

GENERACIÓN DE NUEVAS VARIETADES DE CÍTRICOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN SEXUAL Y RESCATE DE EMBRIONES INMADUROS

M. Manuel Robles González*,
Silvia Herendira Carrillo Medrano
M. Angel Manzanilla Ramírez
J. Joaquín Velázquez Monreal
Víctor M. Manuel Medina Urrutia.
INIFAP- Campo Experimental Tecomán.
Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo.
Tecomán, Colima, México.
Robles.manuel@inifap.gob.mx

RESUMEN

En México se cultivan poco más de 90,000 ha con limón mexicano. Esta agroindustria prácticamente sólo cuenta con una variedad comercial, que aunque está bien adaptada a las condiciones agroecológicas de las regiones productoras y que genera buenos rendimientos, tiene el inconveniente que su fruta es relativamente pequeña y contiene semillas, lo cual le resta competitividad en el mercado. Por otra parte, actualmente el cultivo de limón mexicano está siendo amenazado por enfermedades de alto impacto económico como es la tristeza de los cítricos, que se ha considerado como la enfermedad de tipo viral de mayor importancia económica que afecta al cultivo de los cítricos en todo el mundo. Para hacer frente a las nuevas demandas del mercado en fresco y de la industria así como reducir los impactos de problemas fitosanitarios como la tristeza de los cítricos y otras enfermedades emergentes, se requiere generar nuevas variedades de limón mexicano con características de calidad superiores a las actuales. A partir de 2009 en INIFAP-Colima se está realizando un programa de mejoramiento genético mediante hibridación sexual interploide auxiliado por las técnicas de rescate y cultivo *in vitro* de los embriones en estado inmaduro. En este documento se presentan avances de resultados que comprenden actividades para la estimación de la fertilidad del polen, el tipo de embrionía en limón mexicano, la edad de la fruta adecuada para el rescate de los embriones y de los primeros ensayos de polinización entre genotipos de limón mexicano y limones italianos.

INTRODUCCION

A nivel internacional se cultivan tres especies de cítricos ácidos que precisamente por su sabor ácido y el uso que el consumidor le da, son considerados como limones: el limón Mexicano o lima key [*Citrus aurantifolia* Christm) Swingle], el limón Persa (*C. latifolia* Tanaka) y limón Italiano o verdadero (*C. limon* Burm). Botánicamente, tanto la lima Mexicana como la lima Persa no son propiamente limones ya que en realidad pertenecen al grupo de las limas ácidas (Medina *et al.*, 2001).

La industria mundial de cítricos ácidos requiere de nuevas variedades, no solo para satisfacer el mercado de fruta fresca que demanda alta calidad, ausencia de semillas y alto contenido de acidez, así como para atender las necesidades de la industria que clama por alta calidad en los jugos y aceites. También se requiere el desarrollo de otras características agronómicas que ayuden a

reducir las amenazas que representan algunas enfermedades de alto impacto económico (Viloria y Grosser, 2005).

En México son más de 90,000 ha cultivadas con limón mexicano, mismas que están distribuidas en los estados costeros del Pacífico, desde Jalisco hasta Oaxaca. Esta agroindustria prácticamente sólo cuenta con una variedad comercial, que aunque está bien adaptada a las condiciones agroecológicas de las regiones productoras y que genera buenos rendimientos, excelente calidad química y además tiene gran aceptación en el mercado interno (Robles-González, 1993), el hecho de contar con una base genética tan estrecha la hace extremadamente vulnerable tanto a problemas fitosanitarios como de mercado.

Actualmente el cultivo de limón mexicano está siendo amenazado por enfermedades de alto impacto económico como es la tristeza de los cítricos (VTC), que se ha considerado como la enfermedad de tipo viral de mayor importancia económica que afecta al cultivo de los cítricos en todo el mundo. El VTC es transmitido por injerto durante la propagación, o bien es diseminado de forma muy eficiente por el pulgón café (*Toxoptera citricida* Kirkaldi). Se han detectado árboles infectados con VTC en 20 de los 23 estados productores de cítricos del país. Por su parte el pulgón café ya se encuentra en los estados del sureste mexicano, algunos estados del centro y recientemente se le detectó en el estado Guerrero que es uno de los cuatro principales estados productores de limón mexicano.

De acuerdo con Harms (1992), las enfermedades causadas por virus son especialmente problemáticas ya que además de provocar un serio impacto económico, debido a sus propiedades físicas y biológicas, hacen muy difícil su control (Slack y German, 1998). Por lo que el desarrollo de variedades resistentes es la mejor opción, y ha sido uno de los métodos más eficientes, económicos y ambientalmente seguros para el control de enfermedades virales en plantas (Papu *et al.*, 1995)

En general, el mejoramiento genético en cítricos, se ha dirigido hacia dos grandes temas: a) la producción de portainjertos y b) generación de variedades. En el primer caso se pretende obtener genotipos con resistencia a factores bióticos y abióticos tales como; virus, *Phytophthora*, nematodos, salinidad, sequía y bajas temperaturas, asimismo, que induzcan un porte bajo a los árboles y la producción temprana. Respecto al segundo, se ha tratado de generar variedades con buena producción, de madurez precoz, fruta de buen tamaño y calidad, pocas semillas y cáscara floja (Aliza-Vardi y Spiegel-Roy, 1978).

Actualmente existen programas de mejoramiento genético de cítricos en varias partes del mundo y sus trabajos están enfocados a la generación de variedades de fruta sin semilla o producción de genotipos para uso como portainjertos pero que integren además de buena compatibilidad con las variedades, tolerancia a patógenos y adaptación suelos con salinidad y carbonatos de calcio (Grosser *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2000).

En España, Estados Unidos, Brasil, Japón, África del Sur e Italia están haciendo mejoramiento genético para generar nuevas variedades de naranja, mandarina y limón verdadero resistentes a diversos problemas fitosanitarios y para incorporar características deseables a la fruta, con el fin de aumentar la oferta de variedades para el consumo en fresco (Ollitrault *et al.*, 2002; Tusa *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 2002; Grosser *et al.*, 2000; Grosser y Gmitter, 2005; Cristofani *et al.*, 2002; Machado, 2002).

En Estados Unidos, Brasil, Francia, Italia y España los programas de Mejoramiento Genético en Cítricos están enfocados a resolver problemas en naranja dulce, mandarino, toronjo y limón verdadero (Navarro *et al.*, 2002).

La hibridación sexual interploide es una de las líneas de investigación que se están abordando en programas de mejoramiento genético de países productores de cítricos (Ollitrault *et al.*, 2002; Tusa *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 2002; Grosser *et al.*, 2000; Grosser y Gmitter, 2005). Con esta estrategia de mejoramiento genético además de incorporar tolerancia a patógenos, es posible obtener variedades de cítricos con frutos más grandes y sin semillas, los cuales son deseables tanto para el mercado interno como para la exportación. Esta alternativa gana mayor fuerza por la riqueza de los progenitores de híbridos somáticos alotetraploides que se están produciendo por la hibridación somática (Grosser *et al.*, 2000), entre ellos algunos con potencial para el mejoramiento genético de cítricos ácidos (Kahn y Grosser, 2004).

La hibridación sexual interploide consiste en realizar cruzas entre genotipos de cítricos con diferente nivel de ploidía. Generalmente se están practicando cruzas entre genotipos diploides ($2n = 2x = 18$) con genotipos tetraploides ($2n = 4x = 36$), así como también de su recíproco. Los frutos resultantes de estas cruzas contienen semillas en las cuales se desarrolla un posible embrión triploide. Los árboles de genotipos triploides son de gran valor porque se caracterizan por producir frutas grandes carentes de semillas, las cuales son deseables para mercados de exportación.

La mayoría de cultivares de limas y limones presentan el fenómeno conocido como apomixis o poliembrionía y producen varios embriones en cada semilla (Soost y Roose, 1996). La embrionía nucelar, junto con heterocigocidad, esterilidad, incompatibilidad y largo período juvenil, han dificultado el mejoramiento genético la mayoría de los cítricos mediante la hibridación sexual convencional (Kochba y Spieguel-Roy, 1977; Aliza-Vardi, 1981; Ikeda, 1981; Vardi *et al.*, 1996;) y esto ha impedido que los fitomejoradores utilicen las fuentes de variación existentes para incorporar genes de resistencia que pueden estar presentes en los géneros cercanos a los cítricos (Rocha-Peña *et al.*, 1995).

La hibridación sexual interploide se ha vuelto más eficiente debido a la aplicación de las técnicas cultivo *in vitro* que permiten el rescate de embriones cigóticos en estado inmaduro, cuyo desarrollo puede ser impedido a causa de la competencia que ejercen los embriones nucleares y que bajo condiciones naturales terminan por eliminarlos en etapas tempranas de su desarrollo.

Algunos laboratorios han desarrollado metodologías para el rescate y desarrollo *in vitro* de embriones en cítricos en estado inmaduro y que han permitido la obtención de una buena cantidad de plantas híbridas en cruza sexuales y entre distintos niveles de ploidía (Viloria *et al.*, 2005).

Para lograr un buen programa de hibridación interploide, es importante contar con un número suficiente de progenitores tanto diploides como tetraploides con características deseables, entre los que se harán las combinaciones. También es importante contar con los protocolos eficientes de polinización y de rescate de embriones en estado inmaduro, involucrando técnicas *in vitro* para la regeneración de plántulas a partir de esos embriones híbridos.

El éxito del cultivo de embriones en gran medida está determinado por el estado de desarrollo del embrión y los nutrientes y reguladores del crecimiento vegetal aplicados al medio de cultivo. En general, los embriones jóvenes de cítricos han sido rescatados de semillas poliembriónicas aproximadamente 100 días después de la polinización (Deng *et al.*, 1996; Tusa *et al.*, 1996). En contraste, las semillas de progenitores monoembriónicos se han recogido siete meses después de la polinización o a la madurez (Oiyama Kobayashi, 1990; Sykes y Lewis, 1996).

Por lo tanto, para hacer frente de manera definitiva y sustentable a las demandas del mercado en fresco y de la industria, así como reducir los impactos de problemas fitosanitarios como la tristeza de los cítricos y otras enfermedades emergentes, a partir de 2009 el INIFAP-Colima está realizando un programa de mejoramiento genético mediante hibridación sexual interploide auxiliado con el rescate y cultivo *in vitro* de los embriones inmaduros.

MATERIALES Y METODOS

Los trabajos se llevan a cabo en las instalaciones del Instituto Nacional de investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias INIFAP en Tecomán, Colima, México. El sitio se localiza a 32 msnm con clima BS1 wig considerado como calido semiseco, con temperaturas medias de 26°C y precipitación media anual de 750 mm. Se utilizan árboles de tres variedades, algunos variantes naturales y mutantes radioinducidos de limón mexicano. También se usaron árboles de tres variedades de limón italiano creciendo en un predio cercano de propiedad privada.

Estimación de la fertilidad del polen.

Se utilizaron nueve genotipos de cítricos; tres de los cuales corresponden a variedades de limón mexicano diploide ('Colimex', 'Lise' y 'Colimón', este último produce fruta con bajo contenido de semillas), un variante natural de limón mexicano tetraploide (M 30-9), uno de limón italiano cv 'Rosemberg', un citrange (C-35) y tres genotipos presuntamente híbridos naturales entre limón mexicano y los portainjertos *C. microphylla* Wester y *C. volkameriana* Pasq.). Se utilizaron tres medios de cultivo para la germinación de polen *in vitro* (Brewbaker y Kwack, 1963; Lora *et al.*, 2006 y Leal, 1969), adicionados con 10 mg/L de agar. Para las pruebas de tinción de polen se probaron los colorantes

(2, 3,5- Triphenyl tetrazolium chloride (TTC 1 %) y Acetocarmin 1%). El polen se obtuvo de flores colectadas al tiempo de la antesis entre las 10:00 y 12:00 hrs., luego en laboratorio se disectaron las anteras y se pusieron en cajas petri para dejar que completaran su dehiscencia. Para la germinación *in vitro* del polen, se pusieron cinco gotas de medio de cultivo sobre portaobjetos de vidrio y después de pasados cinco minutos al gelificar las gotas, se espolvoreó el polen sobre el medio de cultivo con ayuda de un pincel de cerdas finas. Para la prueba de tinción, primero se espolvoreó el polen sobre el portaobjetos, luego se colocó con un cubreobjetos sobre la muestra de polen y finalmente se aplicó el colorante con ayuda de una micropipeta con cuidado de no generar burbujas. Las muestras se llevaron a un ambiente con temperatura de 25°C. Los datos de granos de polen teñidos se registraron dos horas después de colocado el colorante, mientras que los granos de polen germinados se registraron a las 24 y 48 horas de iniciada la prueba.

Tipo de embrionía en genotipos de limón mexicano

En un flujo de floración de invierno de 2009 se estudió el tipo de embrionía en semillas de genotipos de limón mexicano. Se eligieron variantes naturales diploides (M 12-8, M - LL, M - SAL), un variante natural tetraploide (M 30-9) y seis mutantes radioinducidos (M - 681, M - 707, M - 822, M - 895, M - 914 y M - 1119). De acuerdo a metodología determinada en trabajos previos, de cada genotipo se colectaron frutas de entre 50 y 60 días de edad, contados a partir de la antesis y que tenían entre 2.0 a 2.5 cm de diámetro ecuatorial. Las semillas se extrajeron y se abrieron utilizando pinzas de disección y bisturí. Con ayuda de un microscopio estereoscópico y con aumento de 40X, se revisó el interior de las semillas para cuantificar los embriones de cada una de las semillas. Con esos datos se calcularon los promedios de embriones por semilla y porcentajes de semillas con más de un embrión (semillas poliembrionicas)

Edad del fruto adecuada para hacer el rescate de los embriones híbridos.

Para determinar la edad adecuada de la fruta en la que se debe de hacer el rescate de los embriones inmaduros de los genotipos de limón mexicano y limón italiano cv 'Rosemberg', mismos que pueden funcionar como progenitores femeninos en cruza diploide por diploide, se seleccionaron flores al tiempo de la antesis. Se etiquetaron racimos florales que presentaban flores recién abiertas y se eliminaron las flores pequeñas, para evitar confusiones con su edad al tiempo de los muestreos. Posteriormente cuando los frutos fueron cumpliendo 40, 50, 60 y 70 días de edad, se colectaron muestras de fruta. En laboratorio y con ayuda de un microscopio estereoscopio, se disectaron las semillas en desarrollo y se caracterizaron en base a su tamaño, aspecto interno y externo, así como por el número y tamaño de los embriones. Con los datos registrados se calcularon los promedios para cada una de las variables.

Polinización y amarre de fruta

Para las pruebas de hibridación sexual se eligieron tres genotipos de limón mexicano: 'Colimex', 'Colimón' y un variante natural tetraploide ('Mex 4x') cultivados en instalaciones del campo experimental de INIFAP y tres de

limones italianos ('Rosenberg', 'Eureka' y 'Limoneira 8A') localizados en un predio particular cercano al INIFAP. En trabajos previos, algunos de ellos ya se habían caracterizado por la viabilidad del polen, contenido de semillas y edad de la fruta adecuada para el rescate de los embriones. Se siguió un protocolo de polinización basado en lo señalado por Vilorio *et al* (2006). Por la mañana, entre las 10:00 y 12:00 horas, se colectaron flores al tiempo de antesis para cada uno de los genotipos. Las anteras se separaron de las flores y se pusieron en cajas petri para ser deshidratadas por una noche en una cámara con sales de sulfato de calcio anhidro. Al día siguiente el polen se liberó de las anteras al agitar la caja petri.

En campo se seleccionaron flores en un estado previo a la antesis en los distintos genotipos que se usaron como progenitores femeninos, a las que se les eliminaron pétalos y anteras para enseguida aplicarles suficiente polen sobre el estigma con ayuda de un pincel de cerdas finas. Las flores más pequeñas no utilizadas para este estudio, fueron eliminadas. Los pistilos polinizados se cubrieron con tela de tul para evitar que las abejas las visitaran. Cada brote vegetativo en los árboles conteniendo flores polinizadas se marcó con cinta de plástico y se etiquetaron con los datos de la fecha y progenitor masculino. Cuando la fruta cumplió 60 días para los genotipos de limón mexicano y 70 días para los limones italianos, se colectaron para realizar el rescate de los embriones. Se registraron datos de número de flores polinizadas y frutos cosechados. Se calculó el porcentaje de amarre.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estimación de la fertilidad del polen.

Como una de las primeras acciones en el programa de hibridación, se procedió a conocer la calidad del polen de los genotipos de limón mexicano y limón Italiano que pueden participar como progenitores masculinos en cruza diploide por diploide y diploide por tetraploide.

En todos los genotipos las anteras presentaron coloración amarilla y liberaron polen del mismo color, que le daba aspecto de ser viable. De acuerdo a los resultados de las pruebas de germinación *in vitro*, los tres medios de cultivo permitieron la germinación de granos de polen en proporciones que variaron de 23.2 a 26.9% (promedios de todos los genotipos) y resultaron estadísticamente similares entre si. También se detectaron interacciones significativas entre los genotipos y los medios de cultivo (Datos no presentados) Los genotipos resultaron ser significativamente diferentes en cuanto a su viabilidad estimada mediante esta prueba. Como lo muestran los datos del Cuadro1, en la mayoría de los genotipos los porcentajes de granos de polen teñido fueron mayores a los porcentajes de granos de polen germinados. Los genotipos 'Citrange C-35', limón italiano cv 'Rosenberg' y los presuntos híbridos interespecíficos naturales de limón mexicano, presentaron los mayores porcentajes de polen germinado, mientras que los genotipos de diploides de limón mexicano presentan los valores más bajos.

Es interesante observar que el genotipo tetraploide de limón mexicano, alcanzó un porcentaje alto de polen germinado y resultó ser estadísticamente similar al

limón italiano cv 'Rosemberg', al 'citrango C-35' y a los presuntos híbridos interespecíficos naturales de limón mexicano.

Con la prueba de tinción se detectaron diferencias altamente significativas entre los colorantes. El acetocarmin tiñó el 70.41 % de granos de polen mientras que con TTC solo se tiñó el 20.96 %, (promedio de todos los genotipos). También se detectaron interacciones significativas entre los genotipos y los colorantes (Datos no presentados).

De acuerdo a los promedios de los dos colorantes, salvo en el caso del genotipo tetraploide de limón mexicano (Mex 4x), en todos los genotipos se detectaron altos porcentajes de granos de polen teñidos. No se observa una relación consistente entre los porcentajes de polen teñido con los resultados obtenidos con la prueba de germinación. Al respecto Jahier (1996) señala que los métodos de tinción se basan en la afinidad de las células por determinadas sustancias colorantes que generalmente sobrestiman la fertilidad del polen y escasamente pueden determinar su poder germinativo real. La tinción con acetocarmin se basa sobre la hipótesis que solamente las células con una membrana intacta y funcional pueden ser teñidas, sin embargo algunos granos de polen con un citoplasma degenerado o muerto pueden ser teñidos (Janssen y Hermsen, 1976, citado por Knudsen, 1999). Tomando en cuenta que la variedad 'Colimón' además de su bajo porcentaje de germinación *in vitro* de polen (0.85%), produce fruta con bajo contenido de semillas (0.3/fruta) y que aparentemente estas dos características pueden estar relacionadas, y por lo tanto indica que tiene problemas de fertilidad tanto en los gametos masculinos como en los gametos femeninos. En este caso la prueba de germinación puede ser más útil para utilizarse como estimación de la viabilidad del polen. También nos permite considerar la posibilidad de descartar esta variedad como posible progenitor en los trabajos de hibridación para no correr el riesgo de hacer trabajo improductivo.

Cuadro 1. Porcentajes de germinación *in vitro* y de tinción de granos de polen en genotipos de limón mexicano, limón italiano y posibles híbridos interespecíficos de limón mexicano.

VARIEDAD	GERMINACIÓN <i>in vitro</i> (%) ^z	Polen teñido (%) ^y
Citrango C-35	51.26 A	54.59 AB
Rosemberg	41.90 A	65.5 A
BG 67-68	42.74 A	65.71 A
BG 63-64	23.69 B	41.59 AB
BG 43-44	15.96 BC	49.03 AB
BG 19-20	44.39 A	29.40 B
Colimex	12.09 C	49.63 AB
Lise	5.00 D	41.59 AB
Colimón	0.85 E	33.96 B
PROMEDIOS	26.43	45.54

Promedios con letra distinta son estadísticamente diferentes (Tukey $p < 0.05$).

^z =Promedio de tres medios de cultivo; ^y =Promedio de dos métodos de tinción

Tipo de embrionía en genotipos de limón mexicano

A los 50 y 60 días de edad, los frutos de los distintos genotipos tuvieron un diámetro ecuatorial entre 2.0 y 2.5 cm. La mayoría de sus semillas en

desarrollo presentaba color blanco verdoso con aspecto translúcido. En el interior se observó un tejido gelatinoso dentro del cual se encontraban los embriones de color verde y con forma cotiledonar y tamaños que variaron entre 0.20 y 0.34 cm de longitud. De los datos del cuadro 2, se puede apreciar que todos los genotipos estudiados producen tres o más semillas por fruta. La variedad regional 'Colimex' produce 4.5 semillas. Sobresale el genotipo M 30-9 que promedió 13.75 semillas por fruta. El número promedio de embriones por semilla de los genotipos fluctuó entre 1.24 y 2.5. Esto demuestra que todos los genotipos estudiados producen semillas poliembriónicas. El M 30-9 registró el promedio más bajo (1.24 semillas por fruta). La mayoría de los genotipos produjeron semillas poliembriónicas en porcentajes superiores al 50%. Nuevamente sobresale el variante natural M 30-9 que promedió un porcentaje relativamente bajo de semillas poliembriónicas (30.4%).

Cuadro 2. Contenido de semillas por fruta, número de embriones por semilla y porcentaje de semillas poliembriónicas en genotipos de limón mexicano

GENOTIPO	SEM./FRU.	EMB./SEM.	SEM. POLIEMB.	LONG. EMB
Colimex	4.5	2.35	75.5	0.30
M - 681	4.55	1.70	38.6	0.30
M - 707	2.71	2.38	75.0	0.34
M - 822	5.7	2.43	67.39	0.22
M - 895	3.71	2.57	62.22	0.20
M - 914	4.08	2.04	52.83	0.32
M - 1119	3.64	1.93	59.09	0.22
M - 30-9	13.75	1.24	30.43	0.27
M - LL	6.22	2.54	64.81	0.27
M - SAL	3.3	2.5	57.50	0.25
M - 12-8	4.75	2.23	58.82	0.30

Uno de los efectos de la embrionía nucelar, es que las hibridaciones realizadas bajo condiciones controladas usando clones poliembriónicos como progenitores femeninos, frecuentemente producen una escasa o nula progenie híbrida, la cual es requerida para la selección de genotipos de interés (Grosser y Gmitter, 1990). En base a los resultados de este trabajo el genotipo M 30-9 resulta interesante por dos características importantes. Primero por presentar fruta con un alto contenido de semillas y segundo porque casi dos terceras partes de las mismas al parecer son monoembriónicas. También es importante destacar que es un genotipo tetraploide por lo que puede ser útil para usarse como progenitor en trabajos de hibridación sexual interploide.

Edad del fruto adecuada para hacer el rescate de los embriones híbridos.

Aunque los sitios donde se cultivan cada una de las especies de cítrico bajo estudio fueron diferentes, así como el manejo del huerto y las fechas en que se presentaron las floraciones, el desarrollo del fruto y de las semillas guardó ciertas semejanzas en algunas de las variables registradas. Como se puede

observar en los datos del Cuadro 3, para cada una de las fechas de muestreo el desarrollo de la fruta fue ligeramente semejante entre ambos tipos de limón. Aunque en el limón italiano la fruta tuvo una tendencia a desarrollar un diámetro ecuatorial ligeramente mayor que la registrada en limones mexicanos, sobre todo a los 60 y 70 días. En cuanto al número de semillas por fruta, se puede apreciar que mientras que en el limón mexicano se registraron promedios entre 4 y 5 semillas, en el limón italiano se registraron de 15 a 20 semillas por fruta. En ambas especies el contenido de semillas por fruta se mantuvo más o menos estable en las cuatro fechas de muestreo.

El tamaño de la semilla determinado en función de su longitud, presentó un comportamiento inverso a lo descrito entre los dos tipos de limón para el diámetro de la fruta. Las semillas de limón mexicano en todas las fechas de muestreo fueron ligeramente mayores que las semillas de limón italiano. En ambos tipos de limón las semillas presentaron un color blanco verdoso y aspecto translúcido. En su interior las semillas en de los frutos muestreados a los 40 días presentaron una textura entre líquida a gelatinosa. Para los 50 y 60 días el contenido de las semillas se tornó gelatinoso, mientras que a los 70 días este tejido prácticamente desapareció.

Para esta última fecha de muestreo algunas semillas están prácticamente rellenas con los embriones. Por su parte el número de embriones por semilla se comportó de manera muy diferente entre los dos tipos de limón. Mientras que en limón mexicano el número de embriones por semilla fue creciendo en las primeras tres fechas de muestreo, hasta alcanzar un promedio de 3.47 embriones a los 60 días. Para los 70 días en algunas semillas los embriones se habían ya fusionados entre sí y se dificultó el conteo. En estos casos se contaron como uno sólo y por lo tanto para esta fecha el promedio disminuyó. Por su parte en el limón italiano en la mayoría de las semillas de fruta muestreada a los 40 días no presentaban aún embriones o estuvieron muy pequeños y no se pudieron observar.

Cuadro 3. Tamaño de fruto, contenido de semillas, número y tamaño de embriones en dos cítricos ácidos en estados de su desarrollo.

EDAD FRUTO (días)	GENOTIPO	DIAM/FRU. (cm)	SEM/FRUTO No.	LONG. SEM (cm)	EMB/SEM No.	LONG/EMB (mm)
40	MEX	1.97	4.95	5.4	2.08	0.57
	ROS	2.00	20.00	3.8	0.14	0.60
50	MEX	2.36	4.58	6.4	3.60	2.77
	ROS	2.50	17.00	5.5	1.00	3.5
60	MEX	2.71	4.11	7.8	3.47	3.73
	ROS	3.00	15.00	6.5	0.95	5.50
70	MEX	3.31	4.11	10.0	1.27	5.83
	ROS	3.50	18.00	8.2	1.00	6.20

En los muestreos posteriores los promedios se mantuvieron en un sólo embrión por semilla desde los 50 hasta los 70 días. Es importante señalar que los datos individuales de cada semilla indican que en la mayoría de las semillas solo se encontró un embrión. Algunas pocas semillas tuvieron dos embriones y hubo un caso de tres embriones por semilla. Esto indica que es un genotipo prácticamente monoembriónico lo que reviste gran importancia para nuestro proyecto ya que se convierte en un buen progenitor femenino. Respecto al tamaño de los embriones, estos muestran una dinámica de constante crecimiento en las dos especies cítricas. No obstante aunque en las dos primeras fechas de muestreo los embriones de ambos tipos de limón tuvieron un tamaño similar, para los 60 y 70 días los embriones de limón italiano fueron más grandes que los de limón mexicano.

En base a estos resultados se puede considerar que a los 60 días es una edad del fruto adecuada para hacer el rescate de los embriones en el limón mexicano. Por su parte en el limón italiano el rescate se puede practicar entre los 60 y 70 días o incluso hasta la madurez debido a que por su bajo nivel de poliembriónía el riesgo de ser eliminado por los embriones nucelares es menor.

Polinización y amarre de fruta

En este primer año de polinizaciones se tuvo problemas de sincronización entre las floraciones de los dos tipos de limón. Sin embargo, se logró realizar algunas hibridaciones con las flores que se pudieron aprovechar. La fruta se dejó crecer hasta los 60 días en el caso de los cruzamientos limones mexicanos x limones italianos y 70 días en las cruces de limones italianos x limones mexicanos. La combinación que más se pudo lograr fue la del cultivar 'Rosenberg' x 'Colimex'. Esto debido a la disposición de suficiente polen de 'Colimex' en el tiempo en que hubo flores de 'Rosenberg'. Como se aprecia en el cuadro 4, en todas las combinaciones se lograron obtener frutas con porcentajes de amarre variable pero aceptable. Solo la cruce entre 'Colimex' x 'Rosenberg' registró el mayor porcentaje de fruta amarrada. Aunque esto no garantiza que se lograron las cruces debido a que en esta especie ocurre algo de partenocarpia.

Cuadro 4. Porcentajes de amarre de fruta en hibridaciones realizadas entre genotipos de limón mexicano con genotipos limón italiano.

Prog. Femenino	Prog. Masculino	Flores. No	Frutos No	%	Semillas No.	Embriones No.
Colimex	Rosenberg	61	41	67.2	246	566
Colimón	Rosenberg	28	13	46.4	1	1
Rosenberg	Colimex	155	45	29.0	333	282
Mex 4x	Rosenberg	10	3	33.3	60	150
Eureka	Colimex	19	5	26.3	Pendiente	Pendiente
Limoneira 8A	Colimex	3	2	66.7	Pendiente	Pendiente

Está pendiente conocer cuantas semillas se produjeron y la cantidad de embriones que se lograron.

Aunque se obtuvieron semillas, aún no se terminan los trabajos de rescate de los embriones en todas las combinaciones. También se logró un porcentaje alto de amarre de fruta en la combinación de 'Colimón'. Este genotipo produce fruta con bajo contenido de semillas.

De acuerdo a estos datos, los porcentajes de amarre de fruta obtenidos con limones mexicano resultaron ser mayores que los reportados por Vilorio *et al* (2006), para esta especie, tanto cuando se usó como progenitor femenino como cuando funcionó como progenitor masculino. De algunas de las combinaciones ya se tienen embriones germinando y plántulas en desarrollo, quedando pendiente concluir con la fase de rescate de los embriones en todas las combinaciones. También está pendiente determinar su nivel de ploidía, la caracterización morfológica y molecular de las plántulas resultantes y así determinar su carácter híbrido. Se espera que esto pueda ser logrado en los próximos meses, antes de que se inicie una nueva estación de polinizaciones.

CONCLUSIONES

Los datos son producto de un primer año de trabajo y por lo tanto las conclusiones son preliminares. La viabilidad estimada del polen de los genotipos de limón mexicano es relativamente baja de acuerdo a resultados de pruebas de germinación *in vitro*. Se cuenta con un genotipo de limón mexicano y uno de limón italiano con bajos porcentajes de semillas poliembriónicas y pueden ser útiles en los trabajos de hibridación sexual. El tiempo adecuado para el rescate de los embriones inmaduros es cuando la fruta tiene 60 días en limón mexicano y 70 días en limón italiano. En hibridaciones realizadas con distintas combinaciones entre limones mexicanos y limones italianos se lograron porcentajes de fruta amarrada variables pero en general aceptables. Queda pendiente realizar los trabajos de rescate de embriones para varias combinaciones de progenitores y desarrollo de plántulas para determinar en que medida se lograron con éxito las hibridaciones.

LITERATURA CITADA

- Aliza - Vardi, P (1981) Protoplast derived plant from different Citrus species and cultivars. Proc. Int. Soc. Citriculture. 1: 149-152.
- Aliza-Vardi, (1981) and P. Spiegel-Roy (1978) Citrus breeding, Taxonomy and the Species problem. pp. 52-57. En: Proc. Int. Soc. Citriculture, Australia Citrus Improvement. Plant Breed Rev 8: 339–374.
- Cristofani, M; M. A. Machado; MPLN Targon and M. A. Takita (2002) Tristeza tolerance by improvement methods. In 7th International citrus seminar: Improvement. (Eds) L. C. Donadio and E. Sanches-Stuchi. Citrus Experimental Station of Bevedoro, SF Brazil. Pages 71-73
- Deng XX, H.L. Yi, F. Li and W.W. Guo (1996) Triploid plants regenerated from crossing diploid pummelo and tangerine with allotetraploid somatic hybrid of citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture. 1: 189–192
- Grosser J. W. and F. G. Gmitter. 2005. SIVB Congress Symposium Proceedings "Thinking outside the cell": applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. In vitro cell Dev. Biol. Plant 41: 220-225

- Grosser, J.W., and F.G. Gmitter Jr (1990) Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breed Rev.* 8: 339-374.
- Grosser JW, P. Ollitrault and O. Olivares-Fuster (2000) Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 36: 434-449
- Harms, C. (1992) Engineering genetic disease Resistance into crops: Biotechnological approaches to crop protection. *Crop protection* 11: 291-306.
- Ikeda, F. 1981. Repression of poliembryony by gamma-rays in poliembryonic citrus. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 39-44.
- Jahier, J (1996) Techniques of plant cytogenetics. Sci. Pub., Inc. New Hampshire, USA. 180 p.
- Kahn, I. A., and J.W Grosser (2004) Regeneration and characterization of somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* (sweet orange) and *Citrus micrantha*, a progenitor species of lime. *Euphytica* 137: 271-278.
- Knudsen, S. (1999) Flower induction in the Andean root crop *Arracha* (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). A description and evaluation of the morphological changes following dehydration. Thesis M.Sc. in Botany, The Royal Veterinary and Agricultural University Copenhagen, Denmark, 71 p.
- Kochba, J., and P. Spiegel-Roy (1977) Cell and tissue culture for breeding and development studies of citrus. *HortScience.* 12: 110-114.
- Machado, M. A. (2002) Citrus breeding and biotechnology in Brazil. In 7th International Citrus Seminar: Improvement. (Eds) L. C. Donadio and E. Sanches-Stuchi. Citrus Experimental Station of Bevedoro, SF Brazil. Pages 32-33
- Medina-Urrutia, V. M, M. M. Robles-González, S. Becerra-Rodríguez, J. Orozco-Romero, M. Orozco-Santos, J. G. Garza-López, M. E. Ovando-Cruz, X. Chávez-Contreras y F. A. Felix-Castro (2001) El cultivo del limón Mexicano. INIFAP-CIRPAC-Tecomán. Libro Técnico # 1, 189 páginas.
- Navarro L., O. Olivares-Fuster, J. Juárez, P. Aleza, J, A, Piña, M. Cerrera, C. Fagoaga, R. M. Pérez and L. Peña (2002) Citrus improvement in Spain through triploid breeding, somatic hybridization and genetic transformation. In 7th International citrus seminar: Improvement. (Eds) L. C. Donadio and E. Sanches-Stuchi. Citrus Experimental station of Bevedoro, SF Brazil. Pages 57-70.
- Ollitrault P., D. Dambier, F. Luro, Y. Froelicher and S. Bruyère (2002) Triploid easy peeler breeding with help of biotechnologies. In 7th International Citrus Seminar: Improvement. (Eds) L. C. Donadio and E. Sanches-Stuchi. Citrus Experimental station of Bevedoro, SF Brazil. Pages 44-45.
- Ollitrault, P., F. Vanel and Y. Froelicher (2000) Creation of triploid citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplast. *Proc. First Int, Symposium of Citrus Biotechnology.* I: 191-198.
- Pappu, H. R., S. S. Pappu, T. Kano, M. Korzumi, M. Cambra, P. Moreno, H. J. Su, S. M. Garnsey, R. F. Lee and C. L. Niblett (1995) Mutagenic Analysis and localization of a highly conserved epitope near the amino terminal end of the citrus tristeza closterovirus capsid protein. *Phytopathology.* 85: 1311-1315.
- Robles, G. M. M. (1993) Mejoramiento Genético del limón mexicano en Colima. II Simposium Internacional sobre sistemas de producción en Cítricos. p. 227-238.

- Rocha-Peña, M. A., R. F. Lee, R. Lastra, C. L. Niblett, F. M. Ochoa-Corona, S. N. Garnsey,, and R. Yokomi (1995) Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threat to citrus production in the Caribbean and central and North America. *Plant Disease*. 79 (5): 437-444.
- Slack, S. A. and T. L German (1998) Impact of transgenic viral resistance on seed potato certification. *Amer. J. of Potato Res.* 75: 265-268.
- Tusa N, S. Fatta del Bosco, Nardi L and S. Lucretti (1996) Obtaining triploid plants by crossing citrus lemon cv. 'Femminello' 2N · 4N allotetraploid somatic hybrids. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 133–136
- Vardi, A., A. Elhanati, A. Frydman-Shani and H. Neumann (1996) Strategies and considerations in mandarin improvement programmes. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 1:109-112.
- Viloria, Z. and J. W. Grosser (2005) Acid citrus fruit improvement via interploid hybridization using allotetraploid somatic hybrid and antotetraploid breeding parents. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130 (3): 392-402.
- Viloria, Z; J. W. Grosser and B. Bracho (2005) Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interploid hybridization. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 82: 159-167.