecha la fusión de protoplastos no ha sido empleada de forma sistemática para la mejora de clementinas. El motivo principal se encuentra en la dificultad de aislar

protoplastos de forma consistente y repetible de clementinas y de algunos híbridos de mandarinas a partir de mesófilo foliar de hojas. Por otro lado, las clementinas y muchas variedades de mandarinas son monoembriónicas, por lo que no es posible producir callo embriogénico a partir de ellas, con lo que la única fuente de protoplastos es el mesófilo foliar. Todo esto representa una limitación para la aplicación de la hibridación somática en la mejora de estos genotipos.

El protocolo de aislamiento de protoplastos a partir de mesófilo, propuesto por Grosser y Gmitter (Grosser & Gmitter 1990), permite obtener protoplastos a partir de hojas de casi todas las variedades que pertenecen al género *Citrus*, incluidas algunas de escaso interés agronómico. Se han aislado protoplastos de mesófilo y obtenidos híbridos somáticos a partir especies muy diferentes, entre ellas: *C. paradisi*, *C. sinensis*, *C. limon*, *C. aurantifolia*, *C. reticulata*, *C. unshiu*, *C. deliciosa*, *C. aurantium*, *C. reshni*, *C. ichangensis*, *C. jambhiri*, *C. amblycarpa*, *C. alemow*, *C. volkameriana* y también muchos híbridos interespecíficos (Grosser y col. 2000; Grosser & Gmitter 2005). También se han aislado protoplastos a partir de especies de la subtribu Citrinae que no pertenecen al género *Citrus*, como por ejemplo: *Microcitrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Severina*, *Citropsis*, *Atalantia* (Grosser y col. 1996; Guo & Deng 2001). Dentro de la sub-familia Aurantioideae se han aislados protoplastos utilizando hojas de plantas pertenecientes a la tribu Clauseneae (Fu y col. 2003) y la subtribu Balsamocitrinae, especies *Feronia* (Grosser y col. 1996), *Feroniella* y *Swinglea* (Takayanagi y col. 1992).

Un dato indicativo es que a pesar que se ha publicado la obtención de más de 250 híbridos somáticos de cítricos, ninguno de ellos procede de fusiones realizadas con protoplastos de hoja de clementinas (Grosser y col. 2000; Grosser & Gmitter 2005). En ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio se ha intentado aislar protoplastos de clementinas utilizando el protocolo propuesto por Grosser y col. (1990); los resultados han sido negativos con rendimientos en protoplastos muy bajos y poco repetibles. Además se observa un característico oscurecimiento de la solución enzimática durante la digestión de las hojas, hecho que no sucede cuando se emplean otras variedades y se obtienen cantidades normales de protoplastos (entre 6 y  $10 \times 10^6$  pp/gr de hoja).

El objetivo del trabajo que aquí se presenta es el de establecer un protocolo que permita obtener, de forma consistente y reproducible, protoplastos a partir de hojas de clementinas y de sus híbridos, para su utilización en la obtención de híbridos y/o híbridos somáticos. Para ello es necesario estudiar y optimizar los factores que influyen

de forma determinante en el rendimiento. Entre ellos destacan el material vegetal de partida, los enzimas empleados en la digestión o las condiciones de digestión de la hoja.

El protocolo propuesto por Grosser (Grosser & Gmitter 1990b) es totalmente empírico en cuanto a los parámetros que determinan la elección del tipo de hoja óptimo para realizar la digestión y el aislamiento de protoplastos. Por esto en este trabajo se ha intentado sistematizar y cuantificar los parámetros que definen el estado de desarrollo de las hojas, con el objetivo de hacer que los resultados sean repetibles y transferibles a otros laboratorios. Normalmente se escoge como material de partida las hojas completamente expandidas y de color verde brillante por lo que se deduce que el tamaño y el color de la hoja son parámetros indicativos.

El estado fisiológico del tejido foliar influye sustancialmente sobre el rendimiento en protoplastos y las condiciones físicas que determinan dicho estado, por lo tanto es necesario determinar también las condiciones de iluminación y temperatura óptimas para el desarrollo de las hojas que permitan obtener buenos rendimientos en protoplastos.

Vardi (1989) afirma que la composición óptima para la solución enzimática puede variar mucho de un genotipo a otro. Para la digestión del material vegetal se utilizan preparados comerciales que contienen diferentes clases de enzimas. Todos los preparados enzimáticos incluyen impurezas, como nucleasas y proteasas, que pueden tener un efecto negativo sobre la viabilidad celular. Las diferencias existentes en la composición de los preparados comerciales de distintas casas productoras pueden proporcionar resultados diferentes en la digestión del material vegetal y en la obtención de protoplastos (Grosser, Dambier comunicación personal). Todo esto implica que para poner a punto una solución enzimática no solamente hay que ajustar la concentración de los preparados sino que también hay que comparar los efectos de preparados procedentes de distintas casas productoras.

Por último se han querido estudiar algunos aspectos relacionados con las condiciones físicas del aislamiento, cómo son los soportes de digestión y la velocidad de agitación; estos parámetros pueden influir sobre la infiltración de la solución enzimática en los tejidos y en la posterior liberación de los protoplastos. Algunos autores han aplicado tratamientos con el fin de facilitar la digestión de las hojas, aplicando vacío en el matraz utilizado para la digestión (Grosser & Chandler 1987) o dejando las hojas sumergidas durante una hora (cortadas en bandas finas) en una solución de *n*-morfolinoetanosulfónico (MES). Además hay desacuerdo entre los

autores sobre la velocidad de agitación más adecuada, que varía entre 45-50 rpm (Grosser & Chandler 1987) y 25-30 rpm (Galiana 1995), por lo que se considera necesario estudiar su influencia sobre el rendimiento en protoplastos.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.2.1 Protocolo general.

#### 4.2.1.1 Material vegetal.

Se utilizaron plantas de la variedad “Clemenules” (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) procedente del Banco de Germoplasma de Cítricos del IVIA, injertada sobre *C. macrophylla* Wester y cultivadas en invernadero.

#### 4.2.1.2 Purificación de protoplastos.

Para la purificación de los protoplastos se utilizó el protocolo puesto a punto por Grosser y Gmitter (Grosser & Gmitter 1990). Tras la digestión del material vegetal durante 16-18 horas la solución de maceración se filtró con malla de 45 µm para eliminar los restos celulares no digeridos. La separación de los protoplastos se realizó en un gradiente de sacarosa-manitol, tal como queda descrito en el apartado 1.2.2.

#### 4.2.1.3 Determinación del rendimiento de protoplastos.

El rendimiento del proceso de aislamiento y purificación se definió como el número de protoplastos obtenidos tras la digestión de un gramo de tejido vegetal. Los protoplastos se contaron utilizando una cámara Fusch-Rosenthal. Esta cámara está constituida por dos subcámaras cuadradas, cada una de ellas dividida en 256 sectores cuadrados. Cada subcámara alberga un volumen de 0,1 ml. Para calcular la densidad de protoplastos en la solución problema (número de protoplastos/ml) se aplicó la siguiente fórmula matemática:

$$[(D_1 + D_2)/2 + (D_3 + D_4)/2]/4 * 10000$$

donde “D” es el número total de protoplastos contenidos en cada una de las diagonales de las subcámaras (cada diagonal corresponde a 16 sectores).



#### 4.2.1.4 Análisis estadístico de los resultados.

Todos los experimentos que se describen a continuación se repitieron tres veces, los datos obtenidos se analizaron estadísticamente para verificar la existencia de diferencias significativas entre las condiciones ensayadas.

En todos los análisis estadísticos, hemos asumido que entre los datos observados siempre hay dos o más variables que se relacionan de forma directamente proporcional, y que los datos de que disponemos se distribuyen de forma normal. Por esto el modelo que mejor se adapta a este tipo de datos es el modelo lineal mixto que permite estudiar datos que presentan una variabilidad correlacionada pero no constante.

Todos los modelos mixtos se caracterizan por la presencia de factores fijos que en nuestro caso son los datos de rendimiento y factores aleatorios que en este tipo de análisis son las repeticiones que se hicieron de cada experimento.

En la mayoría de los experimentos realizados se ha comparado cada valor obtenido con los dos más cercanos con el fin de poder detectar diferencias significativas entre las variables. Para ello se calculan los valores de varianza y se contrastan los p-valores (o nivel de significación empírico del contraste) obtenidos. Si el p-valor es inferior al nivel de significación establecido por el estadístico (normalmente 0,05) se puede rechazar la hipótesis nula o, en otras palabras, las diferencias encontradas son significativas. En algunos experimentos (apartados 4.2.3.1 y 4.2.3.2) se han comparado entre sí todas las condiciones observadas, pero como esto aumenta el margen de error ha sido necesario corregir los p-valores utilizando el método de ajuste de Bonferroni que nos garantiza una mayor fiabilidad en los resultados obtenidos, protegiéndonos de errores del tipo I (error que se comete cuando se rechaza la hipótesis nula, llegando a la conclusión de que existe una diferencia entre las hipótesis cuando en realidad no existe).

## 4.2.2 Influencia del material vegetal sobre el rendimiento en protoplastos.

### 4.2.2.1 Influencia del grado de desarrollo de las hojas sobre el rendimiento de protoplastos.

Se escogieron diferentes tipos de hojas a partir de brotes de plantas de la variedad “Clemenules” injertadas sobre *C. macrophylla* y mantenidas en invernadero a una temperatura aproximadamente de 23°C, humedad alrededor de 70% y luminosidad reducida con malla (aproximadamente  $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Suponiendo que las hojas más oscuras y más grandes corresponden a un estado de desarrollo más avanzado, se utilizaron los parámetros color y tamaño para diferenciar y clasificar las hojas recolectadas.

Para determinar el color de cada hoja se utilizó un colorímetro CR300 (Minolta, Japan). El colorímetro permite determinar con exactitud el color de cada hoja atribuyéndole un valor numérico en una escala de valores. La escala de color aplicada en nuestras mediciones ha sido la de CIELAB, siendo cada medida definida por tres variables “L”, “a” y “b” que finalmente definen el color con un valor único. El índice de color final asignado a cada hoja se obtuvo de la media de cinco mediciones realizadas en puntos diferentes del haz de cada hoja.

Para la medición del área foliar se utilizó el Li-3100 Area Meter (Licor, USA) que permite calcular la superficie de cada hoja expresándola en  $\text{cm}^2$ .

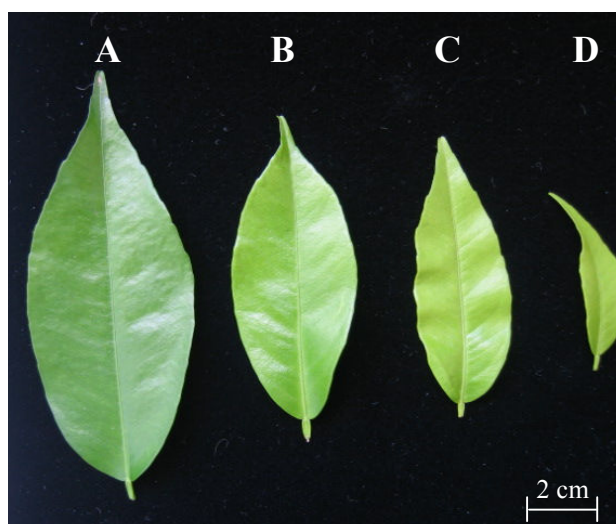
De acuerdo con estos dos parámetros las hojas se clasificaron en cuatro categorías (tabla 4.1, figura 4.1). También se comparó el rendimiento obtenido a partir de hojas que presentaban el mismo tamaño (entre 30 y 40  $\text{cm}^2$ ) pero índices de color diferentes (tabla 4.2, figura 4.2).

Las hojas de los cítricos presentan un color claro cuando empiezan su desarrollo, alcanzando el 80% de su tamaño final en los primeros 1-2 meses. Cuando alcanza el desarrollo máximo la lamina foliar empieza a oscurecerse por el desarrollo de los cloroplastos.

Se realizaron tres aislamientos de protoplastos independientes con cada tipo de hoja. Se evaluó el rendimiento obtenido en cada una de las tres repeticiones según la metodología descrita en el apartado 4.2.1.3.

**Tabla 4.1.** Clasificación de diferentes tipos de hojas de “Clemenules” en función de su color y tamaño.

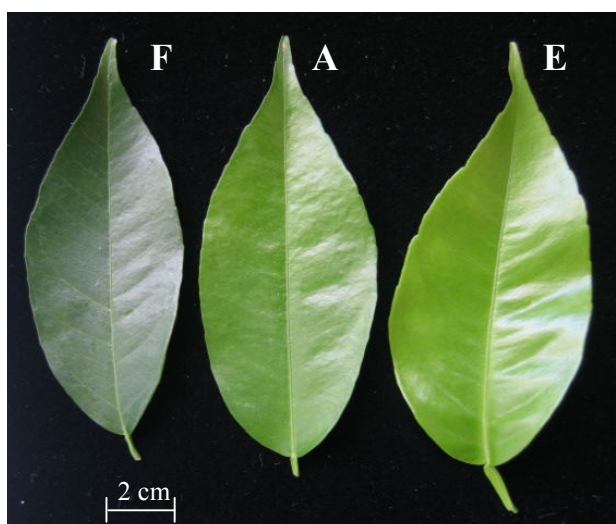
TIPO DE HOJA	A	B	C	D
ÍNDICE DE COLOR	-25/-30	-21/-24	-21/-24	-18/-21
ÁREA FOLIAR (cm <sup>2</sup> )	30/40	20/30	20/10	< 10



**Figura 4.1.** Hojas de “Clemenules” clasificadas según color y tamaño como se describe en la tabla 4.3.

**Tabla 4.2.** Clasificación de hojas de “Clemeunles” de tamaño entre 30 y 40 cm<sup>2</sup> en función del su color.

TIPO DE HOJA	A	E	F
ÍNDICE DE COLOR	-25/-30	< 25	> 30



**Figura 4.2.** Hojas de “Clemenules” de tamaño entre 30 y 40 cm<sup>2</sup> y clasificadas en base al índice de color indicado en la tabla 3.4.

#### 4.2.2.2 Influencia de las condiciones de cultivo de las plantas sobre el rendimiento en protoplastos de las hojas.

Se injertaron dieciséis plantas de la variedad “Clemenules” sobre *C. macrophylla* y se cultivaron en cuatro condiciones de cultivo distintas, cuatro plantas por invernadero. Se escogieron invernaderos con diferentes condiciones de luminosidad, temperatura y humedad (tabla 4.5).

Las plantas se podaron antes de cultivarlas en los respectivos invernaderos para sincronizar el crecimiento de los brotes y poder determinar el tiempo transcurrido hasta disponer de hojas óptimas para la digestión enzimática. Las plantas permanecieron en los invernaderos durante un periodo de aproximadamente tres meses, desde el mes de marzo hasta el mes de mayo. La temperatura y la humedad medias de los invernaderos se calcularon a partir de los datos obtenidos por medio de un sistema de control centralizado que realiza mediciones de los parámetros de interés a intervalos determinados (1 hora). El valor de luminosidad de los invernaderos se obtuvo de la media de tres mediciones realizadas utilizando un fotómetro Li-185 B (Licor Inc., USA). Las tres mediciones se realizaron en tres días diferentes en condición de pleno sol a las 12:00 horas. Se recolectaron hojas que, basándose en los resultados del apartado precedente (4.3.1.1), presentaban el estado de desarrollo más favorable para el aislamiento de protoplastos.

#### **4.2.3 Optimización de las condiciones de aislamiento de protoplastos a partir de hojas de clementinas.**

##### 4.2.3.1 Influencia de la composición de la solución enzimática sobre el rendimiento en protoplastos.

Se ensayaron soluciones enzimáticas con concentraciones diferentes de Cellulase (Duchefa® Biochemie, The Nederland), Macerozyme (Duchefa®) y Pectolyase (Duchefa® o Seishin® Corporation, Japan) (tabla 4.6). También se evaluaron compuestos enzimáticos procedentes de diferentes casas productoras con el fin de verificar posibles diferencias e identificar el compuesto más adaptado para digerir las hojas de clementinas. Se evaluó el rendimiento obtenido con las soluciones comparándolo con el de la solución enzimática puesta a punto por Grosser y Gmitter (Grosser & Gmitter 1990b).

Se utilizaron hojas de la variedad “Clemenules”, escogiendo aquellas que permitieron obtener el mejor rendimiento en protoplastos, según los resultados de los apartados anteriores (tamaño 30/40 cm<sup>2</sup> y índice de color -25/-30).

Se calculó el rendimiento de tres aislamientos independientes con cada una de las soluciones enzimáticas descritas.

#### 4.2.3.2 Influencia de la velocidad de agitación y del soporte sobre el rendimiento en protoplastos.

Se recolectaron hojas de la variedad “Clemenules” escogiendo las que en precedentes experimentos habían dado los mejores rendimientos en protoplastos. Las hojas se esterilizaron en hipoclorito sódico durante 10 minutos, la mitad de ellas se pusieron en digestión en matraces de vidrio con capacidad de 25 ml que contenían 5 ml de medio BH<sub>3</sub> 0,6 M y 3 ml de solución enzimática. La otra mitad se mantuvieron en 2 placas Petri de 6 cm de diámetro que contenían cada una de ellas 2,5 ml de medio BH<sub>3</sub> 0,6 M y 1,5 ml de solución enzimática. Así mismo, se estudió el efecto de la velocidad de agitación orbital durante el proceso de digestión enzimática sobre cada uno de los soportes usando las velocidades de agitación 35 y 45 rpm.

#### **4.2.4 Aplicación del protocolo de aislamiento de protoplastos de clementinas a híbridos de clementinas y otros mandarinos.**

Se estudió la aplicabilidad del protocolo puesto a punto para aislar protoplastos de clementina de la variedad “Clemenules” a otras variedades que presentan un bajo rendimiento en protoplastos. Para esta prueba se escogieron hojas de plantas de las variedades “Fortune” (*C. clementina* x *C. tangerina*), “Dancy” (*C. tangerina* Hort. ex Tan.), “Moncada” (*C. clementina* x (*C. unshiu* x *C. nobilis*)) y “Murcott” (*C. reticulata* x *C. sinensis*) cultivadas en las condiciones óptimas (apartado 4.3.1.2). Se escogieron las hojas que permitían obtener un alto rendimiento (apartado 4.3.1.1) y se pusieron en digestión con la solución enzimática más eficiente (apartado 4.3.2.1). También se utilizaron el tipo de soporte y la velocidad de agitación con las que se obtuvieron los mejores resultados en las pruebas anteriores (4.3.2.2).

Se realizaron tres aislamientos de protoplastos con cada una de las variedades elegidas y los datos obtenidos se compararon por medio de análisis estadístico.

### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 4.3.1 Influencia del material vegetal sobre el rendimiento en protoplastos.

##### 4.3.1.1 Influencia del estado de desarrollo de las hojas sobre el rendimiento en protoplastos.

El estado de desarrollo de las hojas influye de forma significativa en el rendimiento en protoplastos de mesófilo (tabla 4.3). Para casi todas las especies de cítricos es suficiente utilizar hojas a partir de brotes vigorosos, con lamina foliar completamente expandida y de color verde brillante para obtener buenos rendimientos en protoplastos (Grosser 1994). En experimentos previos se ha podido comprobar que la utilización de este tipo de hoja en clementinas no permite obtener un rendimiento en protoplastos aceptable. Por ello se han realizado experimentos con diferentes tipos de hojas con el fin de identificar con claridad las que mejor se prestan para la digestión y el aislamiento de protoplastos de clementinas.

**Tabla 4.3.** Influencia sobre el rendimiento en protoplastos del estado de desarrollo de las hojas de “Clemenules” utilizadas en la digestión.

TIPO DE HOJA	COLOR	ÁREA (cm <sup>2</sup> )	RENDIMIENTO MEDIO* (x10 <sup>6</sup> pp/gr)	
A	-25/-30	30/40	8,0	a
B	-21/-24	20/30	0,0	d
C	-21/-24	20/10	3,5	b
D	-18/-21	< 10	1,4	c

\* Letras diferentes indican diferencias significativas con margen de error del 5%.

Entre los cuatro tipos de hoja que se han estudiado solamente las que presentaban un índice de color de -25/-30 y área de 30/40 cm<sup>2</sup> (hoja tipo A) han permitido aislar un número elevado de protoplastos de forma repetible. Estas hojas suelen tener aproximadamente dos meses de edad, se recolectaron a partir de brotes vigorosos y presentan un tejido que ha empezado a endurecer. Las hojas de tipo B tienen un rendimiento muy bajo, próximo a cero, y presentan un tejido bastante tierno. Se trata de hojas que, aunque están en fase de expansión celular, normalmente proporcionan buenos rendimientos en protoplastos con otros genotipos. Las hojas de tipo C tienen un rendimiento intermedio (alrededor de 3 o 4 millones de pp/gr) aunque hay mucha variabilidad entre los resultados de las tres repeticiones realizadas. Las hojas de tipo D

dan un rendimiento bastante bajo. Además, los protoplastos aislados tienen un tamaño muy reducido y los orgánulos citoplasmáticos no están completamente desarrollados.

Los resultados obtenidos muestran la elevada influencia del estado de desarrollo de las hojas en la obtención de protoplastos. Estos demuestran que los parámetros utilizados para identificar objetivamente los estados de desarrollo de las hojas (color y tamaño) resultan efectivos y facilitan la elección del material vegetal más adecuado para el aislamiento de protoplastos.

Para comprender mejor cómo puede variar el rendimiento en protoplastos utilizando hojas en diferentes estadios de desarrollo se ha comparado el de las hojas con mejores rendimiento (tipo A, color -26/-29 y tamaño 30/40 cm<sup>2</sup>) con el de hojas de igual tamaño y de color diferente.

Los datos generados a partir de esta prueba se muestran en la tabla 4.4.

A partir de la simple observación de los datos resulta evidente que con el protocolo que hemos utilizado no es posible aislar protoplastos a partir de hojas que tengan un color cuyo índice no esté entre -25 y -30, aunque tengan el mismo tamaño. Es decir, pequeñas variaciones en el estado fisiológico de la hoja tienen una gran influencia sobre el rendimiento en protoplastos. Además se ha puesto en evidencia que el índice de color es el dato más útil y eficaz para identificar el estado de desarrollo más adecuado de las hojas para el aislamiento de protoplastos.

**Tabla 4.4.** Influencia de diferentes tipos de hoja de “Clemenules” (de igual tamaño y color diferente) sobre el rendimiento en protoplastos.

TIPO DE HOJA	COLOR	ÁREA (cm <sup>2</sup> )	RENDIMIENTO MEDIO* (x10 <sup>6</sup> pp/gr)	
A	-25/-30	30/40	8,0	a
E	> -25	30/40	0,0	b
F	< -30	30/40	0,2	b

\*Letras diferentes indican diferencias significativas con margen de error del 5%.

Podemos observar cómo las hojas de tipo E, que son las más parecidas a las que Grosser (1994) describe como más apropiadas para aislar protoplastos, tienen un pésimo rendimiento si se utilizan hojas de clementinas.

Se puede deducir que si las hojas son muy jóvenes, y por lo tanto tienen un índice de color superior a -26, la solución enzimática penetra muy fácilmente los tejidos vegetales acelerando así la digestión y reduciendo el número de protoplastos enteros.

Por otro lado, en tejidos vegetales que se encuentran en un estado de desarrollo más avanzado la solución enzimática resulta ser poco eficaz y se reduce el número de protoplastos que es posible aislar. Esto puede estar relacionado con la mayor cantidad de pectinas, celulosa y hemicelulosa que se acumulan en las paredes celulares de las hojas más viejas y que los enzimas no consiguen degradar del todo.

Ambos estudios han permitido por primera vez definir dos parámetros objetivos (como son color y tamaño) útiles para identificar las hojas con mejores rendimientos en protoplastos. Suponemos que estos datos objetivos pueden ser transferibles a otros laboratorios, facilitando así la identificación del material vegetal más indicado. Esto permitirá obtener suficientes cantidades de protoplastos de una forma repetible para su aplicación en programas de mejora.

4.3.1.2 Influencia de las condiciones de cultivo de las plantas sobre el rendimiento en protoplastos de las hojas.

Una vez determinado el material vegetal óptimo para aislar protoplastos a partir de mesófilo de clementinas se ha comparado el rendimiento obtenido con hojas del mismo tipo procedentes de plantas cultivadas en diferentes condiciones. Se ha querido estudiar si los factores ambientales a los que se someten las plantas pueden influir sobre el rendimiento de protoplastos, ya que modifican algunos aspectos morfológicos y fisiológicos de las hojas.

Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4.5. En el análisis estadístico de los datos obtenidos se han comparado entre sí todas las condiciones estudiadas, por lo cual ha sido necesario usar el valor de ajuste de Bonferroni para reducir el margen de error.

**Tabla 4.5.** Influencia de las condiciones de cultivo de las plantas sobre el rendimiento en protoplastos a partir de mesófilo de hojas de “Clemenules”.

CONDICIÓN DE CULTIVO			RENDIMIENTO MEDIO* (x10 <sup>6</sup> pp/gr)
TEMPERATURA MEDIA (C°)	HUMEDAD MEDIA (%)	LUMINOSIDAD (μE·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	
23	70	300 - 800	2,4 b
23	70	30 (reducida con malla)	10,7 a
30	50	500 - 600	1,1 b
21	70	150	7,8 a

\* Letras diferentes indican diferencias significativas con margen de error del 5%.



Los mejores rendimientos se han obtenido cultivando las plantas en condiciones de baja luminosidad  $30 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con temperatura media de  $23^{\circ}\text{C}$  e y humedad media relativa del 70%.

No se han revelado diferencias significativas entre las condiciones de  $30^{\circ}\text{C}$ , 50% humedad y  $500\text{-}600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luminosidad comparada con la condición de  $23^{\circ}\text{C}$ , 70% humedad y  $300\text{-}800 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Tampoco se han encontrado diferencias significativas entre las condiciones de  $23^{\circ}\text{C}$ , 70% humedad y 30 luminosidad comparada con la condición de  $21^{\circ}\text{C}$ , 70% humedad y 150 de luminosidad. Las diferencias significativas se han dado al comparar estos dos grupos entre sí.

Como podemos ver en la tabla 4.5 las condiciones de cultivo con la que se han obtenido los rendimientos en protoplastos más bajos corresponden a los invernaderos con mayor luminosidad y con mayor temperatura. Aunque las hojas presentan el mismo índice de color y el mismo tamaño (color 26-29 y área  $> 30 \text{ cm}^2$ ), que consideramos óptimo basándonos en los experimentos anteriores, pueden existir diferencias determinadas por las condiciones ambientales, como por ejemplo la tasa de lignificación o el estado fisiológico de las hojas. Dependiendo de las condiciones ambientales los estomas pueden abrirse y cerrarse regulando así el nivel de turgencia de las células del mesófilo, en particular la humedad y la luminosidad son los factores que más influyen sobre la apertura y el cierre de los estomas. Los estomas se abren cuando la intensidad de la luz y la humedad aumentan mientras que se cierran cuando disminuyen. La luz estimula la absorción de iones y la acumulación de solutos orgánicos, lo que disminuye el potencial osmótico (aumenta la presión osmótica), produce un aumento de la presión de turgencia y determina la apertura de los estomas (Guardiola 1990). Estos cambios de presión osmótica pueden generar descompensación entre la presión interna y externa de las células vegetales y esto podría afectar a la integridad de la membrana celular en el momento de la digestión.

Otra de las hipótesis para justificar las diferencias de rendimiento en protoplastos encontradas podría ser que las plantas cultivadas en condiciones de luminosidad elevada presentan un número inferior de cloroplastos, además está demostrado que excesos de luminosidad facilitan la fotooxidación de los pigmentos del cloroplasto (Marschner & Cakmak 1989; Barber & Andersson 1992). Esto podría determinar que las hojas cultivadas en condiciones de elevada luminosidad suelen presentar un color más claro respecto a las hojas de una planta cultivada en condiciones de luminosidad reducida.

Las hojas obtenidas en condiciones de elevada luminosidad tardarían más en alcanzar el nivel de desarrollo (definido por el color) óptimo para el aislamiento de protoplastos, y por lo tanto estarían más maduras en el momento de recolectarlas. Estos cambios morfológicos afectarían a la digestión de las hojas y como consecuencia el rendimiento en protoplastos.

Los resultados obtenidos demuestran que las hojas que consideramos óptimas para aislar protoplastos a partir de mesófilo de clementinas lo son solamente si provienen de plantas cultivadas en las condiciones ambientales adecuadas y estandarizadas; es decir, hay diferencias de rendimiento entre hojas aparentemente similares en su estado de desarrollo (con igual tamaño y color) cultivadas en diferentes condiciones.

#### 4.3.2 Optimización de las condiciones de aislamiento de protoplastos a partir de hojas de clementinas.

Para optimizar las condiciones de aislamiento se han estudiado los aspectos del proceso de digestión que consideramos puedan tener una mayor influencia sobre el rendimiento en el aislamiento de protoplastos. Es por esto que se han realizado algunos experimentos relacionado con la solución enzimática, la velocidad de agitación y también el tipo de soporte utilizado.

##### 4.3.2.1 Influencia de soluciones enzimáticas diferentes sobre el rendimiento en protoplastos.

La composición de la solución enzimática tiene una influencia significativa en el rendimiento en protoplastos (tabla 4.6).

**Tabla 4.6.** Influencia de la solución enzimática en el rendimiento en protoplastos a partir de mesófilo de plantas de “Clemenules”

SOLUCIÓN ENZIMÁTICA	COMPOSICIÓN SOLUCIÓN ENZIMÁTICA			RENDIMIENTO MEDIO* (x10 <sup>6</sup> pp/gr)
	Cellulase R-10 (Duchefa)	Macerozyme R-10 (Duchefa)	Pectolyase Y-23	
A	1%	1%	-----	6,1 b
B	1%	1%	0,2% (Duchefa)	0,0 d
C	1%	1%	0,2% (Seishin)	2,5 c
D	2%	2%	-----	9,4 a
E	2%	2%	0,2% (Duchefa)	0,0 d
F	2%	2%	0,2% (Seishin)	0,1 d

\*Letras diferentes indican diferencias significativas con margen de error del 5%.

En el análisis estadístico de los datos se ha aplicado el valor de ajuste de Bonferroni para reducir el margen de error, que aumenta al comparar entre sí todas las variables (en nuestro caso las soluciones).

Los mejores resultados se han obtenido con la solución D, con la que se han conseguido más de 9 millones de protoplastos por gramo de hoja en digestión. También se han obtenidos buenos resultados utilizando la solución A, que junto con la solución D son las únicas que no presentan en su composición la enzima Pectolyase.

Hay que destacar que la solución descrita por Grosser y Gmitter (Grosser & Gmitter 1990) corresponde a la solución C; con esta misma solución, que se aplica con éxito en el aislamiento de protoplastos de muchos genotipos, se ha conseguido aislar una cantidad muy baja de protoplastos de clementinas.

Utilizando la Pectolyase de la casa Duchefa®, en las soluciones B y E, el rendimiento ha sido nulo. Por lo que se supone que en el preparado de esta enzima exista algún elemento tóxico para los protoplastos.

Las soluciones enzimáticas que presentaban en su composición la pectolyase de la casa Seishin® han dado resultados intermedios. La diferencia con respecto a la solución enzimática de Duchefa® podría estar relacionada con los procesos de síntesis utilizados por las casas productoras. Especialmente, diferencias en la pureza del producto y en la concentración de sus componentes podrían tener un efecto importante sobre la digestión de las paredes celulares. En ambos casos el uso de la Pectolyase reduce el rendimiento en protoplastos por lo que es aconsejable no utilizarla para la digestión de hojas de clementinas.

Se ha demostrado que para aumentar el rendimiento en protoplastos de hojas de clementinas es necesario aplicar algunas modificaciones a la solución enzimática propuesta por Grosser y Gmitter (Grosser & Gmitter 1990) (correspondiente a la solución C). Utilizando una concentración del 2% (contra el 1% utilizado por Grosser y colaboradores) para las dos enzimas Macerozyme y Cellulase de la composición de solución enzimática se consigue mejorar el rendimiento en protoplastos. El aumento de las concentraciones de estos dos enzimas podría suplir la falta de la enzima Pectolyase en la digestión de las paredes.

#### 4.3.2.2 Influencia de la velocidad de agitación y del soporte sobre el rendimiento en protoplastos.

Las velocidades de agitación y los soportes ensayados para la digestión de hojas de clementinas han permitido obtener los rendimientos que se presentan en la tabla 4.7.

Los rendimientos obtenidos utilizando las dos velocidades de agitación no han mostrado diferencias significativas entre ellos; en algunas repeticiones se han obtenidos mejores resultados utilizando una velocidad de 45 rpm y en otras de 35 rpm. En cuanto al soporte utilizado para la digestión ha resultado significativamente mejor la placa ya que los rendimientos obtenidos han sido mucho más altos que los conseguidos con el matraz.

**Tabla 4.7.** Influencia de velocidad de agitación y soporte sobre el rendimiento en protoplastos.

CONDICIÓN	VELOCIDAD	SOPORTE	RENDIMIENTO MEDIO* (x10 <sup>6</sup> pp/gr)
1	45	PLACA	7,0 a
2	35	PLACA	6,6 a
3	45	MATRAZ	1,3 b
4	35	MATRAZ	3,9 b

\*Letras diferentes indican diferencias significativas con margen de error del 5%.

Aunque en la digestión del material vegetal en matraz suele proporcionar buenos rendimientos con la mayoría de los genotipos empleados, en el caso de las clementinas esto no ocurre. El uso de un mayor volumen de la solución de maceración produce un mayor movimiento del material vegetal que podría aumentar de forma excesiva la digestión resultando contraproducente para el aislamiento de protoplastos.

#### 4.3.3 **Aplicación del protocolo de aislamiento de protoplastos a híbridos de clementinas y otros mandarinos.**

El protocolo puesto a punto para aislar protoplastos a partir de hojas de la variedad “Clemenules” se ha aplicado a las variedades “Fortune”, “Dancy”, “Moncada” y “Murcott”. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.8.

Los rendimientos medios netos de protoplastos obtenidos a partir de hojas de “Dancy” y “Fortune” han resultado superiores a los registrados con la variedad

“Clemenules”. Resulta evidente que el protocolo de aislamiento utilizado para “Clemenules” es aplicable también con elevada eficiencia a las otras cuatro variedades y puede ser una alternativa válida para aislar protoplastos a partir de mesófilo con todas aquellas variedades donde la aplicación del método general no es satisfactoria, como por ejemplo las clementinas, algunas mandarinas o sus híbridos.

**Tabla 4.8.** Rendimiento en protoplastos obtenido aplicando a las variedades “Fortune”, “Dancy”, “Moncada” y “Murcott” el nuevo protocolo de aislamiento puesto a punto con clementinas.

VARIEDAD	COLOR	ÁREA (cm <sup>2</sup> )	RENDIMIENTO MEDIO (x10 <sup>6</sup> pp/gr)
Clemenules	27,7	34,3	9,4
Fortune	27,5	33,0	12,3
Dancy	28,8	31,2	11,1
Moncada	27,5	33,8	8,7
Murcott	28,0	35,5	8,3

#### 4.4 CONCLUSIONES

- Se ha determinado que las hojas con índice de color entre -25 y -30 y área de 30 cm<sup>2</sup> es el material vegetal óptimo para aislar protoplastos a partir de mesófilo de clementinas. Por primera vez se han utilizados parámetros concretos y cuantificables, como son el índice de color y el área foliar, para identificar el estado de madurez de las hojas que garantiza un mejor rendimiento de protoplastos.

- Las condiciones de cultivo de las plantas a partir de las cuales recolectar el material vegetal tienen una influencia directa sobre el rendimiento de protoplastos. La luminosidad es el factor más determinante y al aumentar su intensidad disminuye el rendimiento. Los mejores rendimientos se han conseguido con la temperatura de 23°C, humedad del 70% y luminosidad de 30  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

- Se ha identificado una solución enzimática que permite obtener buenos rendimientos en protoplastos a partir de mesófilo de hojas de clementinas. También se ha comprobado que enzimas de casas productoras diferentes funcionan de forma distinta, determinando cambios en el rendimiento en protoplastos.

- El soporte empleado para la digestión del material vegetal influye sobre el rendimiento en protoplastos; la placa permite obtener rendimientos superiores a los obtenidos realizando la digestión en matraz de vidrio.

- El protocolo de obtención de protoplastos de mesófilo de hojas puesto a punto con la variedad “Clemunules” se ha aplicado con éxito a otras variedades de mandarinas y sus híbridos.

## **CAPÍTULO 5**

### **MEJORA DE MANDARINAS BASADA EN LA HIBRIDACIÓN SOMÁTICA**

#### **5.1 INTRODUCCIÓN.**

La hibridación somática puede ser un instrumento de gran valor si se aplica a la mejora de variedades, en particular de las clementinas. El objetivo principal en la gran mayoría de los programas de mejora de variedades para consumo en fresco es la obtención de frutos de elevada calidad sin semillas, y la hibridación somática puede ser de gran ayuda para el desarrollo de esos programas.

La producción de frutos sin semilla en cítricos puede ser una consecuencia de la esterilidad de sus órganos florales, tanto en sus partes masculinas como en sus partes femeninas, o también estar regulada por fenómenos de autoincompatibilidad. En los cítricos la autoincompatibilidad es de tipo homomórfico y gametofítico (Ollitrault y col. 2007a) y está controlada genéticamente. No precisa de alteraciones morfológicas en las flores y la autoincompatibilidad resulta de la interacción entre el polen haploide y el estilo diploide es decir, los genotipos autoincompatibles son capaces de producir gametos funcionales pero no producen semillas mediante autopolinización. Tanto las clementinas como las variedades de mandarinos híbridos cultivados en España presentan este sistema de autoincompatibilidad. Esto impide la formación de semillas mediante autopolinización en plantaciones aisladas. Sin embargo ambos grupos de variedades son intercompatibles, lo cual ocasiona la formación de semillas por polinización cruzada cuando se cultivan en plantaciones próximas.

Esto ha hecho que se intensificaran los esfuerzos de los mejoradores hacia el objetivo de limitar la aparición de semillas en los frutos evitando la polinización cruzada. Para ello una de las estrategias aplicables y que más expectativas ha creado es la obtención de híbridos triploides.

Las plantas triploides producen frutos que generalmente no presentan semillas, bien sea por aborto durante la megasporogénesis, formación de las megasporas en el óvulo, o por fallos en el emparejamiento de los cromosomas dado el desequilibrio generado por el número impar de cromosomas homólogos. Los gametos producidos por las plantas triploides son prevalentemente aneuploides y presentan una fertilidad muy

baja. En el marco de la hibridación somática los híbridos triploides se pueden obtener de forma directa a través de la fusión de protoplastos haploides con otros diploides, tal y como fue demostrado en los trabajos pioneros de Kobayashi (Kobayashi y col. 1997) y Ollitrault (Ollitrault y col. 2000b). Sin embargo, las enormes dificultades en la obtención de líneas celulares haploides y la rápida poliploidización espontánea de las mismas ha relegado a un segundo plano esta estrategia. La aproximación más empleada para la obtención sistemática de nuevos genotipos triploides en cítricos se basa en hibridaciones sexuales interploides entre plantas diploides y plantas tetraploides (generalmente autotetraploides). La disponibilidad de tetraploides es escasa y, en este ámbito, la hibridación somática es de gran interés ya que puede proporcionar nuevos parentales alotetraploides para su uso en cruzamientos interploides. Además, el uso de parentales alotetraploides aumenta el nivel de heterocigosis y de variabilidad que es posible obtener dentro de una misma progenie, y permite el diseño de los parentales con mayor potencial en mejora mediante la combinación de genotipos comerciales de élite (Grosser y col. 2000b).

Para limitar la formación de semillas en los frutos existen otras estrategias de mejora que intentan aprovechar el carácter de la esterilidad masculina de algunas variedades. Las principales causas de la esterilidad del polen están relacionadas con aberraciones cromosómicas; entre ellas las más comunes en cítricos son la asinapsis (de origen genético o inducida por las bajas temperaturas), las translocaciones recíprocas y las inversiones (Nakamura 1943; Iwamasa 1962; Iwamasa 1966). La esterilidad masculina también puede ser originada por fallos en la formación de las fibras del huso (Raghuvanshi 1962), el aborto de las anteras, o por la degeneración de la célula madre productora de granos polínicos (Osawa 1912; Froost 1968) (revisados Ollitrault y col. 2007). Estudios realizados sobre la esterilidad masculina en variedades del grupo “Satsuma” han demostrado que este carácter está controlado por el ADN citoplasmático (Yamamoto y col. 1997) (de aquí deriva la definición de *Cytoplasmic Male Sterility* o CMS). Este mismo sistema de esterilidad está presente en numerosas especies vegetales y se relaciona con cambios en la funcionalidad de las mitocondrias que conllevan al desarrollo de polen estéril (Schnable & Wise 1998).

Por tanto, la sustitución del citoplasma de un genotipo que produce polen fértil con el de “Satsuma” podría generar nuevas interacciones con el núcleo que finalmente resultarían en la producción de flores androestériles. Esta estrategia podría aplicarse a las



variedades de clementinas e híbridos de mandarinas para evitar los fenómenos de polinización cruzada y por tanto favorecer la producción de frutos sin semilla.

En la hibridación sexual no es posible obtener recombinación del genoma citoplasmático ya que su herencia es vía materna, con lo cual resulta imposible transferir el citoplasma de una variedad a otra sin modificar los caracteres determinados por el genoma nuclear.

La hibridación somática es la única herramienta biotecnológica disponible que permite sustituir el citoplasma de un genotipo élite por otro, manteniendo intacta la composición nuclear y por tanto sus caracteres de alto valor comercial. Este proceso se basa en la obtención de cíbridos o híbridos citoplasmáticos.

Los cíbridos, no sólo tienen valor en la mejora genética sino que también han sido utilizados en estudios de carácter fisiológico y genómico (Bonnett y col. 1993; Hassanein y col. 1998; Kochevenko y col. 1999; Venema y col. 2000). Gracias a su configuración genética permiten estudiar los caracteres que dependen de los orgánulos citoplasmáticos y aquellos determinados por las interacciones entre el núcleo y el citoplasma de las células.

Se han obtenido numerosos cíbridos con el objetivo de transferir el carácter CMS. En especies como el tomate se ha conseguido transferir con éxito dicho carácter y esto ha permitido reducir el número de semillas en un 80% en la nueva variedad híbrida (Akagi y col. 1995; Melchers y col. 1992). También con la misma estrategia se han conseguidos plantas androestériles o con fertilidad muy baja en miembros de la familia Brassicaceae (Cardi & Earle 1997; Liu y col. 1996; Motegi y col. 2003; Sakai & Imamura 1990; Sigareva & Earle 1997), tabaco (Zelcer y col. 1978; Zubko y col. 1996), arroz (Akagi y col. 1989; QingZhong & Earle 1995) y patata (Golmirzaie y col. 1991).

En cítricos, los cíbridos se han obtenido ocasionalmente de forma espontánea en experimentos de fusión simétrica de protoplastos (Saito y col. 1993; Xu y col. 2004), sobre todo si se utiliza el método de fusión químico-eléctrica (Olivares-Fuster y col. 2005), pero también aplicando la fusión química (Grosser y col. 1996; Guo y col. 2004a; Moreira y col. 2000) o eléctrica (Ollitrault y col. 1996). Así mismo, también se han obtenido cíbridos inactivando el núcleo de los protoplastos de uno de los dos parentales (donante) mediante irradiación e inactivando el genoma citoplasmático del otro parental (receptor) mediante tratamientos químicos (Liu & Deng 1999; Vardi y col. 1987). Otras técnicas utilizadas para obtener cíbridos consisten en la fusión entre protoplastos y citoplastos (protoplastos privados de núcleo) (Xu y col. 2006) o mediante

fusión de microprotoplastos (protoplastos que contienen un número reducido de cromosomas, normalmente entre 1 y 8) (Louzada y col. 2002). Tanto la obtención de citoplastos como la de miniprotoplastos es muy complicada y no se ha conseguido regenerar plantas. Tan solo se han obtenido líneas celulares y embriones utilizando los microprotoplastos.

Hasta la fecha los cíbridos de cítricos de mayor interés potencial en el ámbito de la mejora de variedades para el consumo fresco se han obtenido entre “Satsuma” y el pummelo “Hirado Buntan Pink”, el mandarino “Sunburst”, el tangelo LB8-9 (Clementina x Minneola) y un híbrido de clementina x “Murcott” (Guo y col. 2004a). Recientemente, también se han obtenido cíbridos entre la satsuma “Guoqing” y la variedad de naranja “Bingtang” y el pummelo “Shatian”, ambos de interés para la citricultura china (Cai y col. 2007). Todos los cíbridos aquí mencionados tendrán que ser evaluados en campo para determinar su valor agronómico y sobre todo si los cambios en la interacción núcleo-citoplasma pueden afectar a la esterilidad de las plantas híbridas obtenidas.

Los estudios realizados hasta la fecha han evidenciado que los cíbridos suelen presentar las características agronómicas del parental que tiene el mismo genoma nuclear (Ollitrault y col. 2007b), por lo que respecta a la calidad del fruto (Bassene y col. 2008). Sin embargo se han detectado algunas pequeñas diferencias, como: la resistencia a hongos (por ejemplo el “mal secco”) (Tusa y col. 2000), la composición de los aceites esenciales de las hojas (Fanciullino y col. 2005), la época de maduración del fruto (Grosser y col. 2000a) y algunos caracteres morfológicos (Bassene y col. 2008).

Con el trabajo que aquí se presenta se quiere contribuir a la mejora de una de las variedades de mayor interés para la citricultura española: la clementina “Clemenules” (*C. clementina* Hort. ex Tan.). La exportación de mandarinas y clementinas en el año 2006 ha supuesto para España un ingreso equivalente a 1.361.529.000 de \$, siendo España el país que más exporta en el mundo este tipo de frutos (FAOSTAT, FAO Dirección de Estadística 2009). Dentro de este grupo de cítricos destaca la producción de frutos de la variedad “Clemenules” que según datos proporcionados por el Ministerio de Agricultura (MARM) representa casi un tercio de la producción total de mandarinas en España. Además, las plantas de la variedad “Clemenules” están entre las más propagadas y comercializadas por los viveristas (Conselleria de Agricultura Pesca y Alimentación, Generalitat Valenciana). Todo ello ofrece una idea de la importancia que tiene esta variedad para la citricultura española.

La optimización del protocolo de aislamiento de protoplastos de este genotipo (véase capítulo 4) nos ofrece la posibilidad de aplicar la hibridación somática con el objetivo de obtener tanto híbridos como nuevos genotipos alotetraploides. Los primeros podrían ser utilizados directamente como variedad cultivada mientras que los segundos se utilizarían como parentales en cruzamientos interploides para la obtención de híbridos triploides dentro del programa que nuestro grupo está desarrollando. El programa de mejora que se lleva a cabo en el IVIA tiene el objetivo de obtener nuevas variedades triploides que puedan ocupar el espacio de mercado de las clementinas y de los híbridos tardíos; por lo tanto, resulta de gran interés la disponibilidad de híbridos alotetraploides obtenidos a partir de la combinación de estos genotipos.

## **5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **5.2.1 Material vegetal.**

Plantas de la variedad “Clemenules” injertadas sobre *C. macrophylla* Wester “Alemow” se cultivaron en invernadero a una temperatura de aproximadamente 23°C, humedad relativa del 70% y luminosidad de 30  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

A partir de estas plantas se seleccionaron hojas que se encontraban en los nuevos brotes y que presentaban características óptimas para el aislamiento de protoplastos: lamina completamente expandida, índice de color aproximadamente entre 26 y 29 y área entre 30 y 40  $\text{cm}^2$ . Este tipo de hojas fueron las que en el estudio presentado en el capítulo 4 proporcionaron mejores rendimientos en protoplastos.

Para el aislamiento a partir de callo se utilizaron suspensiones celulares obtenidas a partir de callo crioconservado de la satuma “Ghusji Mill” (*C. unshiu*) perteneciente al banco de germoplasma crioconservado del IVIA. Las suspensiones se mantuvieron en medio líquido H&H (anejo) y en agitación a una velocidad de 30 rpm, realizando subcultivos quincenales.

### **5.2.2 Aislamiento y fusión de protoplastos.**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo 4, se realizó la digestión de las hojas en placas Petri de 6 cm de diámetro con una solución enzimática compuesta por 2% de Celulase Onozuka, 2% de Macerozyme Macerase, 12 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,4 mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM MES y 0,7 M manitol. Para el aislamiento de protoplastos de callo a partir de la suspensión celular se utilizó la solución enzimática descrita en el anejo. El proceso de digestión y aislamiento de protoplastos a partir de callo y hoja se realizó tal y como queda descrito en el apartado 1.2.2.

A los protoplastos aislados se le aplicó el método de fusión químico-eléctrica descrito por Olivares-Fuster (Olivares-Fuster y col. 2005), que favorece la obtención tanto de híbridos somáticos (tetraploides) como de cíbridos (diploides). Este método se describe detalladamente en el apartado 1.2.4.

### **5.2.3 Cultivo de protoplastos y regeneración de embriones.**

Los productos de fusión se cultivaron en medio BH3 0,6M (anejo) en condiciones de luminosidad reducida a una temperatura de 28°C durante una semana. Sucesivamente se fue añadiendo medio BH3 0,4 M para rebajar la molaridad del cultivo y favorecer la multiplicación del callo y la regeneración de embriones. Cuando se observó la formación de minicallos en el medio líquido los cultivos se traspasaron a medio sólido EME maltosa (anejo) para inducir la embriogénesis. Para normalizar el crecimiento de los embriones formados se utilizó la membrana semipermeable de acetato descrita por Niedz (Niedz y col. 2002). Para ello los embriones regenerados se cultivaron en medio 1500 (anejo) con membrana durante un mes. A continuación los embriones se transfirieron a medio sin membrana donde permanecieron un mes más y finalmente se pasaron a medio B+ (anejo). Las plantas obtenidas se trasplantaron a macetas y se cultivaron en invernadero para su aclimatación. Las yemas surgidas de los embriones que presentaron un patrón de desarrollo anómalo se injertaron *in vitro* siguiendo el procedimiento descrito por Navarro (Navarro y col. 1975; Navarro & Juárez 2007) y posteriormente se trasplantaron a invernadero siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.2.8.

### **5.2.4 Caracterización de las plantas regeneradas.**

#### **5.2.4.1 Análisis del nivel de ploidía.**

Las plantas obtenidas se caracterizaron mediante el análisis del nivel de ploidía realizada por citometría de flujo. Para ello se utilizó un citómetro de flujo Ploidy

Analyzer II (PA) (Partec, Munster, Germany) y se siguió el protocolo descrito en el apartado 1.2.10.1.

#### 5.2.4.2 Caracterización nuclear.

Se realizó un análisis previo de las plantas regeneradas utilizando los marcadores microsatélites Ci01C07 y Ci07C07 descrito por Froelicher (Froelicher y col. 2007).

La separación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis vertical en geles desnaturizantes de acrilamida-bisacrilamida al 6%, urea 7 M en cubetas DCode™ de Biorad tal y como queda descrito en el apartado 1.2.10.3. Los fragmentos amplificados se detectaron mediante tinción con plata según el protocolo descrito por Benbouza et al. (2006).

También se realizó el análisis molecular de las plantas obtenidas por medio de un analizador genético automático CEQ-800 (Beckman, Coulter), cuyo funcionamiento está descrito en el capítulo 2 (apartado 2.2.2). Este tipo de caracterización se realizó con los 30 marcadores microsatélites que están descritos en la tabla 5.1.

#### 5.2.4.3 Caracterización citoplasmática.

Con el fin de determinar la procedencia del genoma citoplasmático en las plantas regeneradas, se realizó un análisis molecular utilizando cebadores que amplifican regiones polimórficas de los genomas cloroplástico y mitocondrial (tabla 5.2).

La separación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis vertical en cubetas DCode™ de Biorad tal y como está descrito en el apartado 1.2.10.3.

En el estudio descrito en el apéndice de esta tesis se demuestra cómo la técnica de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) puede aumentar la tasa de discriminación en loci aparentemente monomorfos. Esta técnica facilita la detección de polimorfismo en la secuencia amplificada, aunque se trate de cambios en un solo nucleótido. Por esto se ha intentado aplicarla a las secuencias amplificadas a partir del genoma citoplasmático para caracterizar los genomas citoplasmáticos de las plantas regeneradas.

Las amplificaciones por PCR utilizando los cebadores mt18s-mt5s, *psbC-trnS*, *rbcL-psaI* y *nad1-B/C* generaron unos fragmentos de tamaño entre 1000 y 3000 bp; por esto es necesario cortarlos con enzimas de restricción y aplicar la técnica de SSCP para

facilitar la detección de polimorfismos en las secuencias amplificadas (Olivares-Fuster y col. 2007). Los enzimas utilizados están presentados en la tabla 5.3.

Para la separación de los productos de PCR aplicando la técnica SSCP se utilizó un aparato de electroforesis GenePhor electrophoresis unit (Amersham Biosciences®). Se mezclaron entre 1 y 3 µl del producto de PCR ya cortado con enzimas de restricción con 5 µl de buffer desnaturizante (95% de formamide, 0,025% bromophenol blue y 0,25% Xylene cyanol) y se desnaturizó durante 10 minutos a 98°C. Se pasaron rápidamente los tubos a hielo y se mantuvieron en frío durante 1 minuto. Se cargaron 5 µl del producto desnaturizado en gel de polyacrilamida no-desnaturizante (Amersham Biosciences®, Piscataway, USA), rehidratados con SSCP Buffer A pH 9.0 (Amersham Biosciences®). Se realizó una electroforesis horizontal en condiciones de temperatura constante de 5°C y 90 V, 6 mA, 5 W durante los primeros 25 minutos y 500 V, 14 mA, 10 W durante los siguientes 45 minutos. Los fragmentos separados se visualizaron mediante tinción con plata según el protocolo descrito por Benbouza y colaboradores (2006).

Los productos de PCR obtenidos con los cebadores *Ntcp28* y *mt18s-mt5s* se sometieron a análisis de secuenciación directa con el fin de identificar posibles polimorfismos en las regiones amplificadas. Este trabajo fue llevado a cabo por el servicio de secuenciación de ADN de la Universidad Politécnica de Valencia mediante el secuenciador ABI PRISM DNA 377 (Perkin- Elmer®).

**Tabla 5.1.** Cebadores utilizados para la caracterización nuclear de las plantas regeneradas.

Diana	Nombre	Cebador Reverso Secuencia (5'-3')	Cebador Forward Secuencia (5'-3')	T°C hibridación
DNA	CI04H06	CAAAGTGGTGAACCTG	GGACATAGTGAGAAGTTGG	55°
DNA	CI03C08	GCTTCTTACATTCTCAAA	CAGAGACAGCCAAGAGA	55°
DNA	CI06B07	TGGGCTTGTAGACAGTTA	CGGAACAACATAAAACAAT	50°
DNA	CI07C09	GTGGCTGTTGAGGGTTG	GACCCTGCCTCCAAAGTATC	55°
DNA	mest256	GAGCAAGTGC GTTGTGTGT	CATTAAAATATCCGTGCCGC	50°
DNA	CI02E08	TGATTAGCATGTTGCG	GGTTTGTGGGAGGTG	50°
DNA	CI06A12	TTTTTATTTTCGGTCTCCTT	CCCAACAAACTCAAACCTTC	50°
DNA	CI02F12	TAACTGAGGGATTGGTTT	GGCCATTTCTCTGATG	55°
DNA	CI01C06	TGGAGACACAAAGAAGAA	GGACCACAACAAAGACAG	50°
DNA	mest123	AAGAAAGATTTGCTGGCAGAG	GGGATGGACTCCCAGTGTTA	50°
DNA	CI02G02	TGGTAGAGAAACAGAGGTG	CAATAAGAAAACGCAGG	55°
DNA	Mest86	CCTCTCTGGCTTCTGGATTG	CCAACCTGACACTAATCCTCTTC	50°
DNA	CI06B05	ATGTTGATTACGAGACCTT	GAACGATGGAATGAAGTG	55°
DNA	Taa15	CTTCCCAGCTGCACAAGC	GAAAGGGTTACTTGACCAGGC	55°
DNA	CI07D06	TCAATTCCTCTAGTGTGTGT	CCTTTTCACAGTTTGCTAT	55°
DNA	CI02D04b	AGCAAACCCACAAC	CTCTCTTTCCCAATTAGA	50°
DNA	CI03D12a	CCCACAACCATCACC	GCCATAAGCCCTTTCT	50°
DNA	CI03B07	TGAGGGACTAAACAGCA	CACCTTTCCTTCCA	55°
DNA	mest121	CAATAATGTTAGGCTGGATGGA	TCCCTATCATCGGCAACTTC	50°
DNA	CI02D09	ACCCATCACAAAACAGA	AATGATGAGGGTAAAGATG	55°
DNA	mest46	GGTGAGCATCTGGACGACTT	GAACCAGAATCAGAACCCGA	50°
DNA	mest192	CTTGGCACCATCAACACATC	CGCGGATCATCTAGCATACA	50°
DNA	mest431	CATACCTCCCCGTCCATCTA	GAGCTCAAAAACAATAGCCGC	50°
DNA	CI01G11	TCGCTTTCTTATTTCACTCACC	ACTGTTGCTGCTGCTGCTGCT	55°
DNA	Cac15	GATAGGAAGCGTCGTAGACCC	TAAATCTCCACTCTGCAAAGC	50°
DNA	Taa41	ACATGCAGTGCTATAATGAATG	AGGTCTACATTGGCATTGTC	55°
DNA	CI08C05	CCCTAAAACCAAGTGACA	TCCACAGATTGCCATTA	50°
DNA	CI07E12	TCTATGATTCTGACTTTA	TGTAGTCAAAGCATCAC	50°
DNA	mest 88	ATGAGAGCCAAGAGCACGAT	GCCTGTTTGCTTTCTTTTCTC	50°
DNA	mest 103	CCAGCCACAGATTTTTCACA	CCGTTGCGGTCTACCATTAT	50°

**Tabla 5.2.** Cebadores utilizados para la caracterización citoplasmática de las plantas regeneradas.

Target	Nombre	Cebador Reverso Secuencia (5'-3')	Cebador Forward Secuencia (5'-3')	T°C hibridación
cpDNA	<i>ccmp 1</i>	CCGAAGTCAAAGAGCGATT	CAGGTAAACTTCTCAACGGA	50
cpDNA	<i>ccmp 2</i>	ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	GATCCCGGACGTAATCCTG	50
cpDNA	<i>ccmp 4</i>	CCAAAATATTGGAGGACTCT	AATGCTGAATCGAGACCTA	50
cpDNA	<i>ccmp 5</i>	AGGTTCCATCGGAACAATTAT	TGTTCCAATATCTTCTTGTCATT	50
cpDNA	<i>ccmp 6</i>	CATTACGTGCGACTATCTCC	CGATGCATATGTAGAAAGCC	50
cpDNA	<i>Ntcp 7</i>	CGAATCCCTCTCTTTCCG	TGATCCCGGACGTAATCC	50
cpDNA	<i>Ntcp 9</i>	CTGTCCTATCCATTAGACAATG	CTTCCAAGCTAACGATGC	50
cpDNA	<i>Ntcp 28</i>	AGAAACGAAGGAACCCAC	TCCAATGGCTTTGGCTA	50
mtDNA	<i>Nad 2-3/4</i>	CCCTTCCTTTCTGTTGT	TAGTGTTGATATAGGGG	50
mtDNA	<i>mt18s-mt5s</i>	GTGTTGCTGAGACATGCGCC	ATATGGCGCAAGACGATTCC	57,5
cpDNA	<i>psbC-trnS</i>	GGTCGTGACCAAGAAACCCAC	GGTTCGAATCCCTCTCTCTC	57
cpDNA	<i>rbcl-psal</i>	GCTTGTGAAATATGGAAGGAGATC	GCAATTGCCGAAATACTAAGC	54
mtDNA	<i>nad 1- B/C</i>	GCATAACGATCTGCAGCTCA	GGAGCTCGATTAGTTTCTGC	57,5
mtDNA	<i>nad 5-2/1</i>	CTGGTTAGATGCGTGG	ACACGGCTCACCAAC	50
mtDNA	<i>nad3-rps1</i>	TGAATGGAAAAGGGG	CCGTAACCTTTGGCTATCTT	50
mtDNA	<i>nad 7-1/2</i>	TTTGATATAGGCTCGCT	GGAACATAGCATAGGG	50

**Tabla 5.3.** Enzimas de restricción utilizados para el análisis SSCP de los marcadores citoplasmáticos.

Cebadores	Tamaño fragmento	Enzimas de restricción
<i>mt18s-mt5s</i>	1050 bp	Taq <sup>α</sup> I
<i>psbC-trnS</i>	1600 bp	Ple I - Bstn I
<i>rbcl-psal</i>	3000 bp	Taq <sup>α</sup> I
<i>nad 1- B/C</i>	1550 bp	Tse I - Tsp509 I

### 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se aplicó el método quimioeléctrico para inducir la fusión entre protoplastos aislados a partir de mesófilo de hoja de “Clemenules” y de callo de satsuma. Estos protoplastos se cultivaron durante 3-4 semanas en medio líquido BH3 antes de ser transferidos a medio EME-maltosa gelificado. Tras esta segunda fase de cultivo se produjo la formación de minicallos y sucesivamente se regeneraron embriones. Se obtuvieron aproximadamente unos 50 embriones a partir de dos fusiones independientes. Los embriones en estado de desarrollo globular se cultivaron en medio 1500, durante un periodo variable entre 1 y 2 meses. Sucesivamente se transfirieron a un medio de germinación para inducir la formación de brotes y raíz. Tras 1-2 meses de



cultivo, más de la mitad de los embriones consiguieron germinar y producir brotes, que fueron utilizados para producir plantas mediante mininjertos.

Finalmente se obtuvieron 20 plantas a partir de las dos fusiones.

### **5.3.1 Análisis por citometría de flujo.**

El análisis por citometría de flujo permitió demostrar que todas las plantas analizadas eran diploides, menos una planta que resultó ser tetraploide (figura 5.1). El análisis se repitió dos veces y los resultados se confirmaron en todos los casos.

### **5.3.2 Caracterización nuclear.**

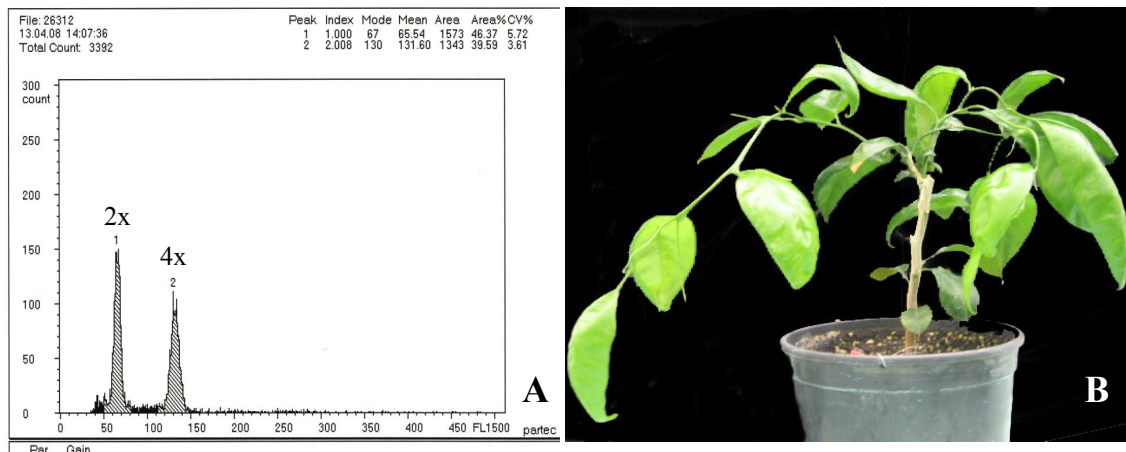
El análisis con marcadores moleculares nucleares permitió constatar que las plantas diploides regeneradas presentaban un perfil nuclear idéntico al de la variedad “Clemenules” y que por lo tanto tenía que tratarse de híbridos (figura 5.2 y 5.3).

El análisis molecular de la planta tetraploide permitió corroborar el carácter híbrido de la planta regenerada, ya que el perfil mostrado resultó ser una suma de los perfiles de los dos parentales (“Clemenules” y satsuma). El análisis permitió identificar los alelos que aparecen en la tabla 5.4.

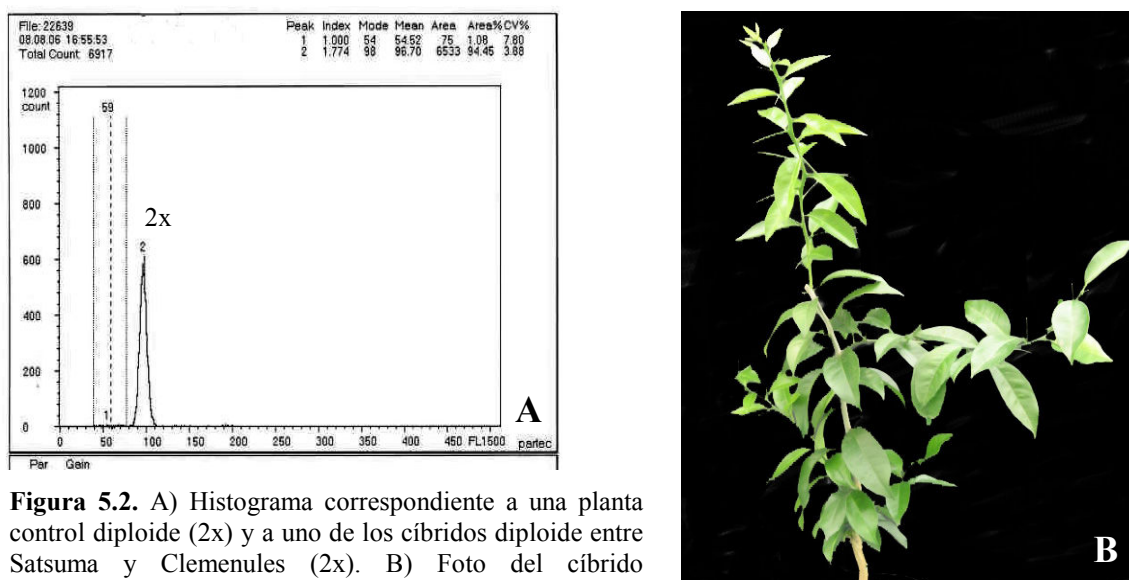
Al contrario que con los otros híbridos regenerados a partir de las fusiones descritas en el capítulo 1, todos los alelos detectados en los parentales también se detectaron en el híbrido tetraploide estudiado. Este resultado apoya la discusión previa sobre la influencia de la distancia filogenética existente entre los genotipos parentales en la pérdida de cromosomas y fragmentos subcromosómicos (capítulos 2), ya que la distancia existente entre los grupos satsuma y clementina es mucho menor que la existente entre citrange y macrophylla. Para confirmar esta hipótesis sería necesario comprobar estos resultados con un mayor número de híbridos somáticos que los que se han obtenido hasta el momento.

El número de híbridos tetraploides obtenidos previamente a partir de clementinas es muy reducido; solamente se ha conseguido un híbrido tetraploide entre la clementina “Caffin” y la mandarina “Encore” (Wu y col. 2005). La escasez de híbridos somáticos de clementina y el elevado interés para la citricultura mundial de los genotipos utilizados aumenta notablemente el valor de los híbridos obtenidos.

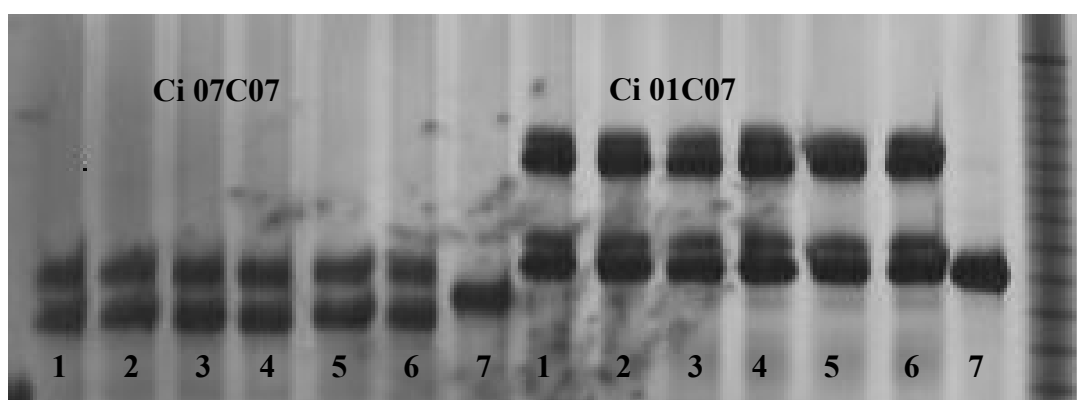
Los híbridos somáticos alotetraploides podrían ser utilizados directamente como variedades cultivadas. La evaluación en campo de los híbridos obtenidos entre el tangelo “Page” y un híbrido de clementina con otras variedades ha mostrado que estos híbridos alotetraploides tienen buenas potencialidades para su cultivo directo (Guo y col. 2004b). Además el híbrido somático obtenido entre “Clemenules” y “Satsuma” tiene un gran interés como parental en programas de obtención de híbridos triploides. Hasta el momento en este tipo de programa de mejora se han utilizado prevalentemente plantas autotetraploides por lo que las plantas alotetraploides podrían ser una fuente de variabilidad muy interesante.



**Figura 5.1.** A) Histograma correspondiente a una planta control diploide (2x) y al híbrido alotetraploide entre Satsuma y Clemenules (4x). B) Foto de la planta alotetraploide regenerada.



**Figura 5.2.** A) Histograma correspondiente a una planta control diploide (2x) y a uno de los híbridos diploide entre Satsuma y Clemenules (2x). B) Foto del híbrido regenerado.



**Figura 5.3.** Análisis genético de los locus Ci07C07 y Ci01C07 en los parentales y en algunos de los híbridos regenerados. El orden de los carriles en la figura corresponden a: 1. Clemenules (hoja), 2-6 Cíbridos, 7 Satsuma (callo).

Tabla 5.4. Caracterización del híbrido alotetraploide; alelos detectados.

Variedad	Primer	alelo a	alelo b	alelo c	alelo d	Primer	alelo a	alelo b	alelo c	alelo d	Primer	alelo a	alelo b	alelo c	alelo d
		tamaño	tamaño	tamaño	tamaño		tamaño	tamaño	tamaño	tamaño		tamaño	tamaño	tamaño	tamaño
<b>Satsuma</b>	Ci 01 C 06	133	145			Mest 123		270	280		Ci 01 G 11	100		105	
<b>Hibrido 53</b>	Ci 01 C 06	133	145	165		Mest 123	251	270	280		Ci 01 G 11	100	103	105	108
<b>Clemenules</b>	Ci 01 C 06	133		165		Mest 123	251		280		Ci 01 G 11		103		108
<b>Satsuma</b>	Ci 02 F 12	122	130			Ci 02 D 09		230	238		Ci 08 C 05	151	157		
<b>Hibrido 53</b>	Ci 02 F 12	122	130			Ci 02 D 09		230	238		Ci 08 C 05	151	157	175	
<b>Clemenules</b>	Ci 02 F 12	122	130			Ci 02 D 09	230	230			Ci 08 C 05			175	175
<b>Satsuma</b>	Ci 07 D 06		188	188		Ci 02 G 02	113		123		Mest 192	214	222		
<b>Hibrido 53</b>	Ci 07 D 06	168	188			Ci 02 G 02	113	121	123		Mest 192	214	222		
<b>Clemenules</b>	Ci 07 D 06	168	188			Ci 02 G 02	113	121			Mest 192		222	222	
<b>Satsuma</b>	Mest 88	99	99			Mest 46		215	215		Ci 06 B 05	187	187		
<b>Hibrido 53</b>	Mest 88		99	111	117	Mest 46	212	215			Ci 06 B 05		187	204	
<b>Clemenules</b>	Mest 88			111	117	Mest 46	212	215			Ci 06 B 05		187	204	
<b>Satsuma</b>	Ci 06 A 12	96	100			Mest 86	113	119			TAA 15	165	185		
<b>Hibrido 53</b>	Ci 06 A 12	96	100	102		Mest 86	113	119	128		TAA 15	165	185	188	192
<b>Clemenules</b>	Ci 06 A 12	96		102		Mest 86	113		128		TAA 15			188	192
<b>Satsuma</b>	Ci 03 C 08		220	220		TAA 41	147	147			Ci 07 E 12	118		125	
<b>Hibrido 53</b>	Ci 03 C 08	206	220		225	TAA 41		147	154		Ci 07 E 12	118	123	125	
<b>Clemenules</b>	Ci 03 C 08	206			225	TAA 41		147	154		Ci 07 E 12	118	123		
<b>Satsuma</b>	Ci 03 D 12			280	280	Mest 431		331	343		Ci 04 H 06	191	191		
<b>Hibrido 53</b>	Ci 03 D 12	251	261	280		Mest 431		331	343		Ci 04 H 06		191	196	
<b>Clemenules</b>	Ci 03 D 12	251	261			Mest 431	331	331			Ci 04 H 06		191	196	
<b>Satsuma</b>	Ci 02 D 04			228	228	Ci 03 B 07	261		265		Ci 07 C 09	240	248		
<b>Hibrido 53</b>	Ci 02 D 04	198	210	228		Ci 03 B 07	261	263	265		Ci 07 C 09	240	248	256	
<b>Clemenules</b>	Ci 02 D 04	198	210			Ci 03 B 07		263	265		Ci 07 C 09	240		256	
<b>Satsuma</b>	Mest 121	180	180			Mest 103	223	223			CAC 15		160	160	
<b>Hibrido 53</b>	Mest 121		180	182		Mest 103	223	223			CAC 15	151	160		
<b>Clemenules</b>	Mest 121			182	182	Mest 103	223	223			CAC 15	151	160		
<b>Satsuma</b>	Ci 06 B 07		107	107		Ci 02 E 08	259	264			Mest 256	209	225		
<b>Hibrido 53</b>	Ci 06 B 07	105	107			Ci 02 E 08	259	264	271		Mest 256	209	225		
<b>Clemenules</b>	Ci 06 B 07	105	107			Ci 02 E 08		264	271		Mest 256	209	225		

### 5.3.3 Caracterización citoplasmática.

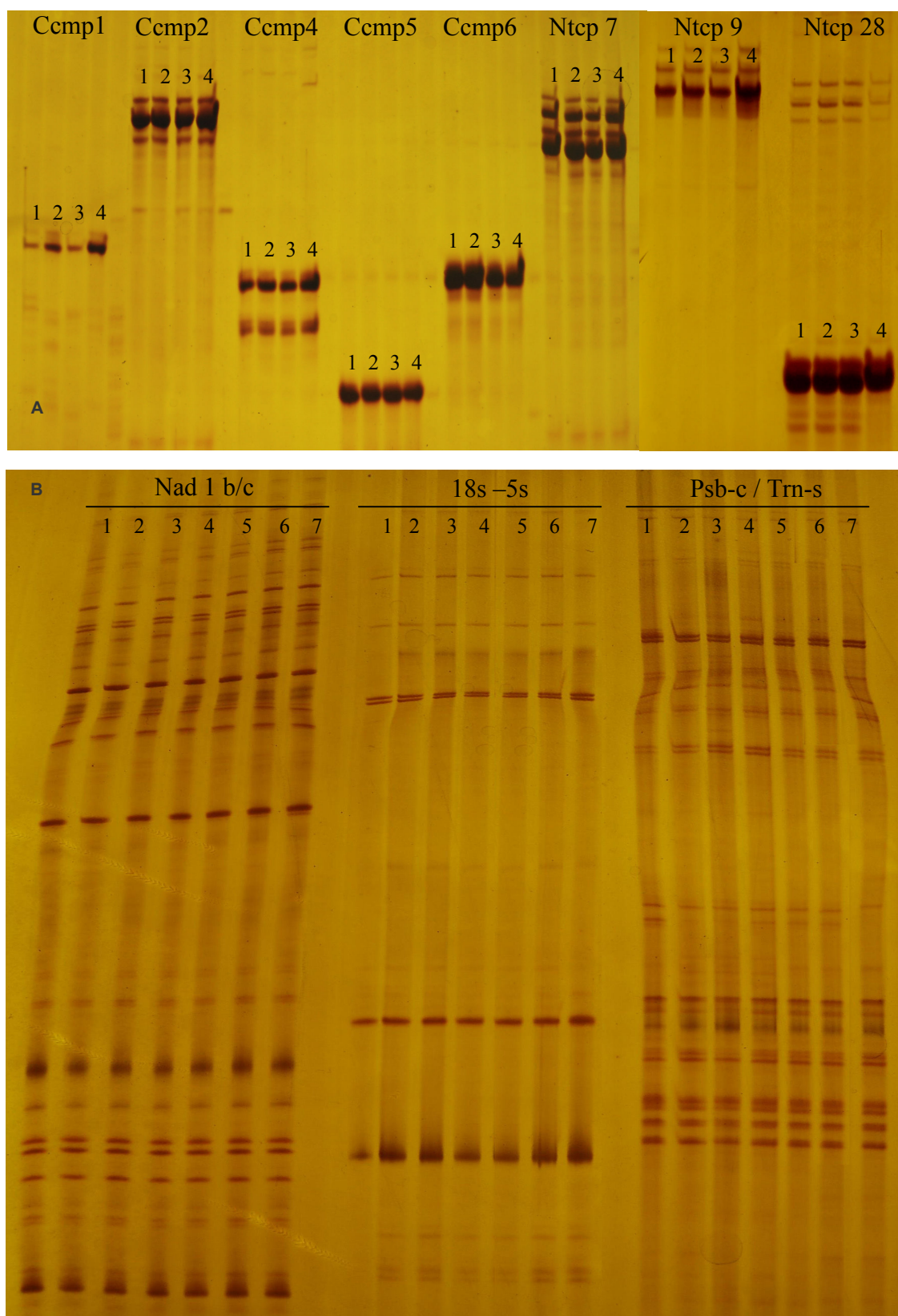
No ha sido posible diferenciar con ningún tipo de marcador, ni mitocondrial ni cloroplástico, los genotipos “Clemenules” y satsuma. Esto se explica por el escaso número de marcadores disponibles, por la proximidad filogenética de ambos parentales y por la escasa variabilidad del genoma citoplasmático. En las figuras 5.4.A y B se muestran algunos de los análisis realizados con los marcadores citoplasmáticos en los que no hay diferencias entre los perfiles detectados de “Clemenules”, de satsuma y de los híbridos. La aplicación de la técnica de SSCP tampoco ha permitido la detección de polimorfismos entre los genomas citoplasmáticos estudiados, a pesar de su mayor grado de resolución y de su mayor sensibilidad.

Los genomas citoplasmáticos en plantas presentan un grado evolutivo menor que los genomas nucleares, ya que están sometidos a una baja presión evolutiva (Pelletier 1988). En las hibridaciones sexuales el citoplasma se hereda por vía materna y no está sujeto a recombinación.

La escasez de polimorfismos en los genomas citoplasmáticos de “Satsuma” y “Clemenules” ha impedido demostrar molecularmente el carácter híbrido de las plantas diploides regeneradas. Aún así podemos considerar que se trata de híbridos citoplasmáticos, ya que toda la bibliografía de cítricos consultada coincide en el hecho de que las mitocondrias procedentes del parental de callo (Satsuma en nuestro caso) son indispensables para la regeneración de plantas en las condiciones de cultivo empleadas y que nunca se han regenerado plantas a partir de protoplastos de mesófilo de hojas (Cabasson y col. 2001; Grosser y col. 1996; Guo y col. 2004a; Liu & Deng 2000; Moriguchi y col. 1997; Moreira y col. 2000; Olivares-Fuster y col. 2005; Saito y col. 1993; Vardi y col. 1987; Wu y col. 2005; Xu y col. 2004).

Las plantas regeneradas representan un óptimo material de partida para la realización de estudios básicos sobre el papel de los orgánulos citoplasmáticos y sus interacciones con el núcleo. Además la posibilidad de comparar el comportamiento de híbridos e híbridos somáticos obtenidos a partir de los mismos parentales deja espacio al estudio sobre los efectos de la alopoliploidización de los genotipos.

Se ha iniciado la evaluación de los híbridos en campo con el objetivo de demostrar si la sustitución del citoplasma de “Clemenules” con el de “Satsuma” permite la expresión del carácter de androesterilidad y si esta estrategia de mejora es aplicable para la obtención de frutos sin semilla.



**Figura 5.4.** Análisis molecular citoplasmático de los dos genotipos parentales “Clemenules” y “Satsuma” y algunos de los híbridos regenerados. A) Análisis con marcadores cloroplásticos *1* Clemenules, *2-3* híbridos, *4* Satsuma. B) Análisis SSCP con marcadores cloroplásticos y mitocondriales. *1* Clemenules, *2-6* híbridos, *7* Satsuma.

#### 5.4 CONCLUSIONES.

- Se ha obtenido un híbrido somático alotetraploide entre la variedad de clementina “Clemenules” (*C. clementina* Hort. ex Tan.) y la variedad de satsuma “Ghusji Mill” (*C. unshiu*). Este genotipo resulta de elevado interés para la mejora de mandarinas considerando su posible utilización en cruces interploides para la obtención de híbridos triploides.

- El análisis molecular del híbrido somático alotetraploide ha evidenciado la presencia de todos los alelos detectados en sus parentales; apoyando así la hipótesis de que la pérdida de cromosomas y fragmentos subcromosómicos está influenciada por la distancia filogenética existente entre los genotipos parentales.

- Se han obtenido plantas diploides a partir de la fusión entre los dos parentales “Clemenules” y satsuma. No se ha conseguido ningún marcador que permita diferenciar los genomas citoplasmático de los dos parentales, por lo que no se ha podido demostrar molecularmente el carácter híbrido de las plantas diploides regeneradas. Sin embargo toda la bibliografía coincide en considerar a las mitocondrias procedentes del parental de callo (Satsuma en nuestro caso) como indispensables para la regeneración de plantas en las condiciones de cultivo empleadas, por lo que suponemos que las plantas regeneradas sean híbridos. La obtención de híbridos con núcleo de “Clemenules” y el citoplasma de satsuma resulta de particular interés para la mejora por la presencia del carácter *CMS* en el genoma citoplasmático de satsuma. También estos genotipos podrían emplearse para llevar a cabo estudios básicos sobre el papel de los orgánulos citoplasmáticos y sus interacciones con el núcleo.

## APÉNDICE

### LOS POLIMORFISMOS DE CONFORMACIÓN DE ADN MONOCATENARIO (SSCP) CÓMO HERRAMIENTA PARA IDENTIFICAR NUEVOS POLIMORFISMOS EN MARCADORES MICROSATÉLITES DE CÍTRICOS.

#### A.1 INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de marcadores moleculares adecuados es fundamental para la caracterización temprana de los híbridos somáticos obtenidos. Es deseable poder comprobar lo antes posible si las plantas regeneradas tienen la conformación genética esperada, tanto para optimizar los recursos dedicados al proceso de regeneración como para determinar el éxito de las fusiones realizadas. Desde el punto de vista de la especificidad de las secuencias analizadas, en la caracterización de híbridos somáticos de cítricos se han empleado principalmente dos clases de marcadores moleculares de DNA: los que permiten el análisis de múltiples regiones del genoma y los que están dirigidos a *loci* específicos. Al primer grupo pertenecen los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Forsberg y col. 1998), los ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Scarano y col. 2002) y los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Tian & Rose 1999; Guo y col. 2002). Del otro grupo de marcadores forman parte los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Roose 1988) y los SSR (Simple Sequence Repeats) (Cheng y col. 2002; Harding & Millam 2000).

En cítricos los marcadores microsatélites han sido empleados también en identificación varietal, en programas de mejora genética y en estudios taxonómicos o evolutivos. Fueron descritos por primera vez por Hamada y colaboradores (Hamada y col. 1982) y se definen como secuencias cortas de ADN constituidas por motivos de uno a seis nucleótidos repetidos en tándem. Se trata de secuencias que no se transcriben a ARN y que tienen función de regulación génica (Hamada y col. 1984) o actúan como señales para la conversión génica y la recombinación (Jeffreys y col. 1985). Estas secuencias son muy abundantes en el genoma de los eucariotas y además presentan un elevado polimorfismo, lo que justifica su frecuente empleo como marcadores. Para el análisis de regiones microsatélites existen diferentes técnicas moleculares, que difieren entre ellas por la naturaleza de los cebadores empleados para la amplificación.



Una de las técnicas utilizada para detectar polimorfismos en las regiones microsatélites es la denominada ISSR. Para su aplicación se diseñan cebadores complementarios a las repeticiones presentes en los microsatélites, anclados a los extremos 3' y 5' de los *loci* mediante 2-4 nucleótidos degenerados. Dada la naturaleza de los cebadores sólo se amplifican las regiones que contienen las secuencias repetidas en tándem. La inespecificidad parcial de los cebadores permite amplificar diferentes *loci* que contengan el motivo repetido en cuestión, lo que conlleva al análisis simultáneo de múltiples regiones del genoma. La variabilidad detectada con estos marcadores deriva de las diferencias en la longitud de la región microsatélite, así como cambios en los sitios de hibridación de los cebadores. Por ello no dan ninguna información sobre las regiones que flanquean los microsatélites que, aunque suelen estar muy conservadas, podrían presentar cambios de un genotipo a otro. Por su configuración estos marcadores son dominantes. Esta técnica ha permitido la caracterización de diferentes genotipos dentro de los cítricos y también de híbridos somáticos alotetraploides (Scarano y col. 2002).

La técnica SSRs se basa en la amplificación por PCR utilizando cebadores específicos dirigidos a las regiones que flanquean el microsatélite, que habitualmente están muy conservadas y no repetidas (Morgante y col. 2002). La variabilidad detectada al aplicar esta técnica es debida tanto a diferencias en la longitud de la región microsatélite como consecuencia de diferencias en el número de repeticiones del motivo principal, como a cambios (mutaciones, deleciones o inserciones) bien dentro del microsatélite o en las regiones que lo flanquean. La electroforesis de los fragmentos amplificados permite la visualización de todos los alelos para cada locus analizado, lo cual constituye una de sus principales ventajas y por ello este tipo de marcadores están considerados codominantes. Los SSR también han sido empleados para acotar genes de interés o QTL (*Quantitative Trait Loci*), facilitando así los trabajos de selección y mapeo de genes. Otras importantes ventajas de la técnica son su elevada reproducibilidad y los limitados costes que conlleva su aplicación. Por otro lado su mayor limitación consiste en las dificultades que presentan la identificación y caracterización de cada *locus* y el desarrollo de cebadores específicos (Hayden y col. 2001).

En cítricos se han descrito marcadores microsatélites tanto en el genoma nuclear como citoplasmático. Sin embargo no siempre es posible identificar polimorfismos entre los genotipos estudiados. Muchos *loci* resultan ser monomórficos para las especies

de interés o el polimorfismo no es detectable con las técnicas habituales de análisis, especialmente cuando se trata de diferencias en la secuencia de nucleótidos, no en el tamaño de los fragmentos amplificados.

La técnica SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*) se basa en la detección electroforética de variaciones de secuencia en alelos de un mismo *locus*, los cuales originan cambios en la conformación tridimensional del ADN (Nuez 2000). En otros términos, la técnica permite diferenciar productos de PCR con el mismo tamaño pero distinta secuencia sin necesidad de recurrir a la secuenciación. Tras la amplificación específica del *locus* de interés, el producto de PCR se desnaturaliza por calor y posteriormente se mantiene en frío para permitir que las cadenas de ADN adopten una conformación tridimensional, la cual depende directamente de su secuencia de nucleótidos. El análisis independiente de cada una de las cadenas de DNA plegadas mediante electroforesis a baja temperatura permite detectar mutaciones basadas tanto en diferencias en tamaño como en la secuencia de nucleótidos. Para poder detectar variaciones de secuencia de hasta un nucleótido el tamaño óptimo del fragmento de PCR debe de ser, en general, inferior a 400 pb, de forma que esa variación puntual conlleve un cambio detectable en el plegamiento de la cadena de DNA. Si la secuencia a analizar es de mayor tamaño se hace necesario cortar las secuencias con enzimas de restricción antes del análisis por SSCP.

Los SSCP han sido utilizados en cítricos para la identificación varietal con secuencias amplificadas a partir de ADN citoplasmático (Olivares-Fuster y col. 2007), pero principalmente se han aplicado para diferenciar secuencias de virus (Rubio y col. 1996; Gago-Zachert y col. 1999) o viroides (Palacio & Duran-Vila 1999) que afectan a los cítricos.

La hipótesis de este trabajo es que la aplicación de la técnica SSCP al análisis de secuencias microsatélites, que parecen “no polimórficas” **si analizadas por electroforesis convencional (con la técnica PAGE, por ejemplo)**, podría aumentar el grado de discriminación que es posible obtener con marcadores SSR, tanto en el caso en que las diferencias entre genotipos sean debidas a cambios en la secuencia de nucleótidos, como a pequeños cambios de tamaño del producto de PCR. Los SSCP son una alternativa menos costosa a la secuenciación directa **sobretudo para identificar polimorfismos puntuales o de tipo SNP** (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Si nuestra hipótesis resulta cierta, la técnica combinada SSR-SSCP (empleando la información de *loci* microsatélites ya disponibles) podría ser util **para el mapeo genetico comparado y el**

genotipado de diferentes especies, así como en la identificación varietal y por lo tanto en la caracterización de híbridos, tanto somáticos como sexuales.

## **A.2 MATERIALES Y METODOS.**

### **A.2.1 Material vegetal.**

Se recolectaron hojas de plantas de cidro “Córcega” (*Citrus medica* (L.)), clementina “Clemenules” (*C. clementina* (Hort. ex Tan)), zamboa “Chandler” (*C. grandis* ((L.) Osb)) y *Poncirus trifoliata* ((L.) Raf.) “Pomeroy” pertenecientes al banco de germoplasma del IVIA. También se recolectaron hojas de una planta haploide, una aneuploide y una autotetraploide de la misma variedad de clementina “Clemenules”. A partir de este material vegetal se extrajo el ADN total siguiendo el protocolo propuesto por Dellaporta y colaboradores (1983).

### **A.2.2 Amplificación por PCR y electroforesis en geles de agarosa.**

Se seleccionaron 25 cebadores diferentes, cada uno específico para un locus microsatélite. Los cebadores utilizados están definidos en la tabla A.1.

La PCR se realizó en un termociclador Termocicler Ep gradient S de Eppendorf en un volumen final de 17  $\mu$ l. Cada mezcla de reacción estaba compuesta por tampón 750 mM tris HCl (pH 9) 50 mM KCl 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,0001% BSA, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de cada dNTP premezclados, 0,2  $\mu$ M de cada cebador, 0,8 unidades de Taq polimerasa y 10 ng de ADN. El programa de PCR utilizado constó de una fase de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de: 94°C durante 1 minuto, 30 segundos de la temperatura de anillamiento específica de cada cebador y 72°C durante 1 minuto, y una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa MS-8 al 3% (Pronadisa®, Conda, Madrid). Las bandas correspondientes se visualizaron mediante tinción en bromuro de etidio y los geles se fotografiaron bajo luz ultravioleta. De esta forma se pudo comprobar el tamaño de los productos amplificados y también se pudo estimar su concentración en base a la intensidad de las bandas.

**Tabla A.1.** Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los respectivos loci microsatélites.

Target	Nombre	Reverse Primer	Secuencia (5'-3')	Forward Primer	Secuencia (5'-3')	T°C hibridación
DNA	MConting 0780		CTTATCTTCTCCAATACGCC		GAGTCACATCTCCAATCTCAA	50
DNA	MConting 4534		ATGTTCAGGCGAGTTCCT		CATAATCGTTGACCCATCTC	50
DNA	MConting 0150		TATGGAGCAGAATAGAGAGCA		GTTAGCCACGAAGAAATCC	50
DNA	MConting 5168		AACTCTTGGACTTGGTAATGT		TTGTGTTGATTTGTTATTGGA	50
DNA	MConting 1758		GCATTCATACCATTTCGG		GGGAAGACAGAGAGAAGAAGA	50
DNA	mest 7		TCAAAGAACCAAAGGAAAAACA		TTTTGCCGAAATTTGTGTGAAC	50
DNA	mest 15		GCCTCGCATTCTTTGACTC		TTATTACGAAGCGGAGGTGG	50
DNA	mest 75		GGTTCACTCCTAACCCGTGA		TCGAGCAAATTCGTCACAAG	50
DNA	mest 92		TGCTGCTAACCCACAGACAG		CGCAGCTTTTGCATGTTTTA	50
DNA	mest 1388		ACGGCAGCAACGAGATAAGT		AAAACAAAGCACCCAGATCG	50
DNA	cac 15		GATAGGAAGCGTCGTAGACCC		TAAATCTCCACTCTGCAAAGC	55
DNA	mest 89		ATTTGGAGCCATTGTTGGAG		CAATTGTGTGCCAAGGCTTA	50
DNA	Ci 1 D 10		ATGGGGATGGGTGATGAAT		AAGCGACGAAATAGAGAG	50
DNA	Ci 02 B 11		CAAAGTAAATAGGGTGTGAG		GTATTTGGCGTGATGAA	40
DNA	Ci 02 B 07		TTGGAGAACAGGATGG		CAGCTCAACATGAAAGG	40
DNA	mest 60		GGAAGTGGCTTCATATGGGA		TCTGGCAGGGGTTTATTTTG	50
DNA	mest 14		AAGCCCAACCATGTTGTTTC		TCCCTCTCTCCCACTCAGA	50
DNA	mest 51		TGGCTGGTAAAGTTGTCACG		AGCCAAGGCAGGAAAGAAAT	50
DNA	mest 101		AAGGGGCTGTTTCTCTCTCTG		TTTGCCAACTAAACCCTCTC	55
DNA	mest 20		TAAACTCCAGGCACCCTC		AAAAACACCTGTGGGACAGC	50
DNA	mest 9		TGCCGGTATTCTTGATTTTC		CGATACCGCAGAAGAAGGAG	50
DNA	mest 22		GGTGCTTGTGATACTCCCA		AACACATCACAACGACGGA	50
DNA	mest 103		CCAGCCACAGAGTTTTCACA		CCGTTGCGGTCTACCATTAT	50
DNA	mest 119		TTCTGATCCCAAGAACCAG		CTACCTTAGAGGGTTGGGGC	50
DNA	Ci 02 F 03		TAAAGCGCATGGATACT		TATCGACAACCTTTTCTCAT	40

### A.2.3 Análisis SSCP de los productos de PCR.

Se mezclaron entre 1 y 3 µl del producto de PCR (en función de la concentración estimada) con 5 µl de buffer desnaturizante (95% de formamide, 0,025% bromophenol blue y 0,25% Xylene cyanol) y se desnaturizó durante 10 minutos a 98°C. Los tubos se pasaron rápidamente a hielo y se mantuvieron en frío durante 1 minuto. Cinco µl del producto desnaturizado se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de polyacrilamida no-desnaturizante (Amersham Biosciences®, Piscataway, USA), rehidratado con SSCP Buffer A pH 9.0 (Amersham Biosciences®). La electroforesis se realizó en un GenePhor electrophoresis unit (Amersham

Bioscences®) en condiciones de temperatura constante de 5°C y 90 V, 6 mA, 5 W durante los primeros 25 minutos y 500 V, 14 mA, 10 W durante los siguientes 45 minutos.

Los fragmentos separados se visualizaron mediante tinción con plata según el protocolo de Benbouza y colaboradores (2006), tal y como queda descrito en el apartado 1.2.10.3. Una vez teñidos los geles se fotografiaron con una cámara digital Nikon coolpix (Nikon®, Japan).

#### **A.2.4 Clonación y secuenciación.**

Los productos de PCR originados tras amplificación de los *loci* microsatelites MCounting 0780 y Mest 75 fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% para comprobar que el ADN obtenido era del tamaño esperado. El ADN se purificó con UltraPure™ Buffer- phenol saturated (Invitrogen®, California, USA). Alícuotas de los ADNs obtenidos se ligaron al vector de clonación pGem-T (Promega Corporation®, Wisconsin, USA). Para ello se mezclaron 4 µl de ligase reaction buffer, 1 µl de vector pGem-T, 3 µl del producto de PCR, 1 µl de T4 DNA Ligase y 11 µl H<sub>2</sub>O. La mezcla se dejó durante 12 horas a una temperatura de 15°C. Con los productos de ligación se transformaron células competentes DH5α' de *Escherichia coli* mediante electroporación utilizando un ECM 630 (BTX®, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA). Las células se sembraron en medios selectivos LB con ampicilina (anejo) a partir de las cuales se realizaron cultivos líquidos de colonias independientes. Se obtuvieron preparaciones de plásmidos recombinantes purificando las células transformadas a través un kit de Miniprep (Quiagen®, Duesseldorf, Germany). A partir de los plásmidos purificados se comprobó la presencia de los insertos mediante una PCR utilizando los mismos cebadores y en las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente.

Los insertos se sometieron a análisis de secuenciación mediante el secuenciador ABI PRISM DNA 377 (Perkin- Elmer®). Este trabajo fue llevado a cabo por el servicio de secuenciación de ADN de la Universidad Politécnica de Valencia.

Las secuencias se alinearon utilizando el programa ClustalW (Thompson y col. 1994), que permitió su comparación.

### A.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Con la finalidad de llevar a cabo un análisis objetivo del poder de discriminación introducido al aplicar la técnica SSCP al análisis de regiones microsátélites, los productos de PCR generados tras su amplificación se analizaron por tres métodos. Además de con la técnica objeto de este estudio, dichos productos fueron analizados mediante una técnica que supuestamente presenta un menor poder de resolución (análisis en geles de agarosa), así como por la técnica que indudablemente ofrece el mayor grado de diferenciación, la secuenciación directa.

Los genotipos utilizados en este estudio incluyen una zamboa y un cidro que son dos de las tres especies ancestrales del género *Citrus* (Barrett & Rhodes 1976; Scora 1988; Federici y col. 1998). También se incluyen una clementina, que es una especie de elevada importancia económica y de origen más reciente a partir de un cruce entre naranjo y mandarino, este último se considera la tercera especie ancestral de los cítricos cultivados. Los tres genotipos utilizados presentan una elevada distancia filogenética, por lo que resulta mucho más probable encontrar polimorfismos entre ellos y además los resultados obtenidos podrán ser generalizables a otros genotipos.

También se ha utilizado un genotipo del género *Poncirus*, que es uno de los más afines al género *Citrus*, y que proporcionará información del desarrollo evolutivo de los *loci* analizados en otro género.

En las figuras A1.A, A2.A y A3.A se presenta el análisis genético de algunos de los productos de PCR en geles de agarosa. En ninguno de los casos presentados este tipo de electroforesis ha permitido distinguir los cuatro genotipos analizados. Por otro lado, las figuras A1.B, A2.B y A3.B presentan los resultados obtenidos tras aplicar la técnica SSCP a los mismos productos amplificados de regiones microsátélites.

Observando estas imágenes resulta evidente que la aplicación de la técnica SSCP permite aumentar notablemente el nivel de discriminación entre las muestras analizadas. En la tabla A.2 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de los 25 *loci* microsátélites analizados para las cuatro especies seleccionadas, tanto en geles de agarosa como mediante SSCP. Empleando la electroforesis en geles de agarosa se han encontrado diferencias solamente en el 11% de todas las posibles combinaciones. Por otro lado, tras aplicar la técnica SSCP el porcentaje de combinaciones discriminadas entre los genotipos estudiados ha aumentado hasta el 75%. En la evaluación de estos

datos hay que tener en cuenta el limitado poder discriminante y la baja resolución que es posible obtener con la electroforesis en gel de agarosa.

Para algunos de los *loci* analizados solamente se ha podido discriminar uno de los cuatros genotipos (véase por ejemplo los *loci* Mest 7 ó Ci02B07), mientras que para otros el nivel de discriminación aplicando la técnica SSCP se ha incrementado desde el 0% en agarosa hasta el 100% (véase por ejemplo los *loci* Mest 75 y MCounting 0780). En ninguno de los casos analizados el nivel de discriminación entre las dos técnicas ha sido igual, siendo mayor siempre cuando se analizaron los productos de PCR mediante la técnica SSCP.

Para comprobar que las diferencias detectadas tras aplicar la técnica SSCP eran reales, se llevó a cabo la secuenciación de algunos de los productos de PCR analizados. Algunas de las secuencias obtenidas se muestran en las figuras A4 y A5.

Al comparar las secuencias amplificadas con el cebador Mest 75 existen diferencias entre cada uno de los genotipos analizados (figura A2.B); en algunos casos, como por ejemplo entre la variedad “Chandler” y *Poncirus*, hay una diferencia de tres nucleótidos en el tamaño de los fragmentos amplificados. Por otro lado entre *Poncirus* y *Clemenules* no hay diferencias de tamaño y solamente hay un cambio de T por A y de A por C, respectivamente. Estos últimos cambios no serían detectables con ningún otro tipo de electroforesis, ya que la migración de estos dos fragmentos sería idéntica si no se aplicara la técnica de SSCP.

Como era de esperar, la pérdida de tres nucleótidos suele producir cambios mucho más evidentes en los perfiles de bandas obtenidos con SSCP (figura A2.B *Poncirus* vs “Chandler”) que los cambios de un nucleótidos por otro (figura A2.B *Poncirus* vs “Clemenules”). Sin embargo la posición que ocupan las bases mutadas en el interior de la secuencia puede ser un factor determinante en la conformación espacial que adopta la molécula y consecuentemente en su migración por electroforesis. Si comparamos la migración de “Chandler” vs “Córcega” observamos una mayor diferencia que comparando la migración de “Clemenules” vs “Poncirus”, aunque en ambos casos la diferencia entre los genotipos es la sustitución de dos nucleótidos. En la primera comparación los dos cambios se encuentran distanciados 4 nucleótidos, mientras que en la segunda comparación la distancia entre los cambios es superior a 30 nucleótidos. Esto sugiere la hipótesis que en el primer caso los cambios podrían afectar solamente a una pequeña parte de la conformación espacial de la molécula, mientras que en el segundo

caso la región afectada podría ser mayor, y de ahí que las diferencias en la electroforesis sean más evidentes.

En la figura A5 se muestran las secuencias de los fragmentos generados por PCR con el cebador MCounting 0780. El tamaño de los productos de PCR obtenidos es idéntico para cada uno de los genotipos analizados; esto significa que no sería posible diferenciar por electroforesis convencional ninguno de ellos, ni siquiera empleando geles de acrilamida ni un secuenciador automático que analizara el tamaño de las bandas como picos. Sin embargo, el análisis con SSCP permite encontrar diferencias entre los cuatro genotipos. La secuenciación ha puesto en evidencia que estos genotipos se diferencian únicamente en una o dos bases, como es el caso de “Clemenules”, “Córcega” y “Chandler”. El cambio de una base por otra se define como SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) y resulta muy complicado de identificar sin recurrir a la secuenciación.

En el caso del *Poncirus* las diferencias con respecto a los otros genotipos afectan a un mayor número de bases, 10 en total, pero al ser el tamaño del fragmento completo idéntico solamente se pueden detectar aplicando el análisis SSCP. La presencia de estos 10 cambios en el genotipo *Poncirus* determina que en su perfil de bandas las diferencias sean más evidentes con respecto a los otros tres genotipos.

Los datos obtenidos con estos dos marcadores demuestran que existe una correlación directa entre lo que se observa en los geles SSCP y las mutaciones que se observan en la secuencia. Tanto el número de mutaciones como su posición en la secuencia determinan cambios en la conformación espacial de la molécula, que se traducen en cambios en la migración durante la electroforesis.

La diferencia de tamaño que se ha observado entre los fragmentos obtenidos por amplificación del locus Mest 75 (figura A4) es imputable a cambios en el número de repeticiones del motivo AAG. Sin embargo, los otros cambios detectados tanto en el locus Mest 75 como en el MCounting 0780, son imputables a SNPs que se encuentran en las regiones microsatélites y más frecuentemente en las regiones flanqueantes. El hecho de que se considere habitualmente que las regiones flanqueantes de los motivos repetidos están muy conservadas aumenta el valor del descubrimiento de estos cambios y con ello el de la técnica SSCP, dado que permite detectarlos sin recurrir a la secuenciación.

El elevado nivel de polimorfismos que se consiguen aplicando la técnica SSCP puede ser de gran utilidad para estudiar plantas con diferentes niveles de ploidía y



determinar su origen y estructura genética. Por este motivo se han analizado los locus Mest 75 y MCounting 0780 en plantas haploides, aneuploides y tetraploides de clementina “Clemenules” que aparentemente no mostraban polimorfismos para estos locus. En las figuras A2.B y A3.B se muestra el resultado obtenido con este análisis.

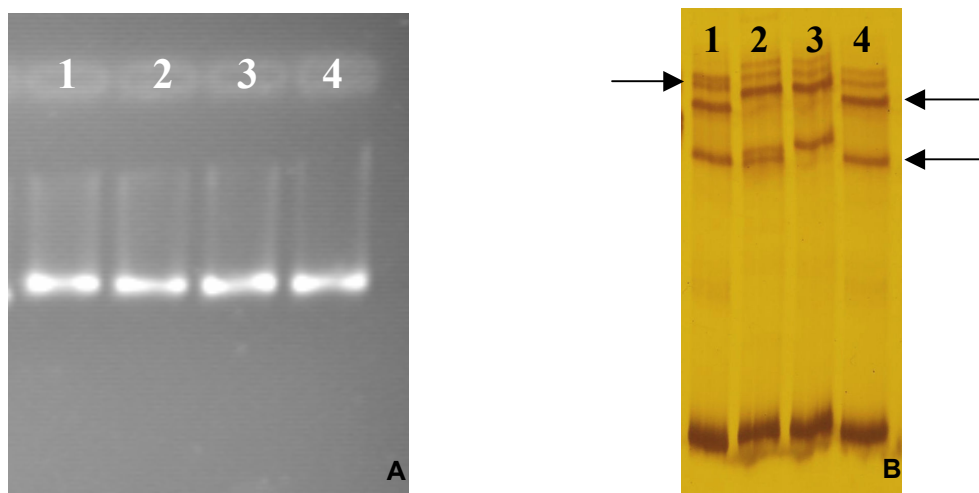
Solamente se detectaron diferencias utilizando el cebador MCounting 0780 y únicamente para los dos genotipos haploides; en este caso estos genotipos se diferencian con respecto a los otros genotipos y también entre ellos. Este resultado es imputable a que las plantas haploides presentan un solo alelo del locus analizado, y demuestra que este locus no se encuentra en homocigosis en las plantas diploides de Clemenules, como parecía evidente tras el análisis convencional por SSR. Aunque la heterocigosis de este locus no se puede detectar directamente a partir del análisis con SSCP de la planta diploide, su comparación con los perfiles generados por las plantas haploides indica su presencia. Este resultado es muy interesante porque puede ser aplicado para estudiar la estructura genética de la planta. De esta forma es posible determinar el nivel real de heterocigosis de los genotipos estudiados, sobre todo si éste está determinado por cambios puntuales en las secuencias homólogas. **Hay que destacar que los perfiles generados por las plantas diploides no resultan como la adición directa de los perfiles generados por las plantas haploides; esto significa que los SSCP no son marcadores codominantes y por tanto su interpretación puede resultar bastante compleja.**

La detección de SNPs a través de la técnica SSCP ha sido descrita por diferentes autores (Dong & Zhu 2005; Sato & Nishio 2002), sin embargo no se había estudiado su potencialidad en la detección de diferencias en *loci* microsatélites tradicionalmente considerados monomórficos, especialmente cuando están dirigidos a las regiones flanqueantes de los motivos repetidos. En análisis genéticos de cítricos la técnica SSCP ha sido empleada para detectar variabilidad en regiones del genoma que se consideran muy conservadas, como son los genomas mitocondrial y citoplasmático (Olivares-Fuster y col. 2007).

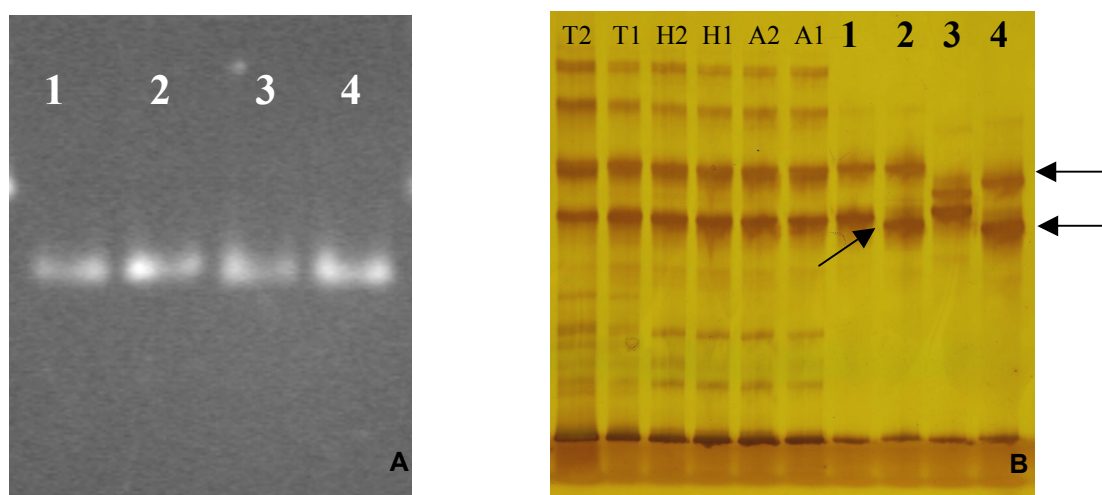
La principal ventaja que conlleva el uso de la técnica SSCP es la de permitir detectar polimorfismos que ni los SSR ni los ISSR permiten detectar. Un claro ejemplo son los cambios de secuencia en las regiones flanqueantes, sobre todo si se trata de SNPs, siendo hasta ahora la única alternativa posible para detectarlos sin recurrir a la secuenciación del fragmento. Entre las ventajas que conlleva la aplicación de la técnica SSR-SSCP hay que destacar su elevada reproducibilidad (datos no mostrados), facilidad de aplicación, rapidez y menor coste cuando se compara con la secuenciación.

El aumento en el nivel de discriminación detectado en este estudio al aplicar la técnica SSR-SSCP indica que existe un elevado grado de polimorfismo dentro de estas regiones, y que en la mayoría de los casos ésta no se detecta mediante las técnicas de electroforesis o análisis en secuenciadores habitualmente empleadas.

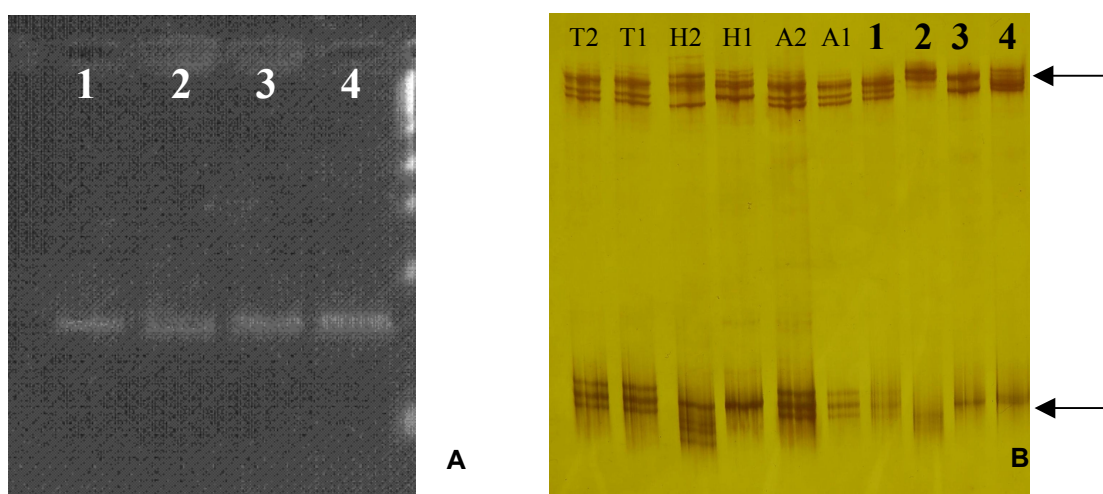
La posibilidad de detectar cambios en las regiones más conservadas, permite aumentar el número de marcadores discriminantes disponibles, los cuales pueden ser de gran utilidad en estudios de carácter filogenético, mapeo cromosómico, etiquetamiento de genes de interés ó caracterización de híbridos (somáticos y sexuales).



**Figura A1.** Análisis genético del *locus* microsatélite Mest 92 realizado a través electroforesis en gel de agarosa (A) y aplicando la técnica de SSCP (B). 1 clementina “Clemenules”; 2 *Poncirus trifoliata*; 3 cidro “Córcega”; 4 zamboa “Chandler”. Las flechas indican los polimorfismos detectados.



**Figura A2.** Análisis genético del *locus* microsatélite Mest 75 realizado a través electroforesis en gel de agarosa (A) y aplicando la técnica de SSCP (B). 1 clementina “Clemenules”; 2 *Poncirus trifoliata*; 3 cidro “Córcega”; 4 zamboa “Chandler”; A1, A2 aneuploides “Clemenules”; H1, H2 haploides “Clemenules”; T1, T2 tetraploides “Clemenules”. Las flechas indican los polimorfismos detectados.



**Figura A3.** Análisis genético del *locus* microsatélite MCounting 0780 realizado a través electroforesis en gel de agarosa (A) y aplicando la técnica de SSCP (B). 1 clementina “Clemenules”; 2 *Poncirus trifoliata*; 3 cidro “Córcega”; 4 zamboa “Chandler”; A1, A2 aneuploides “Clemenules”; H1, H2 haploides “Clemenules”; T1, T2 tetraploides “Clemenules”. Las flechas indican los polimorfismos detectados.

Primer	SSCP				Agarosa			
	Clemenules	Poncirus	Córcega	Chandler	Clemenules	Poncirus	Córcega	Chandler
MConting 0780	+	+	+	+	-	-	-	-
MConting 4534	+	+	+	+	-	-	-	-
MConting 0150	+	+	-	-	-	-	-	-
MConting 5168	+	+	+	+	-	-	-	-
MConting 1758	+	+	+	+	-	-	-	-
mest 7	+	-	-	-	-	-	-	-
mest 15	+	+	+	+	-	-	-	+
mest 75	+	+	+	+	-	-	-	-
mest 92	+	+	+	+	-	-	-	-
mest 1388	-	+	+	-	-	+	-	-
cac 15	+	+	+	+	-	+	-	-
mest 89	+	+	+	+	-	-	-	-
Ci 1 D 10	+	+	+	+	-	+	-	-
Ci 02 B 11	+	+	+	+	+	-	-	-
Ci 02 B 07	+	-	-	-	-	-	-	-
mest 60	-	+	-	-	-	-	-	-
mest 14	-	+	+	-	-	+	-	-
mest 51	+	-	+	-	+	-	-	-
mest 101	+	+	+	+	-	+	-	-
mest 20	+	+	+	+	-	-	-	-
mest 9	+	-	-	+	-	-	-	-
mest 22	-	+	-	-	-	-	-	-
mest 103	+	+	+	+	+	-	-	+
mest 119	-	-	+	-	-	-	-	-
Ci 02 F 03	+	+	+	+	+	-	-	-

**Tabla A.2.** Resumen de los resultados obtenidos realizando la electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa y aplicando la técnica SSCP. Los símbolos + y - indica respectivamente si se ha podido o no se ha podido diferenciar el genotipo de los otros, utilizando el cebador específico. En amarillo están los cebadores que han sido utilizados para la secuenciación de los productos de PCR.

### MEST 75

```

Clemenules  CACGACGTTGTAAAACGACTCGAGCAAATTCGTCACAAGTGGTCGCACAAAAGTCATTTC 60
Poncirus    CACGACGTTGTAAAACGACTCGAGCAAATTCGTCACAAGTGGTCGCACAAAAGTCATTTC 60
Corcega     CACGACGTTGTAAAACGACTCGAGCAAATTCGTCACAAGTGGTCGCACAAAAGTCATTTC 60
Chandler    CACGACGTTGTAAAACGACTCGAGCAAATTCGTCACAAGTGGTCGCACAAAAGTCATTTC 60
*****

Clemenules  CCAAGAGAAAAGTTTCCCTGGCAAGAACAAGAAGAAGAAGAAGAGTGAAGTAAAATGAG 120
Poncirus    CCAAGAGAAAAGTTTCCCTGGCAAGAACAAGAAGAAGAAGAAGAAGTAGTGAATAATGAG 120
Corcega     CCAAGAGAAAAGTTTCCCTGGCAAGAACAAGAAGAAGAAGTAGTGAATAATGAG 117
Chandler    CCAAGAGAAAAGTTTCCCTGGCAAGAACAAGAAGAAGAAGTAGTGAATAATGAG 117
*****

Clemenules  CCGGAGACCGACGTGGAGTCACGGGTTAGGAGTGAACC 158
Poncirus    CCGGAGACCGACGTGGAGTCACGGGTTAGGAGTGAACC 158
Corcega     CCGGAGACCGACGTGGAGTCACGGGTTAGGAGTGAACC 155
Chandler    CCGGAGACCGACGTGGAGTCACGGGTTAGGAGTGAACC 155
*****

```

**Figura A4.** Secuencia de los productos de PCR generados tras la amplificación con el cebador Mest 75 para los cuatros genotipos analizados. Las secuencias han sido analizadas y comparadas por medio del programa Clustal. Se han evidenciado con colores diferentes los cambios encontrados en los cuatros genotipos analizados.

## MCounting 0780

Clemenules	CTTATCTTCTCCAAATACGCCGTGGCGACCCCTTTTCTCTTCTCATCCGCAGTCTCCTCC	60
Poncirus	CTTATCTTCTCCAAATACGCCGTGGCGACCTTTTCTCTTCTCATCCGCAGTCTCCTCC	60
Corcega	CTTATCTTCTCCAAATACGCCGTGGCGACCCCTTTTCTCTTCTCATCCGCAGTCTCCTCC	60
Chandler	CTTATCTTCTCCAAATACGCCGTGGCGACCCCTTTTCTCTTCTCATCCGCAGTCTCCTCC	60
	*****	
Clemenules	TCCTCCTCCTCGCCCTCGCTCTCCTCCGGACCGGATTTCTCAACTTCGTCGTATAATCT	120
Poncirus	TCCTCCTCCTCGCCCTCGCTCTCCTCCGGACCGGATTTCTCAACTTCGTCGTATAATCT	120
Corcega	TCCTCCTCCTCGCCCTCGCTCTCCTCCGGACCGGATTTCTCAACTTCGTCGTATAATCT	120
Chandler	TCCTCCTCCTCGCCCTCGCTCTCCTCCGGACCGGATTTCTCAACTTCGTCGTATAATCT	120
	*****	
Clemenules	TCTGAGTCTGCGGACTCAATATCATCGTCATCGTAGTCAATTTTCTCCTTTTCTTTGGT	180
Poncirus	TCTGATTTCTGCTGACTCAATATCATCATCATAGTAGTCAATTTTCTCCTTTTCTTTGGT	180
Corcega	TCTGAGTCTGCGGACTCAATATCATCGTCATCGTAGTCAATTTTCTCCTTTTCTTTGGT	180
Chandler	TCTGAGTCTGCGGACTCAATATCATCGTCATCGTAGTCAATTTTCTCCTTTTCTTTGGT	180
	*****	
Clemenules	TCCCCGCAAAAAATGGATCTTGATTAATCGAGAATTTTCCCTTGCCCCTTGGGGCTGGC	240
Poncirus	TCCCCGCAAAAAATGGATCTTGCTTAAATCGAGAGTTTCCCTTGCCCCTTGGGGCTGGC	240
Corcega	TCCCCGCAAAAAATGGATCTTGATTAATCGAGAATTTTCCCTTGCCCCTTGGGGCTGGC	240
Chandler	TCCCCGCAAAAAATGGATCTTGATTAATCGAGAATTTTCCCTTGCCCCTTGGGGCTGGC	240
	*****	
Clemenules	CCCTTTTCTTTGTGTTTTTATACTTCATGATTCTACCAGTGTGACAATAGAAGTTTCGA	300
Poncirus	CCCTTTTCTTTGTGTTTTTATACTTCATGATTCTACCAGTGTGACATAGAAGTTTCGA	300
Corcega	CCCTTTTCTTTGTGTTTTTATACTTCATGATTCTACCAGTGTGACAATAGAAGTTTCGA	300
Chandler	CCCTTTTCTTTGTGTTTTTATACTTCATGATTCTACCAGTGTGACAATAGAAGTTTCGT	300
	*****	
Clemenules	GTATTTTCAGTTGCGACTCTATTTGGATGTCCGAAAGTATCGGAAAAAATGCCGTTGAGA	360
Poncirus	GTATTTTCAGTTGCGACTCTATTTGGATGTCCGAAAGTATCGGAAAAAATGCCGTTGAGA	360
Corcega	GTATTTTCAGTTGCGACTCTATTTGGATGTCCGAAAGTATCGGAAAAAATGCCGTTGAGA	360
Chandler	GTATTTTCAGTTGCGACTCTATTTGGATGTCCGAAAGTATGGAAAAAATGCCGTTGAGA	360
	*****	
Clemenules	TTGGAGATGTGACTCA	376
Poncirus	TTGGAGATGTGACTCA	376
Corcega	TTGGAGATGTGACTCA	376
Chandler	TTGGAGATGTGACTCA	376
	*****	

**Figura A5.** Secuencia de los productos de PCR generados tras la amplificación con el cebador MCounting 0780 para los cuatros genotipos analizados. Las secuencias han sido analizadas y comparadas por medio del programa Clustal. Se han evidenciado con colores diferentes los cambios encontrados en las secuencias de los cuatros genotipos analizados.

#### **A.4 CONCLUSIONES.**

- La aplicación de la técnica SSCP a productos de PCR de microsatélites ha aumentado la tasa de discriminación en loci que parecían monomórficos tras análisis con electroforesis convencional.
  
- Con la aplicación de esta técnica es posible detectar polimorfismos determinados por SNPs en productos de PCR de tamaño idéntico.
  
- Tanto el número de mutaciones encontradas como su posición en la secuencia podrían determinar cambios en la conformación espacial de la molécula, que se traducen en cambios en la migración durante la electroforesis.
  
- Se han detectado cambios en regiones supuestamente muy conservadas como son las regiones que flanquean los microsatélites. Este resultado resulta de particular interés para realizar estudios filogenéticos, mapeo cromosómico, etiquetamiento de genes de interés o caracterización de híbridos (somáticos y sexuales).

## FINAL CONCLUSIONS

- A somatic hybridization protocol has been established based on electrical protoplast fusion; the electric parameters have been optimized to our culture conditions and plant materials by comparing the effect of different direct current (DC) pulse voltages and different number of fusion cycles. Percentage of heterokaryon formation, number of embryos regenerated and number of plants obtained proved that 180 V and 2 cycles were the best fusion conditions.
- A direct comparative study about the efficiency of the three fusion procedures (electrical, chemical and electrochemical) was carried out for the first time. All parameters analyzed confirmed that the electrical method is the most efficient in our working conditions and applied to the genotypes used.
- For the first time somatic hybrids between *C. macrophylla* and citrange “Carrizo” have been obtained. These new allotetraploid genotypes could be interesting rootstocks for the citriculture, especially in Spain and the Mediterranean area.
- Morphological, flow cytometry and molecular analysis were carried out on somatic hybrids to study their genetic structure. Chromosome and sub-chromosome changes were observed and studied. The great variability observed between hybrids plants proved that somatic hybridization should lead to important genetic variation. Thus detailed molecular analysis is a basic requirement to select somatic hybrid genotype for evaluation in a genetic improvement program.
- The study of mesophyll and callus protoplasts treated with UV-C light proved that UV reduces cell multiplication and viability in a dose-dependent way. Leaf protoplast result to be more sensible to this kind of radiation.
- Flow cytometry and gel electrophoresis analysis proved that UV radiation is able to produce fragmentation and degradation of nuclear ADN as observed in apoptosis cells. Apoptosis phenomena could also cause spontaneous fragmentation in leaf protoplast.

- A new protocol for protoplast isolation from Clementine leaves has been established. The influence of plant material, plant culture and isolation conditions were studied to improve isolation efficiency from clementine leaves. The new protocol was successfully applied to other mandarin genotypes.
- The new protocol was used to obtain a new allotetraploid hybrid plant between satsuma and clementine “Clemenules”. This hybrid plant could be useful in interploid crosses with selected diploid genotypes to produce new seedless triploid hybrids.
- Diploid plants were obtained from the fusion between “Clemenules” and satsuma. It was impossible to prove at the molecular level the cybrid nature of these plants; but based on bibliographical references and morphological traits, we suppose that we obtained for the first time cybrids plants with nuclear genome from clementine “Clemenules” and cytoplasmic genome from satsuma. Satsuma male sterility has a cytoplasmic determinism, so it is possible that this new genotype expresses this sterility type without altering “Clemenules” variety traits
- The highly discriminative SSCP technique was applied to SSRs molecular markers to detect polymorphisms in presumably monomorphic loci. SNPs were successfully detected and the number of polymorphisms was greatly increased applying the SSCP technique.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abas, Y., Touil, N., Kirsch-Volders, M., Angenon, G., Jacobs, M. & Famelaer, I.D.H. 2007, "Evaluation of UV damage at DNA level in *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts using single cell gel electrophoresis", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 91, no. 2, pp. 145-154.
- Akagi, H., Taguchi, T. & Fujimura, T. 1995, "Stable Inheritance and Expression of the Cms Traits Introduced by Asymmetric Protoplast Fusion", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 91, no. 4, pp. 563-567.
- Akagi, H., Sakamoto, M., Negishi, T. & Fujimura, T. 1989, "Construction of Rice Cybrid Plants", *Molecular & General Genetics*, vol. 215, no. 3, pp. 501-506.
- Aleza, P. 2008. "Obtención de híbridos triploides de cítricos". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. Valencia. España.
- Asins, M.J., Juarez, J., Pina, J.A., Puchades, J., Carbonell, E.A., Navarro, L. 2002. "Nulessin, una nueva clementina". *Levante Agrícola*. 359: 36-40.
- Assani, A., Chabane, D., Haicour, R., Bakry, F., Wenzel, G. & Foroughi-Wehr, B. 2005, "Protoplast fusion in banana (*Musa* spp.): Comparison of chemical (PEG : Polyethylene glycol) and electrical procedure", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 83, no. 2, pp. 145-151.
- Atanassov, A., Dimantov, A., Atanassov, I., Dragoeva, A., Vassileva, Z., Vitanov, V., Jankulova, M., Djilianov, D. 1991. "Transfer of resistance to tomato spotted wilt virus from wild *Nicotiana* species to *N. tabacum* via somatic hybridization". *Physiol Plant* 82: A 23, poster session 8, N° 130.
- Ballester, A., Cervera, M. & Pena, L. 2008, "Evaluation of selection strategies alternative to nptII in genetic transformation of citrus", *Plant Cell Reports*, vol. 27, no. 6, pp. 1005-1015.
- Barber, J. & Andersson, B. 1992, "Too Much of A Good Thing - Light Can be Bad for Photosynthesis", *Trends in biochemical sciences*, vol. 17, no. 2, pp. 61-66.
- Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R. & Federici, C.T. 2006, "Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs)", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 112, no. 8, pp. 1519-1531.
- Barr, C.M., Neiman, M. & Taylor, D.R. 2005, "Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals", *New Phytologist*, vol. 168, no. 1, pp. 39-50.
- Barrett, H.C. & Rhodes, A.M. 1976, "A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives", *Systematic Botany*, vol. 1, no. 2, pp. 105-136.
- Barrett, H.C. 1974, "Colchicine-Induced Polyploidy in Citrus", *Botanical Gazette*, vol. 135, no. 1, pp. 29-41.
- Bassene, J.B., Berti, L., Carcouet, E., Dhuique-Mayer, C., Fanciullino, A.L., Bouffin, J., Ollitrault, P. & Froelicher, Y. 2008, "Influence of mitochondria origin on fruit quality in a Citrus cybrid", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 18, pp. 8635-8640.

- Bates, G.W. 1990, "Asymmetric Hybridization between *Nicotiana-Tabacum* and *Nicotiana-Repanda* by Donor Recipient Protoplast Fusion - Transfer of Tmv Resistance", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 80, no. 4, pp. 481-487.
- Bates, G.W., Hasenkampf, C.A., Contolini, C.L. & Piastuch, W.C. 1987, "Asymmetric Hybridization in *Nicotiana* by Fusion of Irradiated Protoplasts", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 74, no. 6, pp. 718-726.
- Bates, G.W. 1985, "Electrical Fusion for Optimal Formation of Protoplast Heterokaryons in *Nicotiana*", *Planta*, vol. 165, no. 2, pp. 217-224.
- Benbouzas, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P., Mergeai, G. 2006. "Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels". *Biotchnol. Agron. Soc. Environ.* 10(2): 77-81.
- Bonnett, H.T., Djurberg, I., Fajardo, M. & Glimelius, K. 1993, "A Mutation Causing Variegation and Abnormal-Development in Tobacco Is Associated with An Altered Mitochondrial-Dna", *Plant Journal*, vol. 3, no. 4, pp. 519-525.
- Boscariol, R.L., Monteiro, M., Takahashi, E.K., Chabregas, S.M., Vieira, M.L.C., Vieira, L.G.E., Pereira, L.F.P., Mourão Filho, F.de A., Cardoso, S.C., Christiano, R.S.C., Bergamin Filho, A., Barbosa, J.M., Azevedo, F.A. & Mendes, B.M.J. 2006, "*Attacin* A gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 131, no. 4, pp. 530-536.
- Bové, J.M. 2006, "Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus", *Journal of Plant Pathology*, vol. 88, no. 1, pp. 7-37.
- Breto, M.P., Ruiz, C., Pina, J.A. & Asins, M.J. 2001, "The diversification of *Citrus clementina* hort. ex tan., a vegetatively propagated crop species", *Molecular phylogenetics and evolution*, vol. 21, no. 2, pp. 285-293.
- Button, J. 1978, "Effects of Some Carbohydrates on Growth and Organization of Citrus Ovular Callus", *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, vol. 88, no. 1, pp. 61-68.
- Cabasson, C.M., Luro, F., Ollitrault, P. & Grosser, J.W. 2001, "Non-random inheritance of mitochondrial genomes in Citrus hybrids produced by protoplast fusion", *Plant Cell Reports*, vol. 20, no. 7, pp. 604-609.
- Cai, X.D., Fu, J., Deng, X.X. & Guo, W.W. 2007, "Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile Satsuma mandarin and two seedy Citrus cultivars", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 90, no. 3, pp. 275-283.
- Calabrese, F. 1998. "La favolosa storia degli agrumi". pp. 172. L'EPOS. Palermo. Italia.
- Cameroon, J.W., Soost, R.K. 1982. "Breeding and development". California Agriculture 36: 11-12: CR-4.
- Cameroon, J.W., Frost, H.B. 1968. "Genetic, breeding and nucellar embryony". En: Reuther, W.; Batchelor, L.D.; Webber, H.J. (eds) the Citrus Industry. V2. University of California, Berkeley, U.S.A..

- Cardi, T. & Earle, E.D. 1997, "Production of new CMS Brassica oleracea by transfer of 'Anand' cytoplasm from B-rapa through protoplast fusion", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 94, no. 2, pp. 204-212.
- Caruso, M., Federici, C.T., Roose, M.L. 2008. "EST-SSR markers for asparagus genetic diversity evaluation and cultivar identification". *Mol Breeding* 21:195-204.
- Cervera, M., Juarez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Duran-Vila, N., Navarro, L. & Pena, L. 1998, "Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage", *Transgenic research*, vol. 7, no. 1, pp. 51-59.
- Chen, C.X., Zhou, P., Choi, Y.A., Huang, S. & Gmitter, F.G., J. 2006, "Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs", *TAG Theoretical and Applied Genetics*, vol. 112, no. 7, pp. 1248-1257.
- Chen, L.Z. & Adachi, T. 1998, "Protoplast fusion between *Lycopersicon esculentum* and *L-peruvianum*-complex: somatic embryogenesis, plant regeneration and morphology", *Plant Cell Reports*, vol. 17, no. 6-7, pp. 508-514.
- Cheng, A., Cui, H. & Xia, G. 2006, "Construction of a primary RH panel of Italian ryegrass genome via UV-induced protoplast fusion", *Plant Biology*, vol. 8, no. 5, pp. 673-679.
- Cheng, Y.J., De Vicente, M.C., Meng, H.J., Guo, W.W., Tao, N.G. & Deng, X.X. 2005, "A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in Citrus and related genera", *Tree physiology*, vol. 25, no. 6, pp. 661-672.
- Cheng, Y.J., Guo, W.W. & Deng, X.X. 2003, "Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*) plus Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*) intergeneric somatic hybrids", *Plant Cell Reports*, vol. 21, no. 5, pp. 445-451.
- Cheng, Y.J., Guo, W.W. & Deng, X.X. 2003c, "cpSSR: A new tool to analyze chloroplast genome of Citrus somatic hybrids", *Acta Botanica Sinica*, vol. 45, no. 8, pp. 906-909.
- Cheng, Y.J., Guo, W.W. & Deng, X.X. 2002, "Molecular characterization of cytoplasmic and nuclear genomes in phenotypically abnormal Valencia orange (*Citrus sinensis*)+Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia*); intergeneric somatic hybrids", *Plant Cell Reports*, vol. 21, no. 5, pp. 445-451.
- Choi, Y.A., Tao, R., Yonemori, K. & Sugiura, A. 2002, "Multi-color genomic in situ hybridization identifies parental chromosomes in somatic hybrids of *Diospyros kaki* and *D-glandulosa*", *HortScience*, vol. 37, no. 1, pp. 184-186.
- Cocking, E.C. 1960. "A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles". *Nature* 187: 962-963.
- Cohen, G.M., Sun, X.M., Fearnhead, H., Macfarlane, M., Brown, D.G., Snowden, R.T. & Dinsdale, D. 1994, "Formation of Large Molecular-Weight Fragments of Dna is a Key Committed Step of Apoptosis in Thymocytes", *Journal of Immunology*, vol. 153, no. 2, pp. 507-516.
- Cooper, C., Chapot, H., 1977. "Fruit production with special emphasis on fruit for processing". En: Nagy, S., Show, P.E. Veldhuis, M.K. (eds) *Citrus Science and Technology*, pp 1-27. vol II. AVI Publ., Westport, Connecticut, U.S.A..

Creemersmolenaar, J., Hall, R.D. & Krens, F.A. 1992, "Asymmetric Protoplast Fusion Aimed at Intraspecific Transfer of Cytoplasmic Male-Sterility (Cms) in *Lolium-Perenne* L", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 84, no. 5-6, pp. 763-770.

Daniell, H., Khan, M.S. & Allison, L. 2002, "Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology", *Trends in plant science*, vol. 7, no. 2, pp. 84-91.

Danon, A., Rotari, V.I., Gordon, A., Mailhac, N. & Gallois, P. 2004, "Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 1, pp. 779-787.

Danon, A. & Gallois, P. 1998, "UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*", *FEBS letters*, vol. 437, no. 1-2, pp. 131-136.

Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T. & Traganos, F. 1997, "Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis)", *Cytometry*, vol. 27, no. 1, pp. 1-20.

Dellaporta, J., Hicks, J.B. 1983. "A plant DNA miniprep: version II". *Plant Molecular Biology Reports*. 1: 19-21.

Deng, Z., Deng, X.X., Zhang, W.C., Wan, S.Y. 1992. "A preliminary report on gametosomatic fusion in citrus". *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 1: 170-172.

Deng, X.X., Grosser, J.W. & Gmitter, F.G. 1992, "Intergeneric Somatic Hybrid Plants from Protoplast Fusion of *Fortunella-Crassifolia* Cultivar Meiwa with *Citrus-Sinensis* Cultivar Valencia", *Scientia Horticulturae*, vol. 49, no. 1-2, pp. 55-62.

Derks, F.H.M., Hakkert, J.C., Verbeek, W.H.J. & Colijnhooymans, C.M. 1992, "Genome Composition of Asymmetric Hybrids in Relation to the Phylogenetic Distance between the Parents - Nucleus-Chloroplast Interaction", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 84, no. 7-8, pp. 930-940.

Dewald, S.G. & Moore, G.A. 1987, "Somaclonal Variation As A Tool for the Improvement of Perennial Fruit Crops", *Fruit Varieties Journal*, vol. 41, no. 2, pp. 54-57.

Dhont, A., Grivet, L., Feldmann, P., Rao, S., Berding, N. & Glaszmann, J.C. 1996, "Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp) by molecular cytogenetics", *Molecular & General Genetics*, vol. 250, no. 4, pp. 405-413.

Díaz, M., Echenique, V., Schrauf, G., Cardone, S., Polci, P., Lutz, E. & Spangenberg, G. 2004, "Biotechnology and genetic improvement of forage species", *RIA, Revista de Investigaciones Agropecuarias*, vol. 33, no. 3, pp. 77-104.

Dominguez, A., Cervera, M., Perez, R.M., Romero, J., Fagoaga, C., Cubero, J., Lopez, M.M., Juarez, J.A., Navarro, L. & Pena, L. 2004, "Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies", *Molecular Breeding*, vol. 14, no. 2, pp. 171-183.

Dominguez, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P. & Pena, L. 2000, "Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus", *Plant Cell Reports*, vol. 19, no. 4, pp. 427-433.

- Dong, Y.B. & Zhu, H.D. 2005, "Single-strand conformational polymorphism analysis - Basic principles and routine practice", *Hypertension: Methods and Protocols*, vol. 108, pp. 149-157.
- Dragoeva, A., Atanassov, I., Jankulova, M., Atanassova, S. & Atanassov, A. 1997, "Asymmetric somatic hybridization between *N-tabacum* and *N-sanderae*: Transfer of Tomato Spotted Wilt Virus resistance", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 11, no. 1-2, pp. 17-22.
- Dudits, D., Maroy, E., Praznovszky, T., Olah, Z., Gyorgyey, J. & Cella, R. 1987, "Transfer of Resistance Traits from Carrot into Tobacco by Asymmetric Somatic Hybridization - Regeneration of Fertile Plants", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 23, pp. 8434-8438.
- Dudits, D., Fejer, O., Hadlaczky, G., Koncz, C., Lazar, G.B. & Horvath, G. 1980, "Intergeneric Gene-Transfer Mediated by Plant Protoplast Fusion", *Molecular & General Genetics*, vol. 179, no. 2, pp. 283-288.
- Durán-Vila, N., Ortega, C., Olivares-Fuster, O., Navarro, L. 2005. "Crioconservación de germoplasma de cítricos". *Phytoma*. 170: 24-26.
- Engelmann, F., Dambier, D. & Ollitrault, P. 1994, "Cryopreservation of Cell-Suspensions and Embryogenic Calluses of Citrus using a Simplified Freezing Process", *Cryo-Letters*, vol. 15, no. 1, pp. 53-58.
- Fagoaga, C., Vidal, A., Pina, J.A., Lliso, L., Tadeo, F.R., Talón, M., García-Martínez, J.L., Navarro, L., Peña, L. 2003. "Engineering of gibberelin levels in *Citrus* by sense and antisense expresión of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture". En VI Int. Congr. of Plant Molecular Biology. Barcelona. Spain.
- Fagoaga, C., Rodrigo, I., Conejero, V., Hinarejos, C., Tuset, J.J., Arnau, J., Pina, J.A., Navarro, L. & Pena, L. 2001, "Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5", *Molecular Breeding*, vol. 7, no. 2, pp. 175-185.
- Fanciullino, A.L., Gancel, A.L., Froelicher, Y., Luro, F., Ollitrault, P. & Brillouet, J.M. 2005, "Effects of nucleo-cytoplasmic interactions on leaf volatile compounds from citrus somatic diploid hybrids", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 11, pp. 4517-4523.
- Fang, D.Q., Federici, C.T. & Roose, M.L. 1998, "A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf", *Genetics*, vol. 150, no. 2, pp. 883-890.
- Fang, D., Roose, M.L. 1996. "Fingerprinting Citrus cultivars with Inter-SSR markers". Proc. Int. Soc. Citriculture. 1: 185-188.
- Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W. & Roose, M.L. 1998, "Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 96, no. 6-7, pp. 812-822.
- Fehér, A., Preiszner, J., Litkey, Z., Csanádi, G. & Dudits, D. 1992, "Characterization of chromosome instability in interspecific somatic hybrids obtained by X-ray fusion between potato (<i>Solanum tuberosum</i>) and <i>S. brevidens</i>", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 84, no. 7-8, pp. 880-890.

- Filek, M., Holda, M., Machackova, I. & Krekule, J. 2005, "The effect of electric field on callus induction with rape hypocotyls", *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, vol. 60, no. 11-12, pp. 876-882.
- Forner, J.B., Forner, M.A., Alcaide, A., Verdejo-Lucas, S. & Sorribas, F.J. 2003. New hybrid citrus rootstocks released in Spain. Proc. Int. Citrus Congress, Int. Soc. Citriculture, Orlando, Florida. 1:58-61.
- Forsberg, J., Dixelius, C., Lagercrantz, U. & Glimelius, K. 1998a, "UV dose-dependent DNA elimination in asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*", *Plant Science*, vol. 131, no. 1, pp. 65-76.
- Forsberg, J., Lagercrantz, U. & Glimelius, K. 1998b, "Comparison of UV light, X-ray and restriction enzyme treatment as tools in production of asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 96, no. 8, pp. 1178-1185.
- Froelicher, Y., Dambier, D., Bassene, J.B., Costantino, G., Lotfy, S., Didout, C., Beaumont, V., Brottier, P., Risterucci, A.M., Luro, F. & Ollitrault, P. 2008, "Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco)", *Molecular Ecology Resources*, vol. 8, no. 1, pp. 119-122.
- Froelicher Y., Dambier D., Costantino G., Lotfy S., Didout C, Beaumont V., Brottier P., Risterucci A.M., Luro F., Ollitrault P. 2007. "Characterization of microsatellite markers in *Citrus reticulata* Blanco". *Molecular Ecology Note*.
- Froelicher, Y. 1999. "Organisation de la diversité dans le genre *Clausena* Burm.f. (RUTACEAE) et modalité de son exploitation en création variétal". Tesis doctoral. Université de Paris-sud UFR Scientifique D'Orsay. Paris. Francia.
- Froneman, I.J., Breedt, H.J. & Koekemoer, P.J.J. 1996, "Promising seedless citrus selections from the ITSC mutation breeding programme", *Inligtingsbulletin - Instituut vir Tropiese en Subtropiese Gewasse*, , pp. 12-16.
- Frost, H.B., Soost R.K., 1968. "Seed reproduction, development of gametes and embryos". P. 290-324. Reuther, W.; Batchelor, L.D.; Webber, H.J. (eds) the Citrus Industry. VI. University of California, Berkeley, U.S.A..
- Fu, C.H., Guo, W.W., Liu, J.H. & Deng, X.X. 2003, "Regeneration of *Citrus sinensis* (+) *Clausena lansium* intergeneric triploid and tetraploid somatic hybrids and their identification by molecular markers", *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 39, no. 3, pp. 360-364.
- Gago-Zachert, S., Costa, N., Semorile, L. & Grau, O. 1999, "Sequence variability in p27 gene of citrus tristeza virus (CTV) revealed by SSCP analysis", *EJB, Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 2, no. 1, pp. 1-8.
- Galbraith, D.W., Afonso, C.L. & Harkins, K.R. 1984, "Flow sorting and culture of protoplasts: conditions for high-frequency recovery, growth and morphogenesis from sorted protoplasts of suspension cultures of *Nicotiana*.", *Plant Cell Reports*, vol. 3, no. 4, pp. 151-155.
- Galiana, A. 1995 "Obtención y cultivo de protoplastos de cítricos". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. Valencia. España.

- García, R., Asins, M.J., Forner, J. & Carbonell, E.A. 1999, "Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 99, no. 3, pp. 511-518.
- Gavrilenko, T., Thieme, R. & Tiemann, H. 1999, "Assessment of genetic and phenotypic variation among intraspecific somatic hybrids of potato, *Solanum tuberosum* L.", *Plant Breeding*, vol. 118, no. 3, pp. 205-213.
- Gerdemannknorck, M., Nielen, S., Tzschetzsch, C., Iglisch, J. & Schieder, O. 1995, "Transfer of Disease Resistance within the Genus *Brassica* through Asymmetric Somatic Hybridization", *Euphytica*, vol. 85, no. 1-3, pp. 247-253.
- Germanà, M.A. 2007, "Haploidy" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 167-196.
- Germana, M.A., Wang, Y.Y., Barbagallo, M.G., Iannolino, G. & Crescimanno, F.G. 1994, "Recovery of Haploid and Diploid Plantlets from Anther Culture of *Citrus-Clementina Hort Ex Tan* and *Citrus-Reticulata Blanco*", *Journal of Horticultural Science*, vol. 69, no. 3, pp. 473-480.
- Ghorbel, R., Dominguez, A., Navarro, L. & Pena, L. 2000, "High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus", *Tree physiology*, vol. 20, no. 17, pp. 1183-1189.
- Ghorbel, R., Juárez, J., Navarro, L. & Peña, L. 1999, "Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 99, no. 1, pp. 350-358.
- Gilmour, D.M., Davey, M.R. & Cocking, E.C. 1989, "Production of Somatic Hybrid Tissues Following Chemical and Electrical Fusion of Protoplasts from Albino Cell-Suspensions of *Medicago-Sativa* and *Medicago-Borealis*", *Plant Cell Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 29-32.
- Gleba, Y.Y.] & Sytnik, K.M. 1984, *Protoplast fusion - genetic engineering in higher plants*, .
- Gmitter, F.G., Jr., Grosser, J.W., Castle, W.S. & Moore, G.A. 2007, "A comprehensive citrus genetic improvement programme" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 9-18.
- Gmitter, F.G., J., Xiao, S.Y., Huang, S., Hu, X.L., Gamsey, S.M. & Deng, Z. 1996, "A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 92, no. 6, pp. 688-695.
- Gmitter, F.G., Ling, X.B., Cai, C.Y. & Grosser, J.W. 1991, "Colchicine-Induced Polyploidy in Citrus Embryogenic Cultures, Somatic Embryos, and Regenerated Plantlets", *Plant Science*, vol. 74, no. 1, pp. 135-141.
- Gmitter, F.G., Ling, X.B. & Deng, X.X. 1990, "Induction of Triploid Citrus Plants from Endosperm Calli In vitro", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 80, no. 6, pp. 785-790.
- Golmirzaie, A.M., Tenorio, J. & Serquén, F. 1991, "Organelle transfer (mitochondria) for the production of cybrid potatoes and their possible use as TPS parental lines; Report of the planning conference on application of molecular techniques to potato germplasm enhancement, International Potato Center", , pp. 121.
- Gong, J.P., Traganos, F. & Darzynkiewicz, Z. 1994, "A Selective Procedure for Dna Extraction from Apoptotic Cells Applicable for Gel-Electrophoresis and Flow-Cytometry", *Analytical Biochemistry*, vol. 218, no. 2, pp. 314-319.

- Green, R.M., Vardi, A. & Galun, E. 1986, "The Plastome of Citrus - Physical Map, Variation Among Citrus Cultivars and Species and Comparison with Related Genera", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 72, no. 2, pp. 170-177.
- Grosser, J.W., Deng, X.X. & Goodrich, R.M. 2007, "Somaclonal variation in sweet orange: practical applications for variety improvement and possible causes" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 219-233.
- Grosser, J.W. & Gmitter, F.C. 2005, "2004 SIVB Congress Symposium Proceedings "Thinking outside the cell": Applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model", *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 41, no. 3, pp. 220-225.
- Grosser, J.W. & Chandler, T.L. 2004, "Production of twelve new allotetraploid somatic hybrid citrus breeding parents with emphasis on late maturity and cold-hardiness", *Journal of the American Pomological Society*, vol. 58, no. 1, pp. 21-28.
- Grosser, J.W., Medina-Urrutia, V., Ananthakrishnan, G. & Serrano, P. 2004, "Building a replacement sour orange rootstock: Somatic hybridization of selected mandarin plus pummelo combinations", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 129, no. 4, pp. 530-534.
- Grosser, J.W. & Chandler, J.L. 2000, "Somatic hybridization of high yield, cold-hardy and disease resistant parents for citrus rootstock improvement", *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, vol. 75, no. 6, pp. 641-644.
- Grosser, J.W., Ollitrault, P. & Olivares-Fuster, O. 2000a, "Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement", *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 36, no. 6, pp. 434-449.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G., Tusa, N., Recupero, G.R. & Cucinotta, P. 1996a, "Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion", *Plant Cell Reports*, vol. 15, no. 9, pp. 672-676.
- Grosser, J.W., MouraoFo, F.A.A., Gmitter, F.G., Louzada, E.S., Jiang, J., Baergen, K., Quiros, A., Cabasson, C., Schell, J.L. & Chandler, J.L. 1996b, "Allotetraploid hybrids between citrus and seven related genera produced by somatic hybridization", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 92, no. 5, pp. 577-582.
- Grosser, J.W. 1994, "Observations and Suggestions for Improving Somatic Hybridization by Plant Protoplast Isolation, Fusion, and Culture", *HortScience*, vol. 29, no. 11, pp. 1241-1243.
- Grosser, J.W. 1993, "*Citrus* scion and rootstock improvement via somatic hybridization", *Acta Horticulturae*, , pp. 297-305.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G., Louzada, E.S. & Chandler, J.L. 1992a, "Production of Somatic Hybrid and Autotetraploid Breeding Parents for Seedless Citrus Development", *HortScience*, vol. 27, no. 10, pp. 1125-1127.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G., Sesto, F., Deng, X.X. & Chandler, J.L. 1992b, "6 New Somatic Citrus Hybrids and Their Potential for Cultivar Improvement", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 117, no. 1, pp. 169-173.



- Grosser, J.W. & Gmitter, F.G. 1990a, "Somatic Hybridization of Citrus with Wild Relatives for Germplasm Enhancement and Cultivar Development", *HortScience*, vol. 25, no. 2, pp. 147-151.
- Grosser, J.W. & Gmitter, F.G., Jr. 1990b, "Protoplast fusion and citrus improvement" in , pp. 339-374.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G., Tusa, N. & Chandler, J.L. 1990c, "Somatic Hybrid Plants from Sexually Incompatible Woody Species - Citrus-Reticulata and Citropsis-Gilletiana", *Plant Cell Reports*, vol. 8, no. 11, pp. 656-659.
- Grosser, J.W., Moore, G.A. & Gmitter, F.G. 1989, "Interspecific Somatic Hybrid Plants from the Fusion of Key Lime (Citrus-Aurantifolia) with Valencia Sweet Orange (Citrus-Sinensis) Protoplasts", *Scientia Horticulturae*, vol. 39, no. 1, pp. 23-29.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G. & Chandler, J.L. 1988a, "Intergeneric Somatic Hybrid Plants from Sexually Incompatible Woody Species - Citrus-Sinensis and Severinia-Disticha", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 75, no. 3, pp. 397-401.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G. & Chandler, J.L. 1988b, "Intergeneric Somatic Hybrid Plants of Citrus-Sinensis Cv Hamlin and Poncirus-Trifoliata Cv Flying Dragon", *Plant Cell Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 5-8.
- Grosser, J.W. & Chandler, J.L. 1987, "Aseptic Isolation of Leaf Protoplasts from Citrus, Poncirus, Citrusxponcirus Hybrids and Severinia for Use in Somatic Hybridization Experiments", *Scientia Horticulturae*, vol. 31, no. 3-4, pp. 253-257.
- Guardiola, J.L., García Luis, A., 1990. "Fisiología vegetal I: Nutrición y transporte". De Síntesis. pp 440.
- Guo, W.W., Wu, R.C., Cheng, Y.J. & Deng, X.X. 2007, "Production and molecular characterization of Citrus intergeneric somatic hybrids between red tangerine and citrange", *Plant Breeding*, vol. 126, no. 1, pp. 72-76.
- Guo, W.W. & Grosser, J.W. 2005, "Somatic hybrid vigor in Citrus: Direct evidence from protoplast fusion of an embryogenic callus line with a transgenic mesophyll parent expressing the GFP gene", *Plant Science*, vol. 168, no. 6, pp. 1541-1545.
- Guo, W.W., Prasad, D., Cheng, Y.J., Serrano, P., Deng, X.X. & Grosser, J.W. 2004a, "Targeted cybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness", *Plant Cell Reports*, vol. 22, no. 10, pp. 752-758.
- Guo, W.W., Prasad, D., Serrano, P., Gmitter, F.G. & Grosser, J.W. 2004b, "Citrus somatic hybridization with potential for direct tetraploid scion cultivar development", *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, vol. 79, no. 3, pp. 400-405.
- Guo, W.W., Cheng, Y.J. & Deng, X.X. 2002, "Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between Citrus reticulata and Poncirus trifoliata", *Plant Cell Reports*, vol. 20, no. 9, pp. 829-834.
- Guo, W.W. & Deng, X.X. 2001, "Wide somatic hybrids of Citrus with its related genera and their potential in genetic improvement", *Euphytica*, vol. 118, no. 2, pp. 175-183.
- Guo, W.W., Deng, X.X. & Yi, H.L. 2000, "Somatic hybrids between navel orange (Citrus sinensis) and grapefruit (C-paradisi) for seedless triploid breeding", *Euphytica*, vol. 116, no. 3, pp. 281-285.

- Guo, W.W. & Deng, X.X. 1999, "Intertribal hexaploid somatic hybrid plants regeneration from electrofusion between diploids of *Citrus sinensis* and its sexually incompatible relative, *Clausena lansium*", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 98, no. 3, pp. 581-585.
- Guo, W.W., Deng, X.X. & Shi, Y.Z. 1998, "Optimization of electrofusion parameters and interspecific somatic hybrid regeneration in citrus", *Acta Botanica Sinica*, vol. 40, no. 5, pp. 417-424.
- Hall, R.D., Rouwendal, G.J.A. & Krens, F.A. 1992a, "Asymmetric Somatic-Cell Hybridization in Plants .1. the Early Effects of (Sub)lethal Doses of Uv and Gamma-Radiation on the Cell Physiology and Dna Integrity of Cultured Sugar-Beet (*Beta-Vulgaris* L) Protoplasts", *Molecular & General Genetics*, vol. 234, no. 2, pp. 306-314.
- Hall, R.D., Rouwendal, G.J.A. & Krens, F.A. 1992b, "Asymmetric Somatic-Cell Hybridization in Plants .2. Electrophoretic Analysis of Radiation-Induced Dna Damage and Repair Following the Exposure of Sugar-Beet (*Beta-Vulgaris* L) Protoplasts to Uv and Gamma-Rays", *Molecular & General Genetics*, vol. 234, no. 2, pp. 315-324.
- Hamada, H., Seidman, M., Howard, B.H. & Gorman, C.M. 1984, "Enhanced Gene-Expression by the Poly(dt-Dg) . Poly(dc-Da) Sequence", *Molecular and cellular biology*, vol. 4, no. 12, pp. 2622-2630.
- Hamada, H., Petrino, M.G. & Kakunaga, T. 1982, "A Novel Repeated Element with Z-Dna-Forming Potential is Widely found in Evolutionarily Diverse Eukaryotic Genomes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, vol. 79, no. 21, pp. 6465-6469.
- Handa, T. & Oogaki, C. 1985, "Numerical Taxonomic Study of Citrus I and Fortunella Swingle Using Morphological Characters - Application of Multivariate-Analysis", *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, vol. 54, no. 2, pp. 145-154.
- Harding, K. & Millam, S. 2000, "Analysis of chromatin, nuclear DNA and organelle composition in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum sanctae-rosae*", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 101, no. 5-6, pp. 939-947.
- Hartung, J.S., Beretta, J., Brlansky, R.H., Spisso, J. & Lee, R.F. 1994, "Citrus Variegated Chlorosis-Bacterium - Axenic Culture, Pathogenicity, and Serological Relationships with Other Strains of *Xylella-Fastidiosa*", *Phytopathology*, vol. 84, no. 6, pp. 591-597.
- Hassanein, A.M., Fayez, K.A. & Ahmed, A.M. 1998, "Physiological studies on nuclear-organelle interaction of cybrid plants containing *Solanum nigrum* genome and *Solanum tuberosum* plastome", *Phyton-Annales Rei Botanicae*, vol. 37, no. 2, pp. 167-179.
- Hayden, M. J., Sharp, P. J. 2001. "Sequence-tagged microsatellite profiling (STMP): a rapid technique for developing SSR markers". *Nucleic Acids Res.* April 15; 29(8): e43.
- Hensz, R.A. 1971, "Star Ruby, a new deep-red-fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics", *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society*, vol. 25, pp. 54-58.
- Herrero, R., Asins, M.J., Carbonell, E.A. & Navarro, L. 1996, "Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae .1. Intraspecies and intragenus genetic variability", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 92, no. 5, pp. 599-609.

- Hidaka, T., Moriguchi, T., Motomura, T., Katagi, S. & Omura, M. 1995, "Development of A New Electrode Chamber and Its Efficiency in Protoplast Fusion in Citrus", *Breeding Science*, vol. 45, no. 2, pp. 237-239.
- Hidaka, T. & Omura, M. 1992, "Regeneration of Somatic Hybrid Plants Obtained by Electrical Fusion Between Satsuma Mandarin (Citrus-Unshiu) and Rough Lemon (C-Jambhiri) Or Yuzu (C-Junos)", *Japanese Journal of Breeding*, vol. 42, no. 1, pp. 79-89.
- Hidaka, T., Omura, M., Ugaki, M. & Tomiyama, M. 1990, "Agrobacterium-Mediated Transformation and Regeneration of Citrus Spp from Suspension Cells", *Japanese Journal of Breeding*, vol. 40, no. 2, pp. 199-207.
- Imamura, J., Saul, M.W. & Potrykus, I. 1987, "X-Ray-Irradiation Promoted Asymmetric Somatic Hybridization and Molecular Analysis of the Products", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 74, no. 4, pp. 445-450.
- Iwamasa, M. 1966. "Studies on the sterility in the genus Citrus with special reference to the seedlessness". *Bulletin of the Horticulture Research Station*. 6: 1-81.
- Iwamasa, M., Iwasaki, T. 1962. "On the sterility phenomenon caused by low temperatures in the Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle)". *Bulletin of the Horticulture Research Station*. 2: 25-46.
- Iwanami, T., Shimizu, T., Ito, T. & Hirabayashi, T. 2004, "Tolerance to citrus mosaic virus in transgenic trifoliolate orange lines harboring capsid polyprotein gene", *Plant Disease*, vol. 88, no. 8, pp. 865-868.
- Jaskani, M.J., Omura, M. & Khan, I.A. 2007, "Cytogenetics" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 151-165.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. 1985, "Individual-Specific Fingerprints of Human Dna", *Nature*, vol. 316, no. 6023, pp. 76-79.
- Jensen, W.A. 1962. "Botanical Histochemistry". pp. 480. (ed) W.H. Freeman, San Francisco, CA, U.S.A.
- Juarez, J., Aleza, P., Olivares-Fuster, O., Navarro, L. 2004. "Recovery of tetraploid clementine plants (*citrus clementine* hort. ex Tan.) by in vitro colchicine treatment of shoot tips". *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1, 151-154.
- Kameya, T. 1979. "Studies on plant cell fusion: effect of dextran and pronase E on fusion". *Cytologia* 44: 235-246.
- Kaneyoshi, J., Kanou, T., Kuwata, Y., Hirao, A., Nakatani, S. & Kobayashi, S. 1997, "Breeding of triploid citrus cultivars .1. Production of triploids from satsuma mandarin (Citrus unshiu Marc) x tetraploid ponkan mandarin (Citrus reticulata Blanco) crosses", *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, vol. 66, no. 1, pp. 9-14.
- Kaneyoshi, J., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Shigemoto, N. & Doi, Y. 1994, "A Simple and Efficient Gene-Transfer System of Trifoliolate Orange (Poncirus-Trifoliata Raf)", *Plant Cell Reports*, vol. 13, no. 10, pp. 541-545.
- Kao, K.N. & Saleem, M. 1986, "Improved Fusion of Mesophyll and Cotyledon Protoplasts with Peg and High Ph-Ca-2+ Solutions", *Journal of Plant Physiology*, vol. 122, no. 3, pp. 217-225.

- Kao, K.N. & Michayluk, M.R. 1974, "A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts", *Planta*, vol. 115, no. 4, pp. 355-367.
- Keller, W.A., Melchers, G. 1973. "The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion". *Z Naturforsch* 20: 737-741.
- Kihara, H. 1982. "Importance of cytoplasm in plant genetics". *Cytologia* 47: 435-450.
- Kijas, J.M.H., Thomas, M.R., Fowler, J.C.S. & Roose, M.L. 1997, "Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 94, no. 5, pp. 701-706.
- Kisaka, H., Kisaka, M., Kanno, A. & Kameya, T. 1997, "Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare* L.) and carrot (*Daucus carota* L.)", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 94, no. 2, pp. 221-226.
- Kisaka, H. & Kameya, T. 1994, "Production of Somatic Hybrids Between *Daucus-Carota* 1 and *Nicotiana-Tabacum*", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 88, no. 1, pp. 75-80.
- Kobayashi, S., Ohgawara, T., Saito, W., Nakamura, Y. & Omura, M. 1997, "Production of triploid somatic hybrids in citrus", *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, vol. 66, no. 3-4, pp. 453-458.
- Kobayashi, S., Ohgawara, T., Fujiwara, K. & Oiyama, I. 1991, "Analysis of Cytoplasmic Genomes in Somatic Hybrids Between Navel Orange (*Citrus-Sinensis* Osb) and Murcott Tangor", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 82, no. 1, pp. 6-10.
- Kobayashi, S. & Ohgawara, T. 1988, "Production of Somatic Hybrid Plants Through Protoplast Fusion in Citrus", *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly*, vol. 22, no. 3, pp. 181-188.
- Kobayashi, S., Ohgawara, T., Ohgawara, E., Oiyama, I. & Ishii, S. 1988, "A Somatic Hybrid Plant Obtained by Protoplast Fusion Between Navel Orange (*Citrus-Sinensis*) and Satsuma Mandarin (*Citrus-Unshiu*)", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 14, no. 2, pp. 63-69.
- Kobayashi, S., Uchimiya, H. & Ikeda, I. 1983, "Plant-Regeneration from Trovita Orange Protoplasts", *Japanese Journal of Breeding*, vol. 33, no. 2, pp. 119-122.
- Kochoba, J., Spiegelroy, P., Neumann, H. & Saad, S. 1978, "Stimulation of Embryogenesis in Citrus Ovular Callus by Aba, Ethephon, Ccc and Alar and Its Suppression by Ga<sup>3</sup>", *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, vol. 89, no. 5, pp. 427-432.
- Kochba, J., Spiegel-Roy, P. & Safran, H. 1972, "Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus", *Planta*, vol. 106, no. 3, pp. 237-245.
- Kochevenko, A.S., Rudas, V.A. & Ratushnyak, Y.I. 1999, "Use of cytoplasmic hybrids for analysis of a chlorophyll deficiency mutation in *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum*", *Russian Journal of Genetics*, vol. 35, no. 1, pp. 52-57.
- Kovtun, Y.V., Korostash, M.A., Butsko, Y.V. & Gleba, Y.Y. 1993, "Amplification of Repetitive Dna from *Nicotiana-Plumbaginifolia* in Asymmetric Somatic Hybrids between *Nicotiana-Sylvestris* and *Nicotiana-Plumbaginifolia*", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 86, no. 2-3, pp. 221-228.
- Krueger, R.R. & Navarro, L. 2007, "Citrus germplasm resources" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 45-140.

- Kumar, A. & Cocking, E.C. 1987, "Protoplast Fusion - A Novel-Approach to Organelle Genetics in Higher-Plants", *American Journal of Botany*, vol. 74, no. 8, pp. 1289-1303.
- Kunitake, H., Mii, M. 1995. "Somatic embryogenesis in *Citrus* species". En Bajaj, Y. P. S., ed. Somatic embryogenesis and synthetic seed I. *Biotechnology in agriculture and forestry*, Berlin, Springer-Verlag; 30: 280-298.
- Kvam, E. & Tyrrell, R.M. 1997, "Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation", *Carcinogenesis*, vol. 18, no. 12, pp. 2379-2384.
- Lande, R. & Thompson, R. 1990, "Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits", *Genetics*, vol. 124, no. 3, pp. 743-756.
- Larkin, P.J. & Scowcroft, W.R. 1981, "Somaclonal Variation - A Novel Source of Variability from Cell-Cultures for Plant Improvement", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 60, no. 4, pp. 197-214.
- Latado, R.R., Cristofani-Yaly, M., de Carvalho, C.R. & Machado, M.A. 2007, "Citrus autotetraploid plants obtained by in vitro treatment with colchicine", *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 42, no. 10, pp. 1429-1435.
- Lee, L.S., Gillespie, D., Shaw, R. 1990. "Prospects for using Citrus tetraploids as rootstocks". Proc. 3<sup>th</sup> Int. Soc. Citriculture. Nurserymen: 198-203.
- Lee, L.S. 1988, "Citrus Polyploidy - Origins and Potential for Cultivar Improvement", *Australian Journal of Agricultural Research*, vol. 39, no. 4, pp. 735-747.
- Li, X. 1997. "Cultivo in vitro de especies afines a los cítricos". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. Valencia. España.
- Ling, P., Duncan, L.W., Deng, Z., Dunn, D., Hu, X., Huang, S. & Gmitter, F.G., J. 2000, "Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 100, no. 7, pp. 1010-1017.
- Liu, J.H., Xu, X.Y. & Deng, X.X. 2005, "Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 82, no. 1, pp. 19-44.
- Liu, J.H. & Deng, X.X. 2002, "Regeneration and analysis of citrus interspecific mixoploid hybrid plants from asymmetric somatic hybridization", *Euphytica*, vol. 125, no. 1, pp. 13-20.
- Liu, J.H. & Deng, X.X. 2000, "Preliminary analysis of cytoplasmic genome of diploid somatic hybrid derived from fusion between rough lemon and Hamlin sweet orange", *Acta Botanica Sinica*, vol. 42, no. 1, pp. 102-104.
- Liu, J.H. & Deng, X.X. 1999, "Production of hybrid calluses via donor-recipient fusion between *Microcitrus papuana* and *Citrus sinensis*", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 59, no. 2, pp. 81-87.
- Liu, J.H., Landgren, M. & Glimelius, K. 1996, "Transfer of the *Brassica tournefortii* cytoplasm to *B-napus* for the production of cytoplasmic male sterile *B-napus*", *Physiologia Plantarum*, vol. 96, no. 1, pp. 123-129.
- Lotfy, S., Luro, F., Carreel, F., Froelicher, Y., Rist, D. & Ollitrault, P. 2003, "Application of cleaved amplified polymorphic sequence method for analysis of cytoplasmic genome among

- Aurantioideae intergeneric somatic hybrids", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 128, no. 2, pp. 225-230.
- Louzada, E.S., del Rio, H.S., Xia, D. & Moran-Mirabal, J.M. 2002, "Preparation and fusion of Citrus sp microprotoplasts", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 127, no. 4, pp. 484-488.
- Louzada, E.S., Grosser, J.W. & Gmitter, F.G. 1993, "Intergeneric Somatic Hybridization of Sexually Incompatible Parents - Citrus-Sinensis and Atalantia-Ceylanica", *Plant Cell Reports*, vol. 12, no. 12, pp. 687-690.
- Lucretti, S., Chapman, J.V., Lister, A., Giagnacova, G., Migliaccio, A., Moretti, F., Doležel, J. & Starantino, A. 1994, "Flow cytometric analysis and sorting of citrus protoplasts: a rapid and sensitive technique for selecting somatic hybrids and for measuring the effects of toxins; Proceedings of the International Society of Citriculture: Volume 1. Taxonomy, breeding and varieties, rootstocks and propagation, plant physiology and ecology: 7th International; Citrus Congress, Acireale, Italy, 8-13 March 1992", , pp. 329.
- Luro, F.L., Costantino, G., Terol, J., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., Talon, M., Ollitrault, P. & Morillon, R. 2008, "Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping", *BMC Genomics*, vol. 9, no. 287, pp. (16 June 2008).
- Luro, F., Rist, D. & Ollitrault, P. 2001, "Evaluation of genetic relationships in Citrus genus by means of sequence tagged microsatellites; Proceedings of the International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture, Montpellier, France, 6-8 March 2000", , eds. C. Doré, F. Dosba & C. Baril, , pp. 237.
- Luro, F., Laigret, F., Bové, J.M. Ollitrault, P. 1992. "Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to *Citrus* genetics and taxonomy". *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 329-333.
- Marschner, H. & Cakmak, I. 1989, "High Light-Intensity Enhances Chlorosis and Necrosis in Leaves of Zinc, Potassium, and Magnesium Deficient Bean (*Phaseolus-Vulgaris*) Plants", *Journal of Plant Physiology*, vol. 134, no. 3, pp. 308-315.
- Mccabe, P.F., Dunbar, L.J., Guri, A. & Sink, K.C. 1993, "T-Dna-Tagged Chromosome-12 in Donor Lycopersicon-Esculentum X L-Pennellii is Retained in Asymmetric Somatic Hybrids with Recipient Solanum-Lycopersicoides", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 86, no. 2-3, pp. 377-382.
- Medina-Urrutia, V., Madera, K.F.L., Serrano, P., Ananthakrishnan, G., Grosser, J.W. & Guo, W.W. 2004, "New intergeneric somatic hybrids combining amblycarpa mandarin with six trifoliolate/trifoliolate hybrid selections for lime rootstock improvement", *HortScience*, vol. 39, no. 2, pp. 355-360.
- Melchers, G., Mohri, Y., Watanabe, K., Wakabayashi, S. & Harada, K. 1992, "One-Step Generation of Cytoplasmic Male-Sterility by Fusion of Mitochondrial-Inactivated Tomato Protoplasts with Nuclear-Inactivated Solanum Protoplasts", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 15, pp. 6832-6836.
- Melzer, J.M. & Oconnell, M.A. 1992, "Effect of Radiation-Dose on the Production of and the Extent of Asymmetry in Tomato Asymmetric Somatic Hybrids", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 83, no. 3, pp. 337-344.

- Menczel, L., Nagy, F., Kiss, Z.R. & Maliga, P. 1981, "Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 59, no. 3, pp. 191-195.
- Mercer, W.E. & Schlegel, R.A. 1979, "Phytohemagglutinin Enhancement of Cell-Fusion Reduces Polyethylene-Glycol Cytotoxicity", *Experimental cell research*, vol. 120, no. 2, pp. 417-421.
- Mestre, P.F., Asins, M.J., Pina, J.A., Carbonell, E.A., Navarro, L. 1997. "Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.". *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 458-464.
- Miranda, M., Motomura, T., Ikeda, F., Ohgawara, T., Saito, W., Endo, T., Omura, M. & Moriguchi, T. 1997, "Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts", *Plant Cell Reports*, vol. 16, no. 6, pp. 401-405.
- Moore, G.A., Jacono, C.C., Neidigh, J.L., Lawrence, S.D. & Cline, K. 1992, "Agrobacterium-Mediated Transformation of Citrus Stem Segments and Regeneration of Transgenic Plants", *Plant Cell Reports*, vol. 11, no. 5-6, pp. 238-242.
- Moreira, C.D., Gmitter, F.G., Grosser, J.W., Huang, S., Ortega, V.M. & Chase, C.D. 2002, "Inheritance of organelle DNA sequences in a Citrus-Poncirus intergeneric cross", *Journal of Heredity*, vol. 93, no. 3, pp. 174-178.
- Moreira, C.D., Chase, C.D., Gmitter, F.G. & Grosser, J.W. 2000, "Inheritance of organelle genomes in citrus somatic cybrids", *Molecular Breeding*, vol. 6, no. 4, pp. 401-405.
- Morejohn, L.C., Bureau, T.E., Molebajer, J., Bajer, A.S. & Fosket, D.E. 1987, "Oryzalin, A Dinitroaniline Herbicide, Binds to Plant Tubulin and Inhibits Microtubule Polymerization In Vitro", *Planta*, vol. 172, no. 2, pp. 252-264.
- Moreno, P., Ambros, S., biach-Marti, M.R., Guerri, J. & Pena, L. 2008, "Plant diseases that changed the world - Citrus tristeza virus : a pathogen that changed the course of the citrus industry", *Molecular Plant Pathology*, vol. 9, no. 2, pp. 251-268.
- Morgante, M., Hanafey, M. & Powell, W. 2002, "Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes", *Nature genetics*, vol. 30, no. 2, pp. 194-200.
- Moriguchi, T., Motomura, T., Hidaka, T., Akihama, T. & Omura, M. 1997, "Analysis of mitochondrial genomes among Citrus plants produced by the interspecific somatic fusion of 'Seminole' tangelo with rough lemon", *Plant Cell Reports*, vol. 16, no. 6, pp. 397-400.
- Moriguchi, T., Hidaka, T., Omura, M., Motomura, T. & Akihama, T. 1996, "Genotype and parental combination influence efficiency of cybrid induction in citrus by electrofusion", *HortScience*, vol. 31, no. 2, pp. 275-278.
- Motegi, T., Nou, I.S., Zhou, J.M., Kanno, A., Kameya, T. & Hirata, Y. 2003, "Obtaining an ogura-type CMS line from asymmetrical protoplast fusion between cabbage (fertile) and radish (fertile)", *Euphytica*, vol. 129, no. 3, pp. 319-323.
- Motomura, T., Moriguchi, T., Akihama, T., Hidaka, T. & Omura, M. 1996, "Analysis of cytoplasmic genomes in somatic hybrids between 'Hazzara (Abohar)' (*Citrus reticulata* Blanco) and *Microcitrus australis* (Planch) swingle", *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, vol. 65, no. 3, pp. 497-503.

- Mouhaya, W., Allario, T., Costantino, G., Andrés, F., Talón, M., Luro, F., Ollitrault, P. & Morillon, R. 2008, "Citrus tetraploid rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid; Modern variety breeding for present and future needs. Proceedings of the 18th EUCARPIA general congress, Valencia, Spain, 9-12 September, 2008", , eds. J. Prohens & M.L. Badenes, , pp. 439.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures", *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473-&.
- Navarro, L. & Juárez, J. 2007, "Shoot-tip grafting *in vitro*: impact in the citrus industry and research applications" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 353-364.
- Murashige, T., Tucker, D.P.H. 1969. "Growth factor requirement of citrus tissue culture". Proc. 1<sup>st</sup> int Citrus Symp. 3: 1155-1161.
- Nagata, T. 1978. "A novel cell-fusion method of protoplasts by polivinyl alcohol". *Naturewissenschaften* 65: 263.
- Nakamura, M. 1943. "Cytological and ecological studies on the genus *Citrus* with special reference to the occurrence of sterile pollen grain". *Memorial of the Faculty of Science and Agriculture*. Tohoku University. 27: 53-159.
- Navarro, L., Juárez, J. 2007. "Shoot-tip grafting *in vitro*", p. 45-140. In: I. Khan (Ed.) *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI publishing, Oxfordshire.
- Navarro, L. 2005. "Necesidades y problemáticas de la mejora sanitaria y genética de los cítricos en España". *Phytoma*. 170: 2-5.
- Navarro, L., Pina, J.A., Juárez, J., Arregui, J.M., Ortega, C., Navarro, A., Ballester-Olmos, J.F., Vives, M.C., Montalt, R., Duran-Vila, N., Guerri, J. Moreno, P., Cambra, M., Medina, A., Zaragoza, S. 2005. El programa de mejora sanitaria de variedades de cítricos en España: 30 años de historia. *Phytoma* 170: 66-79.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P. & Pina, J.A. 2003, "Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from 2N x 2N and 2N x 4N crosses by embryo rescue and flow cytometry; Plant biotechnology 2002 and beyond. Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress, Orlando, Florida, USA, 23-28 June, 2002", , ed. I.K. Vasil, , pp. 541.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Pina, J.A. 2002. "Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from 2n x 2n and 2n x 4n crosses by embryo rescue and flow cytometry". P: 541-544. En I. K. Vasil (ed) *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*. Orlando, Florida, U.S.A..
- Navarro, L. 1992. "*Citrus* shoot tip grafting *in vitro*". P. 327-338. En JPS Bajaj (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. V. 18. High-Tech and Micropropagation. Springer-Verlag. Berlin.
- Navarro L. Juárez J., Pina J.A., Ballester J.F. 1984. "The citrus quarantine station in Spain", p. 365-370. En: S.M. Garnsey, L.W. Timmer y J.A. Dodds (eds.). Proc. 9th Conf. Intern. Organization Citrus Virol, IOCV. Riverside
- Navarro, L., Ballester, J.F., Juárez, J., Pina, J.A., Arregui, J.M., Bono, R. 1981. "Development of a program for disease-free citrus budwood in Spain". Proc. Int. Soc. Citriculture 1, 452-456.
- Navarro L. 1976. "The citrus variety improvement program in Spain", p. 198-203. En: E. C. Calavan (ed.), Proc. 7th Conf. Intern. Organization Citrus, Virol., IOCV, Riverside



- Navarro, L., Roistacher, C.N. & Murashige, T. 1975, "Improvement of Shoot-Tip Grafting In vitro for Virus-Free Citrus", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 100, no. 5, pp. 471-479.
- Navratilova, B., Luhova, L. & Petrivalsky, M. 2008, "Effect of UV-C irradiation on mesophyll protoplasts of *Cucumis sativus*", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 94, no. 3, pp. 313-318.
- Nea, L.J. & Bates, G.W. 1987, "Factors Affecting Protoplast Electrofusion Efficiency", *Plant Cell Reports*, vol. 6, no. 5, pp. 337-340.
- Negrutiu, I., Debrouwer, D., Watts, J.W., Sidorov, V.I., Dirks, R. & Jacobs, M. 1986, "Fusion of Plant-Protoplasts - a Study using Auxotrophic Mutants of *Nicotiana-Plumbaginifolia*, *Viviani*", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 72, no. 2, pp. 279-286.
- Nicolosi, E. 2007, "Origin and taxonomy" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 19-43.
- 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 and Applied Genetics*, vol. 100, no. 8, pp. 1155-1166.
- Niedz, R.P., Hyndman, S.E., Wynn, E.T. & Bausher, M.G. 2002, "Normalizing sweet orange (*C-sinensis* (L.) Osbeck) somatic embryogenesis with semi-permeable membranes", *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 38, no. 6, pp. 552-557.
- Nuez, F., Carrillo, J.M. 2000. "Los marcadores genéticos en la mejora vegetal". Universidad Politécnica de Valencia. 579 pag.
- Oberwalder, B., Schilde-Rentschler, L., Ruoss, B., Wittemann, S. & Ninnemann, H. 1998, "Asymmetric protoplast fusions between wild species and breeding lines of potato - effect of recipients and genome stability", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 97, no. 8, pp. 1347-1354.
- Ohgawara, T., Kobayashi, S., Ishii, S., Yoshinaga, K. & Oiyama, I. 1989, "Somatic Hybridization in Citrus - Navel Orange (*Citrus-Sinensis* Osb) and Grapefruit (*Citrus-Paradisi* Macf)", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 78, no. 5, pp. 609-612.
- Ohgawara, T., Kobayashi, S., Ohgawara, E., Uchimiya, H. & Ishii, S. 1985, "Somatic Hybrid Plants Obtained by Protoplast Fusion Between *Citrus-Sinensis* and *Poncirus-Trifoliata*", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 71, no. 1, pp. 1-4.
- Ohtani, K., Yamamoto, H. & Akimitsu, K. 2002, "Sensitivity to *Alternaria alternata* toxin in citrus because of altered mitochondrial RNA processing", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 4, pp. 2439-2444.
- Oiyama, I.I. & Kobayashi, S. 1993, "Haploids Obtained from Diploid X Triploid Crosses of Citrus", *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, vol. 62, no. 1, pp. 89-93.
- Oiyama, I., Kobayashi, S., Yoshinaga, K., Ohgawara, T. & Ishii, S. 1991, "Use of Pollen from A Somatic Hybrid Between Citrus and *Poncirus* in the Production of Triploids", *HortScience*, vol. 26, no. 8, pp. 1082-1082.

- Oiyama, I. & Okudai, N. 1986, "Production of colchicine-induced autotetraploid plants through micrografting in monoembryonic *Citrus* cultivars", *Japanese Journal of Breeding*, vol. 36, no. 4, pp. 371-376.
- Oiyama, I. 1981, "A technique for chromosome observation in root tip cells of *Citrus*", *Bulletin of the Fruit Tree Research Station, D*, , pp. 1-7.
- Olivares-Fuster, O., Hernandez-Garrido, M., Guerri, J. & Navarro, L. 2007, "Plant somatic hybrid cytoplasmic DNA characterization by single-strand conformation polymorphism", *Tree physiology*, vol. 27, no. 0829-318; 6, pp. 785-792.
- Olivares-Fuster, O., Duran-Vila, N. & Navarro, L. 2005, "Electrochemical protoplast fusion in citrus", *Plant Cell Reports*, vol. 24, no. 0721-7714; 2, pp. 112-119.
- Olivares-Fuster, O., Pena, L., Duran-Vila, N. & Navarro, L. 2002, "Green fluorescent protein as a visual marker in somatic hybridization", *Ann.Bot.(Lond)*, vol. 89, no. 0305-7364; 4, pp. 491-497.
- Olivares-Fuster, O. 1998. "Hibridación somática de cítricos". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. Valencia. España.
- Ollitrault P., Lotfy S., Costantino G., Federici C.T., Mu L., Chen C., Kacar A.Y., Ollitrault F., Ferrer R.M., Terol J.F., Froelicher Y., Morillon R., Billot C., Talon M., Navarro L., Roose M.L., Gmitter F.G. Jr., Luro F.. 2008. "International effort toward a SSR-based linkage map for *C. clementina*". Proc. Inter Citrus Cong, 26-30. s.l. : s.n., p. 159. Wuhan, Chine.
- Ollitrault, P., Froelicher, Y., Dambier, D., Luro, F. & Yamamoto, M. 2007a, "Seedlessness and ploidy manipulations" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 197-218.
- Ollitrault, P., WenWu, G. & Grosser, J.W. 2007b, "Somatic hybridization" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 235-260.
- Ollitrault, P., Jacquemond, C.; Dubois, C., Luro, F. 2003. *Citrus*. "In Genetic diversity of cultivated tropical plants". Eds. CIRAD: Montpellier, pp: 193-217.
- Ollitrault, P., Lofty, S., Rist, D., Froelicher, Y., Luro, F., Carreel, F. 2000. "Development of CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) for cytoplasmic genome studies in Aurantioideae sub-family". Proc. ISC Congr. 3-7 2000. Orlando. U.S.A..
- Ollitrault, P., Froelicher, Y., Dambier, D. & Seker, M. 2000a, "Rootstock breeding by somatic hybridisation for the Mediterranean citrus industry", *Proceedings of the First International Symposium on Citrus Biotechnology*, , no. 535, pp. 157-162.
- Ollitrault, P., Vanel, F., Froelicher, Y. & Dambier, D. 2000b, "Creation of triploid citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts", *Proceedings of the First International Symposium on Citrus Biotechnology*, , no. 535, pp. 191-197.
- Ollitrault, P., Allent, V., Luro, F. 1996. "Production of haploid plant and embryogenic calli from clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after in situ parthenogenesis induced by irradiated pollen". En Proceedings of 8<sup>th</sup> International Citrus Congress. International Society of Citriculture, 2: 913-917.
- Ollitrault, P. 1996. "Somatic hybridization in citrus: some new hybrid and alloplasmic plants". En Proceedings of 8<sup>th</sup> International Citrus Congress. International Society of Citriculture, 2: 907-912.

- Ollitrault, P., Michaux-Ferrier, N. 1992. "Application of flow cytometry for *Citrus* genetic and breeding". Proc. Int. Soc. Citriculture, 1: 193-198.
- Ortiz, J.M. 1985. "Nomenclatura botánica de los cítricos". Levante Agrícola. v: 259-260: 71-80.
- Osawa, I. 1912. "Cytological and experimental studies in Citrus". Journal of the Collage of Agriculture. Tokyo University. 4: 83-116.
- Palacio, A. & Duran-Vila, N. 1999, "Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for viroid characterisation", *Journal of virological methods*, vol. 77, no. 1, pp. 27-36.
- Pelletier, G. & Chupeau, Y. 1984, "Plant Protoplast Fusion and Somatic Plant-Cell Genetics", *Physiologie Vegetale*, vol. 22, no. 3, pp. 377-399.
- Peña, L., Cervera, M., Ghorbel, R., Domínguez, A., Fagoaga, C., Juárez, J., Pina, J.A. & Navarro, L. 2007, "Genetic transformation" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 329-344.
- Peña, L., Cervera, M., Fagoaga, C., Romero, J., Pérez, R., Juárez, J., Pina, J.A., Navarro, L. 2005. "La transformación genética como herramienta para la mejora de los cítricos". *Phytoma*. 170: 32-35.
- Peña, L., Perez, R.M., Cervera, M., Juarez, J.A. & Navarro, L. 2004, "Early events in Agrobacterium-mediated genetic transformation of citrus explants", *Annals of Botany*, vol. 94, no. 1, pp. 67-74.
- Peña, L., Martin-Trillo, M., Juarez, J., Pina, J.A., Navarro, L. & Martinez-Zapater, J.M. 2001, "Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time", *Nature biotechnology*, vol. 19, no. 3, pp. 263-267.
- Peña, L., Cervera, M., Juarez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Duranvila, N. & Navarro, L. 1995, "Agrobacterium-Mediated Transformation of Sweet Orange and Regeneration of Transgenic Plants", *Plant Cell Reports*, vol. 14, no. 10, pp. 616-619.
- Perez, R.M., Galiana, A.M., Navarro, L. & Duran-Vila, N. 1998a, "Embryogenesis in vitro of several Citrus species and cultivars", *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, vol. 73, no. 6, pp. 796-802.
- Perez, R.M., Mas, O., Navarro, L. & Duran-Vila, N. 1998b, "Production and cryoconservation of embryogenic cultures of mandarin and mandarin hybrids", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 55, no. 1, pp. 71-74.
- Perez, R.M., Navarro, L. & DuranVila, N. 1997, "Cryopreservation and storage of embryogenic callus cultures of several Citrus species and cultivars", *Plant Cell Reports*, vol. 17, no. 1, pp. 44-49.
- Pinto, F.M., Cabrera, V.M. & Chupeau, Y. 1993, "Transfer of Kanamycin Resistance from Nicotiana-Tabacum to Nicotiana-Plumbaginifolia by Fusion of X-Irradiated Protoplasts", *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 29P, no. 2, pp. 83-88.
- Polz, M.F., Cavanaugh, C.M. 1998. "Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR". Appl. Environ. Microbiol. 64(10):3724-3730.
- QingZhong, X. & Earle, E.D. 1995, "Plant regeneration from protoplasts of cytoplasmic male sterile lines of rice (*Oryza sativa* L.)", *Plant Cell Reports*, vol. 15, no. 1, pp. 76-81.

- Raghuvanshi, S. S. 1962. "Cytogenetical studies in genus *Citrus* IV". Evolution in the genus *Citrus*. *Cytologia*. 27: 172-188.
- Rai, M. 2006, "Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (Ctv) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant; lines with candidate resistance genes in this region", *Plant Molecular Biology*, vol. 61, no. 3, pp. 399-414.
- Ramulu, K.S., Dijkhuis, P., Famelaer, I., Cardi, T. & Verhoeven, H.A. 1994, "Cremart - A New Chemical for Efficient Induction of Micronuclei in Cells and Protoplasts for Partial Genome Transfer", *Plant Cell Reports*, vol. 13, no. 12, pp. 687-691.
- Rasmussen, J.O., Waara, S. & Rasmussen, O.S. 1997, "Regeneration and analysis of interspecific asymmetric potato - *Solanum* ssp hybrid plants selected by micromanipulation or fluorescence-activated cell sorting (FACS)", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 95, no. 1-2, pp. 41-49.
- Recupero, G.R., Russo, G. & Recupero, S. 2005, "New promising Citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents", *HortScience*, vol. 40, no. 3, pp. 516-520.
- Roose, M.L. & Williams, T.E. 2007, "Mutation breeding" in , ed. I. Ahmad Khan, pp. 345-352.
- Roose, M.L. 1988, "Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in citrus breeding and systematics; Citriculture. Sixth international citrus congress, Middle-East, Tel Aviv, Israel, 6-11 March 1988. Volume 1", , pp. 155.
- Rubio, L., Ayllón, M.A., Guerri, J., Pappu, H., Niblett, C. & Moreno, P. 1996, "Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene", *Annals of Applied Biology*, vol. 129, no. 3, pp. 479-489.
- Saito, W., Ohgawara, T., Shimizu, J., Ishii, S. & Kobayashi, S. 1993, "Citrus Cybrid Regeneration Following Cell-Fusion Between Nucellar Cells and Mesophyll-Cells", *Plant Science*, vol. 88, no. 2, pp. 195-201.
- Sakai, T. & Imamura, J. 1990, "Intergeneric Transfer of Cytoplasmic Male-Sterility Between *Raphanus-Sativus* (Cms Line) and *Brassica-Napus* Through Cytoplasm-Protoptast Fusion", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 80, no. 3, pp. 421-427.
- Saleh, B., Allario, T., Dambier, D., Ollitrault, P. & Morillon, R. 2008, "Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid", *Comptes Rendus Biologies*, vol. 331, no. 9, pp. 703-710.
- Sass, J.E. 1958. "Botanical microtechnique". Iowa State Univ Press, Ames, pp 73-75.
- Sato, Y. & Nishio, T. 2002, "Efficient detection of DNA polymorphism in cabbage and rice cultivars by PCR-RF-SSCP (PRS)", *Plant Cell Reports*, vol. 21, no. 3, pp. 276-281.
- Savage, E.M., and Gardner, F.E. 1965. "The Troyer and Carrizo citranges". *California Citriograph.*, 50: 112-116
- Scarano, M.T., Abbate, L., Ferrante, S., Lucretti, S. & Tusa, N. 2002, "ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin", *Plant Cell Reports*, vol. 20, no. 12, pp. 1162-1166.

- Schnable, P.S. & Wise, R.P. 1998, "The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration", *Trends in plant science*, vol. 3, no. 5, pp. 175-180.
- Schoenmakers, H.C.H., Wolters, A.-A., Haan, A., Saiedi, A.K. & Koornneef, M. 1994, "Asymmetric somatic hybridization between tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and gamma-irradiated potato (*Solanum tuberosum* L.): a quantitative analysis", *TAG Theoretical and Applied Genetics*, vol. 87, no. 6, pp. 713-720.
- Schwarz, S.F. 2001. "Autotetraploides espontaneos en patrones de cítricos: incidencia, características y comportamiento e vivero y campo". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Producción Vegetal, Valencia, España.
- Scora, R.W. 1988, "Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated citrus; Citriculture. Sixth international citrus congress, Middle-East, Tel Aviv, Israel, 6-11 March 1988. Volume 1", , pp. 277.
- Scora, R.W. 1983, "Chemical Taxonomy of the Genus Citrus", *Phytochemistry*, vol. 22, no. 1, pp. 12-12.
- Scora, R.W., Malik, M.N. 1970. "Chemical characterization of *Citrus* as a tool in phylogeny". *Taxon*. 19: 215-228.
- Shi, Y.Z., Deng, X.X. & Yi, H.L. 1998, "Variation of intergeneric somatic hybrids between *Citrus sinensis* cv Valencia and *Fortunella crassifolia* cv. Meiwa", *Acta Botanica Sinica*, vol. 40, no. 11, pp. 1060-1066.
- Sigareva, M.A. & Earle, E.D. 1997, "Direct transfer of a cold-tolerant *Ogura* male sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp *capitata*) via protoplast fusion", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 94, no. 2, pp. 213-220.
- Soost, R.K., Cameroon, J.W. 1975. *Citrus*. 507-540.
- Soost, R.K. 1969. "The incompatibility gene system in *Citrus*". *Proc. First. Int. Citrus Symposium*. 1: 189-190.
- Soost, R.K., Cameroon, J.W. 1969. "Tree and fruit characters of *Citrus* triploid from tetraploid by diploid crosses". *Hilgardia* 20: 569-579.
- Spiegel-Roy, P., Vardi, A. 1989. "Induced mutation in *Citrus*". *Proc. 6<sup>th</sup> Int. Cong. SABRAO*. 773-776.
- Spiegel-Roy, P., Vardi, A. 1984. "*Citrus*". p. 355-372. En Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Yamada, Y. (eds) *Handbook of plant Cell Culture*. V. 3. Macmillan, New York, U.S.A..
- Stone, B.C., Lowry J.B., Scora, R.W., Jong, K. 1974. "*Citrus Halimii*: a new species from Malaya an Peninsular Thailand". *Biotropica* 5: 102-110.
- Sundberg, E. & Glimelius, K. 1991, "Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within Brassicaceae", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 83, no. 1, pp. 81-88.
- Swingle, W.T., Reece, P.C. 1967. "The botany of *Citrus* and its wild relatives". p. 190-430. En Reuther, W.; Batchelor, L.D.; Webber, H.J. (eds) *the Citrus Industry*. VI. University of California, Berkeley, U.S.A..

- Takayanagi, R., Hidaka, T. & Omura, M. 1992, "Regeneration of Intergeneric Somatic Hybrids by Electrical Fusion Between Citrus and Its Wild Relatives - Mexican Lime (*Citrus-Aurantifolia*) and Java Feroniella (*Feroniella-Lucida*) Or Tabog (*Swinglea-Glutinosa*)", *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, vol. 60, no. 4, pp. 799-804.
- Tanaka, T. 1954. "Species problem in *Citrus* (Revisio Aurantiacearum IX)". Jap. Soc. Promot. Sci., Ueno. Tokio. (Cit. Por Gmitter y Hu, 1990; Tanaka, 1961).
- Tempelaar, M.J., Duyst, A., Devlas, S., Krol, G., Symmonds, C. & Jones, M.G.K. 1987, "Modulation and Direction of the Electrofusion Response in Plant-Protoplasts", *Plant Science*, vol. 48, no. 2, pp. 99-105.
- Tempelaar, M.J. & Jones, M.G.K. 1985, "Fusion Characteristics of Plant-Protoplasts in Electric-Fields", *Planta*, vol. 165, no. 2, pp. 205-216.
- Terol, J., Naranjo, M.A., Ollitrault, P. & Talon, M. 2008, "Development of genomic resources for *Citrus clementina*: Characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences", *Bmc Genomics*, vol. 9.
- Thomas, T.D. & Chaturvedi, R. 2008, "Endosperm culture: a novel method for triploid plant production", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 93, no. 1, pp. 1-14.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994, "Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice", *Nucleic acids research*, vol. 22, no. 22, pp. 4673-4680.
- Tian, D. & Rose, R.J. 1999, "Asymmetric somatic hybridisation between the annual legumes *Medicago truncatula* and *Medicago scutellata*", *Plant Cell Reports*, vol. 18, no. 12, pp. 989-996.
- Timmer, L.W., Zitko, S.E., Gottwald, T.R. & Graham, J.H. 2000, "Phytophthora brown rot of citrus: Temperature and moisture effects on infection, sporangium production, and dispersal", *Plant Disease*, vol. 84, no. 2, pp. 157-163.
- Tolkowsky, S. 1938. "Hesperides. A History of the Culture and Use of *Citrus* Fruits". p. 371. Westminster, Staples and Staples Ltd.
- Tomaz, M.L., Mendes, B.M.J., Mourao, F.D.A., Demetrio, C.G.B., Jansakul, N. & Rodriguez, A.P.M. 2001, "Somatic embryogenesis in citrus spp.: Carbohydrate stimulation and histodifferentiation", *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, vol. 37, no. 4, pp. 446-452.
- Torres, J.P. 1936. "Polyembryony in *Citrus* and study of hybrid seedlings". *Philippine J Agr* 7: 37-58.
- Tounekti, O., Belehradek, J. & Mir, L.M. 1995, "Relationships between Dna Fragmentation, Chromatin Condensation, and Changes in Flow-Cytometry Profiles Detected during Apoptosis", *Experimental cell research*, vol. 217, no. 2, pp. 506-516.
- Tozlu, I., Guy, C.L., Moore, G.A. 1999. "QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC<sub>1</sub> progeny of Citrus and Poncirus under saline and nonsaline environments". *Genome*. 42: 692-705.
- Trick, H., Zelcer, A. & Bates, G.W. 1994, "Chromosome Elimination in Asymmetric Somatic Hybrids - Effect of Gamma-Dose and Time in Culture", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 88, no. 8, pp. 965-972.

- Tsunewaki, K. 1988 "Cytoplasmic variation in *Triticum* and *Aegilops*". In Miller T.E., Koebner R.M.D. (eds) Proc 7<sup>th</sup> Int Wheat Genet Symp. vol 1. Institute of Plant Science Research, Cambridge, pp 53-63.
- Tusa, N., Abbate, L., Ferrante, S., Lucretti, S. & Scarano, M.T. 2002, "Identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus interploid crosses by means of isozymes, flow cytometry and ISSR-PCR", *Cellular & Molecular Biology Letters*, vol. 7, no. 2, pp. 703-708.
- Tusa, N., Del Bosco, S.F., Nigro, F. & Ippolito, A. 2000, "Response of cybrids and a somatic hybrid of lemon to Phoma tracheiphila infections", *HortScience*, vol. 35, no. 1, pp. 125-127.
- Tusa, N., Grosser, J.W., Gmitter, F.G. & Louzada, E.S. 1992, "Production of Tetraploid Somatic Hybrid Breeding Parents for Use in Lemon Cultivar Improvement", *HortScience*, vol. 27, no. 5, pp. 445-447.
- Tusa, N., Grosser, J.W. & Gmitter, F.G. 1990, "Plant-Regeneration of Valencia Sweet Orange, Femminello Lemon, and the Interspecific Somatic Hybrid Following Protoplast Fusion", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 115, no. 6, pp. 1043-1046.
- Vardi, A., Elhanati, A., Frydman-Shani, A., Neumann, H. 1996. "Strategies and considerations in mandarin improvement programmes". Proc. Int Soc Citriculture 1: 109-112.
- Vardi, A., Bleichman, S. & Aviv, D. 1990, "Genetic-Transformation of Citrus Protoplasts and Regeneration of Transgenic Plants", *Plant Science*, vol. 69, no. 2, pp. 199-206.
- Vardi, A. 1988, "Application of recent taxonomical approaches and new techniques to citrus breeding; Citriculture. Sixth international citrus congress, Middle-East, Tel Aviv, Israel, 6-11 March 1988. Volume 1", , pp. 303.
- Vardi, A., Breiman, A. & Galun, E. 1987, "Citrus Cybrids - Production by Donor-Recipient Protoplast-Fusion and Verification by Mitochondrial-Dna Restriction Profiles", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 75, no. 1, pp. 51-58.
- Vardi, A., Spiegelroy, P. & Galun, E. 1982, "Plant-Regeneration from Citrus Protoplasts - Variability in Methodological Requirements Among Cultivars and Species", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 62, no. 2, pp. 171-176.
- Vardi, A. 1981. "Protoplast derived plants from different *Citrus* species and cultivars". Proc. Int. Soc. Citriculture. 1: 149-152.
- Vardi, A. 1977. "Isolation of protoplasts in *Citrus*". Proc. Int. Soc. Citriculture. 1: 303-308.
- Vardi, A., Spiegel-Roy, P. & Galun, E. 1975, "Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos", *Plant Science Letters*, vol. 4, no. 4, pp. 231-236.
- Vela, S. 1996. "Morfogénesis, producción de glucosidos cardiotónicos y electrofusión de protoplastos en sistemas celulares de *Digitalis obscura* L y *D lanata* Ehrh". Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Valencia. España.
- Venema, J.H., Eekhof, M. & van Hasselt, P.R. 2000, "Analysis of low-temperature tolerance of a tomato (*Lycopersicon esculentum*) cybrid with chloroplasts from a more chilling-tolerant *L-hirsutum* accession", *Annals of Botany*, vol. 85, no. 6, pp. 799-807.

- Verhoeven, H.A., Ramulu, K.S. & Dijkhuis, P. 1990, "A Comparison of the Effects of Various Spindle Toxins on Metaphase Arrest and Formation of Micronuclei in Cell-Suspension Cultures of *Nicotiana-Plumbaginifolia*", *Planta*, vol. 182, no. 3, pp. 408-414.
- Viloria, Z. & Grosser, J.W. 2005, "Acid citrus fruit improvement via interploid hybridization using allotetraploid somatic hybrid and autotetraploid breeding parents", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 130, no. 3, pp. 392-402.
- Viloria, Z., Grosser, J.W. & Bracho, B. 2005, "Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interploid hybridization", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 82, no. 2, pp. 159-167.
- Vlahova, M., Hinnisdaels, S., Frulleux, F., Claeys, M., Atanassov, A. & Jacobs, M. 1997, "UV irradiation as a tool for obtaining asymmetric somatic hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Lycopersicon esculentum*", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 94, no. 2, pp. 184-191.
- vonKeller, A., Coster, H.G.L., Schnabl, H. & Mahaworasilpa, T.L. 1997, "Influence of electrical treatment and cell fusion on cell proliferation capacity of sunflower protoplasts in very low density culture", *Plant Science*, vol. 126, no. 1, pp. 79-86.
- Waara, S. & Glimelius, K. 1995, "The Potential of Somatic Hybridization in Crop Breeding", *Euphytica*, vol. 85, no. 1-3, pp. 217-233.
- Wagner, A., Blackstone, N., Cartwright, P., Dick, M., Misof, B., Snow, P., Wagner, G. P., Bartels, J., Murtha, M., Pendleton, J. 1994. "Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift". *Syst. Biol.* 43:250-261.
- Wakana, A., Hanada, N., Park, S.M., Fukudome, I. & Kajiwara, K. 2005, "Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine", *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, vol. 50, no. 1, pp. 93-102.
- Walker, P.R., Kokileva, L., Leblanc, J. & Sikorska, M. 1993, "Detection of the Initial-Stages of Dna Fragmentation in Apoptosis", *BioTechniques*, vol. 15, no. 6, pp. 1032-1040.
- Wallin, A., Glimelius, K. & Eriksson, T. 1974, "The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol", *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, vol. 74, no. 1, pp. 64-80.
- Wang, T.B., Niizeki, M., Harada, T., Ishikawa, R., Qian, Y.Q. & Saito, K. 1993, "Establishment of Somatic Hybrid Cell-Lines Between *Zea-Mays* 1 (Maize) and *Triticum Sect Trititrigia-Mackey* (*Trititrigia*)", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 86, no. 2-3, pp. 371-376.
- Wang, Y.P., Sonntag, K. & Rudloff, E. 2003, "Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 106, no. 7, pp. 1147-1155.
- Watson, C.V., Nath, J. & Nanda, D. 1977, "Possible Mitochondrial Involvement in Mechanism of Cytoplasmic Male-Sterility in Maize (*Zea-Mays-L*)", *Biochemical genetics*, vol. 15, no. 11-1, pp. 1113-1124.
- Webber, H. J. 1967. "History and development of *Citrus* industry". p. 1-39. En Reuther, W., Batchelor, L. D. y Webber, H. J. (eds) *The Citrus Industry*. University of California, California, U.S.A..



- Wijbrandi, J., Zabel, P. & Koornneef, M. 1990, "Restriction-Fragment-Length-Polymorphism Analysis of Somatic Hybrids between *Lycopersicon-Esculentum* and Irradiated *Lycopersicon-Peruvianum* - Evidence for Limited Donor Genome Elimination and Extensive Chromosome Rearrangements", *Molecular & General Genetics*, vol. 222, no. 2-3, pp. 270-277.
- Wolters, A.M.A., Schoenmakers, H.C.H., Kamstra, S., Vaneden, J., Koornneef, M. & Dejong, J.H. 1994, "Mitotic and Meiotic Irregularities in Somatic Hybrids of *Lycopersicon-Esculentum* and *Solanum-Tuberosum*", *Genome*, vol. 37, no. 5, pp. 726-735.
- Wu, J.H., Ferguson, A.R. & Mooney, P.A. 2005, "Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid Citrus breeding", *Euphytica*, vol. 141, no. 3, pp. 229-235.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L. & Dunlop, D. 1984, "Chromatin Cleavage in Apoptosis - Association with Condensed Chromatin Morphology and Dependence on Macromolecular-Synthesis", *Journal of Pathology*, vol. 142, no. 1, pp. 67-77.
- Xia, G.M., Xiang, F.N., Zhou, A.F., Wang, H.A. & Chen, H.M. 2003, "Asymmetric somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum* L.) and *Agropyron elongatum* (Host) Nevishi", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 107, no. 2, pp. 299-305.
- Xiang, F.N., Xia, G.M. & Chen, H.M. 2003, "Asymmetric somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum*) and *Avena sativa* L", *Science in China Series C-Life Sciences*, vol. 46, no. 3, pp. 243-252.
- XiuXin, D., WenWu, G. & GuiHong, Y. 2000, "Regeneration of diploid mesophyll parent type plants from nine symmetrical fusion combinations of *Citrus*", *Acta Horticulturae Sinica*, vol. 27, no. 1, pp. 1-5.
- XiuXin, D., ZhanAo, D., XinRong, Y., Lin, G. & WenCai, Z. 1995, "Protoplast manipulation and breeding in citrus", *Acta Agriculturae Sinica*, , pp. 129-137.
- Xu, X.Y., Hu, Z.Y., Li, J.F., Liu, J.H. & Deng, X.X. 2007, "Asymmetric somatic hybridization between UV-irradiated *Citrus unshiu* and *C. sinensis*: regeneration and characterization of hybrid shoots", *Plant Cell Reports*, vol. 26, no. 8, pp. 1263-1273.
- Xu, X.Y., Liu, J.H. & Deng, X.X. 2006, "Isolation of cytoplasts from Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) and production of alloplasmic hybrid calluses via cytoplast-protoplast fusion", *Plant Cell Reports*, vol. 25, no. 6, pp. 533-539.
- Xu, X.Y., Liu, J.H. & Deng, X.X. 2004, "Production and characterization of intergeneric diploid cybrids derived from symmetric fusion between *Microcitrus papuana* Swingle and sour orange (*Citrus aurantium*)", *Euphytica*, vol. 136, no. 2, pp. 115-123.
- Yamada, T., Ichimura, K. & van Doorn, W.G. 2006, "DNA degradation and nuclear degeneration during programmed cell death in petals of *Antirrhinum*, *Argyranthemum*, and *Petunia*", *Journal of experimental botany*, vol. 57, no. 14, pp. 3543-3552.
- Yamamoto, M., Matsumoto, R., Okudai, N. & Yamada, Y. 1997, "Aborted anthers of *Citrus* result from gene-cytoplasmic male sterility", *Scientia Horticulturae*, vol. 70, no. 1, pp. 9-14.
- Yamamoto, M., Kobayashi, S. 1995. "A cybrid plant produced by electrofusion between *Citrus unshiu* (satsuma mandarin) and *Citrus sinensis* (sweet orange)". *Plant Tissue Culture Letters*. 12 (2): 131-137.

- 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*, vol. 43, no. 3, pp. 355-365.
- Yang, X.Y., Zhang, X.L., Jin, S.X., Fu, L.L. & Wang, L.G. 2007, "Production and characterization of asymmetric hybrids between upland cotton Coker 201 (*Gossypium hirsutum*) and wild cotton (*G-klozschianum* Anderss)", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 89, no. 2-3, pp. 225-235.
- Yang, Z.N., Ye, X.R., Molina, J., Roose, M.L. & Mirkov, T.E. 2003, "Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the citrus tristeza virus resistance gene (Ctv) locus in *Poncirus trifoliata* L. Raf.", *Plant Physiology*, vol. 131, no. 2, pp. 482-492.
- Yue, W., Xia, G.M., Zhi, D.Y. & Chen, H.M. 2001, "Transfer of salt tolerance from *Aeluropus litoralis sinensis* to wheat (*Triticum aestivum* L.) via asymmetric somatic hybridization", *Plant Science*, vol. 161, no. 2, pp. 259-266.
- Zaragoza, S. 2007. "Aproximación a la historia de los cítricos. Origen, dispersión y evolución de su uso y cultivo". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Producción Vegetal, Valencia, España.
- Zelcer, A., Aviv, D. & Galun, E. 1978, "Interspecific Transfer of Cytoplasmic Male-Sterility by Fusion Between Protoplasts of Normal *Nicotiana-Sylvestris* and X-Ray-Irradiated Protoplasts of Male-Sterile *N-Tabacum*", *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, vol. 90, no. 5, pp. 397-407.
- Zeng, S.H., Chen, C.W., Hong, L., Liu, J.H. & Deng, X.X. 2006, "In vitro induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in Citrus", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 87, no. 1, pp. 85-93.
- Zhang, W. & Smith, C. 1993, "Simulation of Marker-Assisted Selection Utilizing Linkage Disequilibrium - the Effects of Several Additional Factors", *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 86, no. 4, pp. 492-496.
- Zhou, C., Xia, G., Zhi, D. & Chen, Y. 2006, "Genetic characterization of asymmetric somatic hybrids between *Bupleurum scorzonerifolium* Willd and *Triticum aestivum* L.: potential application to the study of the wheat genome", *Planta*, vol. 223, no. 4, pp. 714-724.
- Zubko, M.K., Zubko, E.I., Patskovsky, Y.V., Khvedynich, O.A., Fisahn, J., Gleba, Y.Y. & Schieder, O. 1996, "Novel 'homeotic' CMS patterns generated in *Nicotiana* via cybridization with *Hyoscyamus* and *Scopolia*", *Journal of experimental botany*, vol. 47, no. 301, pp. 1101-1110.

## ANEJO

### SOLUCIONES STOCK

#### **MT MACROELEMENTOS (50X) g/l**

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,5
KNO <sub>3</sub>	95
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	18,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1

#### **MT MICROELEMENTOS (100 X) g/l**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	1,68
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,86
KI	0,083
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0,0025
CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,0025

#### **MT SALES DE HIERRO (100x) g/l**

Na <sub>2</sub> EDTA	3,724
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2,784

#### **MT SALES DE CALCIO (100x) g/l**

CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	44,43
---------------------------------------	-------

#### **MT VITAMINAS (100x) g/l**

Myo-inositol	10
Tiamina-HCl	1
Piridoxina-HCl	1
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	0,2

**BH3 – SOLUCIONES STOCK****BH3 MACROELEMENTOS (100x) g/l**

MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	37
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
KCl	150

**BH3 KI STOCK g/100 ml**

KI	0,075
----	-------

**BH3 ÁCIDOS ORGÁNICOS (50x) g/100 ml**

Ácido pirúvico	0,1
Ácido cítrico	0,2
Ácido málico	0,2
Ácido fumárico	0,2

**SUGAR + SUG. ALCOHOLS (100X) g/100 ml**

Fructosa	2,5
Ribosa	2,5
Xylosa	2,5
Manosa	2,5
Ramnosa	2,5
Celobiosa	2,5
Galactosa	2,5
Manitol	2,5

**BH3 MULTIVITAMINAS A g/100 ml**

Pantotenato de calcio	0,05
Ácido ascórbico	0,1
Cloruro de Colina	0,05
Ácido p-amino-benzoico	0,001
Ácido fólico	0,02
Riboflavina	0,01
Biotina	0,001

**BH3 MULTIVITAMINAS B g/100 ml**

Retinol (Vit. A)	0,001
Colecalciferol (Vit. D3)	0,001
Vit. B12	0,002

## MEDIOS DE CULTIVO

### **EME SACAROSA 11**

MT macro stock	20 ml
MT micro stock	10 ml
MT vitaminas stock	10 ml
MT calcio stock	10 ml
MT hierro stock	10 ml
Sacarosa	50 g
Extracto de malta	0,5 g
agar	8 g
pH 5,8	
Esterilizar 15 minutos a 121°C	

### **EME MALTOSA 11**

MT macro stock	20 ml
MT micro stock	10 ml
MT vitaminas stock	10 ml
MT calcio stock	10 ml
MT hierro stock	10 ml
Maltosa	52,6 g
Extracto de malta	0,5 g
Agar	8 g
pH 5,8	
Esterilizar 15 minutos a 121°C	

### **HALF & HALF 11**

MT macro stock	10 ml
BH3 macro stock	5 ml
MT micro stock	10 ml
MT vitaminas stock	10 ml
MT calcio stock	10 ml
MT hierro stock	10 ml
Sacarosa	30 g
Extracto de malta	0,5 g
Glutamina	1,55 g
pH 5,8	
Esterilizar 15 minutos a 121°C	

### **EME 1500 11**

MT macro stock	20 ml
MT micro stock	10 ml
MT vitaminas stock	10 ml
MT calcio stock	10 ml

MT hierro stock	10 ml
Sacarosa	50 g
Extracto de malta	1,5 g
pH 5,8	
Agar	8 g
Esterilizar 15 minutos a 121°C	

---

**B+** **11**

MT macro stock	20 ml
MT micro stock	10 ml
MT vitaminas stock	10 ml
MT calcio stock	10 ml
MT hierro stock	10 ml
Agua de coco	20 ml
Sacarosa	25 g
Coumarina	0,146 mg
NAA	0,02 mg
GA3	1 mg
agar	8 g
pH 5,8	

---

**LB** **11**

NaCl	10 g
Triptona	10 g
Levadura	1 g
agar	3 g

cuando el medio se está enfriando añadir  
200 µl de ampicilina

---

**BH3** **11**

BH3 macro stock	10 ml
MT micro stock	10 ml
MT vitaminas stock	10 ml
MT calcio stock	10 ml
MT hierro stock	10 ml
BH3 multivitaminas stock A	2 ml
BH3 multivitaminas stock B	1 ml
BH3 KI stock	1 ml
sugar alcohol stock	10 ml
BH3 organic acid stock	20 ml
coconut water	20 ml
malt extract	1 g
sacarosa*	51.34 g
mannitol	81.99 g
glutamine	3.1 g

casein enzyme hydrolysate 0.25 g

pH to 5.7 with KOH  
filter sterilize with 0.2  $\mu$  unit

\* for BH3 0,7M añadir sacarosa 85.56 g/l

## SOLUCIONES PARA AISLAMIENTO Y FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

### **SOLUCIÓN ENZIMÁTICA SE-1**

Onozuka R.S (Cellulase)	1%
Pectolyase Y-23	0.2%
Macerase (Macerozyme R-10)	1%
Manitol	0,6 M
CaCl <sub>2</sub>	24 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,92 mM
M.E.S.	6,15 mM
pH 5,6	
Esterilización por filtración (0,22 $\mu$ m)	

### **SOLUCIÓN A 100ml**

Glucosa (0.4 M)	7,2 g
CaCl <sub>2</sub> (66 mM)	0,97g
DMSO (10%)	10 ml
pH 6.0	
Esterilización por filtración (0,22 $\mu$ m)	

### **SOLUCIÓN B: 100ml**

Glicina (0.3 M)	2,25 g
pH 10.5	
Esterilización por filtración (0,22 $\mu$ m)	

### **CALCIO 0,2 M: 100 ml**

CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	15 g
---------------------------------------	------

### **PEG STOCK: 50%**

- Fundir 50g PEG (1500 MW) en 100ml de Agua Mili-Q a 80°C
- Mantener en agitación durante 15 minutos
- Desionizar con AG501-X8 Resina (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) (50g/500ml)
- Mantener en agitación 14 horas
- Eliminar la resina por filtración a través papel Whatman 43 (Whatman Paper, Limited, England)

- Esterilizar por filtración (0,22  $\mu\text{m}$ )

**PEG 40 %: 100 ml**

PEG (1500 MW) 40%  
 Glucosa 0,3 M  
 CaCl<sub>2</sub> 66 mM  
 Disolver 5.41 g de glucosa en 4 ml agua  
 Añadir 6.6 ml CaCl<sub>2</sub> 1 M stock  
 Mezclar con 80 ml de stock PEG (50%) desionizado  
 Llevar el volumen a 100 ml  
 Ajustar el pH a 6.0  
 Esterilizar por filtración (0,22  $\mu\text{m}$ )

**PEG 20 %: 100 ml**

PEG (1500 MW) 20%  
 Glucosa 0,3 M  
 CaCl<sub>2</sub> 66 mM  
 Disolver 5.41 g de glucosa en 4 ml agua  
 Añadir 6.6 ml CaCl<sub>2</sub> 1 M stock  
 Mezclar con 40 ml de stock PEG (50%) desionizado  
 Llevar el volumen a 100 ml  
 Ajustar el pH a 6.0  
 Esterilizar por filtración (0,22  $\mu\text{m}$ )

**Solución Fusión Electro-Química: 100 ml**

Manitol 0.8 M 14,6 g  
 CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM 50  $\mu\text{l}$  CaCl<sub>2</sub> 1 M stock  
 Esterilizar por filtración (0,22  $\mu\text{m}$ )

**Solución Fusión Eléctrica: 100 ml**

Manitol 0.7 M 12,8 g  
 CaCl<sub>2</sub> 0.25 mM 25  $\mu\text{l}$  CaCl<sub>2</sub> 1 M stock  
 Esterilizar por filtración (0,22  $\mu\text{m}$ )

**STOCK SALES CPW 1 100 ml**

MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O 2,50 g  
 KNO<sub>3</sub> 1 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (monobasico) 0,272 g  
 KI 1,6 mg  
 CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O 0,025 mg

**STOCK SALES CPW 2 100 ml**

CaCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O 1,5 g



**SOLUCIÓN SACAROSA 25% 100 ml**

Sacarosa 25 g  
Stock CPW 1 1 ml  
Stock CPW 2 1 ml  
pH 5,7  
Esterilizar por filtración (0,22 µm)

**SOLUCIÓN MANITOL 13% 100 ml**

Manitol 13 g  
Stock CPW 1 1 ml  
Stock CPW 2 1 ml  
pH 5,7  
Esterilizar por filtración (0,22 µm)