

Estudio citogenético en *Citrus* III: genética y proteínas foliares en progenies híbridas de *Citrus volkameriana* Pasq. x *Citrus reshni* Hort. ex Tan.

por A. M. Frías de Fernández¹; M. E. Lozzia de Canelada¹; M. S. Caro²;
M. Hernández¹; S. Saad² y J. L. Foguet³

1. Fundación Miguel Lillo.

2. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Tucumán. Adscripta a Fundación Miguel Lillo.

3. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes, Tucumán.

Summary

«Cytological studies on *Citrus*. III. Reports on genetics and leaf proteins in hybrid progenies of *Citrus volkameriana* Pasq. x *Citrus reshni* Hort. ex Tan.» Cytological studies, as well as leaf protein studies, in hybrid progenies of *Citrus volkameriana* Pasq. (female progeny) x *Citrus reshni* Hort. ex Tan. (male progeny), have been carried out in this paper. The normal production of the pollen grains and their viability, have not been affected by meiotic abnormalities. The electrophoretic patterns of the leaf proteins in progenies and their hybrids are identical. The only differences which were observed are quantitative.

Key words: Cytology, *Citrus volkameriana*, *Citrus reshni*, hybrid progenies, genetics, foliar proteins.

Introducción

La citricultura en nuestro país ha experimentado un notable desarrollo merced a dos hechos fundamentales: la introducción de variedades de distintos orígenes y de gran riqueza genética por un lado y la generación de nuevas variedades a partir de las existentes por otro. Por medio de las cruza controladas de este rico material genético los mejoradores de *Citrus* han logrado obtener híbridos con características agronómicas deseables.

Pensando que será de gran utilidad contar con la mayor cantidad de información sobre las características visibles o detectables a través de

métodos citológicos, fisiológicos o bioquímicos y con la finalidad de aportar datos sobre la forma de herencia y el destino de los genes o caracteres que determinan el valor económico de los frutos de la selección, damos a conocer los estudios del comportamiento meiótico y los patrones foliares proteicos de los progenitores y los descendientes del cruzamiento: *Citrus volkameriana* x *Citrus reshni*. El análisis de la meiosis permitirá detectar si se presentan o no irregularidades y en qué grado ellas conducirán a la formación de gametas inviables lo que ocasionaría un incremento en la esterilidad de los

Tabla 1 Valores proporcionados por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres de Tucumán respecto a: embrionía, rango del número de semillas por fruto, número de semillas sembradas y número de plantines obtenidos.

Individuos	Embrionía	Nº semillas (rango)	Nº semillas sembradas	Nº plantines obtenidos
81G 1-2	Monoembrionía	—	—	—
81G 1-4	Monoembrionía	—	—	—
81G 1-10	Monoembrionía	—	—	—
81G 1-13	Poliembrionía	—	—	—
81G 1-15	Poliembrionía	11-15	161	165
81G 1-24	Poliembrionía	—	—	—
81G 2-2	Poliembrionía	16-20	146	202
81G 2-16	Poliembrionía	> 20	205	—
81G 3-1	Monoembrionía	—	—	—
81G 4-5	Poliembrionía	0-5	175	249
81G 4-17	Poliembrionía	> 20	140	113
81G 5-3	Poliembrionía	—	—	—
81G 5-11	Poliembrionía	11-15	174	274
81G 10-1	Monoembrionía	—	—	—

híbridos. Estos datos sumados a los proporcionados por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres de Tucumán respecto a la producción de semillas, embrionía y producción de plantines serían de utilidad en la selección de futuros portainjertos dentro de los planes de mejoramiento desarrollados por la citada institución.

Materiales y métodos

Los híbridos del cruzamiento: *Citrus reshni* (progenitor masculino) por *Citrus volkameriana* (progenitor femenino) fueron proporcionados por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres de Tucumán. En la nomenclatura utilizada para caracterizar cada planta se incluye: año en que se efectuó el cruzamiento, número de línea y número de planta. Para el estudio se seleccionaron los siguientes híbridos: 81G 1/2; 81G 1/4; 81G 1/10; 81G 1/13; 81G 1/15; 81G 1/24; 81G 2/2; 81G 2/16; 81G 3/1; 81G 3/2; 81G 4/5; 81G 4/17; 81G 4/

25; 81G 5/1; 81G 5/3; 81G 5/11; 81G 10/1.

En la tabla 1 se presentan los datos proporcionados por la EEAIOC respecto a las siguientes características de los híbridos: embrionía, número de semillas y producción de plantines.

Estudios citológicos. Se trabajó con botones florales jóvenes coleccionados en Monte Grande, Famaillá (Tucumán). Se fijaron en alcohol absoluto: ácido acético (3:1); luego fueron transferidos a alcohol 70° y se conservaron en frío a -20°C. La coloración se realizó según la técnica de Feulgen.

Las observaciones meióticas se hicieron sobre 25 células madres del polen. La fertilidad del polen se midió con una coloración de carmín acético y glicerina (1:1). La viabilidad del polen se calculó sobre 100 microsporas.

Estudios electroforéticos. Para estudiar las proteínas foliares se trabajó con extractos de

Tabla 2 Porcentajes de las frecuencias promedio de las irregularidades meióticas de los híbridos del cruzamiento *Citrus volkameriana* x *C. reshni*.

Especies / híbridos	Metafase I %		Anafase I %			Metafase II %		Anafase II %		Tétradas %	
	Norm.	Rezag.	Norm.	Rezag.	Puente	Norm.	Rezag.	Norm.	Rezag.	Norm.	Anorm.
81G 1/2	70	30	89	11	+	76	24	No obs.	No obs.	96	4
81G 1/4	70	30	80	20	+	76	24	No obs.	No obs.	98	2
81G 1/10	76	24	No obs.	No obs.	No obs.	100	0	No obs.	No obs.	92	8
81G 1/13	85	15	98	2	+	92	8	No obs.	No obs.	97	3
81G 1/15	96	4	No obs.	No obs.	No obs.	100	0	No obs.	No obs.	100	0
81G 1/24	92	8	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	96	4*
81G 2/2	58	42	No obs.	No obs.	+	100	0	No obs.	No obs.	100	0
81G 2/16	90	10	77	23	0	100	0	94	6	93	7
81G 3/1	84	16	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	96	4
81G 3/2	88	12	83	17	0	No obs.	No obs.	100	0	100	0
81G 4/5	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	100	0
81G 4/17	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	96	4
81G 4/25	82	18	79	21	0	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	98	2
81G 5/1	80	20	100	0	0	100	0	No obs.	No obs.	100	0
81G 5/3	80	20	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	No obs.	100	0
81G 5/11	89	11	No obs.	No obs.	No obs.	100	No obs.	No obs.	No obs.	100	0
81G 10/1	76	24	100	0	0	100	0	100	0	96	4

(*) 81G 1/24 presenta el 60% de los granos de polen anormales.
No obs.: no observado.

hojas de las especies parentales y de 10 híbridos, todos de edad cronológica similar. Los extractos se sometieron a electroforesis vertical en geles de poliácridamida en condiciones nativas y mediante PAGE SDS según la técnica de Harris (1989).

Resultados y discusión

a) Estudios citogenéticos. El análisis meiótico de la descendencia del cruzamiento: *Citrus reshni* x *C. volkameriana* (tabla 2) fue realizado en Metafase I, Metafase II, Anafase I, Anafase II y en tétradas.

- 81G 1/2. En Metafase I los cromosomas rezagados se presentan con una frecuencia del 30% y en Anafase I la frecuencia es del 11%, observándose la presencia de puentes en este

estadio. En Metafase II los rezagados están en el 24% de las células. No se observaron células en el estadio de Anafase II. Las tétradas se presentan en un 96% con microsporas normales y un 4% de tétradas anormales. Estas últimas se presentan de dos formas: con 4 microsporas normales y 1 micronúcleo o bien tétradas con 3 granos de polen y 1 o 2 más pequeños.

- 81G 1/4. En Metafase I un 30% de cromosomas rezagados; en Anafase I un 20% de cromosomas rezagados y se detectan puentes. En 13 células analizadas en Metafase II, 10 eran normales y 3 presentaban cromosomas rezagados. Anafase II sin recuentos por falta de placas en este estadio y las tétradas fueron 98% normales, 2% anormales con 3 granos de polen grandes y 2 pequeños (micronúcleos).

- 81G 1/10. Metafase I con 24% de células con

comportamiento irregular de los cromosomas; Anafase I sin observaciones en este estadio; Metafase II con un comportamiento de las células en forma normal en un 100%. Las tétradas son 92% normales y un 8% con micronúcleos.

- 81G 1/13. Metafase I con un 15% de cromosomas rezagados y Anafase I con 98% de células normales y 2% de rezagados. Metafase II con un 8% de rezagados y sin observaciones en Anafase II. Las tétradas en un 97% normales y 3% anormales: 4 granos de polen grandes y 1 chico, es lo más frecuente.

- 81G 1/15. Metafase I con un 4% de cromosomas rezagados y la Metafase II con todas las células con comportamiento normal. Faltaron las observaciones en Anafase I y Anafase II por no presentarse en el material estudiado estos estadios. Las tétradas todas normales.

- 81G 1/24. En la Metafase I se observó un 8% de cromosomas rezagados. Las tétradas se presentaron en un 96% normales y un 4% anormales. Se observaron el 60% de los granos de polen, deformados y un 40% normales.

- 81G 2/2. Metafase I con un 42% de cromosomas rezagados y Metafase II con 100% de células normales; Anafase I y Anafase II, no observamos. Las tétradas fueron 100% normales.

- 81G 2/16. Metafase I con un 10 a un 15% de rezagados; Anafase I con 23% de rezagados; Metafase II normal y Anafase II con 6% de rezagados. Las tétradas son normales en un 93%.

- 81G 3/1. Metafase I con un 16% de cromosomas rezagados; tétradas en un 96% se presentan normales y un 4% con irregularidades.

- 81G 3/2. Metafase I con un 12% de células con rezagados; Anafase I en un 17% con rezagados; Anafase II normales. Tétradas normales.

- 81G 4/5. Tétradas en un 100% de normalidad.

- 81G 4/17. Tétradas con un 96% de células normales y 4% anormales.

- 81G 4/25. Metafase I con un 18% de células irregulares; Anafase I en un 79% de las células se presentan normales; tétradas en un 98% nor-

males y un 2% irregulares.

- 81G 5/1. Las Metafases I presentan de un 15 a un 20% de rezagados; Anafase I y Metafase II se presentan normales y las tétradas son normales.

- 81G 5/3. Metafase I con un 15-20% con rezagados. Tétradas normales.

- 81G 5/11. En la Metafase I el 11% de las células presentan cromosomas rezagados; en Metafase II la totalidad de las células tiene comportamiento normal; las tétradas son normales.

- 81G 10/1. Metafase I con un 24% de cromosomas rezagados; Anafase I normal; Metafase II y Anafase II normales. Las tétradas se presentan con un 96% normal y un 4% de anormalidades.

El análisis de la descendencia del cruzamiento *Citrus reshni* x *C. volkameriana* pone en evidencia la existencia de irregularidades como ser: cromosomas rezagados (fig. 1), formación de puentes y fragmentos (fig. 2). Estas irregularidades no alteran la producción normal de granos de polen. Es infrecuente la existencia de micronúcleos y/o la formación de pentadas y hexadas, como observamos por ejemplo en 81G 2/2 que presenta un 42 % de cromosoma rezagados en Metafase I y puentes con fragmentos en Anafase I, sin embargo las tétradas son normales en un 100%. Una situación inversa se presenta en el género *Salvia* (Haque, 1980), donde las irregularidades meióticas conducen a un alto grado de inviabilidad e infertilidad de las gametas. Estos resultados en *Citrus* pondrían en evidencia la existencia de un mecanismo compensador que controlaría la producción normal de los granos de polen y su viabilidad, aún las irregularidades que se presentan en los estadios tempranos de la microesporogénesis o bien se podría explicar considerando que estas anormalidades no son lo suficientemente importantes como para modificar los estadios finales de la meiosis.

Al analizar los datos disponibles sobre producción de semillas, número de plántulas obtenidas y embrionía (tabla I), se infiere que no

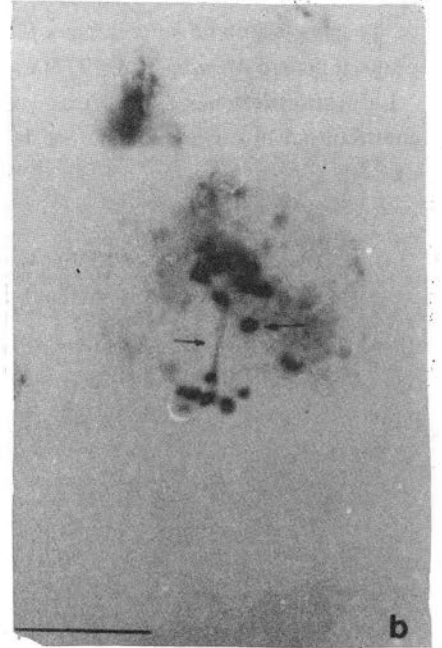
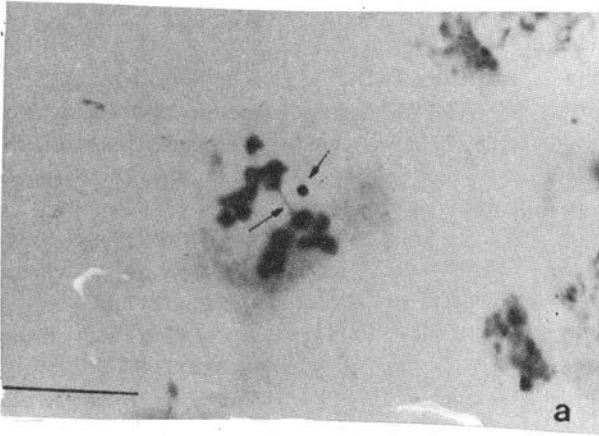


Fig. 1. Cromosomas rezagados (flechas) en el híbrido 81G 1/2. a) Metafase I; b) Anafase I. La escala representa 10 μ m.

Fig. 2. Puentes y fragmentos (flechas) en: a) Anafase I del híbrido 81G 1/2; b) Anafase I del híbrido 81G 1/3. La escala representa 10 μ m.

estarían tampoco correlacionados con las irregularidades que se presentan en la meiosis, en la mayoría de los casos analizados. Sin embargo en el híbrido 81G 1/24 la producción deficiente de frutos podría atribuirse a la proporción elevada (60%) de granos de polen irregulares (fig. 3).

En cuanto al grado de apareamiento que se presenta en los cromosomas de los híbridos interespecíficos, lo que significa una homología de los cromosomas y constituye una evidencia del grado de relación entre las especies parentales, se puede afirmar que las especies involucradas en este cruzamiento tienen una gran afinidad genética, por la presencia regular y constante de nueve bivalentes. Una relación más distante se manifiesta con una disminución del apareamiento y con una decreciente fertilidad de las gametas, como se presenta en las orquídeas del género *Aranda* (Yip, 1977).

Las observaciones citológicas realizadas contribuirían al esclarecimiento de la taxonomía del género *Citrus*, que hasta el momento presenta grandes controversias en la opinión de diferentes autores: para Hooker (1875), el género consta de cuatro especies; para Swingle (1943), de 16 especies; y para Tanaka (1977), de 162 especies. Nuestros resultados concuerdan con la opinión de Scora (1988) que la complejidad taxonómica se debería a la producción asexual de semillas. También tendría importancia la larga duración de los cultivos, los disturbios del hábitat y la extinción. Por lo tanto toda esta variabilidad establecida en el tiempo por la evolución, resulta en derivados híbridos que se estabilizarían por la embriónía nucelar, recibiendo muchos de ellos nombres que corresponden a la categoría de especie.

b) Proteínas foliares. Los resultados de las corridas electroforéticas han demostrado que existe una completa identidad entre los proge-

nitores e híbridos (fig. 4) respecto a las proteínas foliares. Se presentan más de treinta bandas de igual peso molecular, aunque la intensidad de estas difería entre las distintas variedades. En condiciones nativas se evidenció un patrón más diferenciado. Los resultados electroforéticos nos permiten concluir: a) que los genes que determinan la síntesis de las principales proteínas foliares en las dos especies parentales y en los distintos híbridos son esencialmente idénticos en cuanto al tamaño de los péptidos codificados; b) que hay variación en aminoácidos que afectan diferencialmente la carga de algunas proteínas en las variedades estudiadas; c) que existen factores nucleares promotores o inhibidores que actúan de distinta manera determinando diferencias cuantitativas en la expresión de los genes, como consecuencia de lo cual se originarían las diferencias fenotípicas morfológicas y bioquímicas observables.

Bibliografía

- HAQUE M. S. & K. K. GHOSHAL, 1980. «Behavior of meiotic chromosome with special reference to their relationships in pollen sterility in *Salvia L.*». *Cytologia* 45 (4): 743-752.
- HARRIS E. L. V. & S. ANGAL, 1989. *Protein purification methods. A practical approach*. IRL Press. Oxford University Press. New York. 317 pp.
- HOOKER J. D., 1875. *Flora of British India*. Reeve and Co., London, 7 vol. (Rutaceae) 1: 484-517.
- SCORA R. W., 1988. *Biochemistry, Taxonomy and Evolution of Modern Cultivated Citrus*. Proc. Int. Soc. Citriculture. I. Gooren and K. Mendel (eds.).
- SWINGLE W. T., 1943. «The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily». In the *Citrus Industry*. Vol. I. H. J. Webber and L. D. Batchelor. Eds. University California Press, Berkley and Los Angeles. 129-174.
- TANAKA T., 1977. «Fundamental discussion of *Citrus* classification». *Studia Citrologica* 14: 1-6.
- YIP MOH-YING, 1977. Cytological studies of some *Aranda* (*Arachis* x *Vanda*) hybrids (Orchidaceae). *Cytologia* 42: 565-579.

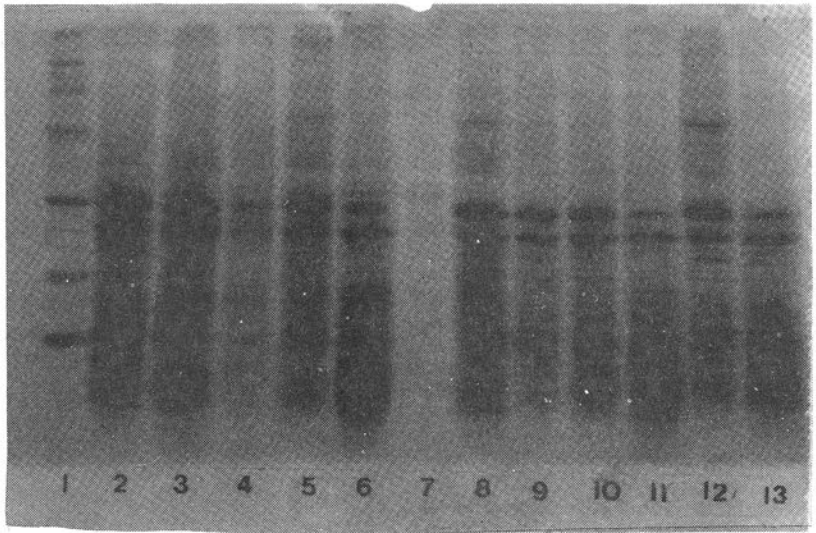


Fig. 1. Granos de polen del híbrido 81G 1-24 mostrando irregularidades.

Fig. 4. Patrones electroforéticos de proteínas foliares en *Citrus*: 1) marcadores de peso molecular; 2) *C. volkameriana*; 3) *C. reshni*; 4) 81G 1/2; 5) 81G 1/5; 6) 81G 1/24; 7) 81G 1/13; 8) 81G 1/15; 9) 81G 2/16; 10) 81G 4/17; 11) 81G 5/1; 12) 81G 5/3; 13) 81G 5/11.