

La hibridación somática en la mejora de los cítricos

O. Olivares-Fuster, G. Pensabene, N. Durán-Vila, L. Navarro (Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia).

La obtención de nuevos patrones y variedades, o la mejora de los que ya existen, es uno de los objetivos principales del programa de mejora genética de cítricos que llevamos a cabo en el IVIA. La **hibridación sexual** entre parentales seleccionados es la técnica de mejora genética que tradicionalmente se ha utilizado para conseguir estos objetivos. Pero los resultados obtenidos con esta técnica no han sido siempre los deseados, principalmente debido a algunos de los factores relacionados con la biología reproductiva de los cítricos, ya explicados en otro artículo de esta revista (NAVARRO, 2005). El caso de la obtención del citrange Carrizo es un ejemplo ilustrativo de los problemas con que se ha encontrado la mejora tradicional a la hora de alcanzar estos objetivos. Este genotipo se obtuvo tras la hibridación sexual de una especie cercana a los cítricos (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) con polen de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L. Osb.) con la intención de transferir la resistencia al frío presente en *Poncirus* al naranjo. El híbrido obtenido tras ese cruzamiento es el que hoy conocemos como citrange Carrizo. Aunque se tuvo la fortuna de obtener un híbrido con buenas propiedades como portainjerto, el resultado final de este cruzamiento estuvo muy alejado del objetivo inicial, que era mejorar el naranjo dulce.

La **hibridación somática** es una de las aproximaciones de la biotecnología vegetal que en la actualidad permite mejorar genéticamente los cítricos. Esta técnica se basa, al igual que la hibridación sexual, en la unión de dos células y la consiguiente regeneración de una nueva planta híbrida con propiedades distintas a las de los parentales. La principal diferencia entre la hibridación somática y la hibridación sexual es que en esta última se unen dos células sexuales, una masculina y una femenina, mientras que en la hibridación somática se unen dos células no sexuales de la planta (Figuras 4 y 5). Las células no sexuales de una planta se denominan somáticas. Además, en la hibridación sexual entre dos parentales diploides hay una recombinación de los genomas de ambos parentales para producir un híbrido diploide (Figura 4), mientras que en la hibridación somática hay una adición de los genomas de ambos parentales para producir un híbrido tetraploide (Figura 5).

Uno de los principios de la biología que ha permitido desarrollar la hibridación somática es la to-

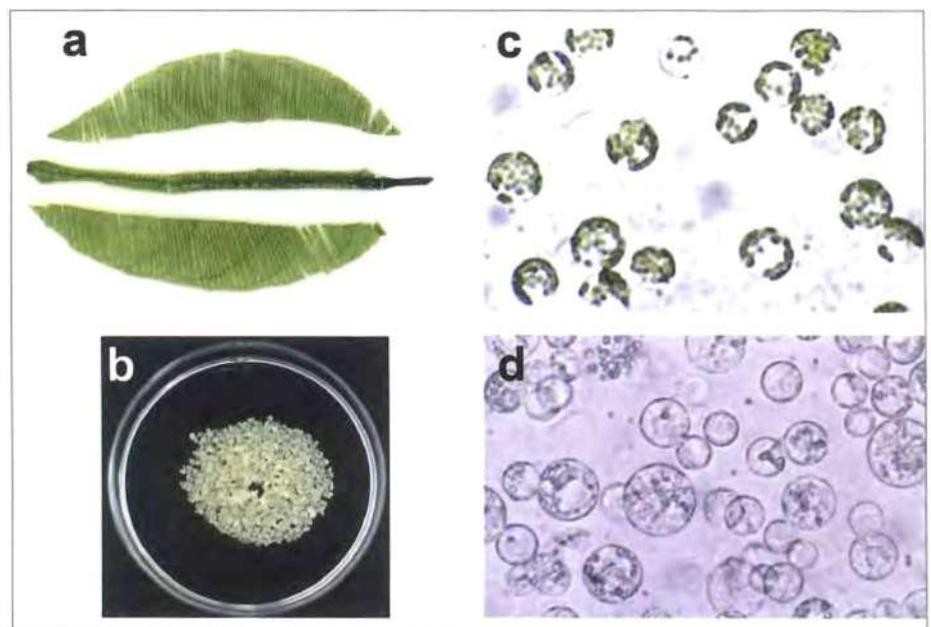


Figura 1. Aislamiento de protoplastos. a) Hoja cortada transversalmente al nervio central; b) Callo nuclear sobre la placa de aislamiento; c) protoplastos aislados del mesófilo de la hoja; d) protoplastos aislados del callo nuclear.

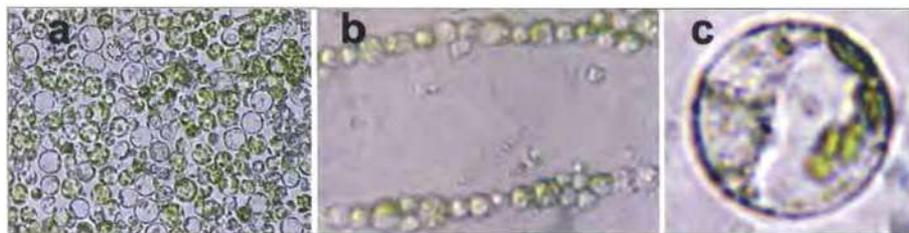


Figura 2. Fusión de protoplastos. a) protoplastos aglutinados por acción del polietilenglicol; b) protoplastos alineados por acción de la corriente eléctrica alterna; c) protoplastos fusionados por el método eléctrico (heterocariote).

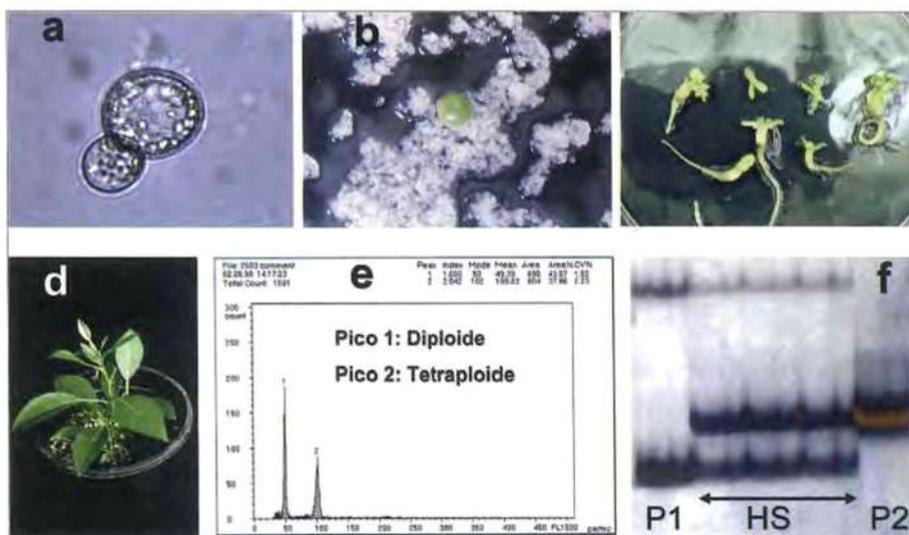


Figura 3. Regeneración y caracterización de híbridos somáticos. a) primera división del heterocariote; b) formación de embriones somáticos en el callo híbrido; c) inicio de la germinación de embriones somáticos; d) híbrido somático; e) análisis de ploidía de las plantas regeneradas por citometría de flujo; el pico 1 corresponde a un control diploide y el 2 a un híbrido somático tetraploide; f) análisis genético de híbridos somáticos mediante microsatélites; las carreras correspondientes a los tres híbridos somáticos (HS) muestran la combinación de bandas de los dos parentales (P1 y P2), lo que demuestra su carácter híbrido.

tipotencia, que es un fenómeno que ocurre en la mayoría de las plantas y consiste en la capacidad que posee cualquier célula vegetal para regenerar una planta completa. Con algunos tipos de células y plantas se ha conseguido regenerar plantas enteras a partir de una sola célula mediante métodos de cultivo *in vitro* y en consecuencia demostrar la totipotencia, mientras en otros casos aún no se han desarrollado los métodos adecuados para conseguirlo. Este fenómeno no sólo se explota en técnicas tan recientes como la hibridación somática o la crioconservación de germoplasma, sino que es la base de otras tan antiguas como la propagación vegetativa por estaquillado de muchas especies vegetales. En esta técnica de propagación se toma un fragmento de una planta (estaquilla) y en unas condiciones determinadas se consigue regenerar raíces en el extremo basal de la estaquilla, y por tan-

to obtener una planta entera, sin la participación de las células sexuales de la misma. En este caso la totipotencia se manifiesta en el hecho de que células programadas para ser parte del tallo de la planta, al dividirse dan lugar a otro tipo de células, que se organizan formando un órgano distinto como son las raíces. Este fenómeno biológico que ha permitido este modo de propagación esté tan extendido.

En la hibridación somática se aíslan en el laboratorio dos células no sexuales de una planta, se fusionan, y en unas condiciones de cultivo determinadas se dividen y regeneran los tejidos y órganos de una nueva planta, gracias al fenómeno de la totipotencia. Esta nueva planta se aclimata después a las condiciones de cultivo del invernadero y finalmente se cultiva en campo para su evaluación agronómica.

Las células empleadas habitualmente en la hibridación somática de cítricos son de dos tipos. Por un lado se aíslan células de **hoja**, y por otro lado células procedentes de callo originado por cultivo *in vitro* de la nucela que se encuentra en las semillas de los frutos inmaduros de los cítricos (DURÁN-VILA y col. 2005) y que por tanto se denominan células de **callo nucelar**. La obtención de las células de hojas es sencilla, pues disponemos de plantas en los invernaderos que nos proporcionan el tipo de hoja adecuado para aislarlas. La obtención de callos nucelares requiere un proceso mucho más laborioso, que dura al menos un año de cultivo *in vitro* y requiere muchos recursos para su conservación por métodos convencionales (DURÁN-VILA y col. 2005). La disponibilidad del Banco de Germoplasma de Callos Crioconservados facilita enormemente el trabajo de fusión de protoplastos. Como se comenta en ese mismo artículo, conocemos las condiciones de cultivo para que las células de callo nucelar regeneren plantas de cítricos completas, es decir, conocemos las condiciones para que estas células expresen su totipotencia. En el caso de las células procedentes de hojas de cítricos desconocemos estas condiciones de cultivo, por lo que no somos capaces de regenerar plantas completas a partir de células de hoja (en otros sistemas vegetales donde también se emplea la hibridación somática para la mejora, como tabaco, melón, tomate o arroz, si se ha descubierto la forma de que las células de hoja expresen su totipotencia y regeneren plantas completas). Aunque en principio esto pueda parecer una desventaja, lo cierto es que en el campo de la hibridación somática de cítricos resulta ser una ventaja, pues cuando en el laboratorio unimos células de hoja y de callo nucelar, son estas últimas las que confieren a las células híbridas la capacidad para dividirse y regenerar plantas, mientras que las células de hoja que no se fusionen con otras de callo no pueden dividirse. Así, tras la hibridación somática únicamente se podrán obtener plantas híbridas o procedentes de las células de callo que no se han unido a ninguna célula de hoja, pero no de las células de hoja.

Antes de fusionar las células somáticas es necesario eliminar su pared celular. Este es un proceso sencillo que se lleva a cabo en el laboratorio en condiciones estériles. Para ello se emplean enzimas (celulasas, hemicelulasas, pectinasas) capaces de degradar la pared celular, aislando células "desnudas" que se denominan **protoplastos**. La Figura 1 muestra los dos tejidos de partida, la hoja (a) y el callo nucelar (b) y los dos tipos de proto-

plastos, que se obtienen a partir de ellos (c) y (d). Como se aprecia en las imágenes existen diferencias morfológicas entre protoplastos de hoja y de callo, pues los primeros mantienen el color verde del tejido original.

Una vez se dispone de los dos tipos de protoplastos se procede a su **fusión**, que también se lleva a cabo en el laboratorio en condiciones estériles. Existen tres métodos diferentes para fusionar los protoplastos de cítricos. Uno **químico**, que emplea un producto llamado polietilenglicol, el cual es capaz de poner en contacto las membranas de los protoplastos y fusionarlas. Otro **eléctrico**, que emplea corriente alterna para poner en contacto los dos tipos de células y después corriente continua para fusionar las membranas. Y un tercero que se denomina **electro-químico**, desarrollado en nuestro laboratorio, que emplea primero el polietilenglicol para poner en contacto las células y después la corriente continua para fusionarlas. La Figura 2 muestra células agrupadas por acción del polietilenglicol (a), protoplastos alineados tras aplicarles el campo de corriente alterna en la fusión eléctrica (b) y protoplastos fusionados tras emplear el método eléctrico (c). En esta última imagen se puede observar que la nueva célula posee los cloroplastos verdes procedentes de la hoja y los gránulos blancos del protoplasto de callo nuclear. Estas células se denominan **heterocariontes** o **protoplastos híbridos**.

Una vez obtenidos los heterocariontes se procede a su cultivo en condiciones que permiten la regeneración de la pared celular, la división y la formación de callo que produce pequeños **embriones somáticos** (no sexuales) y a partir de ellos brotes que se injertan en el laboratorio y dan lugar a plantas completas que se transplantan a suelo y se aclimatan a las condiciones de invernadero. La Figura 3 muestra los distintos pasos del proceso de regeneración, desde las primeras divisiones del heterocarionte (a), la obtención de callo híbrido y embriones somáticos (b), la germinación de los embriones (c) hasta la obtención de la nueva planta, el **híbrido somático** (d). Antes de transferir estas nuevas plantas a los campos experimentales para su evaluación agronómica se debe confirmar que las plantas obtenidas son híbridos de los dos parentales empleados originalmente. Para ello se determina el **numero de cromosomas** de la planta mediante la técnica de citometría de flujo (e) y también se hace un **estudio genético** para confirmar si el híbrido posee información genética de los dos parentales (f). El último paso de la hibridación somática de cítricos es la selección, esto es, la evalua-

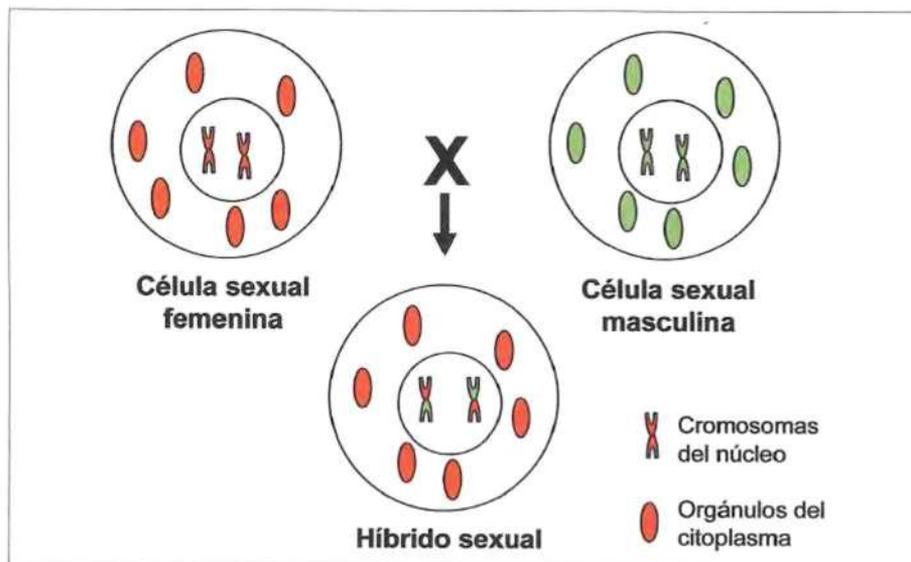


Figura 4. Hibridación sexual.

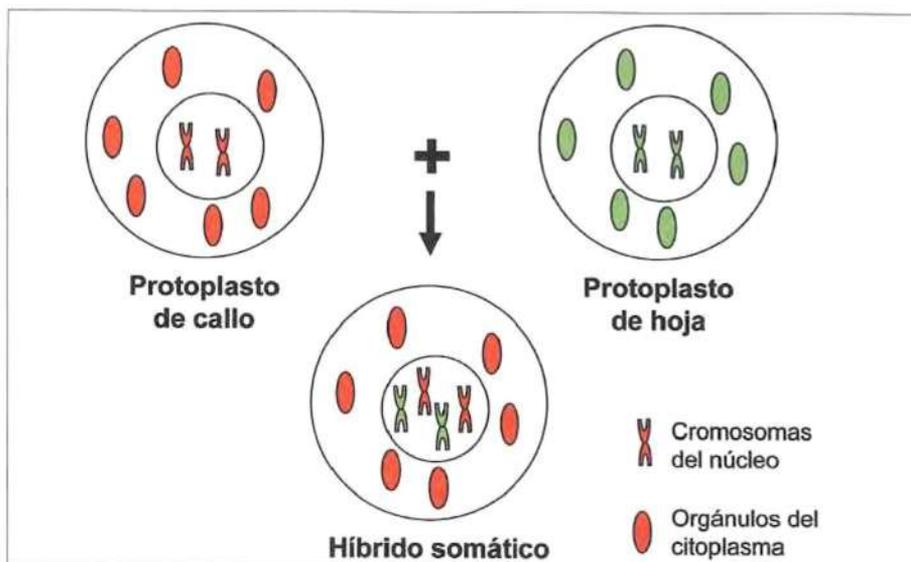


Figura 5. Hibridación somática simétrica.

ción en campo de los híbridos obtenidos. Sin duda este es la etapa más larga de todo el proceso, al igual que ocurre en la selección de los híbridos sexuales.

La metodología descrita hasta este momento, independientemente del método de fusión empleado, permite la obtención de un tipo particular de híbridos somáticos de cítricos, los **híbridos somáticos simétricos** (Figura 5). Se les denomina simétricos porque contienen toda la información genética nuclear de cada uno de los dos parentales utilizados para el aislamiento de protoplastos, es decir, son híbridos que resultan de sumar los dos

genomas completos. Los híbridos somáticos simétricos tienen pues la particularidad de expresar las características de los dos parentales en una única planta.

Variaciones en los protocolos descritos permiten obtener otros tipos de híbridos somáticos. Se pueden obtener lo que se denomina **híbridos somáticos citoplasmáticos** (Figura 6), también llamados cibridos, si se inactiva el núcleo de los protoplastos de uno de los dos parentales. Prácticamente toda la información genética de una planta se encuentra en el núcleo de sus células, pero una parte de la misma está fuera de éste, en los orgá-

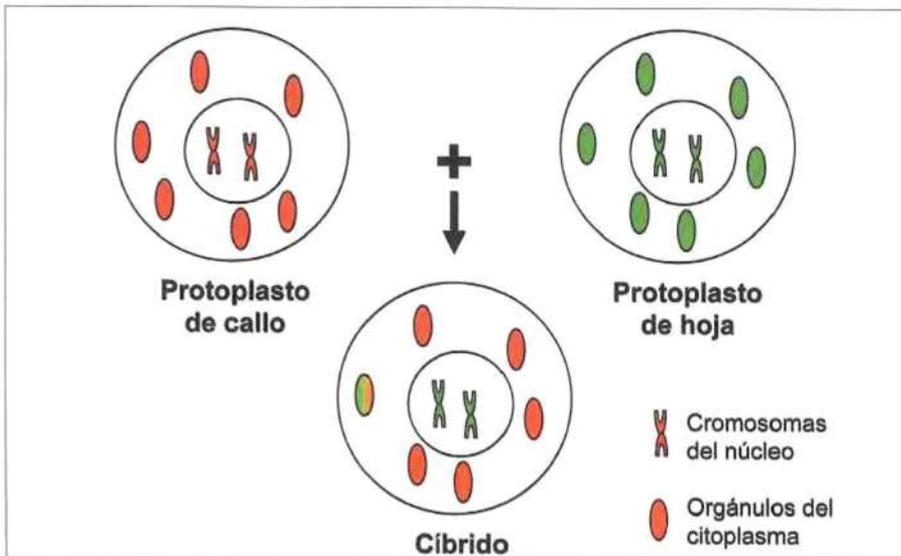


Figura 6. Hibridación somática citoplásmica.

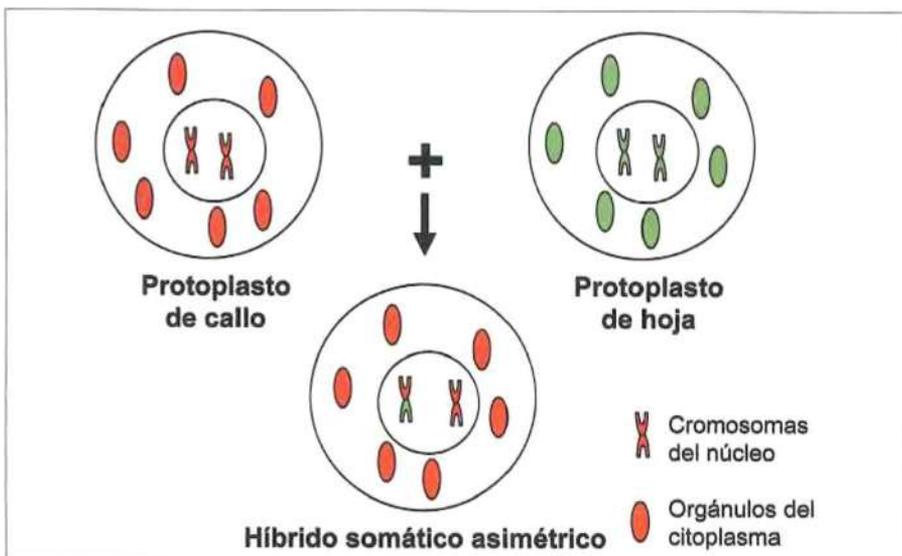


Figura 7. Hibridación somática asimétrica.

nulos del citoplasma (mitocondrias y cloroplastos). La inactivación del núcleo de los protoplastos se puede realizar empleando agentes químicos. Así, la fusión de protoplastos intactos de un parental con protoplastos de otro parental al que se le ha inactivado el núcleo, da lugar a híbridos citoplasmáticos, que poseen la característica de mantener las mismas propiedades que el parental que no ha sido modificado excepto para algunos caracteres cuya información se encuentra en el citoplasma, como podría ser resistencia a enfermedades, esterilidad masculina, eficiencia energética,... Por último

existe también la posibilidad de generar los llamados **híbridos somáticos asimétricos** (Figura 7). Se trata de híbridos que mantienen toda la información, tanto del núcleo como del citoplasma, de uno de los parentales pero además poseen un fragmento de la información del núcleo del otro parental. La metodología empleada para obtener estos híbridos asimétricos consiste en fusionar protoplastos intactos de un parental con protoplastos de otro parental que previamente han sido irradiados con luz ultravioleta o con rayos gamma. Al someter protoplastos a esta irradiación se fragmenta el ADN, la

molécula que contiene la información genética de la célula en el núcleo, y tras la fusión de los protoplastos solo una parte de la información es transferida al otro parental.

Los distintos tipos de híbridos somáticos de cítricos obtenidos mediante estas tecnologías pueden ser empleados tanto para la mejora de portainjertos y variedades comerciales ya existentes, como para la generación de nuevos genotipos. Así, los híbridos somáticos simétricos pueden emplearse directamente para obtener nuevos portainjertos y de forma indirecta para la obtención de nuevas variedades comerciales de cítricos. La utilización directa de los híbridos somáticos simétricos como portainjertos resulta obvia ya que se generan genotipos nuevos que expresaran caracteres de ambos parentales. Por ejemplo, si se fusionan células de un patrón que tolera niveles altos de caliza en el suelo con células de otro patrón que es tolerante a la sequía, se podría obtener un híbrido somático que presente esos dos caracteres. La evaluación en campo de los híbridos regenerados determinará en qué grado el nuevo híbrido expresa los caracteres de interés presentes en los parentales. En cuanto a las variedades comerciales, los nuevos híbridos, que son tetraploides, se pueden usar como parentales en el programa de obtención de nuevas variedades triploides que también llevamos a cabo en nuestro grupo (NAVARRO y col., 2005). Por otra parte los híbridos citoplasmáticos, cíbridos, encuentran su máxima aplicación en el campo de la mejora de variedades ya existentes, ya que el híbrido que se obtiene es prácticamente igual a uno de los parentales, sin perder ninguna de sus características originales, pero puede adquirir alguna nueva codificada por genes del citoplasma del otro parental. Por el tipo de información genética almacenada en el citoplasma, estas nuevas propiedades pueden tener gran importancia en la mejora de variedades comerciales de naranjo y mandarino ya existentes, mas que en la de patrones. Los híbridos asimétricos pueden ser importantes tanto a nivel de portainjertos como de variedades comerciales. Ello dependerá tanto del parental que se desee mejorar como del fragmento de información genética que se consiga transferir desde el otro parental. En general se transferirán pequeños trozos de DNA, con lo que se puede asumir que habitualmente se lograra la mejora genética de portainjertos y variedades comerciales ya existentes.

La hibridación somática representa una alternativa a la hibridación sexual tradicional para obtener nuevos genotipos o mejorar los existentes ya

que dos de los problemas principales por los que la hibridación sexual no ha sido muy efectiva para la mejora genética de cítricos no afectan a la hibridación somática. Por una parte elimina las barreras sexuales entre genotipos sexualmente incompatibles y entre especies de cítricos y de géneros cercanos que presentan caracteres interesantes para la mejora genética. Al no estar implicadas las células sexuales, la hibridación somática permite crear híbridos entre virtualmente cualquier combinación de parentales que se desee. Además, los híbridos somáticos contienen la suma del genoma de ambos parentales, por lo que el nivel de recombinación génica es muy bajo y expresan los genes de ambos parentales y en consecuencia los caracteres de ambos. En cambio, los híbridos sexuales son muy distintos a sus parentales, a causa de la elevada heterocigosis de los cítricos.

La hibridación somática también permite abordar objetivos de mejora que hasta ahora eran impensables empleando la hibridación sexual. Así, la hibridación somática permite modificar los caracteres genéticos que son codificados por el citoplasma. El citoplasma de los híbridos sexuales siempre procede del parental femenino mientras que, tal y como se ha visto anteriormente, en la hibridación somática se pueden combinar los citoplasmas de los dos parentales.

Otra de las ventajas está asociada directamente con la capacidad de obtener híbridos somáticos asimétricos, que permite transferir pequeños fragmentos de información genética. Así, en la hibridación sexual toda la información genética contenida en el núcleo del parental femenino se recombina con la del parental masculino, es decir, tanto los caracteres deseables como los indeseables, mientras que en los híbridos asimétricos se consigue transferir de un parental a otro, solo un fragmento de dicha información, idealmente la responsable de los caracteres deseables para la mejora. Actualmente se está descubriendo en distintas especies, entre las que se encuentran los cítricos, que hay regiones del genoma donde se concentran genes de interés, como los que confieren resistencia a patógenos. La transferencia de estas regiones genómicas tendría obviamente gran interés para la mejora.

A pesar de estas ventajas, no se debe llegar a la conclusión precipitada de que la hibridación somática es mejor o peor que la hibridación sexual, o que otras que se empleen para la mejora genética de los cítricos. En realidad la mejor técnica en cada caso dependerá del objetivo final que se persiga. La hibridación somática es una técnica relativamente nueva que ahora está empezando a producir los primeros resultados transferibles en el ca-

so de portainjertos, ya que se están finalizando los larguísimo experimentos de campo necesarios para evaluar su comportamiento. Hay que tener en cuenta que todos los tipos de híbridos somáticos que hemos descrito más arriba son juveniles cuando se obtienen, por lo que deben superar la larga fase de juvenilidad de los cítricos y posteriormente el largo periodo de evaluación agronómica. Así mismo hay que mencionar de nuevo uno de los principales problemas con los que debe enfrentarse cualquier tipo de mejora genética de cítricos, es el desconocimiento básico sobre los genes que determinan los principales caracteres agronómicos de los cítricos. Si se dispusiera de un mayor conocimiento a ese nivel, todas las técnicas de mejora genética, incluida la hibridación somática, serían mucho más efectivas pues podrían aplicarse de forma mucho más dirigida y efectiva de como se hace actualmente. Como conclusión solo cabe señalar que la hibridación somática es uno de las aproximaciones de la biotecnología actual que ofrece más posibilidades en la mejora genética de los cítricos. Nuestro grupo es uno de los pocos que la aplica de forma rutinaria en sus programas de mejora, y hemos desarrollado y adaptado todos los procesos necesarios para la obtención de todos los tipos de híbridos somáticos.

BIBLIOGRAFÍA

- DURÁN-VILAN N, ORTEGA, C., OLIVARES-FUSTER, O., NAVARRO, L. 2005. *Crioconservación de germoplasma de cítricos*. Phytoma, este número.
- NAVARRO, L. 2005. *Necesidades y problemática de la mejora sanitaria y genética de los cítricos en España*. Phytoma, este número.
- NAVARRO, L, JUÁREZ, J., ALEZA, P., PINA, J.A., OLIVARES-FUSTER, O., CUENCA, J., JULVE, J.M. 2005. *Programa de obtención de híbridos triploides de mandarina en España*. Phytoma, este número.