

Actualización

EL CULTIVO DE PROTOPLASTOS EN CÍTRICOS Y SU POTENCIAL PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO¹

Víctor M. Jiménez *

ABSTRACT

Protoplast culture in citrus and its potential for genetic improvement. Techniques that involve isolation, culture and regeneration of citrus protoplasts for genetic improvement are reviewed. The species and cultivars from which viable protoplasts were obtained are listed. Also, plants regenerated through fusion experiments, cybrid formation and genetic transformation of protoplasts are described. Potential uses of these techniques and their applications are discussed, emphasizing protoplast fusion, which has evolved to a higher degree.

INTRODUCCIÓN

Los cítricos constituyen el principal producto frutícola en el comercio mundial. A pesar de su alta capacidad para hibridarse en forma interespecífica e incluso intergenérica, la aplicación efectiva de programas de mejoramiento genético tradicional se ha visto limitada por una serie de factores biológicos propios del grupo, dentro de los cuales se incluyen una biología reproductiva muy compleja y períodos de juvenilidad prolongados (Grosser y Gmitter, 1990a; Grosser, 1992). Algunas de éstas limitantes pueden obviarse en gran medida mediante la utilización de técnicas biotecnológicas, que involucran entre otras: el cultivo *in vitro*, el aislamiento, cultivo, regeneración, fusión y transformación de protoplastos, y la formación de híbridos. Estas técnicas permiten la incorporación de características genéticas que son de gran utilidad para conferir resistencia o tolerancia contra enfermedades, plagas y condiciones adversas (edáficas, climáticas, etc.), que afectan el rendimiento, así como para mejorar la calidad del fruto.

La diversidad genética que existe entre las especies de *Citrus* y los géneros emparentados es muy grande y ha sido poco estudiada. En el Cuadro 1 se observa que la Subtribu Citrinae (Subtribu 2 de la Tribu Citreae, Subfamilia Aurantioidae, Familia Rutaceae) a la cual pertenece *Citrus*, ha sido dividida en tres grupos subtribales, que contienen en total 28 géneros y 125 especies (Swingle y Reece, 1967).

En el presente trabajo se hace una descripción actualizada sobre el uso del cultivo de protoplastos como método para el mejoramiento genético de cítricos, con énfasis en la fusión de protoplastos, que es la metodología que ha tenido mayor desarrollo.

AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS Y REGENERACIÓN DE PLANTAS

La manipulación de protoplastos y la regeneración de plantas a partir de ellos es una herramienta innovadora en programas de mejoramiento genético. Estos protoplastos provienen de células a las cuales se les ha eliminado la pared celular, ya sea por medios mecánicos o mediante digestión enzimática. La única barrera entonces entre el pro-

1/ Recibido para publicación el 1 de diciembre de 1995.
* Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Cuadro 1. Géneros pertenecientes a la familia Rutaceae y la subfamilia Aurantiodeae (Swingle y Reece, 1967). Entre paréntesis se indica el número de especies en el género; y en negrita, aquellos en los que se ha tenido cierto éxito al hibridarlos somáticamente con *Citrus* (modificado de Grosser y Gmitter, 1990c).

TRIBU I.		Clauseneae			
Subtribu 1.	Micromelinae		<i>Micromelum</i> (9)		
Subtribu 2.	Clauseninae	<i>Glycosmis</i> (35)	<i>Murraya</i> (11)	<i>Clausena</i> (23)	
Subtribu 3.	Merrillinae	<i>Merrillia</i>			
TRIBU II.		Citreae			
Subtribu 1.	Triphasiinae	<i>Wenzelia</i> (9) <i>Oxanthera</i> (4)	<i>Triphasia</i> (3) <i>Luvunga</i> (12)	<i>Monanthocitrus</i> <i>Merope</i>	<i>Pamburus</i> <i>Paramignya</i> (15)
Subtribu 2.	Citrinae	<i>Severinia</i> (6) <i>Burkillanthus</i> <i>Hesperathusa</i> <i>Atalantia</i> (11)	<i>Fortunella</i> (4) <i>Poncirus</i> (2) <i>Microcitrus</i> (6)*	<i>Pleiospermium</i> (5) <i>Limnocitrus</i> <i>Citropsis</i> (11)	<i>Eremocitrus</i> <i>Clymenia</i> <i>Citrus</i> (16)
Subtribu 3.	Balsamocitrinae	<i>Swinglea</i> <i>Afraegle</i> (4)	<i>Balsamocitrus</i> <i>Feroniella</i> (3)	<i>Aegle</i> <i>Aeglopsis</i>	<i>Feronia</i>

* Utilizado para la formación de híbridos.

toplasma celular y el medio externo es la membrana plasmática (Bengochea y Dodds, 1986).

Los protoplastos de cítricos pueden aislarse de varios tejidos, incluyendo hojas, callos no embriogénicos, tétradas florales (protoplastos haploides), callos embriogénicos y cultivos embriogénicos en suspensión, (Grosser y Chandler, 1987; Grosser y Gmitter, 1990a), siendo los dos últimos las fuentes más apropiadas para obtener protoplastos con capacidad embriogénica.

Aislamiento de protoplastos a partir de callo

Se puede aislar protoplastos directamente de callos embriogénicos friables, derivados de nucelas u óvulos mantenidos en un medio de cultivo desprovisto de reguladores de crecimiento, y de callos friables no embriogénicos, obtenidos a partir de órganos de plántulas en medios con altos niveles de auxina (Grosser *et al.*, 1988b). A partir de los primeros es posible obtener protoplastos embriogénicos con capacidad de regenerar plantas normales. Sin embargo, ha sido muy difícil iniciar y mantener estas líneas de callo, lo que ha constituido la etapa limitante para la aplicación en gran escala, de metodologías que involucren el cultivo de protoplastos (Grosser y Gmitter, 1990c). Si bien la utilización de callo se ha relacionado con tasas

elevadas de variación somaclonal en varios cultivos, en cítricos los embriones obtenidos conservan la identidad genética con la planta madre y expresan poca variabilidad. Los mejores resultados para el aislamiento de protoplastos se han obtenido utilizando tejido friable con bajo contenido de almidón. Los cultivos embriogénicos en cítricos generalmente requieren de subcultivos continuos, a intervalos de 1-2 meses, por largos períodos de tiempo (generalmente mayores de un año), antes de que alcancen un grado de friabilidad adecuado, así como niveles apropiados de almidón (Grosser, 1994b).

Kochba *et al.* (1972) obtuvieron callos embriogénicos de *C. sinensis* cv. 'Shamouti' a partir del tejido nucelar de óvulos de frutos inmaduros cultivados *in vitro*. La metodología descrita por ellos, así como modificaciones posteriores han permitido incrementar el número de líneas nucleares de callo friable capaces de producir suspensiones celulares y protoplastos capaces de regenerar plantas. El Cuadro 2 presenta una lista de las especies y cultivares de cítricos en los cuales se ha informado la obtención de callo friable.

El primer aislamiento de protoplastos totipotentes en cítricos fue realizado por Vardi *et al.* (1975), utilizando como explante el callo embriogénico de naranja dulce (*C. sinensis*) cv. 'Shamouti' obtenido por Kochba *et al.* (1972). El cultivo de

Cuadro 2. Géneros, especies y cultivares de cítricos de los cuales se ha obtenido callo friable embriogénico a partir de óvulos cultivados *in vitro*.

Especie	Cultivar	Referencias
<i>C. aurantifolia</i> Swing.	—	Mitra y Chatuverdi (1972; citados por Button <i>et al.</i> , 1974), Hidaka y Omura (1989), Ollitrault <i>et al.</i> (1992; citados por Engelmann <i>et al.</i> , 1994), Grosser (comunicación personal)
<i>C. aurantium</i> L.	—	Vardi <i>et al.</i> (1982b), Galiana <i>et al.</i> (1993), Jiménez y Guevara (1995)
	híbrido	Grosser (comunicación personal)
<i>C. deliciosa</i> Ten.	—	Ollitrault <i>et al.</i> (1992; citados por Engelmann <i>et al.</i> , 1994)
<i>C. jambhiri</i> Lush.	'Milam' 'Volkameriana'	Grosser (comunicación personal) Ben-Hayyim y Neumann (1983)
<i>C. limon</i> (L.) Burm.	'Femminello Continella' 'Villafranca'	Geraci y Tusa (1988), Gentile <i>et al.</i> (1993) Kochba (no publicado, citado por Vardi <i>et al.</i> , 1982b); Nadel y Spiegel-Roy (1987)
<i>C. meyeri</i> Y. Tan.	'Meyer'	Singh <i>et al.</i> (1992)
<i>C. madurensis</i> Lour.	—	Ling <i>et al.</i> (1989)
<i>C. mitis</i> Blanco	—	Sim <i>et al.</i> (1988)
<i>C. paradisi</i> Macf.	'Duncan' 'Marsh Seedless' 'Thompson Pink'	Vardi <i>et al.</i> (1982b) Hidaka y Omura (1989) Grosser (comunicación personal)
<i>C. reticulata</i> Blanco	'Cleopatra' 'Dancy' 'Murcott' 'Ponkan'	Galiana <i>et al.</i> (1993), Ollitrault <i>et al.</i> (1992; citados por Engelmann <i>et al.</i> , 1994), Grosser (comunicación personal) Vardi <i>et al.</i> (1982b) Vardi <i>et al.</i> (1982b) Vardi <i>et al.</i> (1982b)
<i>C. sinensis</i> Osb.	'Acosta 6' 'Bahfa' 'Hamlin' 'Navelina ISA 315' 'Pineapple' 'Salustiana' 'Shamouti' 'Shamouti Landau' 'Succari' 'Tarocco' 'Trovia' 'Ukumori' 'Valencia' 'Washington Navel'	Jiménez y Guevara (1995) Kobayashi <i>et al.</i> (1984) Gmitter y Moore (1986), Ollitrault <i>et al.</i> (1992; citados por Engelmann <i>et al.</i> , 1994), Niedz (1994) Starrantino (no publicado, citado por Lucretti <i>et al.</i> , 1990) Galiana <i>et al.</i> (1993) Galiana <i>et al.</i> (1993) Kochba <i>et al.</i> (1972), Vardi <i>et al.</i> (1982b), Ollitrault <i>et al.</i> (1992; citados por Engelmann <i>et al.</i> , 1994) Vardi <i>et al.</i> (1982b) Grosser (comunicación personal) Gentile <i>et al.</i> (1993) Kobayashi <i>et al.</i> (1984) Hidaka y Omura (1989) Hidaka y Omura (1989), Pasqual y Ando (1990), Grosser (comunicación personal) Button y Rijkenberg (1977), Kobayashi y Ohgawara (1988), Jiménez y Guevara (1995)
<i>C. sudachi</i> Hort.	—	Kobayashi <i>et al.</i> (1984)
<i>C. tankan</i>	—	Hidaka y Omura (1989)
<i>C. unshiu</i> Marc.	'Ishizuka-wase' 'Kanazawa-wase' 'Miyagawa-wase' 'Miyamoto-wase' 'Ohura-wase' 'Okitsu-wase'	Ling <i>et al.</i> (1990) Ling <i>et al.</i> (1990) Kunitake <i>et al.</i> (1991) Hidaka y Omura (1989) Hidaka y Omura (1989) Kunitake <i>et al.</i> (1991)

continua...

Cuadro 2. (Continuación)

Especie	Cultivar	Referencias
	'Saruwatari'	Hidaka y Omura (1989)
	'Sugiyama'	Hidaka y Omura (1989)
	'Tokumori-wase'	Kunitake <i>et al.</i> (1991)
<i>Microcitrus</i> sp.	—	Vardi <i>et al.</i> (1986)
<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i> (Tangelo)	'Nova'	Grosser (comunicación personal)
	'Page'	Grosser (comunicación personal)
<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i> (Tangor)	'Murcott'	Grosser (comunicación personal)

estos protoplastos condujo a la formación de callo y la posterior obtención de embriones somáticos.

Vardi (1981) y Vardi *et al.* (1982b) obtuvieron protoplastos de los cultivares de naranja dulce 'Shamouti Nucelar' y 'Shamouti Landau'; de las mandarinas (*C. reticulata*) 'Murcott', 'Dancy' y 'Ponkan'; de grapefruit (*C. paradisi*) 'Duncan'; de naranja agria (*C. aurantium*); y de limón 'Villafranca' (*C. limon*). A partir de los protoplastos obtenidos lograron regenerar plántulas con características morfológicas normales.

Kobayashi *et al.* (1983) aislaron de manera similar protoplastos de callos nucelares de naranja dulce cv. 'Trovita'. Posteriormente, Kobayashi *et al.* (1985) cultivaron en medio líquido los mismos callos anteriores, y aislaron por primera vez protoplastos a partir de suspensiones celulares.

Vardi *et al.* (1986) obtuvieron plantas a partir de protoplastos del género *Microcitrus*. Esta fue la primera vez que se logró todo el proceso de regeneración a partir de protoplastos hasta la formación de plántulas para una variedad monoembriónica, y dentro de las Rutáceas, de un género diferente de *Citrus*.

Kobayashi (1987) encontró, al observar 25 plantas regeneradas a partir de protoplastos de naranja dulce, que caracteres como morfología foliar y floral, aceites de la hoja, patrones de isoenzimas y número de cromosomas, no variaban entre los individuos. Observó además, uniformidad al comparar estos resultados con los obtenidos de plántulas de origen nucelar. Este y otros estudios evidencian que las plantas de *Citrus* derivadas de protoplastos presentan poca o ninguna variación somaclonal (Kobayashi, 1987; Vardi y Galun, 1988;

Hidaka y Omura, 1989).

El aislamiento y regeneración de protoplastos obtenidos a partir de callos de origen nucelar se limita a lo logrado por Hidaka y Kajiura (1988), quienes obtuvieron callos con capacidad embriogénica de la región hipocotilar de embriones de *C. sinensis* cv. 'Washington Navel', *C. yuko* y *C. reticulata* cv. 'Ponkan'. También Ling *et al.* (1989) regeneraron plantas de *C. madurensis* Lour. a partir de protoplastos obtenidos de callo derivado de la región del hipocótilo de plántulas diferenciadas por cultivo de anteras.

Aislamiento de protoplastos a partir de suspensiones celulares

A partir de callos friables embriogénicos se puede iniciar fácilmente el cultivo de suspensiones celulares, ya que la composición misma del callo permite que el tejido se disgregue fácilmente en medio líquido en agitación. Esto se ve favorecido si se cultivan los callos en medio de cultivo desprovisto de reguladores de crecimiento por tiempo prolongado, ya que en los mismos se da un proceso de habituación o independencia de la adición externa de reguladores de crecimiento (Kochba y Spiegel-Roy, 1973).

Se ha obtenido mayor cantidad de protoplastos intactos a partir de suspensiones celulares que de callos cultivados en medio sólido (Kobayashi *et al.*, 1985; Citrus Research and Education Center, Universidad de Florida, Grosser, 1994, (comunicación personal), por lo cual a veces se han preferido las primeras como material de origen (Sim *et al.*, 1988; Kunitake *et al.*, 1991; Niedz, 1993).

Aislamiento de protoplastos a partir de hojas

La mejor fuente de material foliar para aislar protoplastos ha sido a partir de las plántulas nucelares desarrolladas *in vitro*, ya que se elimina la necesidad de un proceso de desinfección antes del aislamiento. También se puede utilizar hojas de plántulas en cámaras de crecimiento, invernadero o en el campo, pero es necesario efectuar una desinfección previa. Estos protoplastos pueden contener en algunos casos metabolitos secundarios que pueden interferir con el cultivo eficiente de los mismos y de los híbridos somáticos en eventos de fusión. A diferencia de los protoplastos obtenidos de callo friable y suspensiones celulares embriogénicas, los protoplastos de hoja no son capaces de regenerar en medio de cultivo desprovisto de reguladores de crecimiento.

Aislamiento de protoplastos a partir de yemas florales

Se ha logrado aislar protoplastos haploides de las tétradas que se encuentran en las yemas florales de grapefruit (*C. paradisi*) y 'pomelo' (*C. grandis*), ya que sus yemas son de mayor tamaño y fáciles de desinfectar (Grosser y Gmitter, 1990a).

Regeneración de plantas a partir de protoplastos

Se ha logrado la regeneración de plantas por medio de embriogénesis somática a partir de protoplastos en varios genotipos de *Citrus* (Cuadro 3). La naranja dulce es la especie en la cual se ha observado mejor respuesta.

Cuadro 3. Géneros, especies y cultivares de cítricos de los cuales se han regenerado plántulas a partir de protoplastos embriogénicos.

Especie	Cultivar	Referencias
<i>C. aurantium</i> L.	—	Vardi <i>et al.</i> (1982b), Hidaka y Omura (1989)
<i>C. jambhiri</i> Lush.	—	Vardi <i>et al.</i> (1990), Li (1991, citado por Roest y Gilissen, 1993)
<i>C. limon</i> (L.) Burm.	'Villafranca'	Vardi <i>et al.</i> (1982b), Spiegel-Roy y Saad (no publicado, citados por Vardi y Galun, 1988)
<i>C. madurensis</i> Lour.	—	Ling <i>et al.</i> (1989)
<i>C. mitis</i> Blanco	—	Sim <i>et al.</i> (1988)
<i>C. paradisi</i> Macf.	'Duncan' 'Marsh Seedless'	Vardi <i>et al.</i> (1982b) Hidaka y Omura (1989)
<i>C. reticulata</i> Blanco	'Cleopatra' 'Dancy' 'Murcott' 'Ponkan'	Grosser (1993) Vardi <i>et al.</i> (1982b) Vardi <i>et al.</i> (1982b) Vardi <i>et al.</i> (1982b), Hidaka y Kajiura (1988), Hidaka y Omura (1989)
<i>C. sinensis</i> Osb.	'Hamlin' 'Shamouti' 'Shamouti Landau' 'Trovita' 'Valencia' 'Washington Navel'	Grosser (1993), Niedz (1993) Vardi <i>et al.</i> (1975, 1982b) Vardi <i>et al.</i> (1982a) Kobayashi <i>et al.</i> (1983, 1985, 1988b), Hidaka y Omura (1989) Hidaka y Omura (1989), Tusa <i>et al.</i> (1990) Hidaka y Kajiura (1988)
<i>C. tankan</i>	—	Hidaka y Omura (1989)
<i>C. unshiu</i> Marc.	'Saruwatari Satsuma'	Ling <i>et al.</i> (1990), Kunitake <i>et al.</i> (1991) Hidaka y Omura (1989)
<i>C. yuko</i> Hort.	—	Hidaka y Kajiura (1988)
<i>Microcitrus</i> sp.	—	Vardi <i>et al.</i> (1986)
<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i> (Tangor)	'Murcott'	Grosser (1993)
<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i> (Tangelo)	'Page'	Grosser (1993)

Los protoplastos pueden cultivarse inicialmente en medio de cultivo líquido, o en medio solidificado con agarosa de bajo punto de fusión. Es recomendable colocarlos a una densidad de cultivo de aproximadamente 105 protoplastos/ml de medio (Grosser y Gmitter, 1990a), pero para obtener divisiones celulares a densidades menores (103-102 protoplastos/ml), los protoplastos pueden ser cultivados sobre una capa de protoplastos cuya división fue detenida o disminuida mediante irradiación con rayos X o gamma (Vardi y Raveh, 1976).

El tiempo requerido para que los protoplastos en cultivo formen callo depende de factores como la fuente de protoplastos y la densidad de plateo (Vardi y Galun, 1988). Generalmente se observan las primeras divisiones celulares a los 10-14 días, y la formación de embriones somáticos en forma espontánea a las 6-16 semanas (Grosser y Gmitter, 1990a; Vardi y Galun, 1988).

FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

La ausencia de la pared celular permite que cuando 2 o más protoplastos entran en contacto íntimo bajo ciertas condiciones, se adhieran entre sí, y bajo un estímulo apropiado puede provocar que ambas células se fusionen en una sola unidad. Si bien eventos de fusión pueden ocurrir en forma espontánea en una suspensión de protoplastos, la tasa a la cual ocurre es extremadamente baja, y en consecuencia de poca aplicación práctica. Se han desarrollado varios métodos para aumentar la eficiencia en este proceso. Los que han tenido mayor aceptación son la fusión mediada por polietilén glicol (PEG) y por la aplicación de una corriente eléctrica (electro-fusión). El primero provoca la aglutinación de los protoplastos, favoreciendo el contacto entre ellas, mientras que el segundo las alinea mediante la aplicación de un diferencial de potenciales, y luego las fusiona al aplicar un pulso eléctrico de corriente directa (ac) (Bengochea y Dodds, 1986).

La hibridación somática efectiva se había limitado hasta hace poco a solanáceas, crucíferas y leguminosas. Sin embargo, los híbridos somáticos obtenidos no han tenido importancia agronómica directa, principalmente porque son portadores de características indeseables de las variedades silvestres, que reducen sus ventajas hortícolas, incluyendo la calidad del producto cosechable (Grosser y Gmitter, 1990b).

Fusión de protoplastos en cítricos

A través de la hibridación somática (fusión de protoplastos) en cítricos se obvian una serie de problemas de la hibridación sexual. Este es un proceso aditivo, que la mayoría de las veces resulta en la formación de alotetraploides, en los cuales se combinan los genomas nucleares completos de ambos padres (Grosser y Gmitter, 1990b). La heterocigosidad potencial de los híbridos somáticos es grande, dependiendo de las diferencias alélicas acumulativas entre los padres. Y, en contraste con la hibridación sexual, donde la herencia del genoma citoplasmático (cloroplastos y mitocondrias) es predominantemente materno, el híbrido somático recibe contribuciones citoplasmáticas de ambos progenitores (Grosser y Gmitter, 1990c; Ohgawara y Kobayashi, 1991). Cierta variabilidad genética adicional puede resultar de la recombinación genética nuclear y citoplasmática o de variación somaclonal (Grosser y Gmitter, 1990 b y c).

El primer ejemplo de hibridación somática en *Citrus* fue descrito por Ohgawara *et al.* (1985). Este híbrido somático intergenérico entre especies sexualmente compatibles, fue producto de la fusión, utilizando PEG, de protoplastos de hoja de *Poncirus trifoliata*, con protoplastos obtenidos de callo embriogénico de *C. sinensis* cv. 'Trovia'. El primer híbrido interespecífico fue producido entre *C. sinensis* 'Washington' y *C. unshiu* 'Hayashi' (mandarina Satsuma); ésta fue una combinación importante para el mejoramiento de injertos, en los cuales el progreso mediante el mejoramiento tradicional ha sido limitado (Kobayashi *et al.*, 1988b).

Grosser *et al.* (1988b), obtuvieron más de 150 híbridos somáticos entre especies de dos géneros sexualmente incompatibles: *Severinia disticha* (Blanco) Swing y *C. sinensis* cv. 'Hamlin'. Fusionaron protoplastos derivados de cultivos embriogénicos en suspensión de 'Hamlin' con protoplastos derivados de callos del epicótilo de plántulas de *Severinia*. Estos géneros están emparentados en forma muy distante. La producción de este híbrido evidenció la capacidad de esta técnica para sobrepasar barreras de hibridación sexual y de esta forma utilizar germoplasma anteriormente no disponible, pero importante, dentro de la familia Rutaceae.

El primer híbrido intertribal fue producto de la fusión de naranja dulce 'Hamlin' con *Clausena lansium* (Lour.) Skeels, un miembro de la Tribu I

Clauseneae (Cuadro 1). Debido a que las plántulas de este híbrido no desarrollaron raíces, los brotes fueron microinjertados en citrange 'Carrizo'. Sólo se obtuvieron dos plantas, las cuales crecieron bien hasta que alcanzaron 30 cm de altura; pero luego degeneraron, y finalmente murieron. Esto fue atribuido a incompatibilidad de injerto, o a una incompatibilidad somática latente. Posteriormente se logró la fusión de naranja dulce 'Hamlin' con *Feronia limonia* (L.) Swing., un miembro de la Subtribu 3, Balsamocitrinae (Cuadro 1). Sin embargo, las plántulas enraizadas de esta combinación no sobrevivieron la transferencia de condiciones asépticas, e intentos repetidos de microinjertarlas han sido infructuosos. Tanto *Clausena* como *Feronia* tienen una compatibilidad de injerto limitada con *Citrus* (Swingle y Reece, 1967). En el Cuadro 1 se presentan los géneros con los cuales se ha logrado cierto éxito al hibridarlos con *Citrus*.

Saito *et al.* (1991) indican que el procedimiento de fusión química utilizando PEG consume mucho tiempo, y es complicado y tóxico para los protoplastos; y que las técnicas de electrofusión desarrolladas recientemente son muy simples y eficientes. Los primeros híbridos somáticos producidos por medio de electrofusión fueron las siguientes combinaciones: sudachi (*C. sudachi*) y lima 'Mexicana' (*C. aurantifolia*) (Saito *et al.*, 1991); mandarina 'Satsuma' (*C. unshiu*) y limón rugoso (*C. jambhiri*) o yuzu (*C. junos*) (Hidaka y Omura, 1992).

El Cuadro 4 presenta una recopilación de los híbridos somáticos interespecíficos e intergenéricos informados para cítricos hasta la fecha, con información sobre el método de fusión, el número de plántulas híbridas obtenidas y el uso potencial de las mismas.

Todavía no se conocen bien las limitaciones genéticas de la hibridación somática en *Citrus*. Aparentemente la compatibilidad de injerto refleja cierto potencial para hibridaciones somática exitosas. Aunque se han producido plantas híbridas somáticas entre ocho combinaciones sexualmente incompatibles (Cuadro 4), sólo una se ha producido entre combinaciones incompatibles por injerto (Shinozaki *et al.*, 1992).

Selección de embriones híbridos somáticos

La clave para un programa exitoso de hibridación somática reside en la aplicación de un esquema de selección muy eficiente, que permita identificar y seleccionar los híbridos.

En cítricos generalmente se efectúa la fusión de protoplastos derivados de hojas o callos no embriogénicos, con protoplastos obtenidos de callo friable o suspensión celular embriogénica (Grosser y Gmitter, 1990a), para poder efectuar una selección temprana. Los protoplastos derivados de hoja no pueden resintetizar la pared celular o iniciar mitosis en medio de cultivo desprovisto de reguladores de crecimiento, por lo que los protoplastos no fusionados de esta especie mueren (Grosser y Gmitter, 1990b). En los obtenidos de callo la capacidad para formar plantas normales se ve reducida a causa de su cultivo por períodos prolongados, con lo cual se ven disminuidas las posibilidades de regeneración (Ohgawara *et al.*, 1985; Grosser y Gmitter, 1990a).

Por otra parte, en los productos de fusión ocurre cierta complementación que permite el crecimiento de los híbridos somáticos (Grosser y Gmitter, 1990b). Aparentemente la capacidad embriogénica en cítricos está bajo el control de genes dominantes, que pueden expresarse en los productos de fusión, permitiendo la obtención de plantas completas (Grosser y Gmitter, 1990a), y recientemente se ha planteado la posibilidad de que haya alguna ingerencia del genoma mitocondrial (Saito *et al.*, 1993) como se describe más adelante.

Verificación de los híbridos somáticos

A pesar de que el esquema de selección descrito anteriormente permite una discriminación inicial de los protoplastos no fusionados, es necesario verificar la condición híbrida o no híbrida de cada una de las plantas obtenidas. Para este proceso existen una serie de técnicas, las cuales se describen a continuación.

Se espera que los híbridos somáticos en cítricos tengan una morfología vegetativa intermedia entre los progenitores donadores, sean tetraploides, y manifiesten una expresión compuesta de marcadores moleculares. Las técnicas disponibles para verificar que las plantas regeneradas, presumiblemente de heterocariones, son en realidad híbridos somáticos, incluyen la evaluación visual por una persona familiarizada con la morfología de los padres, la determinación del número de cromosomas durante la mitosis, la caracterización molecular mediante electroforesis de ADN o isoenzimas y la separación cromatográfica de aceites de hoja. Sin embargo, ninguno de estos métodos por sí solo provee conclusiones determinantes, ya que cada uno tiene sus limitaciones (Grosser y Gmitter, 1990a).

Cuadro 4. Híbridos somáticos obtenidos en la familia Rutaceae mediante fusión de protoplastos.

Progenitores y fuente de protoplastos(1)	Tipo de fusión(2)	Nº. de plantas	Uso potencial(3)	Referencia
Híbridos interespecíficos:				
<i>C. aurantifolia</i> lima 'Key' (s.e.) + <i>C. sinensis</i> 'Valencia' (hoja)	PEG	>40	P,I	Grosser <i>et al.</i> (1989)
<i>C. aurantifolia</i> lima mexicana (c.e. híbrido) + <i>C. limon</i> 'Eureka' (hoja)	E	5	I	Saito <i>et al.</i> (1994)
<i>C. autantium</i> naranja agria + <i>C. limonia</i> 'Rangpur'	PEG	?	I	Grosser (1993)
<i>C. aurantium</i> naranja agria (c.e.) + <i>C. volkameriana</i> 'limón Volkamer' cigótico (hoja)	PEG	113	P	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>C. jambhiri</i> 'Milam' (c.e.) + <i>C. limon</i> 'Femminello' (hoja)	PEG	1	P,I	Tusa <i>et al.</i> (1992)
<i>C. jambhiri</i> 'Milam' + <i>C. reticulata</i> 'Sun Chu Sha'	PEG	?	I	Grosser (1993)
<i>C. paradisi</i> 'Thompson Pink' (s.e.) + tangor 'Murcott' (hoja)	PEG	19	I	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>C. reticulata</i> mandarina 'Cleopatra' (c.e.) + <i>C. aurantium</i> naranja agria (hoja)	PEG	171	P	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>C. reticulata</i> mandarina 'Cleopatra' (c.e.) + <i>C. jambhiri</i> 'limón rugoso' (hoja)	PEG	5	P	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>C. reticulata</i> mandarina 'Cleopatra' (c.e.) + <i>C. limonia</i> 'Rangpur' (hoja)	PEG	>1000	P	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>C. reticulata</i> mandarina 'Cleopatra' (c.e.) + <i>C. volkameriana</i> 'limón Volkamer' (hoja)	PEG	8	P	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>C. sinensis</i> 'Bahia' navel (s.e.) + <i>C. paradisi</i> 'Marsh' (hoja)	PEG	<10	I	Ohgawara <i>et al.</i> (1989)
<i>C. sinensis</i> 'Hamlin' (c.e.) + <i>C. jambhiri</i> limón rugoso (hoja)	PEG	11	P	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>C. sinensis</i> 'Hamlin' (c.e.) + <i>C. limon</i> 'Femminello' (hoja)	PEG	2	P,I	Tusa <i>et al.</i> (1992)
<i>C. sinensis</i> 'Hamlin' (c.e.) + <i>C. limonia</i> 'Rangpur' (hoja)	PEG	>1000	P	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>C. sinensis</i> 'Hamlin' (c.e.) + <i>C. reticulata</i> 'Dancy' (hoja)	PEG	1	I	Grosser <i>et al.</i> (1992a)
<i>C. sinensis</i> 'Hamlin' (c.e.) + [mandarina 'Clementina' x tangelo 'Minneola']	PEG	?	I	Grosser (1993)
<i>C. sinensis</i> 'Trovia' (s.e.) + <i>C. unshiu</i> 'Hayashi' mandarina Satsuma (hoja)	PEG	?	I	Kobayashi y Ohgawara (1988)
<i>C. sinensis</i> 'Valencia' (s.e.) + <i>C. jambhiri</i> limón rugoso (hoja)	PEG	12	P	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>C. sinensis</i> 'Valencia' (s.e.) + <i>C. limon</i> 'Femminello' (hoja)	PEG	25	P,I	Tusa <i>et al.</i> (1990)
<i>C. sinensis</i> 'Valencia' + [tangelo 'Robinson' x tangor 'Temple']	PEG	?	I	Grosser (1993)
<i>C. sinensis</i> 'Washington' navel (s.e.) + <i>C. unshiu</i> 'Hayashi' mandarina Satsuma (hoja)	PEG	1	I	Kobayashi <i>et al.</i> (1988b)
<i>C. sinensis</i> 'Washington' navel (s.e.) + tangor 'Murcott' (hoja)	PEG	?	I	Kobayashi <i>et al.</i> (1988a)
<i>C. sudachi</i> (s.e.) + <i>C. aurantifolia</i> lima mexicana (hoja)	E	12	I	Saito <i>et al.</i> (1991)
<i>C. sudachi</i> (s.e.) + <i>C. limon</i> 'Eureka' (hoja)	E	6	?	Saito <i>et al.</i> (1993)
<i>C. unshiu</i> 'Saruwatari' (s.e.) + <i>C. jambhiri</i> limón rugoso (hoja)	E	?	?	Hidaka y Omura (1992)
<i>C. unshiu</i> 'Saruwatari' (s.e.) + <i>C. junos</i> yuzu (hoja)	E	?	?	Hidaka y Omura (1992)
Tangelo 'Nova' (c.e.) + <i>C. sinensis</i> 'Succari' (hoja)	PEG	2	I	Grosser <i>et al.</i> (1992a)
Tangelo 'Nova' (c.e.) + <i>C. grandis</i> 'Hirado Buntan' cigótico (hoja)	PEG	>10	I	Grosser (1992)

continua...

Cuadro 4. (Continuación)

Progenitores y fuente de protoplastos(1)	Tipo de fusión(2)	No. de plantas	Uso potencial(3)	Referencia
Tangelo 'Page' (c.e.) + <i>C. sinensis</i> 'Succari' (hoja)	PEG	2	I	Grosser (1994a)
Híbrido de <i>C. aurantium</i> ('Smooth Flat Seville') (c.e.) + <i>C. jambhiri</i> limón rugoso (hoja)	PEG	>70	P	Louzada <i>et al.</i> (1992)
Híbridos intergenéricos; padres sexualmente compatibles:				
<i>C. reticulata</i> mandarina 'Cleopatra' (c.e) + citrumelo 'Swingle' (hoja)	PEG	5	P	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>C. reticulata</i> mandarina 'Cleopatra' (c.e) + <i>P. trifoliata</i> 'Argentine' (hoja)	PEG	>200	P	Grosser (1992)
<i>C. reticulata</i> mandarina 'Cleopatra' (c.e) + <i>P. trifoliata</i> 'Flying Dragon' (hoja)	PEG	>150	P	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>C. sinensis</i> 'Bahia' (s.e.) + citrange 'Troyer' (hoja)	PEG	20	P,I	Ohgawara <i>et al.</i> (1991)
<i>C. sinensis</i> 'Hamlin' (s.e.) + <i>Poncirus trifoliata</i> 'Flying Dragon' (hoja)	PEG	>300	P	Grosser <i>et al.</i> (1988a)
<i>C. sinensis</i> 'Succari' + <i>P. trifoliata</i> 'Argentine'	PEG	?	P	Grosser (1993)
<i>C. sinensis</i> 'Trovita' (s.e.) + <i>P. trifoliata</i> (hoja)	PEG	>10	P	Ohgawara <i>et al.</i> (1985)
<i>C. sinensis</i> 'Trovita' (s.e.) + citrange 'Troyer' (hoja)	PEG	17	P,I	Kobayashi y Ohgawara (1988)
<i>C. sinensis</i> 'Valencia' (c.e.) + citrange 'Carrizo' (hoja)	PEG	7	P,I	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>C. sinensis</i> 'Valencia' (c.e.) + <i>Fortunella crassifolia</i> 'Meiwa' kumquat (hoja)	PEG	>40	P,I	Deng <i>et al.</i> (1992)
Híbridos intergenéricos; padres sexualmente incompatibles:				
<i>C. aurantifolia</i> lima 'mexicana' (s.e.) + <i>Feroniella lucida</i> (hoja)	E	?	P	Takayanagi <i>et al.</i> (1992)
<i>C. aurantifolia</i> lima 'mexicana' (s.e.) + <i>Swinglea glutinosa</i> (hoja)	E	?	P	Takayanagi <i>et al.</i> (1992)
<i>C. reticulata</i> mandarina 'Cleopatra' (s.e.) + <i>Citropsis gillettiana</i> (hoja)	PEG	>35	P	Grosser <i>et al.</i> (1990)
<i>C. sinensis</i> 'Hamlin' (c.e.) + <i>Atalantia ceylanica</i> (hoja)	PEG	5	P,I	Louzada <i>et al.</i> (1993)
<i>C. sinensis</i> 'Hamlin' (s.e.) + <i>Citropsis gillettiana</i> (hoja/callos n.e.)	PEG	>150	P,I	Grosser y Gmitter (1990b)
<i>C. sinensis</i> 'Hamlin' (s.e.) + <i>Severinia buxifolia</i> (callo n.e.)	PEG	>50	P,I	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>C. sinensis</i> 'Hamlin' (s.e.) + <i>Severinia disticha</i> (callo n.e.)	PEG	>150	P,I	Grosser <i>et al.</i> (1988b)
<i>C. sinensis</i> 'Trovita' (s.e.) + <i>Murraya paniculata</i> (hoja)	E	?	P	Shinozaki <i>et al.</i> (1992)

(1)s.e.: suspensión embriónica; n.e.: no embriónica; c.e.: callo embriónico; (2)PEG: fusión química utilizando polietilén glicol; E: fusión mediante la aplicación de una corriente eléctrica; (3)P: patrón; I: injerto

Evaluación morfológica. Las diferencias morfológicas que existen entre *Citrus* y los géneros relacionados facilitan en gran medida la identificación de los híbridos somáticos. Caracteres bajo el control de genes dominantes o codominantes se identifican generalmente con facilidad en los híbridos somáticos, particularmente cuando se cruzan padres muy poco relacionados filogenéticamente. Las plantas híbridas pueden identificarse por la expresión de cualquier carácter único al progenitor no embriónico. Algunos ejemplos incluyen: la expresión de la hoja trifoliada de *Poncirus* (Grosser *et al.*, 1988a; Ohgawara *et al.*, 1985), la hoja pentafoliada de *Citropsis* (Grosser y Gmitter,

1990b) y de pigmentos rojos de *Severinia* (Grosser *et al.*, 1988b).

Aunque es más difícil utilizar diferencias morfológicas para identificar híbridos somáticos interespecíficos, se pueden utilizar características menos prominentes, como el tamaño del 'ala' en el pecíolo, la forma y el grosor de la hoja, que generalmente son intermedios a los de los progenitores (Grosser y Gmitter, 1990a).

Utilizar caracteres morfológicos como único método no es correcto, ya que se ha encontrado, por ejemplo, morfología intermedia en regenerantes originados por fusión de protoplastos, pero con eliminación de cierta cantidad de material cromosómico.

sómico (pre o posfusión). Estas plantas no portan toda la información genética que deben incluir los verdaderos híbridos somáticos tetraploides.

Determinación del número de cromosomas. Los experimentos de fusión somática en cítricos generalmente se orientan hacia la obtención de heterocariones, células tetraploides que poseen genomas completos de ambos progenitores. La evaluación de los posibles híbridos mediante conteo de cromosomas únicamente, es poco confiable, ya que los regenerantes homocariones (2 juegos completos de cromosomas del mismo progenitor), también poseerán un número tetraploide de cromosomas, y podrían ser confundidos con híbridos heterocariones.

Análisis electroforético de isoenzimas de hoja. Los sistemas de isoenzimas más útiles para la verificación de híbridos somáticos, son aquellos con el control genético más simple y con la mayor disparidad de alelos entre los progenitores (cada progenitor debe tener al menos un alelo distinto del otro). De los sistemas enzimáticos que se han estudiado hay 3 que han probado, a través del tiempo, ser muy útiles: fosfoglucomutasa (PGM), malato deshidrogenasa (MDH) y fosfohexosa isomerasa (PHI), en los cuales los alelos isoenzimáticos se expresan en forma codominante (Grosser y Gmitter, 1990a).

Los análisis por isoenzimas pueden ser engañosos en casos en los cuales ha ocurrido pérdida de material genético. También, esta técnica es de poco valor cuando se necesita la verificación de cíbridos (como se verá más adelante), ya que las isoenzimas comúnmente utilizadas están codificadas en el núcleo. En tales casos, o para verificar híbridos creados por fusión de protoplastos de especies muy cercanas entre sí, se pueden aplicar técnicas de caracterización de ADN más sensibles, tanto a genomas nucleares como citoplasmáticos (Grosser y Gmitter, 1990a).

Análisis de ADN ribosomal y mitocondrial. Estas técnicas son más sofisticadas que los análisis de isoenzimas. Se utiliza el ADN ribosomal ya que se ha observado que es altamente conservado a nivel filogenético, y por lo tanto permite determinar diferencias con mayor propiedad. El ADN mitocondrial se utilizó para la verificación de cíbridos y para esclarecer la naturaleza de plantas regeneradas en un evento de fusión, con genoma

diploide y bastante similitud con el progenitor derivado de protoplastos de hoja. Mediante este análisis se comprobó que estas plantas eran en realidad cíbridos, con genoma nuclear del progenitor embriogénico, y genoma mitocondrial del otro. Como se mencionó anteriormente, y se describe con más detalle adelante, existe, probablemente, un efecto del genoma mitocondrial en la capacidad de regeneración de los protoplastos en medio de cultivo.

También las técnicas moleculares, utilizadas por sí solas, a pesar de ser muy precisas, pueden dar falsos positivos. Por ejemplo, si las plantas regeneradas son quimeras, debido a un origen multicelular en lugar de unicelular, entonces las técnicas moleculares indicarían la presencia de híbridos, debido a la presencia de poblaciones de células heterogéneas en la planta.

APLICACIONES DE LA FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

La fusión de protoplastos puede tener aplicaciones hortícolas de gran importancia, tanto para el mejoramiento genético de patrones como de injertos. Con relación a los primeros, se conocen más de 20 características hortícolas y patológicas importantes que son controladas o determinadas en cítricos por los patrones (Grosser y Gmitter, 1990a). Para el desarrollo de patrones mejorados en cítricos existen dos aplicaciones principales: la producción de híbridos alotetraploides de cultivares que posean características complementarias y la formación de híbridos entre *Citrus* y especies silvestres incompatibles. Por su parte, el mejoramiento de injertos se ha orientado principalmente hacia la producción de triploides sin semilla, con calidad de fruto similar al de las variedades actuales, lo cual podría estimular el crecimiento del mercado de fruta fresca.

Mejoramiento de patrones

Formación de híbridos alotetraploides entre cultivares con características complementarias. Debido a que la hibridación somática es un proceso aditivo, sin segregación, las características que están bajo el control de genes dominantes o codominantes en uno de los padres tienen gran posibilidad de expresarse en cualquier híbrido somático alotetraploide. Algunas características que están bajo el dominio de genes dominantes en *Citrus*

son: poliembrionía, resistencia al frío, a *Phytophthora parasitica*, al virus de la tristeza y al nematodo *Tylenchulus semipenetrans* (Hutchison, 1985). Además, los genes recesivos deletéreos que se encuentran enmascarados en los progenitores no se expresan en los híbridos somáticos. Por ejemplo, el híbrido somático entre *C. sinensis* 'Hamlin' (naranja dulce) y *P. trifoliata* 'Flying Dragon' puede llegar a exhibir todas las características complementarias de cada progenitor, como resistencia a *Phytophthora*, tristeza y nematodos, aportadas por 'Flying Dragon', y cierta tolerancia a 'blight' por naranja dulce. También tiene la ventaja de reducir el tamaño del árbol para lograr plantaciones con mayor densidad. Los patrones diploides 'Carrizo' y 'Troyer' que se originaron de cruces sexuales entre *C. sinensis* y *P. trifoliata*. Sin embargo no exhiben todas las características anteriores, debido a la segregación meiótica (Grosser y Gmitter, 1990 a y c).

Formación de híbridos alotetraploides entre *Citrus* y especies silvestres sexualmente incompatibles. Muchos géneros emparentados con *Citrus* expresan ciertas características de importancia (tolerancia a factores de estrés, características hortícolas y productividad). También son una fuente potencial importante para resistencia a 'blight', lo cual no se ha encontrado dentro del género *Citrus*. Muchas especies emparentadas con *Citrus* son compatibles por injerto, pero incompatibles sexualmente, y no son aceptadas desde el punto de vista hortícola cuando son utilizadas directamente como patrones (*Citropsis gillettiana*, *Severinia*, *Feronia*, *Swinglea*, etc.) (Grosser y Gmitter, 1990b). Sin embargo, por medio de la hibridación somática pueden aportar una serie de características importantes que no estarían disponibles de otra forma, como resistencia a *Phytophthora citrophthora*, a nematodos y a otra serie de agentes bióticos muy perjudiciales (Grosser *et al.*, 1988b; Grosser y Gmitter, 1990b). Algunos híbridos somáticos desarrollados en este sentido han sido propagados e introducidos en campos experimentales, con el objeto de evaluar su potencial como patrones (Grosser, 1992).

Mejoramiento de injertos

Las plantas triploides de cítricos pueden ser vigorosas y producir frutos prácticamente carentes de semillas, como lo evidenció el estudio de la li-

ma triploide 'Persa'. Los triploides generalmente se obtienen de la hibridación de madres tetraploides con padres diploides; pueden surgir en forma espontánea en poblaciones de plántulas nucelares u obtenidas de cultivo *in vitro* de cultivares poliembriónicos diploides, mediante la aplicación de colchicina (Oiyama y Okudai, 1986; Grosser y Gmitter, 1990a). Se obtienen plantas triploides mediante cruces sexuales entre un híbrido somático tetraploide y una planta diploide, o bien fusionando directamente células diploides con aploides.

Producción de padres alotetraploides para uso en cruces sexuales 4x:2x. La hibridación somática interespecífica provee un método excelente para la producción de progenitores heterocigotos (entre padres complementarios), los cuales podrían ser utilizados en cruces sexuales de tetraploides x diploides para generar una progenie cigótica triploide, potencialmente sin semilla. Podría ser ventajoso utilizar híbridos somáticos alotetraploides que exhiban una heterocigocidad máxima en dichos cruces, con el fin de producir variación máxima en la progenie. Por ejemplo, si el híbrido somático entre lima 'Key' y naranja dulce 'Valencia' es fértil, podría ser hibridado sexualmente con ciertos cultivares diploides de lima, para intentar transferir tolerancia al frío, mejorar el tamaño y calidad del fruto, y tolerancia/resistencia a enfermedades de la naranja dulce en una progenie triploide, sin semilla, del tipo de la lima (Grosser *et al.*, 1989). También el híbrido somático entre naranja 'Washington' y mandarina Satsuma 'Hayashi' (Kobayashi *et al.*, 1988b) puede ser cruzado sexualmente con su complementario diploide, ya sea mandarina o naranja dulce, para generar plantas potencialmente sin semilla, fáciles de pelar, con maduración temprana y con buena calidad de fruto. Muchas más combinaciones triploides serán posibles conforme se generen nuevos progenitores alotetraploides interespecíficos.

Producción directa de triploides por medio de la fusión de n+2n. La fusión de protoplastos somáticos diploides, con protoplastos cigóticos haploides, tal y como se ha realizado con otras especies, produce híbridos triploides, probablemente sin semilla. Dichos híbridos se podrían obtener mediante la fusión de protoplastos diploides con protoplastos gaméticos haploides, aislados de tétradas de genotipos seleccionados por sus características

complementarias. Por ejemplo, la fusión de protoplastos embriogénicos de mandarina 'Dancy' (un tipo muy popular, fácil de pelar, pero con mucha semilla) con protoplastos gaméticos haploides de algún cultivar de grapefruit o pomelo, podría llevar al desarrollo de tangelos triploides sin semilla. Al contrario de las fusiones somáticas entre dos progenitores específicos, cada planta regenerada a partir de una fusión separada de $n+2n$ es única, debido a que cada protoplasto haploide es un producto de segregación (Grosser y Gmitter, 1990a).

Si tiene éxito, este método tendría muchas ventajas sobre el método descrito anteriormente de obtener triploides a partir de cruces sexuales entre diploides y tetraploides. La primera sería la reducción del tiempo necesario para producir los triploides. La segunda es que el uso de un genoma diploide intacto, sin sufrir recombinación ni segregación, podría mantener ocultos ciertos caracteres recesivos deletéreos, en la progenie resultante. Características importantes bajo el control de genes dominantes o codominantes en el progenitor diploide, o recesivos en ambos progenitores, serían expresados en una progenie generada por fusión de $n+2n$. Como resultado, una mayor cantidad de la progenie debe exhibir las características de interés, en contraste con lo que se esperaría en la progenie de un cruce sexual de un tetraploide con un diploide. El número de combinaciones parentales posibles está limitado por la disponibilidad de líneas de callos embriogénicos totipotentes y árboles de cultivares que produzcan tétradas de tamaño suficiente que resistan el proceso de desinfección. Otro factor limitante es que las fusiones $n+2n$ sólo pueden realizarse durante la estación en que las yemas florales están disponibles, a menos que sea posible controlar la floración en invernadero (Grosser y Gmitter, 1990a).

TRANSFERENCIA DE ORGANELAS ENTRE PROTOPLASTOS

Cuando en un evento de fusión de protoplastos se pierde el núcleo de uno de los progenitores y permanecen las organelas del otro progenitor o de ambos, se forma un híbrido (Bengochea y Dodds, 1986). Aunque puede ocurrir formación de híbridos en forma espontánea, esto generalmente sucede en porcentajes muy bajos. Por ello se han desarrollado metodologías que estimulen su formación. Galun y Aviv (1986) aplicaron un esquema basado en el empleo de radiaciones X o gam-

ma sobre los protoplastos donadores (los que van a transferir las organelas) para disminuir la división nuclear, y trataron los receptores (los que aportan el genoma nuclear) con el antimetabolito iodoacetato para inactivar el citoplasma. Después de la fusión donador-receptor, fue posible recobrar las plantas híbridas debido a la complementación entre el citoplasma de las plantas donadoras, y el núcleo de las receptoras (Grosser y Gmitter, 1990a).

Vardi y colaboradores utilizaron el procedimiento mencionado anteriormente para generar plantas híbridas de *Citrus*. Realizaron las siguientes combinaciones (Galun *et al.*, 1987; Vardi *et al.*, 1987, 1989):

- Híbrido de 'Poorman' X *Poncirus trifoliata* (donador) con limón Villafranca (*C. limon*) (receptor).
- Híbrido de 'Poorman' X *P. trifoliata* (donador) con naranja agria (*C. aurantium*) (receptor).
- Naranja agria (*C. aurantium*) (donador) con limón Villafranca (*C. limon*) (receptor).
- *Microcitrus* sp. (donador) con limón rugoso (*C. jambhiri*) (receptor)
- *Microcitrus* sp. (donador) con naranja agria (*C. aurantium*) (receptor).

En todas las combinaciones anteriores se encontraron plantas híbridas con el genoma nuclear y la morfología general del progenitor receptor, y el genoma mitocondrial del donador (Vardi *et al.*, 1987, 1989). En las primeras 3 combinaciones mencionadas, no se pudo verificar la transferencia de cloroplastos del progenitor donador, ya que los ADN cloroplásticos tienen patrones de restricción idénticos en ambos progenitores (Vardi *et al.*, 1987). Sin embargo, en las últimas dos combinaciones, se observó incorporación de cloroplastos de los progenitores donadores en los receptores. Esto se pudo verificar, porque el género *Microcitrus* sí presenta diferencias en los patrones de restricción del ADN cloroplástico con respecto a los de *Citrus* (Vardi *et al.*, 1989).

Esta línea de investigación generará información importante con respecto a la identificación, herencia y transferencia de caracteres importantes codificados por el ADN de las organelas (Vardi y Galun, 1988). Por ejemplo, en vista de que *Microcitrus* posee esterilidad masculina codificada por la mitocondria, es factible introducir esta característica de importancia agronómica al género *Citrus*, con el fin de obtener frutos sin semilla (Ohgawara y Kobayashi, 1991).

En eventos de electrofusión entre *C. sudachi* y *C. aurantifolia* (lima) o *C. limon* (limón), Saito *et al.* (1993) observaron cierto número de regenerantes con genoma diploide y características similares a limón y lima (progenitores derivados de protoplastos de hoja). Mediante análisis del ADN mitocondrial se comprobó que estas plantas eran en realidad híbridos, con el genoma nuclear del progenitor no embriogénico, y genoma mitocondrial del otro. Resultados semejantes obtuvieron estos mismos autores analizando plantas regenera-

das por Ohgawara *et al.* (1989), las cuales tenían características similares al progenitor no embriogénico. Con éstos y otros resultados, Saito *et al.* (1993) especulan que el genoma mitocondrial de células de callos nucelares juegan un papel importante en el proceso de embriogénesis en cítricos, ya que los protoplastos de los progenitores no embriogénicos no regeneran normalmente. En el Cuadro 5 se encuentra una lista de las plántulas obtenidas a partir de protoplastos no embriogénicos en eventos de fusión.

Cuadro 5. Plántulas diploides con características del progenitor no embriogénico, obtenidas en eventos de fusión.

Especie	Cultivar	Método de fusión(1)	Referencia
<i>C. aurantifolia</i>	—	E	Saito <i>et al.</i> (1991)
<i>C. aurantium</i>	—	PEG	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>C. jambhiri</i>	limón rugoso	PEG	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>C. limon</i>	Eurekaí	E	Saito <i>et al.</i> (1993)
<i>C. limon</i>	Femminelloí	PEG	Tusa <i>et al.</i> (1990)
<i>C. limonia</i>	Rangpurí	PEG	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>C. paradisi</i>	Marshí	PEG	Ohgawara <i>et al.</i> (1989)
<i>C. paradisi</i>	Duncaní	PEG	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>C. sinensis</i>	Succarií	PEG	Grosser <i>et al.</i> (1992a)
<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i> (Tangor)	Murcottí	PEG	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>C. sinensis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i> (Citrange)	Troyerí	PEG	Ohgawara <i>et al.</i> (1991)
<i>C. volkameriana</i>	—	PEG	Louzada <i>et al.</i> (1992)

(1)PEG: fusión química utilizando polietilén glicol; E: fusión mediante la aplicación de una corriente eléctrica

Recientemente se utilizó una línea embriogénica híbrida, resultante de una fusión de *C. aurantifolia* con *C. sudachi* (Saito *et al.*, 1993), para efectuar una fusión con *C. limon* 'Eureka'. Se logró la obtención de híbridos alotetraploides que incluía el genoma mitocondrial de *C. sudachi*, transferido a través del híbrido (Saito *et al.*, 1994)

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

La transformación genética es un método atractivo para agregar características específicas importantes, codificadas por uno o pocos genes, con la finalidad de obtener injertos o patrones mejorados sin alterar la integridad del cultivar. La transformación en *Citrus* ha demostrado ser mucho más difícil que en las especies herbáceas anuales de solanáceas, que se utilizan como sistemas modelo. Sin embargo, los progresos que se han obtenido recientemente son alentadores (Grosser, 1992).

Kobayashi y Uchimiya (1989) realizaron la primera transformación genética en cítricos y en una especie leñosa; en protoplastos de naranja

dulce 'Trovia', un gen quimérico que contenía el promotor de la nopalina sintetasa, el gen estructural que codifica para la aminoglicósido fosfotransferasa II y la región terminadora del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Utilizaron PEG para efectuar la introducción directa de plásmidos de ADN a los protoplastos derivados de callos embriogénicos. Mediante esquemas de selección a nivel celular utilizando kanamicina, lograron aislar microcallos transformados, aunque no lograron la regeneración de plántulas.

Posteriormente, Vardi *et al.* (1990) obtuvieron dos plantas transgénicas de limón rugoso, a las cuales les introdujeron los genes que codifican para la neomicín fosfotransferasa II (*nptII*) y la cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*), utilizando un método similar al anterior. Este constituyó el primer ejemplo de transformación directa de protoplastos de una especie leñosa que tuvo como resultado final la regeneración de plántulas.

En el Cuadro 6 se encuentra una lista de los informes de transformación genética en cítricos que involucraron la utilización de protoplastos. En la actualidad, no hay ejemplos de plantas transgé-

Cuadro 6. Genotipos de cítricos sobre los cuales se han efectuado eventos de transformación genética que involucren la utilización de protoplastos.

Especie	Cultivar	Método de transformación(1)	No. de plantas	Referencia
<i>C. jambhiri</i>	—	PEG	2	Vardi <i>et al.</i> (1990)
<i>C. reticulata</i>	'Ohta'	electroporación	0	Hidaka y Omura (1993)
<i>C. sinensis</i>	'Hamlin'	PEG	12	Schell (1991)
<i>C. sinensis</i>	'Trovitá'	PEG	0	Kobayashi y Uchimiya (1989)

nicas de *Citrus* que contengan genes de importancia agrícola. Sin embargo, conforme avance la investigación al respecto, se logrará una mejora sustancial en las técnicas, y en consecuencia, aumentará el número de genotipos importantes capaces de ser transformados (Grosser, 1992).

Dentro de las características posibles de ser introducidas mediante esta técnica se encuentra el gen que codifica para la proteína de cápside del virus de la tristeza de los cítricos, para tratar de conferir resistencia a esta enfermedad. También, la tecnología 'antisense' (que se basa en la introducción de una secuencia complementaria a la secuencia que codifica para el producto cuya expresión que se quiere inhibir, con lo cual los ARNm respectivos se aparean e inhiben mutuamente su traducción, reduciendo la presencia de un producto génico determinado) tiene un gran potencial para reducir los niveles de enzimas o proteínas reguladores indeseables (ej. la pectín esterasa en naranja dulce). Habrá más ejemplos conforme se identifiquen, aislen y clonen más genes (Grosser, 1992).

CONCLUSIONES

Las técnicas mencionadas a lo largo de este trabajo permitirán oportunidades únicas para estudiar el control genético de características de importancia económica en cítricos, de las cuales se conoce muy poco. Sería posible, por ejemplo, determinar su aditividad o dominancia/recesividad mediante la creación de combinaciones específicas de tipos parentales tolerantes y susceptibles y estudiar así el comportamiento de híbridos somáticos. También, estudios de la meiosis y la fertilidad relativa de los híbridos somáticos que lleguen a floración, pueden producir información valiosa en cuanto a la homología de cromosomas entre *Citrus* y los géneros emparentados, que pueden resultar útiles en intentos para describir la relación taxonómica entre miembros de esta familia (Grosser y

Gmitter, 1990b). También mediante transferencia de organelas se puede conocer más sobre la composición de los genomas citoplasmáticos, como eventuales fuentes de características de interés para incorporar a cultivares comerciales.

Es probable que a muy corto plazo se estén viendo los beneficios de la aplicación de muchas de las metodologías discutidas. Actualmente se encuentran en evaluación en condiciones de campo, una serie de plantas producto de la fusión somática de protoplastos. Éstos han sido injertados sobre patrones que estimulan la floración precoz, con el fin de acelerar las determinaciones de fertilidad. Híbridos somáticos con potencial para ser utilizados como patrones, están siendo propagados, evaluados para resistencia a enfermedades, injertados con varios cultivares e introducidos en pruebas de campo con patrones comerciales, para comparar su rendimiento. Estos árboles están creciendo a un ritmo similar al de patrones comerciales (Grosser y Gmitter, 1990c). Sin embargo, estas plantas deben pasar por períodos prolongados de evaluación antes de estar disponibles para los productores para su cultivo a nivel comercial.

Es importante recalcar que ninguna de estas técnicas reemplazará los programas de hibridación tradicional. Su papel principal recaerá en facilitar en forma cualitativa y cuantitativa la creación de variación genética útil. Genotipos potencialmente importantes, obtenidos en estos programas conjuntos, requerirán evaluaciones intensivas y extensivas en el campo (Grosser, 1992).

RESUMEN

Se hace una revisión de las diferentes técnicas que involucran el aislamiento, cultivo y regeneración de protoplastos de cítricos para el mejoramiento genético del cultivo. Se enumeran y describen los especies y cultivares a partir de los cuales se han podido obtener protoplastos viables y regenerar plantas completas, así como los resulta-

dos exitosos en experimentos de fusión, formación de híbridos y transformación genética. Se discuten los usos potenciales de las técnicas y su aplicación, profundizando en la fusión de protoplastos, que es la metodología que ha evolucionado en mayor grado.

AGRADECIMIENTO

El autor agradece a Eric Guevara por la lectura crítica y exhaustiva del presente trabajo.

LITERATURA CITADA

- BEN-HAYYIM, G.; NEUMANN, H. 1983. Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in citrus callus cultures. *Z. Pflanzenphysiol* 110:331-337.
- BENGOCHEA, T.; DODDS, J.H. 1986. Plant protoplasts: a biotechnological tool for plant improvement. Cambridge, U.K., Chapman & Hall 90 p.
- BUTTON, J.; RIJKENBERG, F.H.J. 1977. The effect of subculture interval on organogenesis in callus cultures of *Citrus sinensis*. *Acta Hort.* no.78:225-236.
- BUTTON, J.; KOCHBA, J.; BORNMAN, C.H. 1974. Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.). *J. Exp. Bot.* 25:446-457.
- DENG, X.X.; GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. 1992. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* cultivar 'Meiwa' with *Citrus sinensis* cultivar 'Valencia'. *Sci. Hort.* 49:55-62.
- ENGELMANN, F.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P. 1994. Cryopreservation of cell suspensions and embryogenic calluses of *Citrus* using a simplified freezing process. *Cryo-Letters* 15:53-58.
- GALIANA, A.; PEREZ, R.M.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. 1993. Obtención de líneas celulares embriogénicas de cítricos. *Actas del V Congreso, S.E.C.H.* 7 p. Material mimeografiado.
- GALUN, E.; AVIV, D. 1986. Organelle transfer. *In Plant molecular biology. Methods in enzymology.* Ed. by A. Weissbach, H. Weissbach. Orlando, Fla., Academic Press. v. 118, p. 595-611.
- GALUN, E.; AVIV, D.; BREIMAN, A.; FROMM, H.; PERL, A.; VARDI, A. 1987. Cybrids in *Nicotiana*, *Solanum* and *Citrus*: isolation and characterization of plastome mutants, pre-fusion treatments, selection and analysis of cybrids. *In Plant Molecular Biology.* Ed. by D. Wettstein, N.H. Chua. N.Y., Plenum Press. p. 199-207.
- GENTILE, A.; TRIBULATO, E.; DENG, Z.N.; GALUN, E.; FLUHR, R.; VARDI, A. 1993. Nucellar callus of 'Femminello' lemon, selected for tolerance to *Phoma tracheiphila* toxin, shows enhanced release of chitinase and glucanase into the culture medium. *Theor. Appl. Genet.* 86:527-532.
- GERACI, G.; TUSA, N. 1988. Calli and plants from *Citrus limon* Burm. cv. 'Femminello' ovules in vitro. *Acta Hort.* no.227:381-383.
- GMITTER, F.G.; MOORE, G.A. 1986. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: Embryo production, germination, and plant survival. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 6:139-147.
- GROSSER, J.W. 1992. The role of biotechnology in the development of improved *Citrus* scion and rootstock cultivars. *In Transactions of the 1992 Citrus Engineering Conference. Florida Section of the American Society of Mechanical Engineers.* 38:24-37.
- GROSSER, J.W. 1993. Citrus scion and rootstock improvement via somatic hybridization. *Acta Hort.* 336:297-305.
- GROSSER, J.W. 1994a. *In vitro* culture of tropical fruits. *In Cell culture and somatic cell genetics of plants. Plant tissue culture-methods and applications.* Ed. by I.K. Vasil, T.A. Thorpe. San Diego, Cal, Academic Press. v. 9, p. 475-496.
- GROSSER, J.W. 1994b. Observations and suggestions for improving somatic hybridization by plant protoplast isolation, fusion and culture. *HortScience* 29(11):1241-1243.
- GROSSER, J.W.; CHANDLER, J.L. 1987. Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus X Poncirus* hybrids and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. *Sci. Hort.* 31:253-257.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. 1990a. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Rev.* 8:339-374.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. 1990b. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. *HortScience* 25(2):147-151.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. 1990c. Wide-hybridization of *Citrus* via protoplast fusion: progress, strategies, and limitations. *In Horticultural Biotechnology, plant biology.* Ed. by A.B. Bennett, S.D. O'Neill. N.Y., Wiley-Liss. v. 25, p. 31-41.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G.; CHANDLER, J.L. 1988a. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. *Plant Cell Rep.* 7:5-8.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G.; CHANDLER, J.L. 1988b. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. *Theor. Appl. Genet.* 75:397-401.

- GROSSER, J.W.; MOORE, G.A.; GMITTER, F.G. 1989. Interspecific somatic hybrid plants from the fusion of 'Key' lime (*Citrus aurantifolia*) with 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis*) protoplasts. *Sci. Hort.* 39:23-29.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G.; LOUZADA, E.S.; CHANDLER, J.L. 1992a. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. *HortScience* 27(10):1125-1127.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G.; TUSA, N.; CHANDLER, J.L. 1990. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus reticulata* and *Citropsis gilletiana*. *Plant Cell Rep.* 8:656-659.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G.; SESTO, F.; DENG, X.X.; CHANDLER, J.L. 1992b. Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(1):169-173.
- HIDAKA, T.; KAJIURA, I. 1988. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryo. *Sci. Hort.* 34:85-92.
- HIDAKA, T.; OMURA, M. 1989. Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture: Regeneration from protoplasts and attempts to callus bank. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. B* 16:1-17.
- HIDAKA, T.; OMURA, M. 1992. Regeneration of somatic hybrid plants obtained by electrical fusion between Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu*) and Rough Lemon (*C. jambhiri*) or Yuzu (*C. junos*). *Japan J. Breed.* 42(1):79-89.
- HIDAKA, T.; OMURA, M. 1993. Transformation of *Citrus* protoplasts by electroporation. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 62(2):371-376.
- HUTCHISON, D.J. 1985. Rootstock development screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics. *Fruit Var. J.* 39:21-25.
- JIMENEZ, V. M.; GUEVARA, E. 1995. Regeneración *in vitro* mediante embriogénesis somática de variedades de cítricos. I. Obtención de callo friable y suspensiones celulares de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y naranja agria (*C. aurantium*) cultivadas en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 19(2):7-18.
- KOBAYASHI, S. 1987. Uniformity of plants regenerated from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 74:10-14.
- KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T. 1988. Production of somatic hybrid plants through protoplast fusion in *Citrus*. *J. Agr. Rev. Quarterly* 22:181-188.
- KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. *Japan J. Genet.* 64:91-97.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. 1984. Induction of nucellar callus from orange (*Citrus sinensis* Osb.) ovules, and uniformity of regenerated plants. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. (Japón)* E 5:43-54.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; UCHIMIYA, H. 1985. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 4:249-259.
- KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H.; IKEDA, I. 1983. Plant regeneration from 'Trovita' orange protoplasts. *Japan J. Breed.* 33(2):119-122.
- KOBAYASHI, S.; FUJIWARA, K.; OIYAMA, I.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. 1988a. Somatic hybridization between Navel Orange and 'Murcott' Tangor. In *Proc. 6th Int. Citrus Congr. Ed. by R. Goren, K. Mendel. Tel Aviv.* p. 135-140.
- KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T.; OHGAWARA, E.; OIYAMA, I.; ISHII, S. 1988b. A somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between navel orange (*Citrus sinensis*) and satsuma mandarin (*C. unshiu*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 14:63-69.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P. 1973. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflanzenzücht.* 69:156-162.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. 1972. Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. *Planta* 106:237-245.
- KUNITAKE, H.; KAGAMI, H.; MII, M. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Sci. Hort.* 47:27-33.
- LING, J.T.; NITO, N.; IWAMASA, M. 1989. Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). *Sci. Hort.* 40:235-333.
- LING, J.T.; NITO, N.; IWAMASA, M.; KUNITAKE, H. 1990. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of 'Satsuma'. *HortScience* 25(8):970-972.
- LOUZADA, E.S.; GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. 1993. Intergeneric somatic hybridization of sexually incompatible parents: *Citrus sinensis* and *Atalantia ceylanica*. *Plant Cell Rep.* 12:687-690.
- LOUZADA, E.S.; GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G.; NIELSEN, B.; CHANDLER, J.L.; DENG, X.X.; TUSA, N. 1992. Eight new somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved disease resistance. *HortScience* 27(9):1033-1036.
- LUCRETTI, S.; LISTER, A.; CHAPMAN, J.V.; MORETTI, F.; DE GIACOMETTI, F.; PALARCHIO, P.I. 1990. Flow cytometric assessment of viability and differentiation in potato and orange cell suspension protoplasts. *Acta Hort.* no.280:277-280.

- NADEL, B.; SPIEGEL-ROY, P. 1987. Selection of *Citrus limon* cell culture variants resistant to the Mal Secco toxin. *Plant Sci.* 53:177-182.
- NIEDZ, R.P. 1993. Culturing embryogenic protoplasts of 'Hamlin' sweet orange in calcium alginate beads. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34(1):19-25.
- NIEDZ, R.P. 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39:1-5.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S. 1991. Application of protoplast fusion to *Citrus* breeding. *Food Biotechnology* 5(2):169-184.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHII, S.; YOSHINAGA, K.; OIYAMA, I. 1989. Somatic hybridization in *Citrus*: navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) and grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Theor. Appl. Genet.* 78(5):609-612.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHII, S.; YOSHINAGA, K.; OIYAMA, I. 1991. Fertile fruit trees obtained by somatic hybridization: navel orange (*Citrus sinensis*) and Troyer citrange (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*). *Theor. Appl. Genet.* 81:141-143.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, E.; UCHIMIYA, H.; ISHII, S. 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theor. Appl. Genet.* 71:1-4.
- OIYAMA, I.; OKUDAI, N. 1986. Production of colchicine-induced autotetraploid plants through micrografting in monoembryonic citrus cultivars. *Japan J. Breed.* 36(3):371-376.
- PASQUAL, M.; ANDO, A. 1990. Influência da irradiação gama na produção de calos nucleares de *Citrus sinensis* Osb. cv. Valência *in vitro*. *Pesq. Agrop. Bras.* 25(10):1471-1475.
- ROEST, S.; GILISSEN, L.J.W. 1993. Regeneration of protoplasts--supplementary literature review. *Acta Bot. Neerlandica* 42(1):1-23.
- SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; ISHII, S. 1991. Acid citrus somatic hybrids between sudachi (*Citrus sudachi* Hort. ex Shirai) and lime (*C. aurantifolia* Swing.) produced by electrofusion. *Plant Sci.* 77:125-130.
- SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; KOBAYASHI, S. 1994. Somatic hybridization in *Citrus* using embryogenic cybrid callus. *Plant Sci.* 99:89-95.
- SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; ISHII, S.; KOBAYASHI, S. 1993. *Citrus* cybrid regeneration following cell fusion between nucellar cells and mesophyll cells. *Plant Sci.* 88:195-201.
- SCHELL, J. 1991. Genetic transformation of citrus protoplasts by PEG-mediated direct DNA uptake and the regeneration of transgenic plants. MS thesis. University of Florida, Gainesville, FL.
- SHINOZAKI, S.; FUJITA, K.; HIDAKA, T.; OMURA, M. 1992. Plantlet formation of somatic hybrids of sweet orange (*Citrus sinensis*) and its wild relative, orange Jessamine (*Murraya paniculata*), by electrically-induced protoplast fusion. *Japan J. Breed.* 42(2):287-295.
- SIM, G.E.; LOH, C.S.; GOH, C.J. 1988. Direct somatic embryogenesis from protoplasts of *Citrus mitis* Blanco. *Plant Cell Rep.* 7:418-420.
- SINGH, A.K.; NITO, N.; IWAMASA, M. 1992. Influence of lactose and glycerol on growth and somatic embryogenesis of citrus callus. *Acta Hort.* 321:606-609.
- SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. 1967. The botany of citrus and its wild relatives. In *The Citrus Industry*. Ed. by W. Reuther, L.D. Batchelor, H.J. Weber. Berkeley, Cal., Univ. of California Press. v. 1, p. 190-430.
- TAKAYANAGI, R.; HIDAKA, T.; OMURA, M. 1992. Regeneration of intergeneric somatic hybrids by electrical fusion between *Citrus* and its wild relatives: Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) and Java Feroniella (*Feroniella lucida*) or Tabog (*Swinglea glutinosa*). *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 60(4):799-804.
- TUSA, N.; GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G. 1990. Plant regeneration of 'Valencia' sweet orange, 'Femminello' lemon, and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(6):1043-1046.
- TUSA, N.; GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G.; LOUZADA, E.S. 1992. Production of tetraploid somatic hybrid breeding parents for use in lemon cultivar improvement. *HortScience* 27(5):445-447.
- VARDI, A. 1981. Protoplast derived plants from different *Citrus* species and cultivars. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1:149-152.
- VARDI, A.; GALUN, E. 1988. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. *Sci. Hort.* 37:217-230.
- VARDI, A.; RAVEH, D. 1976. Cross-feeder experiments between tobacco and orange protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 78:350-359.
- VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. 1990. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. *Plant Sci.* 69:199-206.
- VARDI, A.; BREIMAN, A.; GALUN, E. 1987. *Citrus* cybrids: production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. *Theor. Appl. Genet.* 75:51-58.
- VARDI, A.; HUTCHISON, D.J.; GALUN, E. 1986. A protoplast-to-tree system in *Microcitrus* based on protoplasts derived from a sustained embryogenic callus. *Plant Cell Rep.* 5:412-414.

- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. 1975. *Citrus* cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. *Plant Sci. Lett.* 4:231-236.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. 1982b. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor. Appl. Genet.* 62:171-176.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; BEN-HAYYIM, G.; GALUN, E. 1982a. Protoplast derived plants and fusion experiments in different *Citrus* species. *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture.* p. 619-620.
- VARDI, A.; ARZEE-GONEN, P.; FRYDMAN-SHANI, A.; BLEICHMAN, S.; GALUN, E. 1989. Protoplast-fusion-mediated transfer of organelles from *Microcitrus* into *Citrus* and regeneration of novel alloplasmic trees. *Theor. Appl. Genet.* 78:741-747.