



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

MAESTRÍA EN CIENCIAS AREA BIOTECNOLOGIA VEGETAL

TESIS:

**“Hibridación somática de cítricos ácidos para
incorporar resistencia a factores bióticos”**

Alumna: Ing. Alma Delia Hurtado Mercado

Tutores:

Dr. Marciano Manuel Robles González

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

Comité tutorial

Dr. Francisco Morales Domínguez

Aguascalientes, Ags. Junio, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

**I.B.Q. ALMA DELIA HURTADO MERCADO
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
P R E S E N T E .**

Estimado (a) alumno (a) Hurtado:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Hibridación somática de cítricos ácidos para incorporar resistencia a factores bióticos"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 3 de junio de 2011
"SE LUMEN PROFERRE"
LA DECANO

M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ



c.c.p.- Archivo
MCGD,mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
P R E S E N T E :

Estimada M. en C. González Díaz:

Por este medio le comunico que la I.B.Q. Alma Delia Hurtado Mercado, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente, tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "Hibridación somática de cítricos ácidos para incorporar resistencia a factores bióticos".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder al examen de grado.

A T E N T A M E N T E
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 01 de Junio de 2011

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Cotutor de Tesis
Departamento de Química
Centro de Ciencias Básicas

"2011, Año del Turismo en México"

inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Tecomán Col., a 31 de mayo de 2011

M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Por este medio informo a Usted que la **I.B.Q. Alma Delia Hurtado Mercado**, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, de esa Institución, ha concluido satisfactoriamente su trabajo de tesis, que lleva como título "**Hibridación somática de cítricos ácidos para incorporar resistencia a factores bióticos**".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, en el que se tomaron en cuenta algunas observaciones de mi parte, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder al examen de grado.

Quedo a sus órdenes para alguna aclaración.

ATENTAMENTE

MC. M. MANUEL ROBLES GONZALEZ
INVESTIGADOR DEL CAMPO EXPERIMENTAL TECOMAN

c.c.p. archivo.

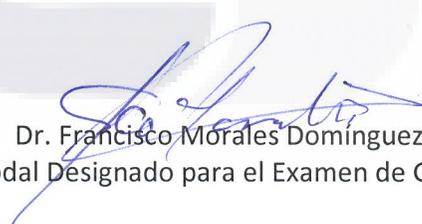


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. Martha Cristina González Díaz
Decana del Centro de Ciencias Básicas
Presente:

Por este medio le comunico que he revisado la versión final del escrito de la tesis **“Hibridación somática de cítricos ácidos para incorporar resistencia a factores bióticos”** presentada por la alumna **I.B.Q. Alma Delia Hurtado Mercado**, como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE
“SE LUMEN PROFERRE”
Aguascalientes, Ags. A 02 de Junio de 2011


Dr. Francisco Morales Domínguez
Sinodal Designado para el Examen de Grado

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, ya que él me dio la motivación, la salud, y apoyo al cursar esta maestría.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por permitirme el cursar este programa de maestría, a cada uno de los Catedráticos que me transmitieron sus conocimientos día a día, por su orientación y motivación para la realización de este proyecto, a mis asesores: Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, Dr. Manuel M. Robles González y el Dr. J. Francisco Morales Domínguez por sus consejos, por su apoyo incondicional, así como en la revisión y comentarios atinados a mi tesis.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agropecuaria y Pecuarias por permitirme el paso a sus laboratorios, capacitarme, por permitir mi desarrollo profesional y otorgarme facilidades para realizar este programa de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a los productores de limón de Colima y al INIFAP por haberse interesado en el proyecto y poderlo llevar a cabo.

A la Universidad de Florida, en el Centro de Investigación y Educación en Cítricos, especialmente al Dr. Jude W. Grosser, Mónica Vasconcellos, Milica Calovic, Gary Barthe, Manjul Dutt, Julie Ann Gmitter, por su apoyo en mi capacitación, no solo poniendo a mi disposición su laboratorios, sino su apoyo y experiencia, así como su amistad para efectuar este estudio. Sin su apoyo y consejos no se hubiera logrado parte de este proyecto.

A todos los Estudiantes, post doctorares, Doctores, Asistentes de la Universidad de Florida por abrimme las puertas de su casa y de su amistad.

Mi agradecimiento siempre a todos ustedes por su apoyo incondicional.

DEDICATORIA

A mi familia, mi esposo René Martínez que de alguna manera siempre estuvo a mi lado apoyándome constantemente.

A mi hija Nataly Mariam ya que apoyo a su mamá en sus constantes ausencias, apoyándola incondicionalmente siempre, te amo.

A mi madre Carmen, a mi hermano Víctor que me apoyaron desde la Licenciatura, hasta la maestría confiando en mí.

A mi familia política por el apoyo brindado durante mis ausencias.

A mis amigos, familiares y compañeros de maestría, que estuvieron a mi lado pendiente de mis logros.

A todas las personas que de alguna manera u otra me apoyaron e hicieron que este proyecto se volviera una realidad.

A mis actuales compañeros de trabajo por el apoyo a mis ausencias para la finalización de este proyecto, especialmente al Dr. Edmundo Bayram Llamas.

RESUMEN

El limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] es altamente sensible al virus de la tristeza de los cítricos VTC. El desarrollo de variedades resistentes es la mejor opción para el control de la enfermedad. Algunas especies de cítricos pueden ser relativamente tolerantes a este virus. La hibridación somática vía la fusión de protoplastos es una alternativa viable para incorporar genes que confieran algún grado de tolerancia. Para la hibridación somática es necesario contar con callo embriogénico de alguno de los progenitores. En este trabajo se evaluó el potencial para desarrollar callo embriogénico de óvulos no desarrollados de limón mexicano y tres variedades de limón verdadero (*C. limón* Burm.), cultivados en medio MT con sacarosa (EME+S), MT con 5 ml/l de Cinetina (DOG), y MT con 0.775 g/l de L-glutamina (H+H), todos adicionados con 500 mg/l de extracto de malta. La producción de callo embriogénico también se estudio en tejido de estilo estigma de limón mexicano cultivado en medio MS adicionado con 500 mg/l de extracto de malta y 13.3µM de BAP. El medio DOG resulto ser el mejor para inducción de callo utilizando óvulos como explantes. La fusión de protoplastos se realizó utilizando una suspensión de callo embriogénico en medio H+H y hojas de plantas germinadas *in vitro* de ambos progenitores, haciendo fusiones en ambos sentidos más no se lograron obtener plantas híbridas somáticas.

ABSTRACT

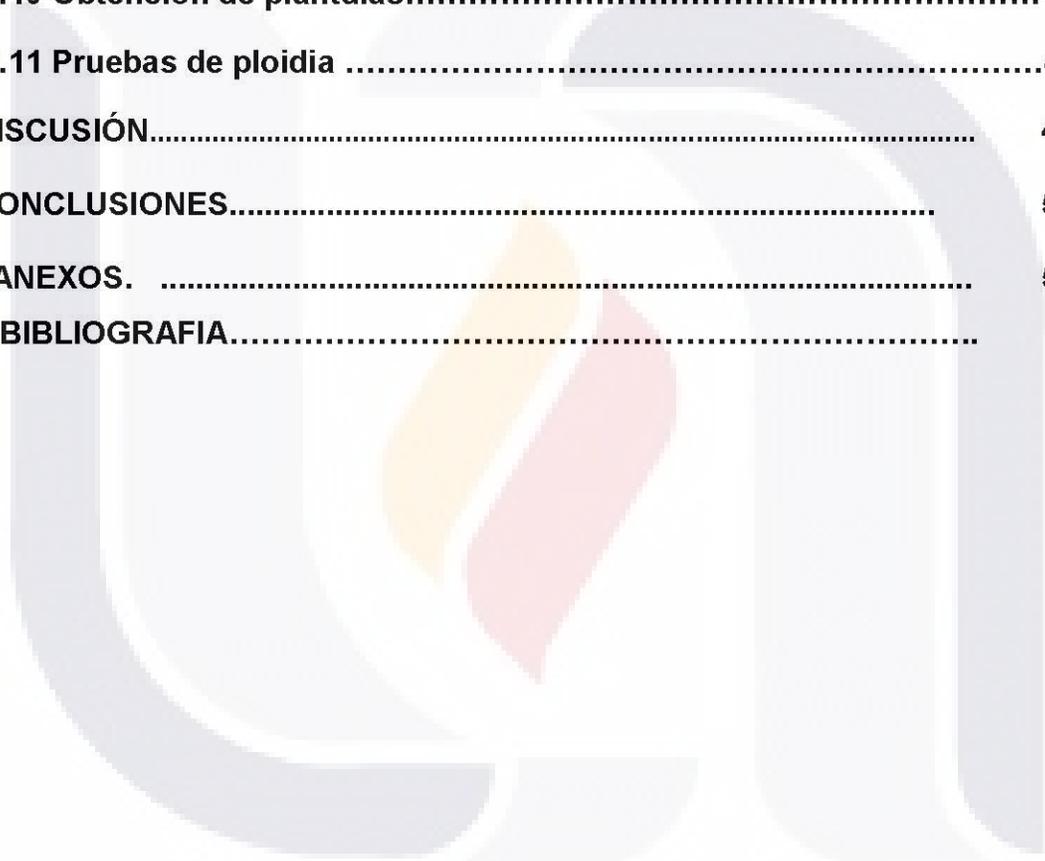
The Mexican Lime [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] is highly sensitive to the citric tristeza virus. The improvement of resistance varieties is the best option to control the disease. Some citric varieties could be relatively tolerant to this virus. The somatic hybridization via protoplast fusion is viable to incorporate genes that confer some grade of tolerance. For the somatic hybridization is necessary to have embryogenic callus from one of the parents. In this work we evaluated the potential to develop embryogenic callus from ovules from Mexican Lime and three varieties of true lime (*C. Limon Burm*), cultivated in MT media with sucrose (EME+S), MT with 5ml/l Kinetin (DOG) and MT media with 0.775 g/l L-glutamine (H+H), all with 500 mg/l of malt extract. We studied the production of embryogenic callus from stile and stigma tissue too from Mexican Lime cultivated in MS media added with 500 mg/l of malt extract and 13.3 μ M of BAP. The DOG media was the best media for callus induction in ovules tissue like explants. The protoplast fusion were using an embryogenic callus suspension in H+H media and leaves from in vitro plants from both parents, making fusions in both senses, but we cannot obtain somatic hybrid plants.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE CUADROS	ix
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION LITERARIA.....	4
2.1 Historia de los cítricos	4
2.1.1. El limón.....	6
2.1.2. Clasificación botánica.....	6
2.1.3. Descripción de la planta	7
2.2 Hibridación somática.....	8
2.2.1. Embriones somáticos.....	8
2.2.2. Comparación de embrión cigótico vs somático.....	9
2.2.3. Embriogénesis directa e indirecta.....	9
2.2.4. Aislamiento de protoplastos y regeneración de plantas...	10
2.2.5. Métodos para la fusión de protoplastos	11
2.2.6. Hibridación mediante fusión de protoplastos	13
2.3. Enfermedades de los cítricos.....	13
2.3.1. Diagnóstico de la enfermedad.....	14
2.3.2. La ocurrencia de la enfermedad y su proliferación.....	15
2.3.3. Virus de la tristeza de los cítricos.....	15
2.3.4. Rango del hospedero y su sintomatología.....	15
2.3.4.1. El agente causal	15
2.3.4.2. Síntomas.....	17
2.3.4.3. Síntomas en arboles sobre naranjo agrio.....	17
2.3.5. Epidemiología.....	18
2.3.6. Transmisión.....	19
2.3.7. Diagnostico.....	20

2.3.8. Identificación.....	21
2.3.9. Control.....	21
2.3.10. Cuarentena.....	22
2.3.11. Erradicación.....	22
2.3.12. Portainjertos tolerantes.....	22
2.3.13. Protección cruzada	22
2.3.14. Síntomas en arboles sobre patrones tolerantes	23
3. JUSTIFICACION DEL PROYECTO	23
4. HIPOTESIS DEL PROYECTO	25
5. OBJETIVOS.....	25
6. METODOLOGIA	26
6.1 Obtención de los genotipos de limón.....	26
6.2. Metodología para la obtención de callo embriogénico.....	27
6.2.1 Embriogénesis somática a partir de estilo y estigma	27
6.2.1.1. Establecimiento de los explantes en el medio.....	27
6.3. Obtención de callo modificando lo propuesto por Grosser.....	28
6.3.1. Desinfección del explante.....	28
6.3.2. Extracción y explantación de óvulos.....	28
6.4 Cultivo de callo friable en medio líquido	29
6.5 Experimento alternativo para la obtención de callo embriogénico...29	
6.6 Fusión de protoplastos.....	30
6.7 Fusión de protoplastos.....	32
6.7.1 Cultivo de protoplastos	32
6.7.2 Obtención de embriones somáticos.....	33
6.8. Obtención de plántulas.....	33
6.9. Verificación de híbridos somáticos.....	33
7. RESULTADOS.....	33
7.1 Capacitación en el INIFAP campus Tecomán y CREC.....	34
7.2 Obtención de callo embriogénico método Grosser.....	34
7.3 Obtención de callo embriogénico método Carimi.....	37

7.4 Experimento alterno para la obtención de callo embriogénico.....	40
7.5 Obtención de protoplastos.....	47
7.6 Fusión de protoplastos.....	47
7.7 Cultivo de protoplastos	47
7.8 Obtención de embriones somáticos.....	47
7.9 Enraizamiento de embriones somáticos.....	48
7.10 Obtención de plántulas.....	48
7.11 Pruebas de ploidia	48
8. DISCUSIÓN.....	49
9. CONCLUSIONES.....	54
10. ANEXOS.	55
11. BIBLIOGRAFIA.....	61



INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Genotipos de limón mexicano e italiano utilizados en la obtención de callo embriogénico mediante la metodología propuesta por Grosser y Gmitter <i>et al</i> 1990.	36
2	Limón mexicano en los cinco estadios de desarrollo del fruto utilizados en la obtención de callo embriogénico en experimento alterno.	40
3	Capacitación en CREC.	44
4	Gráfica. Efecto de los 3 medios de cultivo propuestos por Grosser y Gmitter <i>et al</i> 1990 en la obtención de callo embriogénico en limón mexicano e italiano.	45
5	Obtención de callo a partir de óvulos no desarrollados así como de estilos y estigmas.	46
6	Efecto de la concentración de la BA y del THDZ en la respuesta de explantes de estilo y estigma de limón mexicano en la generación de callo friable.	48
7	Inducción de callo embriogénico a partir de estilo y estigma en medio MT+BA	49
8	Obtención de callo embriogénico en el estadio 1 en presencia de los tres medios utilizados	50
9	Obtención de callo embriogénico en los Estadios 2 y 3, utilizando los tres medios estudiados.	50
10	Obtención de callo embriogénico y embriones somáticos en los Estadios 4 y 5, utilizando los tres medios estudiados.	50
11	Callo embriogénico de 3 diferentes estadios de desarrollo en presencia de luz.	51
12	Obtención de protoplastos viables a partir de hoja de limón italiano y callo embriogénico de limón mexicano.	57
13	Plántulas obtenidas de fusiones somáticas conservadas en medio RMAN.	58
14	Prueba de ploidia aplicada a plántulas de fusiones somáticas.	59

INDICE DE CUADROS

Cuadros	Descripción	Página
1	Porcentaje de explantes de estilo y estigma de limón mexicano que regeneraron tejido calloso en medio de cultivo MT con algunos reguladores de crecimiento.	45
2	Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenida de fruta de limón mexicano en 5 estadios de desarrollo cultivados en oscuridad total que generaron callo embriogénico a los 15 días de establecidos los cultivos	51
3	Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenida de fruta de limón mexicano en 5 estadios de desarrollo cultivados en oscuridad total que generaron callo embriogénico a los 30 días de establecidos los cultivos	52
4	Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenida de fruta de limón mexicano en 5 estadios de desarrollo cultivados en oscuridad total que generaron callo embriogénico a los 45 días de establecidos los cultivos	53
5	Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenida de fruta de limón mexicano en 5 estadios de desarrollo cultivados en luz que generaron callo embriogénico a los 15 días de establecidos los cultivos	54
6	Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenida de fruta de limón mexicano en 5 estadios de desarrollo cultivados en luz que generaron callo embriogénico a los 30 días de establecidos los cultivos	55
7	Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenida de fruta de limón mexicano en 5 estadios de desarrollo cultivados en luz que generaron embriones a los 15 días de establecidos los cultivos	55
8	Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenida de fruta de limón mexicano en 5 estadios de desarrollo cultivados en luz que generaron embriones a los 30 días de establecidos los cultivos	56

1.INTRODUCCIÓN:

En la citricultura mundial se cultivan tres tipos de limón, mismos que pertenecen a tres especies diferentes: El limón Mexicano [*Citrus aurantifolia* (christm) Swingle], el limón persa (*C. latifolia* Tanaka) y los limones Italianos o verdaderos (*C. limon* Burm). Botánicamente, tanto el limón Mexicano como el limón persa son en realidad limas de fruta ácida (Medina *et al.*, 2001), sin embargo por su sabor y acidez se comercializan y consumen como limones.

En el contexto internacional, México es el principal productor de limón mexicano con aproximadamente 79,821 ha plantadas con este cítrico y de las que anualmente se obtiene un volumen de producción el millón 300 mil toneladas con un valor cercano a los tres mil millones de pesos (SAGARPA, 2009). Le siguen en importancia la India con 30,000 ha y Perú con 17,500 ha. (Medina *et al.*, 2001). Aunque este cítrico no es originario de México, ha encontrado condiciones favorables para su desarrollo en las Costas del Pacífico Mexicano donde se cultiva de manera comercial. Los estados con mayor superficie cultivada durante el 2009 son: Colima 20158. ha; Michoacán 36416 ha; Oaxaca 10, 520.ha y Guerrero 6863 ha (SAGARPA 2010). Esta agroindustria genera una gran cantidad de empleos para diversas actividades que se desarrollan ya sea en el campo, en las empacadoras, la industria, el transporte y la comercialización de fruta o subproductos. Además existe un gran número de viveros dedicados a la producción de plantas de cítricos y proveedores de insumos para los distintos eslabones de esta cadena productiva, que se benefician con este cultivo.

Los árboles de limón mexicano son afectados por diversas enfermedades que además del daño físico en la planta, provocan reducción tanto de la producción como la calidad de la fruta. Algunas de esas enfermedades están ya presentes en México y se conoce su impacto en la producción de este cítrico. Otras enfermedades causadas principalmente por virus y viroides se mantienen como una fuerte amenaza para este cultivo. Hoy día agroindustria del limón mexicano está siendo amenazada por dos enfermedades de alto impacto económico. Estas

enfermedades son sistémicas y se caracterizan por ser transmitidas tanto por insectos vectores como en los materiales vegetativos utilizados para la propagación.

La tristeza de los cítricos (VTC), enfermedad de tipo viral que ha matado mas 116 millones de árboles de cítricos en el mundo, es transmitida por injerto durante la propagación, o bien es diseminada eficientemente por el pulgón café (*Toxoptera citricida Kirkaldi*). El VTC se ha detectado en 20 de los 23 estados productores de cítricos en México y el pulgón café ya se encuentra en los estados del sureste y recientemente se le detecto en el estado de Puebla.

Por su parte el Huanglongbing (HLB) o greening es una enfermedad causada por la bacteria (*Candidatus liberobacter*), que ha provocado la muerte de de más de 60 millones de árboles en países asiáticos y africanos, es transmitida por el psílido asiático (*Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: *Psyllidae*). Este insecto se encuentra diseminado en practicante todas las regiones productoras de cítricos de nuestro país. En tanto que el HLB se encuentra muy cerca, afectando los cítricos de Cuba y Florida y recientemente se ha detectado especímenes de *Diaphorina citri* portando la bacteria en Belice.

La base genética del limón Mexicano es estrecha, lo que propicia que las plantaciones sean vulnerables a dichos problemas fitosanitarios, por lo que el mejoramiento genético es una de las opciones más viables y económicas para su solución. Sin embargo, el mejoramiento por hibridación sexual, presenta barreras tales como; apomíxis, esterilidad e incompatibilidad, heterocigosis, poliembrionía y largo período juvenil, las cuales impiden ó dificultan la obtención plantas híbridas.

La hibridación somática vía fusión de protoplastos es una alternativa de mejoramiento genético que se ha utilizado en otros cítricos para desarrollar genotipos tetraploides con características deseadas.

La embriogénesis somática representa un método eficiente para la regeneración de plantas y se le ha preferido entre otros métodos para ser usada en el mejoramiento genético de frutales, debido principalmente a la dificultad que existe para regenerar tejido por otras vías, como la organogénesis que se ve dificultada por el alto contenido de compuestos fenólicos en los explantes. La embriogénesis somática se define como el proceso por el cual células somáticas desarrollan los estados de embrionía y dan como resultado plantas completas sin fusión de gametos.

En todos los estudios realizados hasta ahora sobre regeneración y fusión de protoplastos en cítricos, la etapa más importante y limitante ha sido el establecimiento de masas de callo friable con capacidad embriogénica. El callo friable en cítricos está compuesto por conglomerados de proembriones de varios tamaños. La proliferación de este tipo de callo se da por formación, a partir de células individuales, de nuevos proembriones. Estos pueden originar a su vez embriones, aunque esta disposición afecta el crecimiento del callo, que cesa su proliferación y se orienta hacia el proceso embriogénico (Button *et al.*, 1974).

La iniciación y el mantenimiento de líneas embriogénicas son generalmente muy difíciles y consumen mucho tiempo. Todavía no se conocen bien los requerimientos nutricionales para muchos genotipos importantes (Grosser y Gmitter, 1990b). Aunque se ha logrado el establecimiento de callos friables de cítricos para muchos cultivares (Vardi y Galun, 1988), hay que tomar en cuenta que el comportamiento *in vitro* de prácticamente cualquier material vegetal se ve afectado por una serie de factores internos y externos, dentro de los cuales se pueden citar: la edad de la planta y del tejido, su estado fisiológico, así como las condiciones ambientales de cultivo (Pierik, 1987). Debido a ello, el comportamiento del material vegetal varía de una manera muy amplia, aún dentro de una misma especie (Drew y Smith, 1986; Pierik, 1987), por lo que el

establecimiento de un cultivar por técnicas *in vitro* requiere una serie de estudios en condiciones locales (Sancho y Guevara, 1991).

2.- Revisión Literaria.

2.1 Historia de los cítricos

La biología, historia y desarrollo de frutas cítricas ha sido de gran interés alrededor del mundo. Esto es cada vez mayor, en gran medida, como el único atractivo del fruto su apariencia y por sus grandes propiedades medicinales (Spiegel, 1996).

El término “*Citrus*” originado de la forma Latina de “*Kedros*”, una palabra griega que define árboles como el cedro, pino, y ciprés. Como el olor de las hojas y frutos recuerda el del cedro, el nombre de cítrico ha sido aplicado al citrón. Linneo agrupó todas las especies de cítricos conocidos por él en el género *Citrus*.

Los cítricos se originaron en el Sureste de Asia y se dispersaron durante la edad media, para después establecerse en todos los continentes. Los cítricos son por mucho el cultivo de frutos perennes más importante en el comercio mundial. La estructura especial del fruto y su largo tiempo de vida lo cual ha facilitado su gran escala de exportación como fruto fresco. Los productos de jugo procesado, por otro lado, son muy importantes por lo cual también éste rubro se ha incrementado grandemente alrededor del mundo (Spiegel, 1996).

El origen exacto de los cítricos, sus tipos ancestrales y sistemáticos son desconocidos. La gran riqueza de los cítricos y cultivos de hoy reflejan las inmensas opciones de reproducción natural con cítricos, tan bien como las intervenciones efectivas intencionales del ser humano. La citricultura moderna ha adoptado la partenocarpia para todos los tipos de cítricos superiores. En nuestros días los cultivos representan una gran gama de combinaciones de genes conservados por propagación vegetativa en propagación en semillas, y portainjertos apomíxicos (Spiegel, 1996).

Por años el citrón fue por años el único cítrico conocido por los Europeos, quienes lo valoraron para embellecer sus jardines. Después, los árabes distribuyeron naranja agria y limones a través del Norte de África y el Sur de España (Walheim, 1996).

Los cítricos han siempre mostrado ser altamente dependiente de la irrigación en muchos ambientes. La relación de agua y nutrición mineral han sido extensivamente investigados. La significancia de enfermedades virales para la sobrevivencia y propagación de cítricos han llegado a ser incrementados evidentemente durante el presente siglo. El notable incremento en estándares de mercado ha dictado la adopción de estrategias estrictas en cuanto al control de enfermedades y pesticidas, involucrando el uso extensivo de pesticidas y fungicidas. Aunque destacados progresos han sido desarrollados en el control de muchos virus destructivos, los problemas causados por ciertos virus están influidos enormemente por el portainjerto y los retoños (Spiegel, 1996).

El estado de Colima ocupa el segundo lugar como productor de limón mexicano en el país, con una superficie de 20,148 ha y una producción de 402,124 ton. En la entidad se cuenta con 50 empacadoras y 16 industrias que procesan el fruto del limón (SAGARPA, 2010).

En el país existen varios tipos de limón, entre las que se encuentra el agrio, persa, italiano, real y mexicano; siendo este último el de mayor importancia, ya que de las 78 mil hectáreas plantadas en la República le corresponden el 70 por ciento, seguido del persa (SAGARPA, 2010).

Dentro del estado de Colima el principal municipio productor de limón mexicano es Tecomán, donde se localiza el 63% de la superficie de cultivo (SAGARPA, 2004).

Debido a que el limón ocupa un lugar importante en Colima, surgió el interés de trabajar en un tema que tiene preocupados a los investigadores y productores del Estado, el virus de la tristeza de los cítricos, por lo que se decidió elaborar un protocolo de trabajo en fusión de protoplastos para las variedades de limón

mexicano e italiano, ya que este último es resistente a dicho virus, entonces por medio de esta fusión lograr el objetivo de obtener plantas de limón mexicano resistente (Grosser y Gmitter, 1990b).

2.1.1 El limón.

Existen esencialmente dos tipos de limones: los limones verdaderos representados por Eureka y Lisbón; y Meyer, el cual es probablemente un híbrido entre un limón y una mandarina o de limón con naranja.

2.1.2 Clasificación botánica

El limón Mexicano también conocido como: Mexican lime, West Indian lime, limón Gallego, Key Lime ó limón criollo, limón sutil es en realidad una lima ácida de frutos pequeños (Leal-Pinto, *et al.*, 1984). Representa a la especie *aurantifolia* dentro del género *Citrus*. Se ubica taxonómicamente en:

FAMILIA: Rutaceae

SUBFAMILIA: Aurantioideae

TRIBU: Citreas

SUBTRIBU: Citrinas

GENERO: *Citrus*

SUBGENERO: *Eucitrus*

ESPECIE: *Aurantifolia*

Según Tanaka, *Citrus aurantifolia* fue la primera especie en evolucionar del subgénero *Eucitrus* (Scora, 1988).

La taxonomía del género *Citrus* ha tenido importantes modificaciones en el transcurso de la historia, en la medida que se han desarrollado nuevos métodos y técnicas de estudio taxonómico. Mientras que Carlos Linneo reconoció sólo dos especies en el género *Citrus*, Swingle identificó 16 (Galum, 1988); en tanto que Tanaka aseguró que en realidad eran 159 (Luro *et al.*, 1992).

Anteriormente y de acuerdo con Galum (1988), mediante técnicas bioquímicas y moleculares se determinó que en el género *Citrus*, solamente existen tres especies cítricas comestibles verdaderas, mientras que el resto son híbridos interespecíficos. Las tres especies son *C. medica*, *C. reticulata* y *C. maxima*.

También se ha podido establecer que *Citrus aurantifolia* es en realidad un trihíbrido en el que participaron *C. medica*, *C. maxima* y *Microcitrus* (Scora, 1988).

2.1.3 Descripción de la planta.

De acuerdo con Hodgson (1967) en comparación con los otros cítricos, los árboles de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*), son de vigor y tamaño medio, desarrollo arbustivo con varios tallos delgados e irregulares, ramas densamente armadas con pequeñas espinas puntiagudas. El follaje es denso, consistente y de hojas pequeñas color verde pálido, de forma lanceolada ó elíptica-ovada, punta generalmente obtusa, base redondeada, bordes y pecíolos ligeramente alados. Estudios realizados por Robles-González y Medina-Urrutia, 1984 para conocer la biología floral del limón, indican que las inflorescencias se producen en racimos de dos a siete flores, en las axilas de las hojas, rara vez aparecen solitarias. Las flores son pequeñas, blancas, de cáliz cupulado con cuatro a cinco lóbulos, cuatro a cinco pétalos y de 20 a 25 estambres. Es posible encontrar flores en el árbol la mayor parte del año, pero las floraciones principales ocurren en dos a tres flujos masivos según la región y manejo agronómico. El fruto es pequeño, oval ó esférico con base convexa y en ocasiones con cuello pequeño. El ápice también convexo pero con mamila pequeña ligeramente hundida; la cáscara es delgada con una superficie lisa corácea y fuertemente adherida, de color verde y verde amarillento al madurar; con 9 a 12 segmentos y un eje pequeño sólido; la pulpa es de color verde pálido, grano fino, muy jugosa, altamente ácida, con sabor y aroma distintivos; el número de semillas es moderado (3-5), pequeñas y de color blanco. Los árboles fructifican prácticamente durante todo el año pero con mayor abundancia de mayo a octubre (Medina, 1998).

2.2 HIBRIDACION SOMATICA.

La hibridación somática vía la fusión de protoplastos ha llegado a ser una herramienta importante en la mejora de plantas, permitiendo a los investigadores de combinar células somáticas (todas o parcialmente) de diferentes cultivares, especies y géneros resultando en combinaciones genéticas incluyendo híbridos somáticos allotetraploides simétricos, híbridos asimétricos o cíbridos somáticos. Esta técnica puede facilitar la reproducción y la transferencia genética, pasando problemas asociados en ocasiones con cruzas convencionales incluyendo incompatibilidad sexual, poliembrionía y esterilidad masculina o femenina. Desde el primer reporte exitoso de la hibridación somática con tabaco en 1972, cientos de reportes han sido publicados durante las pasadas tres décadas las cuales extienden los procedimientos a generación de plantas adicionales y evaluar el potencial de los híbridos somáticos en algunos cultivos, incluyendo arroz, tomate, papas y cítricos.

Las aplicaciones de la hibridación somática en mejoramiento de cultivos están continuamente envueltas en el mejoramiento genético de cítricos. El uso más común de la hibridación somática es la generación de híbridos somáticos que contienen los genomas nucleares completos de los dos padres. Esto es especialmente importante en cítricos donde la hibridación somática es clave de padres allotetraploides para usar en cruzas interploides para generar triploides sin semilla (Grosser, 2007).

2.2.1 Embriones somáticos

Los embriones somáticos son estructuras bipolares que cuentan con cotiledones, un eje radical y otro apical; no poseen conexión vascular con el tejido materno y presentan bandas procambiales entre los ápices (Zimmerman, 1993, citado por Rodríguez-Garay, 2000). Su desarrollo es nutrido por células vecinas a través de reconexiones protoplasmáticas. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer

y formar plantas normales, debido a la naturaleza bipolar del embrión, es posible la alta velocidad de multiplicación.

2.2.2 Comparación de embrión cigótico vs. Somático

En muchas especies el paso más limitante para el desarrollo de la embriogénesis somática es el proceso de maduración (Merkle, 1995). Por lo tanto, el estudio del proceso de maduración del embrión cigótico puede ser útil para definir un modelo que sea aplicable a la embriogénesis somática, fundamentalmente en lo que se refiere a la composición de los medios de cultivo. Los estudios sobre nutrición de embriones se han realizado tradicionalmente aplicando diferentes composiciones y concentraciones de nutrientes y reguladores de crecimiento en los medios de cultivo, y evaluando su efecto mediante la determinación de parámetros sencillos, tales como la tasa de crecimiento y el número de estructuras embriogénicas. Los resultados que se obtienen con estos ensayos carecen de una significación fisiológica, por lo que en la mayoría de los casos, no es posible conocer los mecanismos involucrados en el proceso. Más recientemente en algunos estudios se han considerado otras variables tales como los nutrientes y los cambios en la composición del embrión, lográndose mejores ajustes en la composición del medio de cultivo y un mejor control del proceso embriogénico (Montoso *et al.*, 1995; Magnaval *et al.*, 1997; citados por Celestino *et al.*, 2005). Existe la posibilidad de mejorar los procesos de embriogénesis somática basándose en el conocimiento de la fisiología de cada estadio de desarrollo del embrión cigótico *in vivo*, y sobre el conocimiento de los factores de crecimiento y niveles de nutrientes observados en óvulos durante los procesos de embriogénesis cigótica (Carman *et al.*, 1996; Joy *et al.*, 1996; citados por Celestino *et al.*, 2005). En este sentido Michaux-Ferriere (1998) llegó a la conclusión de que la información suministrada por el estudio del desarrollo del embrión cigótico puede mejorar la realización de sistemas de embriogénesis somática en ciertas especies.

2.2.3 Embriogénesis directa e indirecta

Los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen si el tejido del explante está formado de CsDPE (Células somáticas determinadas proembriogénicas) ó CsNE (Células somáticas no embriogénicas), términos que fueron planteados por Evans *et al* (1981). Bajo el primer caso "un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante" (Merkle *et al.*, 1995). Este proceso es llamado comúnmente embriogénesis directa. En el caso de embriogénesis indirecta, las células no embriogénicas tienen que llevar a cabo varias divisiones mitóticas en la presencia de una auxina durante la inducción al estado de células embriogénicas, formándose los callos. En este proceso la fase de formación de callo se interpone entre el explante original y la aparición de embriones somáticos. (Merkle *et al.*, 1995).

La selección de plantas cítricas es de vital importancia para el desarrollo eficiente de embriogénesis somática. Para estos propósitos los explantes deben ser colectados de plantas libre de síntomas de enfermedades, estrés, o mutación espontánea. Los puntos a tener en mente cuando se decide de donde tomar los explantes son: 1) La formación de callo aparece dependiendo del estado del tejido, 2) La inducción de callo ocurre en tejidos que siguen siendo juveniles, 3) Esos explantes deberían contener células vivas. Cuando las flores y los frutos son viejos, la formación de callo y la embriogénesis somática en estilo, estigma y óvulos no desarrollados decrece. El estigma y el estilo derivado de flores inmaduras y óvulos no desarrollados de frutos inmaduros tienen un más alto potencial embriogénico. (Carimi *et al.* 1986)

2.2.4 Aislamiento de protoplastos y regeneración de plantas.

El primer aislamiento controlado y repetible de protoplastos fue realizado por Cocking (1960) y desde entonces se han aislado protoplastos mediante digestión enzimática en numerosas especies y a partir de muy distintos tejidos vegetales (hojas, primordios foliares, cotiledones, pétalos, peciolos, ápices caulinares,

yemas florales, raíces, frutos, coleóptilos, hipocotilos, tallos, capa de aleurona de semillas de cereales, nódulos radiculares, polen o células madre de microesporas, callos o cultivos celulares en suspensión) (Bajaj, 1989 a, 1989 b, 1993 a, 1993 b, 1994, 1996). Así mismo se han establecido sistemas de regeneración de plantas a partir de protoplastos en muy diversas especies (Roest y Gillisen, 1989, 1993).

En los cítricos, el establecimiento de un sistema de obtención de protoplastos y regeneración de plantas fue abordado con éxito una vez que se dispuso del sistema de regeneración de plantas completas a partir de callos embriogénicos de origen nucelar (Button y Bornman, 1971; Kochba *et al.*, 1972). En 1975 Vardi *et al.*, consignaron el aislamiento y cultivo de protoplastos de cítricos a partir del callo nucelar de naranja dulce “*Shamouti*” obtenido por Kochba *et al.*, (1972). Posteriormente se logró la primera regeneración de plantas a partir de protoplastos de una especie leñosa de naranja dulce (Vardi, 1977; Galun *et al.*, 1977). Durante los años siguientes se logró la regeneración de plantas a partir de protoplastos en otras especies de cítricos, como el naranja agrio, limón verdadero, mandarinos y el híbrido Tangor (Vardi, 1981; Vardi *et al.*, 1982).

Para la regeneración de plantas de cítricos a partir de protoplastos, se ha partido de callos y células de origen nucelar. Los intentos de regeneración de planta a partir de protoplastos de hoja de cítricos han sido infructuosos (Grosser y Chandler 1987), habiéndose observado la regeneración de pared y algunas divisiones, pero nunca el establecimiento de callo, ni la regeneración de plantas (Galiana, 1995). Esto último se ha conseguido solamente cuando se cultivaron protoplastos de hoja junto a protoplastos de callo de origen nucelar en experiencias de fusión. Sin embargo al caracterizar las plantas regeneradas se demostró que éstas poseen el genoma mitocondrial del parental embriogénico, por lo que en realidad se trata de híbridos (Tusa *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1993 a).

2.2.5 Métodos para fusión de protoplastos.

Los métodos para inducir la fusión de protoplastos vegetales se basan en las propiedades de agentes químicos o condiciones físicas para variar el potencial de

membrana de las células. Los agentes químicos más empleados son el polietilenglicol (PEG) (Kao y Michayluk, 1974), el polivinil alcohol (Nagata, 1978), el dextrano, el dimetilsulfóxido (DMSO) y los iones calcio, o la combinación de varios de ellos (Olivares-Fuster, 1998). De entre los parámetros físicos que pueden ser modificados para conseguir la fusión de las membranas plasmáticas de dos células puestas en contacto, se encuentran el pH, la temperatura, el potencial osmótico del medio o la fuerza centrífuga (Gleba y Sytnik, 1984; Pelletier y Chupeau, 1984).

El conocimiento de los fenómenos fisiológicos que posibilitan la fusión de las membranas biológicas ha permitido combinar parámetros físicos y químicos, empleándose conjuntamente el PEG, el DMSO, la presencia de iones calcio y un elevado pH (Grosser *et al.*, 1990).

Un avance importante en la fusión química lo proporcionaron los estudios de Kao y Saleem (1986), que determinaron que el efecto tóxico del PEG comercial, era debido en parte, a la presencia de impurezas, de carácter ácido, que afectaban a la viabilidad de los protoplastos, y que pueden eliminarse mediante la deionización del PEG con resinas de intercambio iónico.

Como alternativa para conseguir la fusión controlada de gran número de protoplastos son los métodos de electrofusión (Zimmermann y Scheurich, 1981; Bates y Hasenkampf, 1985), basados en el empleo de cámaras de fusión y fuentes eléctricas, los cuales se aplican actualmente con éxito en muchos sistemas vegetales.

El método más conocido de fusión de protoplastos se basa en la utilización de una fuente eléctrica que proporciona tanto corriente alterna como pulsos de corriente continua. El método consiste en resuspender los protoplastos en un medio de baja conductividad y situarlos entre los electrodos de la cámara de fusión que permite someterlos a la acción de un campo eléctrico de corriente alterna de elevada intensidad, en el que los protoplastos se mueven por dielectroforénesis hasta

disponerse unos junto a otros en hilera, formando lo que se denomina “cadenas de perlas”. A continuación, la aplicación de un pulso corto de corriente continua, da lugar a la formación de poros reversibles en los puntos de contacto de las membranas plasmáticas de las células, posibilitando así la fusión de protoplastos con las intensidades de campo eléctrico y el tiempo de duración de los pulsos (Bates *et al.*, 1987; Tempelaar y Jones, 1985; Merhle *et al.*, 1990).

En la fusión de protoplastos de cítricos el grupo americano, dirigido por el Dr. J. Grosser, viene utilizando con éxito la fusión química mediante la combinación de PEG, DMSO, elevado pH y presencia de iones calcio, habiendo conseguido hasta la fecha la regeneración de más de 100 híbridos somáticos distintos (Grosser *et al.*, 1996 c; Grosser *et al.*, 2000). El grupo japonés que inicialmente empleó la fusión química con PEG, se ha inclinado posteriormente por la electrofusión (Hidaka y Omura, 1992; Yamamoto y Kobayashi, 1995), habiendo incluso desarrollado una cámara propia de electrofusión (Hidaka *et al.*, 1995). El grupo francés, dirigido por el Dr. Ollitrault, inició su programa de hibridación somática con la adaptación del método químico de fusión basado en el PEG, pero al no conseguir resultados positivos optó por la electrofusión empleando una cámara plana de doce electrodos en paralelo (Ollitrault *et al.*, 1996).

2.2.6 Hibridación somática

El mejoramiento genético mediante hibridación somática se basa en la fusión de protoplastos aislados de callo nucelar embriogénico con protoplastos del mesófilo de las hojas. Este esquema se basa en la capacidad que presentan algunas especies para producir líneas celulares embriogénicas de origen nucelar a partir del cultivo *in vitro* de óvulos obtenidos de frutos inmaduros.

2.3 ENFERMEDADES EN CÍTRICOS

El término enfermedad, es definido como cualquier síntoma de la apariencia normal, formas, o funcionalidad de los árboles de cítricos o bien de sus frutos. Las enfermedades son clasificadas como infecciosas (bióticas) o no infecciosas

(abióticas). Las enfermedades bióticas son causadas por varios agentes incluyendo bacterias, fitoplasmas, hongos, nematodos, virus y viroides. Las enfermedades abióticas son causadas por condiciones adversas ambientales, nutricionales y defectos genéticos, y prácticas de cultivo erróneas como el impropio uso de químicos. También se incluyen en los abióticos algunos daños de pesticidas que aparecen como anormalidades en el crecimiento como lo son la clorosis y la necrosis y pueden ser atribuidos a enfermedades producidas por agentes (Timmer, 2000).

2.3.1 Diagnóstico de la enfermedad.

Algunas enfermedades pueden ser identificadas relativamente fácilmente por los síntomas que presentan. Otras requieren una búsqueda en microscopio para encontrar los agentes causantes o los análisis y pruebas apropiadas de laboratorio antes de dar un diagnóstico. Con muchas enfermedades, el agente causante no reside donde los síntomas visuales son aparentes. Seguido, es imposible por un fitopatólogo manejar alguna conclusión sin antes haber visto u observado la enfermedad en campo y obtener información de la topología local, condiciones de suelo, prácticas de cultivo, portainjertos, u otros posibles factores asociados (Timmer, 2000).

Las enfermedades se producen con síntomas muy diferentes y específicos, como aquellos que los causan ciertas bacterias, hongos, virus y viroides, pueden ser realmente identificados en campo una vez que el observador ha llegado a ser suficientemente familiarizado con la enfermedad respectiva. Otras enfermedades, y particularmente aquellas que causan efectos extraños o la declinación del árbol, requieren un estudio de campo más arduo y los análisis de laboratorio pertinentes antes de poder decir que la enfermedad está establecida. La transmisión del agente causal de un árbol enfermo a otro sano necesita ser diagnosticada. Muchas pruebas serológicas y métodos moleculares están ahora al alcance para diagnosticarla (Timmer, 2000).

2.3.2 La ocurrencia de la enfermedad y su proliferación.

La ocurrencia y severidad de una enfermedad biótica será determinada por la virulencia del patógeno, la susceptibilidad del hospedero, y las condiciones ambientales locales. Con algunas enfermedades sistémicas, un vector debe estar presente para transmitir el agente de la enfermedad de un árbol a otro.

2.3.3 Virus de la tristeza de los cítricos.

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es el patógeno viral más importante económicamente en cítricos y causa algunas enfermedades severas. Millones de árboles con portainjerto de naranja agria han muerto o se han vuelto inproductivos por declinamiento inducido por CTV. El virus de la tristeza probablemente se originó en Asia, la cual también es considerada el origen de los cítricos, y se ha venido diseminando a muchos países por el movimiento de material infectado. La subsecuente diseminación por vectores áfidos ha creado mayor epidemia. La etiología viral de la tristeza fue reconocida en 1946, y el virus fue posteriormente asociado con problemas en el tallo en naranja dulce, toronja, y aun en portainjertos tolerantes al CTV como lima Rangpur y limón. (Timmer, 2000)

2.3.4 Rango del hospedero.

2.3.4.1 El agente causal.

El CTV es un miembro del grupo de los closterovirus. Los viriones son flexus, cerca de 2,000 x 11 nm en tamaño, y contienen una cadena sencilla no segmentada, de sentido positivo de RNA genómico. La secuencia del genoma de CTV de aislamiento de la declinación en Florida T36 contiene 19,296 nucleótidos, con 12 marcos de lectura abiertos (ORFs), que codifican para 17 proteínas. Los ORFs 7 y 8 codifican para las proteínas de peso molecular calculado de 27.4 (P27) y 24.9 KDa respectivamente. ORF 8 ha sido identificado como la proteína de la cápside (CP), y P27 como una CP divergente con 41% de similitud con el nivel proteínico. La CP y P27 son ambas proteínas estructurales del virión, con P27

localizada en la parte terminal del virión y la CP encapsulada en el resto del virión. Este es transmitido por injerto o por pulgones. El vector más eficiente es el pulgón café o pulgón oriental (*Toxoptera citridus*, Kirk), que está presente en Asia, África, América del sur, algunos países de Centroamérica e Islas del Caribe. (Medina, Becerra, 1993)

Los genomas de todas las cadenas secuenciadas difieren de ser similares en la organización del genoma y la secuencia homóloga de cierre en la porción 3´del genoma.

Las plantas infectadas con CTV contienen, en adición con las cadenas completas de moléculas de RNA sencillo y doble, algunas moléculas pequeñas de virus comúnmente llamadas RNA subgenómico (sgRNA) y RNA defectuosos. Los RNA defectuosos representan moléculas del virión de RNA que contienen los extremos 5´y 3´del genoma normal pero que han perdido algunas partes internas. Estos son diferentes dependiendo del CTV. (Timmer, 2000)

Muchas especies de cítricos son hospederos para CTV, como son otras especies de otra generación de la familia *Rutaceae*: *Aegle marmelos*, *Aeglopsis Chevalieri*, *Afraegle paniculata*, *citropsis gillettiana*, *Microcitrus australis*, y *Pamburus missionis*. Muchos clones de naranja trifoliados y muchos de sus híbridos son resistentes a infección.

Dependiendo de cómo el CTV fue aislado variara considerablemente en su habilidad para causar síntomas en diferentes plantas hospederas y de la intensidad de los síntomas expresados. Muchos tipos aislados de CTV son componentes de una mezcla de cadenas de CTV, pero a menudo solamente la cadena más severa es reconocida en dichas mezclas. Algunas son medianamente agresivas y producen efectos no notables en muchas variedades comerciales de cítricos esto usualmente causa un ligero aclaramiento en las venas y tallo pinto cuando son inoculados en hospederos susceptibles como limón Mexicano y *Citrus excelsa* (Timeer, 2000).

La tristeza produce el declinamiento de todas las variedades comerciales de cítricos injertadas sobre naranjo agrio, excepto los limones verdaderos (*Citrus limón*). La enfermedad provoca la muerte o taponamiento de los vasos conductores de la corteza que alimentan a las raíces. En consecuencia, las raíces quedan desnutridas y mueren, principalmente las raicillas responsables de la absorción de agua y nutrientes. Cuando la enfermedad produce un colapso repentino, los árboles mueren en una o dos semanas quedando totalmente secos con hojas y frutos colgando de las ramas. Existe otro tipo de tristeza que produce hendiduras o acanaladuras en árboles injertados sobre patrones tolerantes, ocasionando bajas sensibles en el rendimiento y calidad de los frutos (Medina, Becerra, 1993).

2.3.4.2 Síntomas.

Los síntomas de tristeza en árboles afectados se pueden describir de dos maneras: **1)** aquellos producidos en árboles injertados sobre naranjo agrio y **2)** síntomas producidos por razas virulentas en variedades injertadas sobre patrones tolerantes (Garnsey y Lee, 1988; Moreno *et al.*, 1983; Rocha *et al.*, 1995). Estos síntomas pertenecen a cítricos dulces más que al limón Mexicano.

2.3.4.3 Síntomas en árboles sobre naranjo agrio.

La tristeza produce el decaimiento de todas las variedades comerciales de cítricos injertadas sobre naranjo agrio, excepto los limones verdaderos (*C. limón*). Esto se atribuye a que la enfermedad provoca la muerte del árbol por taponamiento de los vasos conductores de la savia elaborada que sirve de alimento a las raíces. En consecuencia, las raíces quedan desnutridas y mueren, principalmente las raicillas responsables de la absorción del agua y nutrientes del suelo. En condiciones de campo se pueden distinguir tres tipos de comportamiento en árboles infectados por tristeza.

a) Colapso rápido. Los árboles aparentemente sanos comienzan a mostrar en sus hojas un marchitamiento similar al producido por falta de agua a pesar de disponer

de ella en el suelo. Estos árboles mueren en una o dos semanas quedando totalmente secos con hojas y frutos colgando de las ramas.

b) Decaimiento lento. En árboles afectados el follaje cambia su color verde intenso por un verde claro seguido de un amarillamiento general. Se produce una defoliación importante y una muerte progresiva de raicillas. El árbol pierde vigor y las escasas brotaciones se presentan en ramas gruesas, por lo que el volumen de la copa se reduce progresivamente. Los frutos producidos son de tamaño pequeño y se amarillean prematuramente. La coloración final en la madurez es más pálida que lo normal. Estos árboles pueden permanecer vivos durante varios años, aunque su valor comercial es prácticamente nulo.

c) Árboles sin decaimiento. En ocasiones se observan árboles infectados que no muestran síntomas de la enfermedad en el follaje y frutos. Estos árboles tienen con frecuencia un tamaño inferior a los árboles sanos y presentan hinchazón del tronco de la variedad y punteaduras en la corteza del portainjerto de naranjo agrio, al nivel de la línea del injerto. No obstante pueden encontrarse árboles infectados con aspecto y desarrollo normal. Las causas de esta ausencia de síntomas son desconocidas y pueden ser debidas a la presencia de razas del virus muy débiles o a condiciones ambientales que dificultan la expresión de síntomas.

1. Picado del tallo en toronja en Sudáfrica, Australia y Japón.
2. Aislamiento de Capao Bonito sobre naranjo dulce en Brasil.
3. Picado del tallo 12-B que ataca naranjo dulce en California.
4. Picado del tallo en naranja Navel en Perú.
5. Aislamiento destructivo en naranjo dulce sobre naranjo agrio en Florida.
6. Nueva raza que destruye árboles sobre patrón de naranjo agrio en Israel.
7. Raza severa que produce picado del tallo en naranja Navel en Australia.

2.3.5 Epidemiología.

El CTV es dispersado por movimiento de material vegetal infectado y por vectores áfidos. La dispersión a larga distancia es usualmente por material vegetal infectado. Un número de factores influyen en la dispersión natural de CTV por áfidos. Las temperaturas templadas en verano y caen a favor del desarrollo de áfidos en nuevo tejidos con gran cantidad de virus. Los factores que promueven nuevos brotes, como la irrigación, fertilización, incrementan la oportunidad de transmisión. Cuando las colonias de áfidos incrementan, formas con alas se desarrollan; pueden volar y dispersar el CTV a árboles cercanos (Timmer, 2000).

2.3.6 Transmisión.

El virus de la tristeza es transmitido fácilmente por injerto y de una manera semipersistente por áfidos o pulgones. El grado de eficiencia en la diseminación del virus varía con las especies de pulgones, razas del virus y especies hospederas. También se ha demostrado que la tristeza puede ser transmitida por *Cuscuta sp.*, la cual es una planta parásita de los árboles de cítricos (Garnsey y Lee, 1988).

El pulgón café de los cítricos o asiático (*Toxoptera citricida Kirkaldy*), además de ser una plaga importante de este grupo de frutales, es el principal vector del virus de la tristeza, incluyendo las razas agresivas que ocasionan "picado del tallo" y amarillamiento de plantas (Roistacher y Bar-Joseph, 1987; Roistacher y Moreno, 1991; Roistacher *et al.*, 1991). Este pulgón se encuentra presente en las regiones cítricas de Asia, Centro y Sur de África, Australia, América del Sur, América central, el Caribe y Florida. A fines del año de 1999 se encontró por primera vez en el estado de Quintana Roo en México. Hasta el momento, este pulgón no se ha detectado en el resto de los estados cítricos de México, Estados Unidos (con excepción de Florida) y en países de la Costa del mar Mediterráneo. Sin embargo, la reciente dispersión de esta plaga hacia el norte del continente Americano (de la parte sur del continente hacia Colombia, Venezuela el Caribe y América Central), levanta gran preocupación de que el áfido pueda emigrar hacia los estados productores del Golfo y Océano Pacífico México de. La introducción de *T.*

citricidus en áreas libres de la plaga, podría incrementar la dispersión de razas exóticas del virus. Es casi seguro que existan aislamientos severos del virus de la tristeza en forma "latente" en todos los países de América Central, México, Texas, California y las islas del Caribe. Si el pulgón café es introducido a México y se presente de manera endémica, es probable que estos aislamientos sean diseminados, tal y como ha sucedido en las áreas cítricas de Venezuela y recientemente en Costa Rica (Roistacher y Moreno, 1991; Roistacher *et al.*, 1991; Lastra *et al.*, 1991 a; Lastra *et al.*, 1991 b).

El pulgón del melón *Aphis gossypii* Glover, también puede transmitir muchos aislamientos exóticos del virus de la tristeza, pero usualmente no es abundante en el cultivo de los cítricos y es menos eficiente que el *T. citricida* para transmitir esta enfermedad. A pesar ello, actualmente, es el principal vector de la enfermedad en California, Florida, España e Israel (Roistacher y Bar-Joseph, 1987; Yokomi *et al.*, 1989).

Otras especies de áfidos que pueden transmitir el virus, aunque con una eficiencia aún más baja son: el pulgón verde de los cítricos *A. spiraecola* Patch (sinónimo de *A. citricola* van der Goot) y pulgón negro de los cítricos *Toxoptera aurantii* (Garnsey y Lee, 1988; Roistacher y Bar-Joseph, 1987).

2.3.7 Diagnóstico.

Históricamente, el limón mexicano se ha usado como planta indicadora para el diagnóstico de esta enfermedad. Al injertar esta especie con yemas de árboles infectados se observa una decoloración de las venas en hojas jóvenes y el picado del tallo. Para fines de comparación de razas del virus de la tristeza se utiliza el siguiente grupo de plantas indicadoras: naranja dulce 'Madam Vinous', limón mexicano, naranjo agrio, toronja y plantas de naranjo dulce injertadas sobre naranjo agrio. Con estas plantas, son evaluados la mayoría de las razas o aislamientos del virus que causan amarillamiento de plantas, picado del tallo y declinamiento sobre el naranjo agrio (Lee y Rocha, 1992; Rocha *et al.*, 1995).

Otros métodos de identificación del virus son microscopía electrónica y de luz, inclusiones virales, análisis de RNA de doble filamento y PCR; sin embargo, la técnica serológica ELISA (inmunosorbencia ligado a enzima) ha llegado a ser el método más común y ampliamente usado para un rápido diagnóstico del virus (Rocha *et al.*, 1995).

2.3.8 Identificación.

El clásico método para la detección de CTV es por inoculación de un indicador en plantas y producción de aclaramiento de venas. Para propósitos de rutina, la detección del CTV es ahora más sofisticada con procedimientos serológicos como lo es el ELISA o un ensayo de tejido de blot. Algunos otros métodos pueden ser utilizados: microscopio específico de electrones, análisis de Western Blot o PCR. Recientemente, un sistema de ELISA llamado (OSP-ELISA) fue desarrollado ya que reacciona selectivamente con cadenas de CTV que causan tallo pintado en naranja dulce. Otros métodos involucran la amplificación de productos usando PCR con pruebas específicas de cadena o polimorfismo conformacional de cadena sencilla del producto del gen de CTV obtenido por PCR.

El CTV fue inicialmente mapeado en la región 282 kb incluyendo un cluster de genes resistentes a la enfermedad con 7 miembros y 8 retrotransposones. El análisis de secuencia del CTV alrededor de la región genómica localizada en el locus dentro de la región de Poncirus 121 Kb de 10 genes comprimidos. Cada gen fue clonado en *Agrobacterium* vector binario y usado para transformar variedades susceptibles para probar su capacidad de resistencia. (Gmitter, 2008)

2.3.9 Control.

Las medidas de control para la tristeza consisten en: evitar la entrada de la enfermedad en un área o país libre de la misma (cuarentena) y/o suprimir los árboles infectados para evitar su diseminación (erradicación); y convivir con la tristeza evitando los daños producidos mediante el uso de portainjertos tolerantes

y protección cruzada (Garnsey y Lee, 1988; Lee y Rocha, 1992; Moreno *et al.*, 1983; Rocha *et al.*, 1995. Bar-Joseph *et al.*, 1989).

2.3.10 Cuarentena.

En México es necesario tomar medidas para evitar la introducción de razas severas del virus. Se debe establecer un sistema de cuarentenas que controlen la introducción clandestina de material de propagación procedente de aquellos países donde la enfermedad y/o el vector están presentes, para evitar la introducción del virus de la tristeza y/o el pulgón café de los cítricos.

2.3.11 Erradicación.

En zonas donde la tristeza ha sido introducida, pero su incidencia es baja, es posible evitar o retrasar el avance de la enfermedad mediante la eliminación de árboles infectados. Si la velocidad de eliminación de los árboles infectados es superior a la velocidad de difusión de la tristeza por los vectores, se puede conseguir la erradicación total de la enfermedad.

2.3.12 Portainjertos tolerantes.

En los países donde la tristeza causa daños severos debido a su alta incidencia, las medidas de control son principalmente el uso de yemas libres del virus y la selección de portainjertos tolerantes a la enfermedad. El naranjo trifoliado, citrange troyer y carrizo, naranjo dulce, limón rugoso, volkameriana, lima rangpur y mandarina cleopatra son tolerantes al virus.

2.3.13 Protección cruzada.

La utilización de portainjertos tolerantes como medida de combate es necesaria, pero no suficiente en aquellos países en donde existen razas virulentas, capaces de causar daños directos aún en las variedades injertadas sobre esos portainjertos. En estos casos, una de las medidas más efectivas para el control de la tristeza es la preinoculación con cepas benignas del virus (protección cruzada).

Esta medida de control se practica en Brasil para proteger las plantaciones de naranja pera de razas del virus que causan picado del tallo, y ha tenido una gran aceptación por parte de los productores de cítricos (Costa y Muller, 1980). En 1985, se estimó que alrededor de 45 millones de árboles de naranjo 'Pera' fueron establecidos con protección cruzada y para 1992 esta cifra se incrementó a 80 millones de árboles. Otros países como Sudáfrica, las islas Reunión, Australia, Japón, India, Venezuela y California han tenido resultados promisorios con la protección cruzada.

2.3.14 Síntomas en árboles sobre patrones tolerantes.

El síntoma más característico es la presencia de acanaladuras en la madera, que hacen que las ramas sean muy quebradizas y puedan romperse con facilidad por el viento. El follaje puede presentar síntomas de decaimiento y deficiencias nutricionales. Desde el punto de vista económico los síntomas más importantes son la disminución de la producción y la baja calidad de los frutos, debido al tamaño pequeño y deformación de los mismos. Las razas existentes en América del Sur, Sudáfrica, Australia y Asia producen daños importantes en toronjas y naranja dulce. En algunas zonas del Extremo Oriente, África y Brasil existen razas muy virulentas que, además de producir síntomas en toronjas, afectan a todas las variedades de naranja dulce e incluso a algunos portainjertos tolerante.

3.- JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.

En el contexto internacional, México es el principal productor de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle], con más de 78,000 ha plantadas y de las que anualmente se obtiene un volumen de producción superior a las 1,750,000 ton. de fruta. Le siguen en importancia la India con 30,000 ha y Perú con 17,500 ha. Aunque este cítrico no es originario de México, ha encontrado condiciones favorables para su desarrollo en las Costas del Pacífico Mexicano donde se cultiva de manera comercial. Los estados con mayor superficie cultivada son: Colima

29,310 ha; Michoacán 37,012 ha; Oaxaca 17,858 ha y Guerrero 7,104 ha (SAGARPA 2005).

La citricultura mexicana y especialmente el limón mexicano, están seriamente amenazados por dos enfermedades de alto impacto económico. La tristeza de los cítricos (VTC) enfermedad de tipo viral que ha matado más de 116 millones de árboles de cítricos en el mundo, la cual es transmitida por injerto durante la propagación o bien es diseminada eficientemente por el pulgón café *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Hemiptera: *Aphididae*). El VTC se ha detectado en 20 de los 23 estados productores de cítricos del país y el pulgón café ya se encuentra en los estados del sureste y recientemente se le reportó en Puebla.

Por su parte el Huanglongbing (HLB) o greening es una enfermedad causada por la bacteria (*Candidatus liberobacter*), que ha provocado la muerte de más de 60 millones de árboles en países asiáticos y africanos, es transmitida por el psílido asiático (*Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: *Psyllidae*). Este insecto se encuentra diseminado en prácticamente todas las regiones productoras de cítricos de nuestro país. En tanto que el HLB se encuentra muy cerca, afectando los cítricos de Cuba y Florida y recientemente se ha detectado especímenes de *Diaphorina citri* portando la bacteria en Belice.

Desgraciadamente la inmunidad genética contra el VTC es rara en el grupo de la *Aurancioideas*, y prácticamente todas las especies de cítricos pueden ser portadoras de algún aislamiento de este virus. No obstante, muchas de ellas son relativamente tolerantes y no llegan a expresar síntomas de la enfermedad (Rocha-Peña *et al.*, 1995).

La resistencia genética natural está presente en algunos géneros próximos a los cítricos como; *Poncirus trifoliata*, *Severina buxifolia*, *Swinglea glutinosa* (Dawson y Bor-Joseph, 1995), *Atlántica ceylanica*, *Fortunella crasifolia* (Mestre *et al.*, 1997a). De todos esos géneros, la resistencia genética contra VTC que presenta *P. trifoliata* es la que ha captado mayor atención (Fang y Roose, 1999).

El mejoramiento por hibridación sexual, presenta barreras tales como; apomixis, esterilidad e incompatibilidad, heterocigosis, poliembrionía y largo período juvenil, las cuales impiden ó dificultan la obtención plantas híbridas(Frost y Soost, 1968; Vardi, 1981; Ikeda, 1981; Moore *et al.*, 1993; Vardi, 1996; Kochba y Spiegel-Roy, 1977).

La hibridación somática vía fusión de protoplastos es una alternativa de mejoramiento genético que se ha utilizado en otros cítricos para desarrollar genotipos tetraploides con características de interés.

La hibridación somática se lleva a cabo mediante fusión de protoplastos aislados de callo embriogénico obtenido del estigma y estilo con protoplastos del mesófilo de las hojas. Este esquema se fundamenta en la capacidad que presentan algunas especies de cítricos para producir líneas celulares embriogénicas.

De esta forma, la embriogénesis somática cobra importancia debido que puede superar las limitaciones o barreras que tiene el fitomejoramiento genético convencional, y permite un eficiente mejoramiento genético de la especie deseada y de esta manera incorporar características de interés como el de la resistencia al CTV y otras enfermedades lo que es el objetivo de éste proyecto.

4.- HIPÓTESIS DEL PROYECTO.

Es factible la generación de plantas híbridas somáticas entre limón mexicano y limón italiano usando las metodologías de de fusión de protoplastos propuestas por Grosser et al 1990.

5.- OBJETIVOS

Objetivo general.

Desarrollar las metodologías necesarias para generar híbridos somáticos entre limón mexicano y otras especies cítricas con el fin de incorporar resistencia genética al virus de la tristeza de los cítricos

Objetivos Particulares:

- 1.- Implementar un protocolo para la generación de callo embriogénico de limón mexicano.
- 2.- Desarrollar un protocolo eficiente para hibridación somática de limón mexicano con otras especies de cítricos.
- 3.- Regeneración de plantas híbridas somáticas
- 4.- Caracterizar genéticamente los productos de la hibridación somática

6.- METODOLOGIA

Este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Campo Experimental Tecomán Col., del INIFAP, y en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Dpto. de Química de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. En el transcurso del proyecto se hizo además una estancia en el Laboratorio del Citrus research and education center de la Universidad de Florida.

6.1 Obtención del explante

Los genotipos utilizados en este proyecto fueron: Limón mexicano variedades colimón y colimex, limón Italiano Rosemberg, Limoneria R-8 y Eureka. El limón Italiano fue proporcionado por el INIFAP campus Tecomán al igual que los estilos y estigmas, el limón mexicano se obtuvo de árboles de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

El tejido utilizado en la realización de este proyecto fueron estilos y estigmas de limón mexicano, y óvulos no desarrollados de limón Mexicano e Italiano como los observados en la Figura 1.



Figura. 1 Genotipos de limón mexicano e Italiano utilizados en la obtención de callo embriogénico por la metodología de Grosser y Gmitter *et al* 1990

6.2 Metodología para la obtención de callo.

Para la generación de callo embriogénico se llevó a cabo la metodología propuesta por Carimi *et. al* 1986, y la de Grosser y Gmitter 1990, las se describen a continuación:

6.2.1. Embriogénesis somática a partir del estigma y el estilo de la flor.

Los botones florales de los genotipos de limón mexicano colimón y colimex y se colectaron entre 10:00 y 12:00 del día en el campo experimental y en la Universidad Autónoma de Aguascalientes se tomaban los explantes a las 10:00 de la mañana. Se seleccionaron botones florales en etapa final de su desarrollo pero antes de la antesis. Ya en el laboratorio y bajo condiciones estériles, los botones se esterilizaron por inmersión de 2 minutos en etanol al 70% y posteriormente por 15 minutos en hipoclorito de sodio al 2%. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril en campana de extracción.

6.2.2.1. Establecimiento de los explantes en el medio de cultivo.

Bajo condiciones estériles y con ayuda de pinzas y un bisturí, las flores se disectaron para extraer la porción del estigma-estilo, mismos que posteriormente fueron colocadas de forma vertical dentro de las cajas petri con la parte herida en contacto con el medio de cultivo elaborado en base a las sales básicas de Murashigue y Tukey (1969), adicionado con 3 concentraciones diferentes 0.3, 0.6, y 1 mg·L⁻¹ de Bencil amino purina MT+BA, se estudió adicionalmente las 3 concentraciones de BA con 0.42 mg·L⁻¹ de 2,4 D cada una de ellas. Se prueba una

concentración de $0.42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ. Se colocaron cinco explantes por caja petri con medio de cultivo, las que finalmente se rotularon y sellaron debidamente. Los cultivos se transfirieron a la cámara de crecimiento la que permaneció a temperatura de entre 25 y 27°C . Los tejidos se subcultivaron cada 21 días. Las cajas petri con los cultivos se monitorearon periódicamente para detectar y eliminar el material contaminado.

6.3. Obtención de callo embriogénico modificando lo propuesto por Grosser y Gmitter 1990.

6.3.1. Desinfección de frutas

Para la generación de callo embriogénico a partir de óvulos no fecundados, como lo proponen Grosser y Gmitter (1990), se utilizaron frutas en estado inmaduro de aproximadamente 4 cm de diámetro que luego fueron llevadas a el laboratorio donde primero se lavaron con agua corriente, posteriormente se pusieron en una solución de etanol al 70% durante 5 minutos, luego se enjuagaron una vez con agua destilada y finalmente se sumergieron en una solución de blanqueador comercial 15% por 30 minutos. Pasado este tiempo bajo condiciones de esterilidad se enjuagaron por tres ocasiones con agua destilada estéril.

6.3.2. Extracción de óvulos

Con pinzas estériles se tomó el fruto y se colocó en una caja petri y con ayuda de un bisturí estéril, se abrió el fruto, haciendo un corte en la zona ecuatorial sin llegar al centro de la fruta, seguido se hizo girar ambos hemisferios de la fruta y se separaron en mitades. Con ayuda fórceps estériles se extrajeron los óvulos y se colocaron en medio de inducción de callo embriogénico. Se probaron las formulaciones EME 0.15M, H+H, y DOG, propuestas por Grosser y Gmitter (1990). Los óvulos extraídos se incubaron en la oscuridad a una temperatura de $28\pm 2^\circ\text{C}$. Los tejidos fueron transferidos cada 2 o 3 semanas a medio nuevo de inducción, hasta que el callo embriogénico emergió de los óvulos que respondieron a los

tratamientos. Para mantener los cultivos de callo embriogénico se subcultivaron cada 4 semanas bajo las mismas condiciones de oscuridad y temperatura.

6.4. Cultivo de callo friable en medio líquido

Para iniciar la suspensión de callo no diferenciado, se tomaron aproximadamente 2.0 g de callo friable y se transfirieron a frascos Erlen Meyer con 25 ml de solución H+H (Anexo 1). Se colocaron las suspensiones en un agitador rotativo a 100 rpm y a temperatura de 28°C. Durante las primeras tres semanas las suspensiones se fueron transfiriendo a medio nuevo cada semana. Posteriormente las transferencias se hicieron cada 2 o 3 semanas a medio nuevo. Para mantener las suspensiones de callo embriogénico por largo tiempo, se requirió de hacer subcultivos cada 2 semanas a 40 ml de solución H+H agitando a 100 rpm e incubando a las mismas condiciones de temperatura y en ambiente de oscuridad.

6. 5. Experimento alterno para la obtención de callo.

Se utilizaron 5 estadios diferentes de maduración de limón mexicano, el primero de 0.5 cm, segundo de 1.5cm, tercero de 3cm, el cuarto de 4.5cm y el quinto de 5cm de diámetro respectivamente como se muestra en la Figura 2. Se cortaron los frutos de los diferentes estadios y se sometieron a un proceso de limpieza, el primer paso fue colocarlos en un baño rápido de 1 min en alcohol al 70%, agitando cuidadosamente. El segundo paso fue colocarlos en una solución de hipoclorito de sodio al 15% y aforando con agua destilada, se le agregaron 5 gotas de tween, se colocaron en agitación continua por 20 minutos, a excepción de el estadio 1 que se coloca por 10 minutos aproximadamente. Se llevan a la campana y se enjuagan con agua estéril por 3 ocasiones. El fruto se abrieron con bisturí y se extrajeron cuidadosamente los óvulos y tejido nucelar con pinzas. Se colocaron alrededor de 8 explantes por caja petri. Se utilizaron 3 medios de cultivo diferentes: a) DOG 5x (con 5 ml de Cinetina/L de medio) propuesto por Grosser y Gmitter (1990), b) DOG 10x (Con 10 ml de Cinetina/L de medio), y por último el

medio 5:1 (Con 5 mgL^{-1} de BA, 1 mgL^{-1} de 2,4-D). Se elaboraron 8 cajas por cada medio por estadio. Cuatro de las cajas se colocaron en presencia de luz, y las cuatro restantes se colocaron en la oscuridad. Al cabo de 1 semana se revisaron para ver el proceso de producción de callo, y así sucesivamente cada semana. Los explantes se cambiaron de medio cada 4 semanas aproximadamente. El callo obtenido se separó del explante cada semana para evitar su aglomeración. El callo embriogénico friable se subcultivó cada 4 semanas colocándolo en medio DOG, DOG 2X.



Figura. 2. Limón mexicano de los cinco estadios utilizados en experimento alterno para estudiar el potencial de formación de callo embriogénico.

6.6. Fusión de protoplastos

Para los trabajos de fusión de protoplastos o producción de híbridos somáticos, se utilizó la metodología reportada por Grosser *et al* 2007, misma que describe a continuación:

Los protoplastos se aislaron de tejido de hoja y suspensiones de callo embriogénico de 4 semanas de cultivados.

Se extrajeron 2 ml callo en suspensión y se colocaron en cajas petri 60 x 15 mm, con pipeta Pasteur se extrajo el exceso de líquido, se colocaron 1.5 ml de solución enzimática y 2.5 ml de medio BH3 (Anexo 1), se agitó cuidadosamente, se selló y se llevó a agitación en oscuridad por 18 horas.

El procedimiento para obtener plántulas in vitro es como sigue: se removió mecánicamente las coberturas de las semillas, desinfectándolas por inmersión en una solución comercial de cloro al 20% por 15-20 minutos seguido por 3 enjuagues de 10 minutos con agua estéril doblemente destilada. Las semillas se germinaron en 2-3 semanas por cultivo en medio RMAN (Anexo 1) en cajas magenta para el cultivo de tejidos, mantenidos en la luz a temperatura ambiente. Se seleccionaron las hojas de plantas vigorosas, se desinfectaron por inmersión en HCl 1N por 30 segundos, seguido por inmersión en cloro comercial al 10% por 12-15 minutos conteniendo 3 gotas de detergente tween 20, seguido de 5 minutos de enjuague en agua doblemente destilada. Tanto en hojas in vitro como de invernadero se disectó tejido vascular dañado con un escarpelo. Se cortaron 10-15 hojas de plantas de 2 meses de edad cultivadas in vitro propagadas en medio MS al 50% o RMAN. Se removió tejido vascular dañado y la vena central con un bisturí estéril; el material de hoja se cortó horizontalmente en cortes de 1-2 mm de longitud. Se incubó el material en frascos Erlen Meyer de 125ml conteniendo una mezcla de 8 ml de 0.6M BH3 medio líquido y 3 ml de solución enzimática. Se colocó la solución por 15 minutos a 50 kilopascales (KPa) para facilitar la infiltración de la solución enzimática al tejido. La preparación se incubó por 18 h, en total oscuridad y en un agitador rotatorio a 50 revoluciones por minuto (rpm).

Finalizada la incubación se pasaron los preparados enzimáticos a través de mallas de nylon de 45µm, se removió el tejido no digerido y otros desechos celulares. Se

colectó el filtrado en tubos Pírex de 40 ml. Se transfirió el contenido en un tubo de centrifuga de 15 ml y se colocaron 5 ml de medio líquido 0.6M BH3 se centrifugaron a 900 rpm por 8 min. Se removió la suspensión con una pipeta Pasteur y se resuspendió cuidadosamente el pellet de protoplastos en 5 ml de solución sacarosa al 25%. Se añadieron lentamente 2 ml de solución de manitol al 13% directamente en la cima de la capa de sacarosa no mezclando los gradientes. Se centrifugó a 900 rpm x 8 min. Se removieron los protoplastos del centro con cuidado de no extraer los gradientes al mismo tiempo. Se resuspendieron con 13 ml de medio 0.6 M BH3. Se vuelven a centrifugar a 1000 rpm por 9 min. Se Remueve el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente la pastilla en medio 0.6M BH3 (Anexo 1) aproximadamente 10 veces el tamaño de la pastilla. Se volvió a centrifugar a 900 rpm por 8 min. Se removió el sobrenadante.

6.7. Fusión de protoplastos.

Las preparaciones se purificaron colocando 10 ml de medio BH3 y centrifugándose a 800 rpm por 6 minutos. Se decantó el sobrenadante y se diluyó el pellet 10 veces su volúmen, posteriormente se mezclaron ambos progenitores (protoplastos) y se centrifugaron a 700 rpm por 6 min. Se decantó el sobrenadante y se diluyó la pastilla de 2 a 3 veces su volumen, se mezcló con cuidado.

Se colocaron 9 gotas de la mezcla de protoplastos en el centro de las cajas petri y posteriormente se agregaron 6 gotas de la solución de Polietilenglicol 500 al 50%, esperamos 15 min. tratando de no perturbar la fusión. Posteriormente se agregaron en la periferia 4 gotas de solución A+B (90/10 v/v) (Anexo 1) y se dejó actuar por 10 min, se añadieron 20 gotas de medio BH3 en la periferia para eliminar las soluciones anteriores, esperamos 5 min, se retiró con mucho cuidado la solución con ayuda de una pipeta Pasteur y se volvieron a agregar 20 gotas, sin esperar se retiran de la solución de protoplastos, se añadieron rápidamente 20 gotas de solución BH3 y posteriormente 10 gotas de medio líquido EME con maltosa, se sellaron, se rotularon y se almacenaron en oscuridad por 28 días.

6.7.1. Cultivo de protoplastos.

Los cultivos en caja petri se prepararon esparciendo 4-8 gotas de la suspensión de protoplastos en el centro de las cajas petri, seguido por la adición de algunas gotas de medio de cultivo BH3 fresco alrededor del perímetro de la caja para mantener una alta humedad. Las cajas petri son selladas eficientemente con Parafilm y almacenadas en cajas plásticas en la oscuridad a 28°C por un periodo de 4-6 semanas.

6.7.2 Obtención de embriones somáticos.

Los embriones somáticos se recuperaron a los 2 meses y se elongaron en medio 1500 sólido (Anexo 1) en cajas petri de 100 x 20. Ya elongados se colocaron en medio B sólido para germinar en cajas petri de 100x20 mm. Los embriones somáticos se transfirieron a medio B sólido con 0.02 mg/l de NAA para promover la elongación axial.

6.8. Obtención de plántulas.

Los embriones ya elongados y enraizados se colocaron en medio ½MS en presencia de luz a temperatura ambiente.

6.9. Verificación de híbridos somáticos

Los posibles híbridos somáticos resultantes se sometieron a un análisis de ploidía de acuerdo a lo propuesto por Grosser y Gmitter (1990).

7.- RESULTADOS.

Durante la capacitación en Florida se lograron hacer fusiones de protoplastos de diferentes tipos de cítricos entre los cuales se encontraban: Meiwa, Ruby Red, Murcott, Vernia, Limequat, Pakistan Sweet Lime, entre otros por lo cual se logró el objetivo de aprender la metodología para llevar a cabo Hibridación somática en cítricos. Así mismo se aprendió la técnica de rescate de embriones y micropropagación de cítricos como se muestra en la Figura 3.

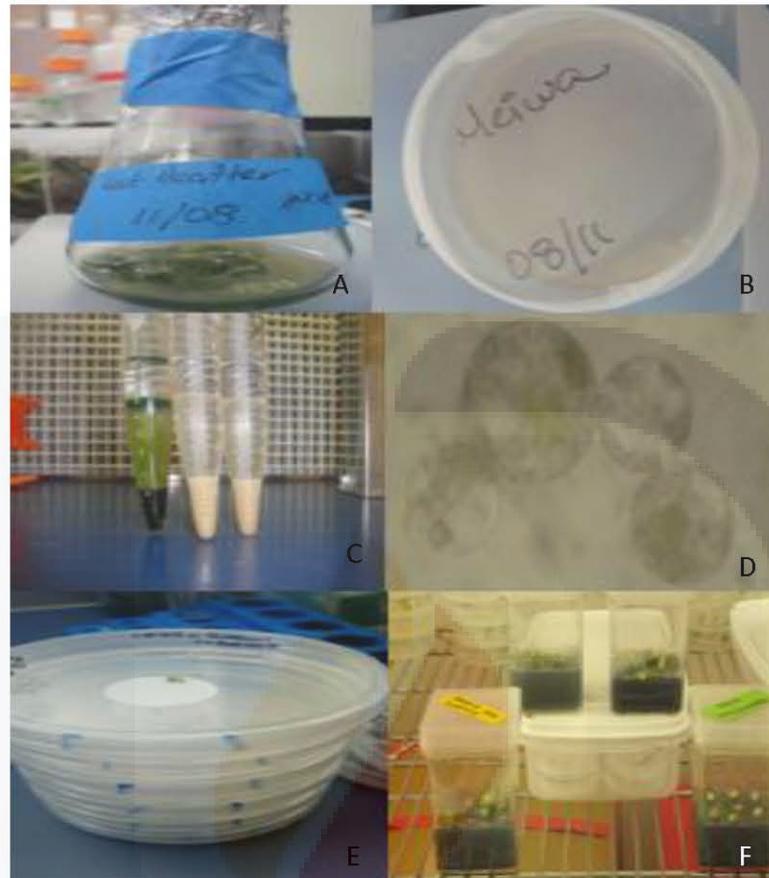


Figura 3. Capacitación en la Universidad de Florida: A) Obtención de protoplastos del mesófilo, B) Obtención de protoplastos de suspensiones embriogénicas, C) Obtención de protoplastos friables, D) Fusión de protoplastos, E) Rescate embrionario y F) Micropropagación de plantas.

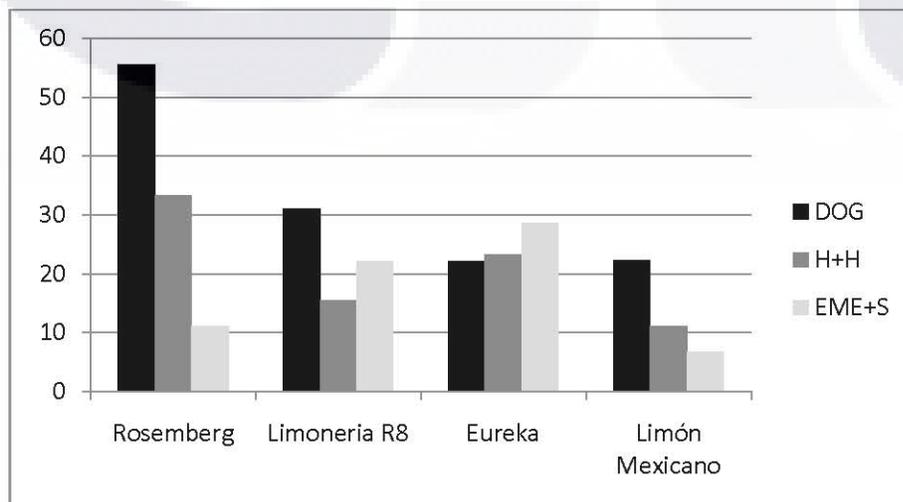


Figura 4. Efecto de los 3 medios de cultivo propuestos por Grosser y Gmitter *et al* 1990 en el porcentaje de regeneración de callo embriogénico a partir de óvulos no desarrollados de frutos semimaduros a los 6 meses de establecidos los cultivos.

Se ha observado que de los tres medios de cultivo utilizados para la obtención de callo a partir de óvulos, el DOG es el que presenta una mayor cantidad de óvulos en proceso de desarrollo de callo, el H+H es más lento pero funcional y el EME+sacarosa torna el proceso en embriogénesis directa lo cual no es muy apropiado para el proceso, ya que nosotros requerimos la embriogénesis indirecta. Cabe resaltar que estos resultados son con cultivos de limón mexicano como se puede observar en la figura 4.

El proceso de obtención fue sumamente lento, los resultados se comenzaron a ver a partir de los 5 meses de expuestos los óvulos no desarrollados en los medios.

Se describen a continuación los resultados al obtener callo embriogénico a partir de limón mexicano e italiano, utilizando los medios de cultivo DOG, EME+S, H+H, obteniéndose los siguientes:

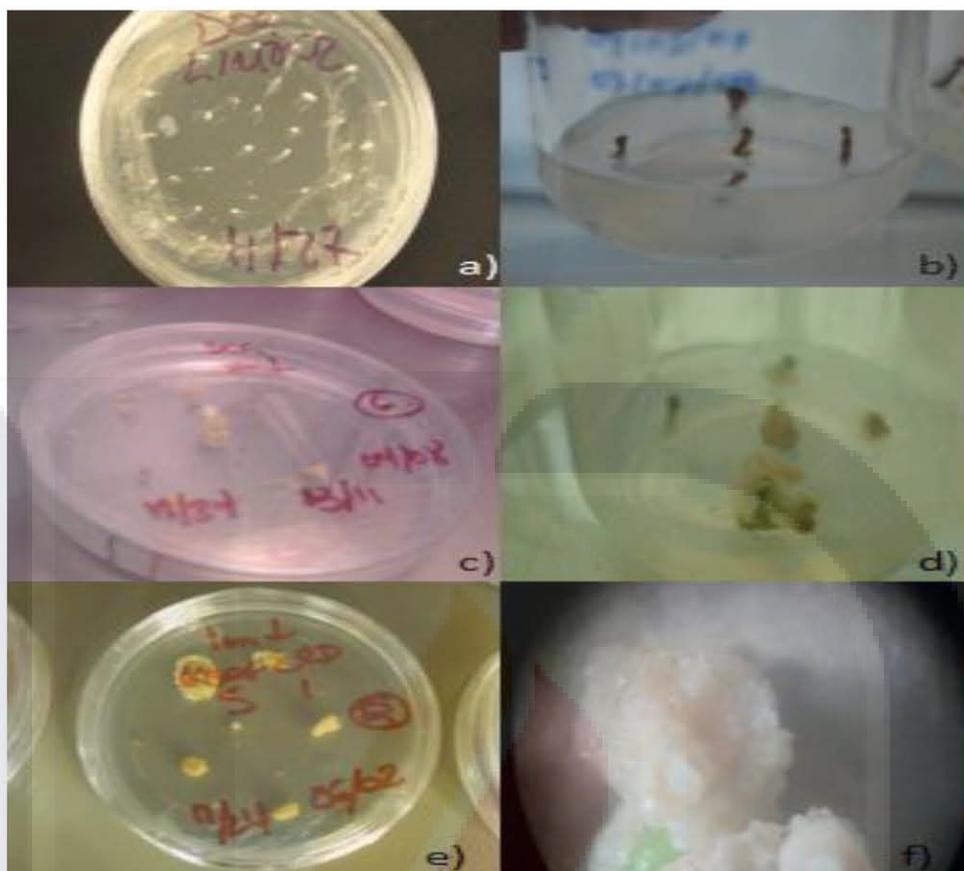


Figura 5. Obtención de callo embriogénico a partir de óvulos no desarrollados y estilos y estigmas. a) Óvulos no desarrollados de limón mexicano sembrados en medio DOG, b) Cultivo de estilos y estigmas de limón mexicano en medio MS, c) Obtención de embriones en medio DOG de limón mexicano a partir de óvulos, d) Desarrollo de callo embriogénico de limón italiano a partir de estilos, e) Obtención de callo comprimido y friable de limón mexicano a partir de óvulos, y f) Vista al microscopio de embriones somáticos y callo embriogénico de limón Italiano.

En la figura 5 en el inciso f podemos observar también el proceso embriogénico que se genera en el limón mexicano por lo que constantemente se estuvo que estar removiendo todos el embriones que se iban regenerando, antes de que todo el tejido se convirtiera en masa embriogénica y se perdiera el callo embriogénico. Cabe mencionar que se obtuvo callo embriogénico acuoso que tardaba mayor tiempo en poderse establecer como callo friable. En los incisos a, c, y e podemos observar el proceso de obtención de callo por medio de óvulos no desarrollados el cual en comparación con el de estilo y estigma es poco eficiente.

Cuadro 1. Porcentaje de explantes de estilo-estigma de limón mexicano que regeneración de callo friable en medio de cultivo MT adicionado con reguladores de crecimiento y tres fechas posteriores a su establecimiento.

Medio de cultivo	11 días	22 días	33 días
TESTIGO	62.0 abc	62.0 abc	66.0 abc
0.3 mg BA	88.0 a	88.0 ab	88.0 ab
3 mg BA + 0.42 mg de 2,4-D	48.0 bc	52.0 bc	60.0 bc
0.6 mg. BA	92.0 a	92.0 a	94.0 a
0.6 mg BA + 0.042 mg de 2,4-D	34.0 c	34.0 c	34.0 c
1.0 gr. de BA	82.0 ab	84.0 ab	84.0 ab
1.0 gr. de BA + 0.042 mg de 2,4-D	46.0 bc	52.0 bc	56.0 bc
0.42 mg de 2,4-D	72.0 abc	78.0 ab	78.0 ab
0.42 mg de TDZ	92.0 a	92.0 a	92.0 a
Sig. Estadística	**	**	**
PROMEDIO	68.66	69.78	72.44

**Promedios con letra distinta dentro de columnas, difieren estadísticamente P=0.01

Como se muestra en el cuadro 1 todos los medios de cultivo evaluados promovieron la regeneración de callo friable en explantes de estilo-estigma de limón mexicano, incluido el tratamiento testigo sin reguladores de crecimiento. El análisis de varianza de los datos detectó diferencias estadísticas altamente significativas (P=0.01) entre los medios de cultivo para esta variable

Desde la primera lectura realizada a los 11 días posteriores a la fecha de su establecimiento, en todos los tratamientos se registro el desarrollo insipiente tejido formado por células de color blanco cremoso en la base del explante, que se consideró como callo friable. Los porcentajes de respuesta de los tejidos fueron diferentes entre los distintos medios de cultivo. Como se aprecia en los datos, los mejores resultados se obtuvieron en los medios de cultivo que fueron adicionados con citosininas ya sea BA en sus distintas concentraciones; 0.3 mg/ L, 0.6 mg/L y 1.0 mg así como con como con 0.42 mg/L deTDZ.

La auxina 2,4-D presentó un efecto inhibitor de la regeneración de callo friable en los explantes. Los medios de cultivo donde además de la BA, se adicionaron 0.42 mg/L de 2,4-D, presentaron los menores porcentajes de respuesta de los

explantes para la regeneración de callo friable, resultando inferiores incluso al presentado por el tratamiento sin reguladores.

La auxina 2,4-D presento un efecto inhibitor de la regeneración de callo en los explantes. Los medios de cultivo donde además de la BA, se adicionaron 0.42 mg/L de 2,4-D, presentaron los menores porcentajes de respuesta de los explantes para la regeneración de tejido calloso, resultando inferiores incluso al presentado por el tratamiento sin reguladores.

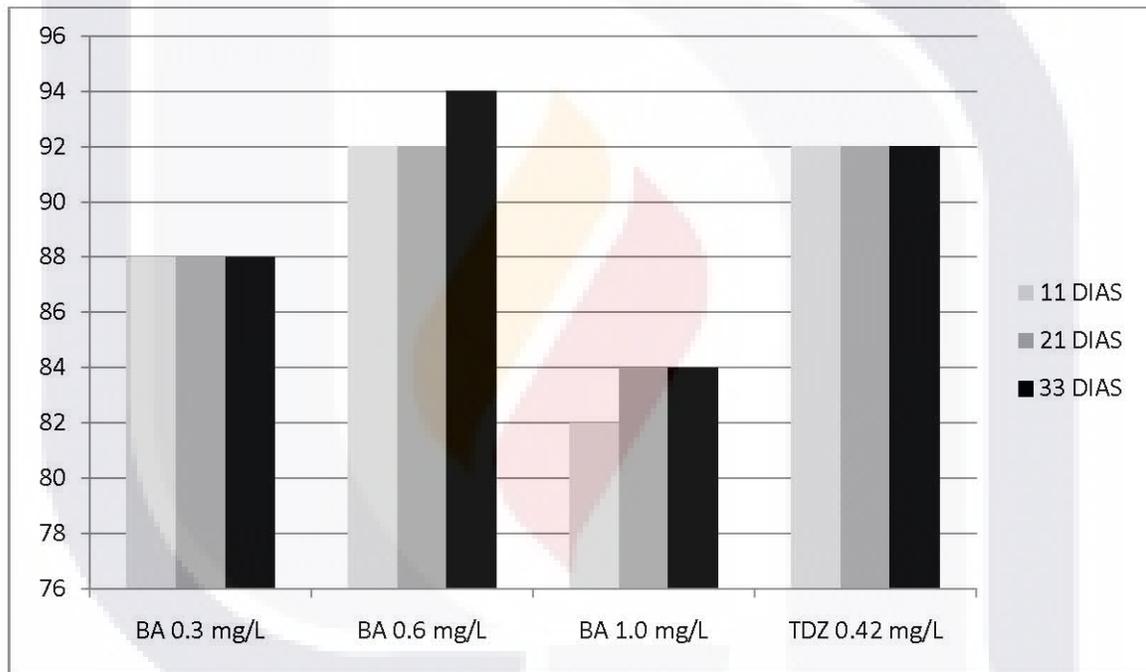


Figura 6. Efecto de la concentración de la BA y el TDZ en la respuesta de porcentaje de explantes de estilo-estigma de limón mexicano para la regeneración de callo friable.

En la Figura 6 se puede observar los medios de cultivo adicionados con 0.6 mg/L de BA y 0.42 mg/L de TDZ promovieron los mayores porcentajes de explantes que regeneraron callo friable desde los 11 días posteriores al establecimiento de los cultivos y esa respuesta se mantuvo en las lecturas posteriores.

El tratamiento adicionado con 1.0 mg/L de BA redujo los porcentajes de respuesta de los explantes y alcanzó los valores más bajos en las tres lecturas.

El callo friable que se obtuvo de este experimento se pasó a medio fresco (Medio para proliferación, semisólido y líquido) los propuestos por Grosser y Gmitter *et al.*, (1990) para su proliferación y conservación. En todos los casos el callo dejó de proliferar y aunque los subcultivos se hicieron a intervalos de 15 días, fue perdiendo su coloración blanco cremoso y se fue tomando una coloración café oscuro. Después de tres o cuatro subcultivos ya no se tuvo material para continuar los subcultivos.

En algunos casos los callos iniciaron la formación de estructuras embriogénicas e incluso se obtuvieron algunas plántulas, pero no se pudo conservar como callo friable



Figura. 7 Inducción de callo embriogénico a partir de estilo y estigma en medio MS+BA, se observa tejido altamente embriogénico, todo el callo se convierte en masas embriogénicas rápidamente.

Debido a que el tejido de estilo y estigma es altamente embriogénico Figura 7 se utilizaron cantidades mayores de BA en medio MS para detener el proceso embriogénico e inducir el crecimiento de callo. Esto se observó con limón

mexicano, no así con limón Italiano, ya que con éste ultimo la obtención de callo es más rápida y con las características deseadas.

RESULTADOS DE EXPERIMENTO 2

Los resultados obtenidos del estadio 1 con los 3 medios de cultivo tanto en luz como en oscuridad, fue que la producción de callo fue un tanto escasa y lenta. Como se puede observar en la Figura 8.

Los resultados de los medios de cultivo utilizados para la obtención de callo embriogénico, podemos observar que en los estadios 2, y 3 es donde se observa más rápidamente la aparición de callo embriogénico como se demuestra en el cuadro 2, este callo se compactó y se hizo sumamente rígido en muy poco tiempo, esto también se puede observar en la Figura 9, ya que produjo el callo de características deseadas.



Figura. 8. Obtención de Callo embriogénico en el estadio 1, A) Utilizando el medio DOG, B) Utilizando el medio DOG2X y C) Utilizando el medio BA+2,4-D.



Figura. 9 Obtención de Callo embriogénico en el estadio 2 y 3, A) Utilizando el medio DOG, en el estadio 2 B) Utilizando el medio DOG2X en el estadio 2, y C) Utilizando el medio BA+2,4-D, en el estadio 3.



Figura. 10 Obtención de callo y embriones somáticos en los estadios 4 y 5, A) Utilizando el medio DOG, en el estadio 4 B) Utilizando el medio DOG2X en el estadio 5, y C) Utilizando el medio BA+2,4-D, en el estadio 5.

En estadios 3 y 4 se obtuvo callo embriogénico pero el medio se tornaba en coloración blanquesina esto probablemente se debió a que el callo y el explante en contacto con el medio produce algún tipo de producto secundario que nos hace aparecer este fenómeno.

En los estadios de desarrollo 2,3 y 4 en cultivos con luz, obtuvimos callo embriogénico que al paso de los días se tornaba verdoso, como lo podemos observar en la Figura 11.

En los estadios 4 y 5 se formaban grandes cantidades de embriones como lo observamos en Figura 10, que al cabo de dos o tres semanas se convertían en plántulas, las cuales se transfirieron a medio MS al 50% para poder utilizar las hojas en la fusión de protoplastos.



Figura. 11 Callo embriogénico de tres diferentes estadios de desarrollo: a) estadio 2, b) estadio 3, y c) estadio 4 respectivamente. Esto en cultivos en presencia de luz.

Cuadro 2. Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenidos de fruta de limón mexicano en cinco estados de desarrollo cultivados en oscuridad total que generaron callo embriogénico a los 15 días de establecidos los cultivos.

ESTADIO	M1	M2	M3	PROMEDIO
1	42.5 c	30.0 c	35.0 c	35.8 b
2	80.0 a	77.5 ab	92.5 a	83.3 a
3	82.5 a	87.5 a	95.0 a	88.3 a
4	35.0 c	32.5 c	45.0 bc	37.5 b
5	22.5 c	22.5 c	27.5 c	23.3 b
PROMEDIO	52.5 ab	49.5 b	59.0 a	

* Promedios con letra distinta dentro de grupos difieren estadísticamente. Tukey 0.05

De acuerdo a los resultados obtenidos, el estadio de desarrollo de la fruta, como los medios de cultivo, tuvieron efectos significativos sobre la respuesta de los explantes para la regeneración de callo a los 15 días de iniciados los cultivos. El análisis de varianza (Anexos), detectó diferencias altamente significativas entre los estadios de desarrollo ($P=0.01$) y diferencias significativas ($P=0.05$) entre los medios de cultivo. Sin embargo, no se detectó interacción significativa entre ambos factores.

De acuerdo a los datos que se presentan en el cuadro 2, es claro que los óvulos no desarrollados obtenidos de los cinco estados de desarrollo lograron regenerar callo friable con distinto grado de eficiencia. Los óvulos originados de fruta en estado de desarrollo 2 y 3 presentaron porcentajes de respuesta en la regeneración de callo superior al 80% y resultaron estadísticamente diferentes al resto de tratamientos. En el mismo cuadro se puede apreciar también que todos los medios de cultivo promovieron la callogénesis, aunque el medio M3 promovió el mayor porcentaje de respuesta y resultó estadísticamente igual al medio M1 pero superior al medio M2.

Dentro de cada estado de desarrollo de la fruta, los medios de cultivo tuvieron un comportamiento similar entre sí, con bajos porcentajes de respuesta de los tres medios de cultivo cuando los óvulos provenían de frutos de los estados de desarrollo 1,4 y 5, pero con mayores porcentajes de respuesta cuando los óvulos se obtuvieron de fruta en los estados de desarrollo 2 y3.

Cuadro 3. Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenidos de fruta de limón mexicano en cinco estados de desarrollo cultivados en oscuridad total que generaron callo embriogénico a los 30 días de establecidos los cultivos.

ESTADIO	M1	M2	M3	PROMEDIO
1	47.50 b	37.50 b	45.00 b	43.33 b
2	87.50 a	82.50 a	82.50 a	88.33 a
3	82.50 a	82.50 a	97.50 a	90.83 a
4	40.00 b	40.00 b	40.00 b	43.33 b
5	37.50 b	32.50 b	42.50 b	37.50 b
PROMEDIO	59.50 b	56.50 b	66.00 a	

* Promedios con letra distinta dentro de grupos difieren estadísticamente. Tukey 0.05

Los resultados obtenidos de generación de callo de óvulos no desarrollados a los 30 días de cultivados presenta un comportamiento similar al de los 15 días de cultivo. El análisis de varianza presenta una diferencia altamente significativa entre los estadios, una diferencia significativa entre los medios, más no así una interacción entre medios y estadios (Anexo 2).

Se puede observar en el cuadro 3, la producción de callo aumenta a los 30 días en comparación con los resultados de los 15 días de cultivo. Los estadios 2 y 3 son los que presentan una mayor eficacia en la generación de callo con porcentajes de hasta 97.5%.

Cuadro 4. Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenidos de fruta de limón mexicano en cinco estados de desarrollo cultivados en oscuridad total que generaron callo embriogénico a los 45 días de establecidos los cultivos.

ESTADIO	M1	M2	M3	PROMEDIO
1	50.00 b	50.00 b	50.00 b	50.00 b
2	87.50 a	87.50 a	95.00 a	88.33 a
3	85.00 a	90.00 a	97.50 a	90.83 a
4	40.00 b	40.00 b	50.00 b	43.33 b
5	40.00 b	35.00 b	42.50 b	39.16 b
PROMEDIO	60.50 b	59.50 b	67.00 a	

* Promedios con letra distinta dentro de grupos difieren estadísticamente. Tukey 0.05

Los resultados a los 45 días de establecidos en oscuridad no presenta diferencias significativas con los resultados obtenidos a los 30 días de cultivados. Lo que se puede resaltar es que el porcentaje de callo aumenta un poco solamente. Al igual que en los resultados anteriores tenemos que existe una diferencia significativa en cuanto a los estadios $p < 0.01$, más no así con los medios (Anexo 2).

Con el medio M1 y M2 no se observaron diferencias en cuanto a los promedios de porcentaje de callo embriogénico. En cambio con M3 si existe una diferencia en relación con los otros dos medios (Cuadro 4).

Cuadro 5. Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenidos de fruta de limón mexicano en cinco estados de desarrollo cultivados en presencia de luz que generaron callo embriogénico a los 15 días de establecidos los cultivos.

ESTADIO	M1	M2	M3	PROMEDIO
1	15.00 cde	10.00 de	12.50 de	12.50 de
2	22.50 cde	30.00 abcd	10.00 de	20.83 cde
3	32.50 abc	40.00 ab	47.50 a	40.00 ab
4	25.00 bcde	22.50 bcde	12.50 cde	20.00 cde
5	5.00 e	5.00 e	5.00 e	5.00 e
PROMEDIO	20.00 cde	21.50 cde	17.50 cde	

* Promedios con letra distinta dentro de grupos difieren estadísticamente. Tukey 0.05

El estado de desarrollo de la fruta tuvo efectos significativos sobre la respuesta del explante en la regeneración de callo embriogénico a los 15 días en presencia de luz. El análisis de varianza determina diferencias altamente significativas entre los estadios de desarrollo ($P < 0.01$), no se presentan diferencias entre los medios, ni se observan interacciones entre los factores (Anexo 2).

Al igual que en oscuridad, en presencia de luz tenemos que los óvulos no desarrollados en los 5 estadios de desarrollo lograron generar en diferente grado callo friable. A diferencia de los resultados en oscuridad, el estadio 3 es el que presenta mayor porcentaje de eficiencia. Los estadios 2 y 4 presentan el mismo porcentaje de desarrollo. El estadio 5 es el que presenta el porcentaje más bajo de desarrollo (Cuadro 5).

Cuadro 6. Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenidos de fruta de limón mexicano en cinco estados de desarrollo cultivados en presencia de luz que generaron callo embriogénico a los 30 días de establecidos los cultivos.

ESTADIO	M1	M2	M3	PROMEDIO
1	17.50 cde	12.50 de	15.00 de	15.00 cde
2	35.00 abc	32.50 abcd	20.00 de	29.16 bcde
3	40.00 ab	42.50 ab	47.50 a	43.33 ab
4	25.00 bcde	27.50 bcde	12.50 cde	21.66 bcde
5	7.50 e	5.00 e	5.00 e	5.83 e
PROMEDIO	25.00 bcde	24.00 bcde	20.00 bcde	

* Promedios con letra distinta dentro de grupos difieren estadísticamente. Tukey 0.05

Los resultados a los 30 días de iniciado el cultivo no difiere mucho en cuando a los resultados a los 15 días, la única diferencia que se presenta es que obtenemos un promedio un poco más eficiente en algunos de los estadios y medios (Cuadro 6). En el estadio 5 y los M2 y M3 no se observan diferencias. Al analizar nuestro análisis de varianza observamos que se presentan diferencias altamente significativas en cuanto a los estadios ($p < 0.01$), en cuanto a los medios no presenta diferencias. Los factores no interactúan entre sí, se presenta una ($p > 0.01$) (Anexo 2)

Cuadro 7. Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenidos de fruta de limón mexicano en cinco estados de desarrollo cultivados en presencia de luz que generaron embriones a los 15 días de establecidos los cultivos.

ESTADIO	M1	M2	M3	PROMEDIO
1	35.0 abcd	15.0 d	20.0 cd	23.8 b
2	27.5 bcd	20.0 cd	27.5 bcd	25.0 b
3	20.0 cd	27.5 bcd	37.5 abcd	27.5 b
4	42.5 abc	45.0 abc	45.0 abc	44.2 a
5	50.0 ab	30.0 bcd	60.0 a	46.6 a
PROMEDIO	35.0 ab	28.4 b	36.5 a	

* Promedios con letra distinta dentro de grupos difieren estadísticamente. Tukey 0.05

Los resultados de nuestro análisis de varianza nos indican que al igual que en el proceso con callo embriogénico, los medios de cultivo y los estadios de desarrollo de la fruta tienen efectos significativos sobre la respuesta de los explantes en la generación de embriones a los 15 días de iniciados los cultivos. El análisis determina diferencias altamente significativas entre los medios de cultivo ($p < 0.01$) y altamente significativo entre los medios de cultivo ($p < 0.01$). A diferencia de la producción de callo embriogénico, se determina que hay interacción altamente

significativa entre los medios y los estadios de desarrollo del fruto ($p = 0.006$) (Anexo2).

Los medios que mayor respuesta obtuvieron fueron M1 y M3 respectivamente, los estadios de desarrollo que mayor eficiencia presentaron fueron 4 y 5 (Cuadro 7).

Al igual que en la producción de callo embriogénico, los medios de cultivo presentaron un comportamiento similar, el medio que se aleja un poco del resto y el cual presentó una menor eficiencia fue el M2.

Cuadro 8. Porcentaje de óvulos no desarrollados obtenidos de fruta de limón mexicano en cinco estados de desarrollo cultivados en presencia de luz que generaron embriones a los 30 días de establecidos los cultivos.

ESTADIO	M1	M2	M3	PROMEDIO
1	35.0 cdef	17.5 f	22.5 ef	25.1 b
2	27.5 def	27.5 def	27.5 def	26.6 b
3	25.0 def	30.0 cdef	37.5 cdef	30.8 b
4	47.5 bcde	50.0 bcd	55.0 abc	50.8 a
5	65.0 ab	42.5 bcde	80.0 a	62.5 a
PROMEDIO	40.0 ab	33.7 b	43.8 a	

*Promedios con letra distinta dentro de grupos difieren estadísticamente. Tukey 0.05

En el Cuadro 8 podemos observar que no existe mucha diferencia en cuanto a los resultados a los 15 días solamente mayor cantidad de óvulos no desarrollados de diferentes estadios que generaron embriones. En nuestro análisis de varianza determinamos que los medios entre si tienen diferencias altamente significativas al igual que los estadios de maduración del fruto con una $p < 0.01$, se presenta interacción altamente significativa entre los medios de cultivo y los estadios de desarrollo del fruto (Anexo 2).

En M1 los estadios 3,4 y 5 son los estadios de desarrollo del fruto que presentan un incremento en la cantidad de óvulos no desarrollados que generaron embriones. En M2 todos los estadios de desarrollo muestran un incremento siendo el estadio 5 el de mayor eficiencia. En M3 los estadios que muestran incremento son 1, 4 y 5 respectivamente.

Obtención y aislamiento de protoplastos.

Se observó que al tratar de obtener protoplastos de callo embriogénico de limón mexicano y otras variedades de limón, se dificulta separar las células y digerirlas.

Se obtuvieron protoplastos de hoja de limón mexicano e italiano. Se puede observar el anillo formado en el centro de ambos gradientes, al igual para la obtención de protoplastos de callo embriogénico de limón mexicano, como se muestra en la siguiente figura 12. Este proceso se llevó a cabo en 4 ocasiones, en las cuales se mostraron resultados deseados.



Figura 12. Obtención de protoplastos viables a partir de hojas de limón Italiano y de callo embriogénico de limón mexicano, fusión de los mismos, división de los protoplastos, colonia de protoplastos, embriones en estado de torpedo, plántulas en proceso de regeneración antes del medio RMAN.

Obtención de plántulas.

Se obtuvieron embriones a los 2 meses aproximadamente de haber hecho las fusiones de 4 cajas de las 12 generados en la fusión dando un aproximado del 33.33% de eficiencia, cabe mencionar que solo se pudieron obtener 23 embriones.

Estos embriones generaron 13 plántulas por lo que se logra un 56.5% de eficiencia en regeneración de embriones a plantas, como las mostradas en la figura 13.



Fig. 13. Plántulas obtenidas de fusiones somáticas conservadas en medio RMAN.

Prueba de ploidía.

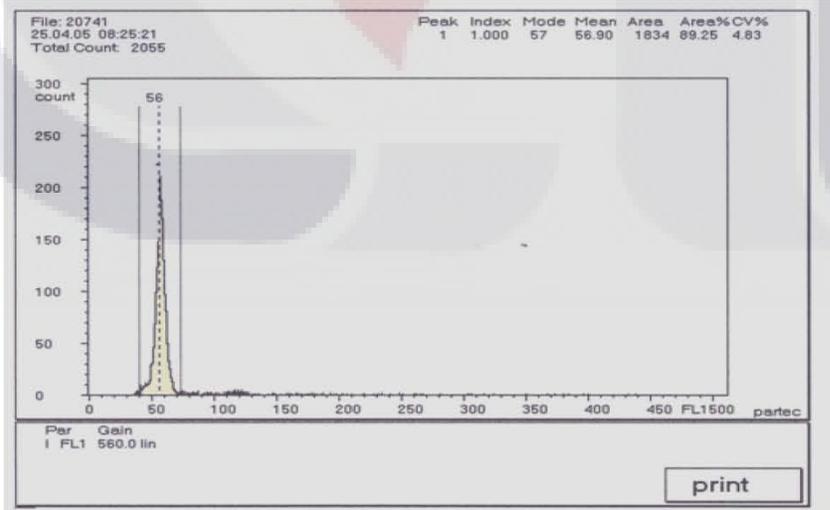


Fig. 14 Prueba de ploidia donde se puede observar un pico en la región marcada con el número 50 que corresponde a un genotipo diploide.

Se practicó la prueba de ploidía a 13 plántulas (Figura 14) las cuales dieron como resultados ser diploides, esto se corrobora con el pico obtenido de 50, lo que significa que ninguna de esas plántulas regeneradas corresponde a fusiones efectivas y por lo tanto no se logró obtener híbridos somáticos.

8.-DISCUSIONES

Se evaluó la obtención de callo embriogénico en medios de cultivo DOG, EME+S, H+H, utilizando óvulos no desarrollados de limón mexicano e italiano, esto sin mucho éxito para limón mexicano. Éste método ha sido probado en diferentes tipos de cítricos como lo son: naranja, toronja, pomelo y mandarina con mucho éxito, se pensó que se tendría el mismo resultado con limón pero no fue así, por lo que la metodología propuesta por Grosser *et al.*, (2007), funciona bien para limón italiano Figura 4, por lo que se podría pensar en que el factor genético del limón es el que nos está ayudando a obtener estos resultados. Esto puede deberse a que el estadio de desarrollo del fruto no fue el adecuado, ya que era un fruto semimaduro de tamaño aproximado en limón mexicano de 5 cm y en limón italiano de 12 cm aproximadamente. Grosser *et al.*,(2010) comenta que el callo embriogénico de cítricos puede obtenerse de óvulos no desarrollados que pueden ser removidos de cualquier cítrico maduro o inmaduro, lo cual coincide con lo obtenido en el experimento alterno en óvulos no desarrollados de frutos inmaduros, más no así de frutos maduros Figuras 8, 9, 10.

Podemos decir que el limón Italiano responde más rápidamente a los medios de cultivo, a diferencia del limón mexicano, esto se podría deber a factores genéticos y epigenéticos que rodean al limón mexicano, ya que ésta especie presenta un alto porcentaje de recalcitrancia, según Birsh *et al.*, (1997) sugiere que las plantas leñosas de alguna manera carecen de la capacidad biológica de responder a desencadenamientos esenciales para integrar las fusiones.

Se hizo la regeneración de callo embriogénico por medio de estilos y estigmas como lo denota Carimi *et al.*, (1994), pero al cambiar el callo de un medio a otro

nuevo, éste necrosa y no sobrevive, denotando así, que Carimi tenía razón al obtener callo a las 3 semanas pero no al tratar de conservarlo, cabe mencionar que esto sucede más en limón mexicano que en el italiano, Cuadro 1. También el callo obtenido no es friable ya que presenta una consistencia acuosa, convirtiéndolo en un callo pastoso difícil de ser manejado. Carimi *et al.*, (2002) también maneja la utilización de otros reguladores de crecimiento como el 4-CPPU para la obtención de callo embriogénico en limón italiano, posiblemente éste medio hubiera sido de gran ayuda aplicándolo a la obtención de callo embriogénico en limón mexicano.

Como utilizaron óvulos no desarrollados para la obtención de callo embriogénico, y estos se colocaron como semillas no desarrolladas, debemos considerar que tarda más tiempo en desarrollar callo ya que debe atravesar las paredes, considerando también las hormonas que se agreguen al medio o se estén utilizando, ya que algunas de ellas pueden actuar de manera inversa a lo esperado Figura 1 y Figura 5 respectivamente.

Por otro lado, en observaciones preliminares en limón se tiene que es muy difícil el poder obtener callo y que éste sea viable para hacer las fusiones, ya que se observó que al tratar de hacer suspensiones de callo embriogénico, este no se divide rápidamente por lo que en algunas ocasiones se debe optar por obtener los protoplastos directamente del callo embriogénico y no de suspensiones embriogénicas (Viloria y Grosser, 2006).

La producción de callo es generalmente ineficiente, y una gran cantidad de óvulos (algunos cientos) deberán ser cultivadas por cada cultivo de interés Grosser *et al.*, (2010). Esto concuerda con lo hecho en el proyecto, ya que se hicieron varias repeticiones para lograr resultados esto lo podemos observar en los Cuadros 2, 3, 4.

La preparación de suspensiones de células embriogénicas y la regeneración de plantas de protoplastos requiere de tiempo y el uso de reguladores de crecimiento

en todos los pasos del proceso, ambos incrementan la variación somaclonal, incluyendo cambios citológicos Figura 11, esto concuerda con lo propuesto por Fiuk *et al.*, (2007).

El proceso de degradación de la pared celular debe ser un proceso lento, eso debe depender de la composición de la pared así como de factores de la misma que actúen como barreras físicas, de acuerdo con lo propuesto por Cocking *et al.*, (2000) se debe de considerar las características de la pared celular del limón Italiano y del Limón mexicano para obtener una degradación total y exitosa de los mismos, debe ser un proceso muy bien cuidado con el fin de evitar la degradación o el daño a los protoplastos.

Unos de los mayores requisitos para lograr una fusión de protoplastos eficiente, es lograr que la hoja y el callo embriogénico libere una cantidad adecuada de protoplastos, esto se debe de hacer tomando en cuenta una adecuada concentración de enzimas, y polietilenglicol (PEG), en este trabajo se cambio dicha concentración para poder obtener los protoplastos del callo ya que este a la concentración propuesta por Grosser y Gmitter *et al.*,(1990) no digería adecuadamente las células y los protoplastos se encontraban aglomerados esto en caso de callo embriogénico más no así con protoplastos derivados de hojas como se muestra en la Figura1 y Figura 12.

Al obtener protoplastos de callo embriogénico de limón mexicano y otras variedades de limón, se dificultó separar las células y digerirlas por lo que se utilizó la solución enzimática sin medio BH3, por lo que se utilizó la solución enzimática al 100%, denotando así que lo propuesto por Grosser y Gmitter *et al.*, (1990) no aplica para todas las variedades de cítricos Figura 12. Lo propuesto por Fiore *et al* 2001 dice que los protoplastos que vienen de suspensiones embriogénicas frescas y jóvenes presentan un muy alto potencial morfológico y que el éxito de la formación de embriones somático dependerá de la edad del cultivo en suspensión. Cuando el cultivo ya es viejo o muy joven no se obtienen

grandes cantidades de protoplastos, cuando es muy joven no se pueden degradar fácilmente las paredes celulares y los protoplastos de callo contiene más cantidad de almidón en su interior lo que impide que el protoplasto de hoja se fusión debido a que el espacio libre es muy reducido, lo que sucedió en las primeras fusiones.

En términos generales, la mezcla de enzimas utilizadas para degradar la pared celular de las hojas tiernas y suaves de los géneros *Citrus*, que fue celulasa, y macerasa permitieron la liberación de numerosos protoplastos, los cuales a su vez al ser sometidos a los gradientes para separarlos mostraron un anillo verde de mayor intensidad que los protoplastos que quedaron en el fondo Figura 3. Es muy probable que esto se pudiese experimentar con diferentes combinaciones enzimáticas, las cuales en algunas ocasiones son conformadas por 5 tipos de enzimas diferentes, además se debe determinar el tipo de tejido foliar más apropiado, tal como lo mencionan otros autores (Ona y Tsuda, 1999). La pared celular de las plantas generalmente está compuesta por celulosa, hemicelulosa, pectinas y en algunos casos por callosa (Bengochea y Dodds, 1986); y la mezcla de enzimas a utilizar debe ser lo suficientemente capaz de digerir su composición estructural (Li et al. 1995), citados por Bajaj *et al* (1995) consignaron que el aislamiento de protoplastos de tejido no embriogénico de diferentes especies de *Arachis* requirió distintas combinaciones y concentraciones de enzimas, esto para un óptimo rendimiento. En el caso de callo embriogénico de limón los protoplastos contienen grandes cantidades de almidón, esto se debe de disminuir al bajar la cantidad de azúcares en el medio líquido o sólido que contenga el callo embriogénico con la finalidad de poder tener mayor eficiencia en las fusiones, ya que el protoplasto se encuentra lleno de almidón y no permite ser fusionado.

La obtención adecuada de protoplastos a partir de hojas de las especies *Citrus* con las cuales se trabajó no constituyeron un problema, ya que en pruebas preliminares la mayoría de las especies y variedades utilizadas como fuentes donantes de protoplastos, mostraron hojas suaves, bien desarrolladas de color

verde. D’Onofrio *et al* 1999 encontró un mayor número y alta concentración de protoplastos en hojas jóvenes que en hojas maduras. Se ha demostrado que las hojas tiernas desarrollan una cutícula muy delgada por lo que ofrecen poca resistencia a la penetración de las enzimas que degradan la pared celular (Bengochea y Dodds, 1986).

Como en la embriogénesis somática, embriones verdes se desarrollan alrededor del callo como lo comentado por Liu *et al.*, (2005), pero debido a la poca o nula aparición de los mismos (Deng, 1992) tuvimos un bajo porcentaje de eficiencia en las fusiones de protoplastos. Se debe de tener en consideración antes de comenzar una fusión de protoplastos algunos puntos importantes que nos van a redituar en una fusión eficiente, con bajos riesgos, bajos costos y alta rentabilidad. Según Birsch *et al.*, (1997) comenta que la fusión de protoplastos es un procedimiento altamente demandante que requiere de experiencia y de mucha manipulación, lo cual lo convierte en una técnica no muy sencilla.

Después de una fusión y obtención de embriones, el enraizamiento de los embriones tentativamente fusionados no es menos problemático como lo comenta Singh *et al.*, (2009), ya que los embriones y las plántulas que se van generando son débiles y pequeños y deben ser colocados en un medio adecuado de enraizamiento. Es de hacerse notar que las técnicas de cultivo de tejidos en cítricos es altamente dependiente del genotipo y ninguna de las técnicas es completamente adaptable a todos los genotipos bajo todas las condiciones.

Las pruebas de ploidía mostraron solamente plántulas diploides, lo cual fue debido a la baja cantidad de callo embriogénico que se obtuvo en el momento, se deben de realizar al menos 20 fusiones para poder lograr un híbrido somático, esto propuesto por Grosser *et al.*, (1996), lo cual explica lo sucedido ya que solo se pudieron realizar 4 fusiones, esto se debió a la falta de callo embriogénico friable ya que se requieren de grandes cantidades del mismo. Se sabe que en el genoma

de los organelos del núcleo y citoplasma existen numerosos caracteres que son responsables de la respuesta de la planta en cuanto a su comportamiento frente a problemas bióticos y abióticos. Se ha indicado que en el citoplasma están los organelos que contienen genes responsables de la tolerancia a ciertas plagas y enfermedades. En tanto que en las mitocondrias están los genes que regulan el comportamiento productivo y calidad del fruto, entre otros caracteres (Moreira 2000 a; 2000 b; Grosser *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2003). No existe un reporte específico que indique en cual organelo está la característica de resistencia a VTC.

9.-CONCLUSIONES

Se logra la obtención de un protocolo eficiente para la obtención de callo embriogénico tanto para limón mexicano.

Se logra la obtención de un protocolo eficiente para la obtención y fusión de protoplastos.

No sólo se logró saber que metodología, medios y tipo de explante nos proporcionaron mayor eficiencia en la obtención de callo embriogénico sino también cuáles de ellos nos proporcionan mayor cantidad de embriones somáticos, esto para la utilización posterior en rescate embrionario.

La eficiencia de la fusión de protoplastos y la obtención de híbridos somáticos es proporcional a la eficiencia de los sistemas de fusión en el cultivo de tejidos. Por lo que se obtienen planta de fusiones más no así híbridas.

10.-ANEXOS DE TABLAS DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LA METODOLOGIA

	EME	H+H	B	RMAN	DBA3	DOG
Component	Concetración mg/L					
NH ₄ NO ₃	1650	825	1650	825	1650	825
KNO ₃	1900	950	1900	950	1900	950
KH ₂ PO ₄	170	170	170	85	170	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370	185	370	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	440	440	440	440
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
MnSO ₄ .H ₂ O	22.3	22.3	22.3	11.15	22.3	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	4.3	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	3.1	6.2	6.2
KCl		750				
KI	0.83	0.83	0.83	0.41	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.13	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.013	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.013	0.025	0.025
Glutamine		1550				
Tiamina HCl	10	10	10	5	10	10
Piridoxina HCl	10	10	10	5	10	10
Acido nicotínico	1	1	1	0.5	1	1
Myo Inositol	100	100	100			100
Extracto de malta	500	500			1500	500
Acido Giberelico			1			
2,4-D					0.01	
Benzilaminopurina					3	
NAA			0.02	0.02		
Carbón Activado				500		
Sacarosa	50000	50000	25000	25000	25000	50000
Agar	8000	8000	8000	8000	8000	8000
Agua de coco					20 ml/L	
Cinetina						5

** Medios propuestos por Grosser para la hibridación somática. Grosser *et al* 2010.

Preparación de BH3 stock.

BH3 MACRO STOCK (100X)	500 ml	1 l
KCl	75 g	150 g
MgSO4*7H2O	18.5 g	37 g
KH2PO4-monobásico	7.5 g	15 g
K2HPO4-dibásico	1 g	2 g

Los ingredientes para micronutrientes, vitaminas, calcio, hierro son las propuestas por Murashige y Tukey (1969).

ANEXOS DE LAS PRUEBAS ESTADISTICAS PRACTICADAS EN EL EXPERIMENTO 1.

EUREKA

Analysis of Variance Table for PC

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	2	150.463	75.2315	1.35	0.2871
REP	8	636.574	79.5718	1.43	0.2583
Error	16	891.204	55.7002		
Total	26				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 6.0185 CV 124.00

Analysis of Variance Table for PEMBT

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	2	31.771	15.8853	0.47	0.6330
REP	8	222.395	27.7993	0.82	0.5940
Error	16	540.101	33.7563		
Total	26				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.5341 CV 378.73

LIMONERIA

Analysis of Variance Table for PC

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	2	138.889	69.4444	2.29	0.1339
REP	8	416.667	52.0833	1.71	0.1707
Error	16	486.111	30.3819		
Total	26				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 2.7778 CV 198.43

Analysis of Variance Table for PEMBT

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	2	31.771	15.8853	0.47	0.6330
REP	8	222.395	27.7993	0.82	0.5940
Error	16	540.101	33.7563		
Total	26				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.5341 CV 378.73

ROSEMBERG

Analysis of Variance Table for PC

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	2	312.50	156.250	2.18	0.1453
REP	8	520.83	65.104	0.91	0.5329
Error	16	1145.83	71.615		
Total	26				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 5.5556 CV 152.33

Analysis of Variance Table for PEMBT

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	2	127.083	63.5413	2.29	0.1339
REP	8	222.395	27.7993	1.00	0.4726
Error	16	444.789	27.7993		
Total	26				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.5341 CV 343.69

LIMON MEXICANO

Analysis of Variance Table for PCEM

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	2	118.15	59.0749	2.23	0.1140
REP	44	736.16	16.7310	0.63	0.9536
Error	88	2335.73	26.5424		
Total	134				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1.9067 CV 270.21

Analysis of Variance Table for PEMBRT

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	2	3438.7	1719.34	15.03	0.0000
REP	44	5109.4	116.12	1.01	0.4659
Error	88	10068.5	114.41		
Total	134				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 6.5187 CV 164.09

Limón mexicano (Metodología Carimi)

Analysis of Variance Table for CE1T

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	8	36480.0	4560.00	7.08	0.0000
REP	9	5808.0	645.33	1.00	0.4471
Error	72	46404.3	644.50		
Total	89				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 52.477 CV 48.38

Analysis of Variance Table for CE2T

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	8	25588.9	3198.62	7.65	0.0000
REP	9	1815.0	201.66	0.48	0.8819
Error	72	30105.4	418.13		
Total	89				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 60.733 CV 33.67

Analysis of Variance Table for CE3T

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	8	23979.4	2997.42	7.29	0.0000
REP	9	3028.6	336.51	0.82	0.6014
Error	72	29616.3	411.34		
Total	89				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 61.565 CV 32.94

Analysis of Variance Table for CE4T

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	8	22682.7	2835.34	6.72	0.0000
REP	9	2376.5	264.06	0.63	0.7713
Error	72	30377.1	421.90		
Total	89				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 61.449 CV 33.43

Analysis of Variance Table for CE5T

Source	DF	SS	MS	F	P
MEDIO	8	23354.3	2919.28	7.76	0.0000
REP	9	2006.6	222.96	0.59	0.7989
Error	72	27083.1	376.15		
Total	89				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 63.242 CV 30.67

Experimento alterno

Analysis of Variance Table for PC15T

Source	DF	SS	MS	F	P
Estado	4	27129.4	6782.35	58.23	0.0000
Medio	2	1002.4	501.19	4.30	0.0183
Rep	4	650.5	162.63	1.40	0.2471
Estado*Medio	8	668.7	83.58	0.72	0.6750
Error	56	6522.6	116.47		
Total	74				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 49.195 CV 21.94

Analysis of Variance Table for PC30T

Source	DF	SS	MS	F	P
Estado	4	24396.9	6099.23	66.00	0.0000 **
Medio	2	923.3	461.67	5.00	0.0101 *
Rep	4	511.2	127.79	1.38	0.2516
Estado*Medio	8	533.7	66.72	0.72	0.6713 NS
Error	56	5175.0	92.41		
Total	74				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 54.622 CV 17.60



11.-BIBLIOGRAFIA:

1. - Ali, S. Mirza, B.(2006) Micropropagation of rough lemon: effect of explants type and hormone concentration. *Acta bot. croat.* 65: 137-146.
2. - Ananthakrishnan, G. Calovic, M, Serrano, P. Grosser, J.W. (2006). Production of additional allotetraploid somatic hybrid combining mandarins and sweet orange with pre-selected pummelos as potential candidates to replace sour orange rootstock. *In Vitro Cell* 42: 367-371.
3. - Bates, G. W.; Nea, L. J. and Hasenkampf, C. A. (1987). Electrofusion and plant somatic hybridization. In: Sowers, A.E. (ed) *Cell Fusion*. Plenum Press, New York, pp 479-496.
4. - Beloualy, N (1991). Plant regeneration from callus culture of three citrus rootstocks. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 24: 29-34.
5. - Button J. Kochba, J. and Bornman, C.H. (1974). Fine structure of embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamout' orange (*Citrus sinensis* Osb.). *J. Exp.Bot.* 25(85): 445-475.
6. - Carimi, F., Pasquale, F. and Crescimanno, F. G. (1994). Somatic embryogenesis from styles of lemon (*Citrus Limon*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37: 209-211.
7. - Chen, E. Olson, N. (2005). Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science*, Vol. 308, pp. 369-373.
8. - Ching, C.C. Chiu, and S.C. Ku. (2001) Mass rearing and release of an eulophid wasp. *Tamarixia Radiata* (Waterston). Technical notes of food and fertilizer technology center, Plant Protection 2001-5. 1-4 pp.
9. - Cocking, E. C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*. 187: 962-963.
- 10.- Cocking, E.C. (2000) Turning point article plant protoplasts. *In vitro cell dev-biol. plant* 36: 77-82.

- 11.- Da Graca, J.V. (1991) *Citrus* greening disease. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 109-136.
- 12.- Da Graca J.V. and L. Korsten (2004) *Citrus* haunglonbing. Review, present status and future strategies. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 229-245.
13. - Davey, M.R. (1988). Aspects of protoplast culture and plant regeneration. Plant cell tissue and organ culture 12: 115-125.
14. - Drew, R. A., Smith N .G. (1986).Growth of apical and lateral buds of papaya (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. J. Hort. Sci. 61(4):535-543.
15. - Duquenne, B. Werbrouk, S. (2007). Effect of enzyme concentration on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Athurium*. Plant cell tissue and organ culture. Pp. 165-173.
- 16.- Evans, D.A., Sharp, W.R. and Flick, C.E. (1981). Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe TA (ed). Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press, INC. Orlando pp. 45-113.
- 17.- Fiore, S, De Pasquale, F. Carimi, F, Sajeve, M. (2002). Effect of 2, 4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of citrus.Plant cell tissue and organ culture 68: 57-63.
- 18.- Fiuk, A, Ribczynski, J. (2007) The effect of several factors on somatic embryogenesis and plant regeneration in protoplast cultures of *Gentiana Kuroo* (royle). Plant cell tissue organ culture. 91: 263-271.
- 19.- Galiana, A. (1995). Obtención y cultivo de protoplastos de cítricos. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
20. - Galun, E. and Aviv, D. (1988). Organelle transfer. Methods Enzymol. 118: 595-611
21. - Garnsey, S. M. and Lee, R. F. (1988). Tristeza. In: J. O. Whiteside; S. M. Garnsey. and L. W. Timmer (eds), Compendium of *Citrus* Disease. APS Press st Paul. p. 48-50

22. - Garnsey, S. M.; Barrett, H. C. and Huitchison, D. J. (1987). Identification of citrus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica*. 19: 187-191.
23. - Gleba, Y. Y. and Sytnik, K. M. (1984). Protoplast fusion: genetic engineering in higher plants. In: Schoeman R (ed). Springer-Verlag, Berlin, 220 pp.
- 24.- Gleba, Y. Y.; Hinnisdaels, S.; Sidorov, V. A.; Kaleda, V. A.; Parakonny, A. S.; Boryshuk, N, V.; Cherep, N, N.; Negrutiv, I. and Jacobs, M. (1988). Intergeneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbajinifolia* and *Atropa bejjadonna* obtained by “gamma fusion”. *Theor Apl Gen.* 76: 760-766.
25. - Gmitter, F. Chen, C. Nageswara, R, Soneji, J. (2007) Genome mapping and molecular breeding in plants. Springer-Verlag, Vol. 4, Berlin, Alemania. 265-279.
- 26.- González, C.D. Hernández, R.I. Cabrera y Tapia, J.R. (2005) *Diaphorina Citri Kum*, inventario y comportamiento de los enemigos naturales en la agricultura cubana. FAO Cuba, p.p. 11
27. - Grosser, J. W. and Gmitter, F. G. (1990 a). A protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Review*_ 8: 339-374.
28. - Grosser, J.W. and Gmitter, F.G. (2005). 2004 SIVB Congress symposium in proceedings “thinking outside the cell, applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. *In vitro cell* 41: 220:225.
29. - Grosser, J. W. Jiang, J. Mourao, F.A. Gmitter, F. (1998). Somatic hybridization, an integral component of citrus cultivar improvement: I. Scion Improvement. *Hortscience* 33: 1057-1059.
30. - Grosser, J.W. Ollitraut, P, Olivares, O. (2000). Invited review: Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In vitro cell*, 36: 434-449.
31. - Halbert, .S.E. and Manjunoth, K.L. (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus. A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87 (3): 401-402.

32. - Hidaka, T. and Omura, M. (1992). Regeneration of somatic hybrids plants obtained by electrical fusion between Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and rough lemon (*C. jambhiri*) or yuzu (*C. junos*). Jpn J. Breed. 42: 79-89.
33. - Hodgson, R. W. (1967). Horticultural varieties of citrus. In: Reuther, W; Webber, H. J. and Batchelor, L.D (eds). The Citrus Industry vol. 1. University of California Press, Barkeley. 431-591 pp.
34. - Iglesias, N. Robledo, G. Vera, O. (2007) Population structure of citrus tristeza virus from field Argentinean isolates. Virus genes 36: 199-207. Proc. Int. soc.citriculture, 166-169.
- 35.- Ishii, S. Ohgawara, T. Oiyama, I. (1992). Somatic hybridization in citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture. 166-169.
36. - Knauss, J.F. (1979). Contamination in plant tissue cultures. Proc. Fla. State Hort. Soc. 92: 341-343.
37. - Kao, K. N. and Saleem, M. (1986). Improved fusion of mesophyll and cotyledon protoplasts with PEG and high pH-Ca²⁺ solutions. J. Plant Physiol. 122: 217-225.
38. - Kochba J. and Spieguel, R. P. (1997). Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of Citrus. HortScience. 12 (2): 110-114.
- 39.- Koltunow, A. (1993). Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. The plant Cell Vol. 5: 1425-1437.
- 40.- López-Arroyo J.I. Peña, M.A. Rocha-Peña M.A. y Loera, J. (2005) Ocurrencias en México de psilido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) p.p. 68. Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología, Chihuahua, Chih, México.
41. - Liu, J. (2005) Protoplast isolation and cultura of woody plants. Springer protocols for somatic embryogenesis in woody plants, 553-566.
42. - Luro, F; Laigret, F; Bove, J. M. and Ollitrault, P. (1995). DNA Amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in citrus. HortScience. 30 (5): 1063-1067.

43. - Luro, F.; Laigret, F.; Bové, J. M. and Ollitrault, P. (1992). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to citrus genetics and taxonomy. Proc. Int. Soc. Citriculture. 1: 225-228.
44. - Marloth, R. (1948). Citrus Growth studies, periodicity of root-growth and top-growth in nursery seedlings and budlings. 46 th annual meeting of the south African association for advancement of science. Loureco Marques. 50-59.
45. - Martelli, G.P. Agranovsky, A.A. Bar-Joseph, M, Boscia, D. Coutts, R.H.A. (2002). The family Closteroviridae revised. Virology division news. 2039-2044.
- 46.- Medina, U. V. M.; Robles, G. M. M.; Becerra, R. S.; Orozco, R. J.; Orozco, S. M.; Garza, L. J. G.; Ovando, C. M.; Chávez, C. X. y Felix, C. F. A. (2001). El cultivo del limón mexicano. Libro Técnico # 1. SAGARPA-INIFAP-Campo Experimental Tecomán 188 p.
47. - Merkle, S.A; Parrott, W.A. & Flinn, B.S. (1995). Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis, In: in Vitro Embryogenesis in Plants. pp 155-203 T.A. Thorpe(ed.). Kluwer Academic Publisher.. Netherlands. p. 155-203.
48. - Michaud, J.P. (2004). Natural mortality of Asian *citrus psyllid* (*Homoptera: Psyllidae*) in central Florida. Biol. Control. 29: 260-269
49. - Michaux-Ferriere N. (1998). Zygotic embryogenesis as a model for somatic embryogenesis. Some examples from tropical trees. COST «EUROSILVA» Working group I: Growth and Development. Workshop: Advances on somatic embryogenesis in forest trees. Orleans. France.
50. - Moreira, C. Chase, C. Gmitter, F. Grosser, J.W. (2000). Plant cell tissue and organ culture, 61: 165-168.
51. - Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 473-497.
52. - Murashige, T. and Tucker, D. P. H. (1969). Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc. 1st Int. Citrus Symp. 3: 1155-1161.
53. - Ohgawara, T. Uchimiya, H. Ishii, S. Kobayashi, S. (1994). Somatic hybridization between citrus sinensis and poncirus trifoliata. Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 27: 439-453.

54. - Ohawara, T. Kobayashi, S. Ishii, S. (1989). Somatic hybridization in citrus: navel orange (*C. Sinensis* Osb.) and grapefruit (*C. paradise* Macf). Theory applied genetics, 78: 609-612.
55. - Ollitrault, P. Dambier, D. (1996). Somatic hybridization in citrus: some new hybrid and alloplasmic plants. Proc. Int. Soc. Citriculture, 907-912.
- 56.-Ollitrault, P.; Lotfys, R. D.; Froelicher, Y; Luro, F. and Carreel, F. (2003). Development of CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) for cytoplasmic genomes studies in Aurantioideae subfamily. Proc. Int. Soc. Citriculture. (In Press).
57. - Ollitrault, P. (1990). Isozymes and restriction fragment length polymorphisms as genetic marks in citrus selection. Proc. 4th Asia-Pacific Int. Conf. on Citrus rehabilitation. FAO-UNDP RAS/86/022 Regional project, pp 59-63.
58. - Ollitrault, P.; Allent, V. and Luro, F, (1996 c). Production of haploid plants and embryogenic calli of clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after *insitu* pathenogenesis induced by irradiated pollen. Proc. Int. Soc. Citriculture. 2: 913-917.
- 59.- Ollitrault, P.; Dambier, D.; Froelicher, Y.; Carred, F.; D'Hont, A.; Luro, F.; Broyere, S.; Cabasson, C.; Lutfy, S.; Joumaa, A.; Vanel, F.; Maddi, F.; Treanton, K. and Grisoni, M. (2000 b). Somatic hybridization for citrus germoplasm utilization. Cashiers Agric. 9: 223-236.
60. - Pierik, R.L.M. (1987). *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff, Dordrecht, Holanda. 3 44 p.
61. - Roest, S. and Gilissen, L. J. W. (1989). Plant regeneration from protoplast: a literature review. Acta Bot Neerl_ 38 (1): 1-23.
- 62.- Rodriguez-Garay, B., Santacruz-Ruvalcaba, F., Loera-Quezada, M. M. y Gutiérrez- Mora, A. (2000). Embriogénesis sexual y somática en plantas. Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco.
63. - Roest, S. and Gilissen, L. J. W. (1993). Regeneration from protoplast a supplementary literature review. Acta Bot Nerrl_ 42 (1): 1-23.
- 64.- Sagarpa. (2010). Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera. México, D. F. Archivo electrónico.

- 65.- Saito, W. Ohgawara, T. Shimizu, J. Ishii, S. Kobayashii, S. (1992). Citrus cybrid regeneration following cell fusion between nucellar cells and mesophyll cells. *Plant sciences*, 88: 195-201.
- 66.- Sancho, G., Guevara, E. (1991). El cultivo in vitro de yemas axilares de papaya (*Carica papaya* L.). I. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la contaminación inicial de explantes. *Bol. Tec. Est. Exp. Fabio Baudrit (Costa Rica)* 24(1):14-25.
67. - Scora, R. W. and Kumamoto, J. (1983). Chemotaxonomy of the genus *Citrus*. In: Waterman, P. G; Grundon, M. F. (eds). *Chemistry and Chemical taxonomy of the rutaces* Phytochemical Society of Europe Symposia series No. 22. Academic Press. London.
68. - Spiegel, R. and Vardi, A. (1984). *Citrus*. In: *Handbook of Plant Cell Culture* 13, pp 355-372.
69. - Talon, M. Gmitter, F. (2008). Citrus genomics reviews. (*International Journal of plant genomics*, Volume 2008, 1-17.
70. - Tanaka, T. (1961). *Citrologia*, semicentennial commemoration papers on citrus studies. *Citrologia Supporting Foundation*, Univ. Osaka Prefecture, Sakai.ahi, Osaka, Japan.
71. - Timmer, L.Graham, J. (2000) *Compendium of citrus disease*. APS Press, 2nd. Edition, USA, pp 61-64.
72. - Tusa, N; Grosser, J. W. and Gmitter, F. (1990). Plant regeneration of Valencia Sweet orange, “Femminello” lemon and interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115 (6): 1043-1046.
73. - Vardi, A. and Galum, E. (1988). Recent advances in protoplast culture of Horticultural crops: Citrus. *Scientia Horticulturae*. 37: 217-230.
74. - Venette, R.C. Moon, R.D. and W.D. Hutchison (2002) *Strategies and statistics of sampling for rare individuals*.
75. - Zimmermann, V. and Sheurich, P. (1981). High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta*. 151: 26-32.