

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

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

43

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

1.1 INTRODUCCIÓN.....	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
FINAL CONCLUSIONS	192
BIBLIOGRAFÍA	194
ANEJO	220
