

PROBLEMÁTICA DE LA MEJORA GENÉTICA CONVENCIONAL Y NUEVOS MÉTODOS DE MEJORA EN LOS CÍTRICOS

Mejora genética de los cítricos, métodos de obtención y leyes de protección de nuevas variedades

A pesar de los inconvenientes a los que han tenido que enfrentarse los programas de mejora, en los últimos años ha crecido de forma importante el interés por la mejora de los cítricos, tanto en instituciones de investigación públicas como en empresas privadas. En este tra-

bajo se revisan brevemente las distintas tecnologías usadas actualmente para la mejora genética de los cítricos y se discute la relación de estas tecnologías con las normas derivadas de la normativa legal para la protección de variedades.

Luis Navarro.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología.
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).
Moncada (Valencia).

Los cítricos constituyen el primer cultivo frutal del mundo, con una producción de unos 110 millones de toneladas y una superficie de más de 7 millones de hectáreas. En España también constituyen el principal cultivo frutal, con una producción de unos 6,3 millones de toneladas y una superficie cercana a las 330.000 hectáreas.

Los cítricos pertenecen a la subfamilia de las Aurantioideae, que se caracteriza por producir frutos en hesperidio. El número de especies del género *Citrus* no está consensuado debido a la disparidad de criterios entre los taxónomos clásicos y oscila según autores entre 16 y 162. No obstante, estudios modernos basados en taxonomía numérica y en distintos marcadores moleculares indican que los cítricos actuales se originaron a partir de tres especies básicas: las zamboas (*Citrus máxima*), los cidros (*C. medica*) y los mandarinos (*C. reticulata*). Las zamboas son nativas de Indonesia y el archipiélago mala-

yo, los cidros del noreste de India y zonas cercanas a China y Birmania y los mandarinos de una amplia región que incluye China, Vietnam y el sur de Japón.

Las otras especies actualmente conocidas del género *Citrus* se originaron por hibridaciones sucesivas de estas tres especies originales. Las principales especies de cítricos cultivadas comercialmente por su fruta comestible son los naranjos dulces (*C. sinensis*), los mandarinos, los limoneros (*C. limon*), los pomelos (*C. paradisi*), las limas (*C. aurantifolia*) y las zamboas. Las mandarinas constituyen un grupo muy diverso, entre las que se encuentran subgrupos característicos como las satsumas (*C. unshiu*) y las clementinas (*C. clementina*), que realmente son híbridos entre mandarinos y naranjos. En la **figura 1** se muestra el origen de estas especies, que se formaron por hibridación entre las especies ancestrales.

Algunas especies cultivadas son híbridos de origen muy antiguo, pero otras, como por ejemplo las clementinas, son híbridos de origen muy reciente, de apenas un siglo de antigüedad. En algún momento de la evolución apareció el carácter apomíctico (poliembrionía asexual de las semillas), típico de la mayoría de las especies de cítricos. La apomixis y la propagación vegetativa han contribuido al mantenimiento de estas especies. La diversificación de las especies cultivadas se ha realizado fundamentalmente por mutaciones espontáneas en campo, que son el origen de la mayoría de las variedades actuales. Le excep-



Foto 1. Diversidad fenotípica de frutos del Banco de Germoplasma de Cítricos del IVIA.

FIGURA 1.

Origen de las especies cultivadas de los cítricos.



Foto 2. Embrionía nucelar. Plántulas de cítricos procedentes de una misma semilla. Estas plantas son normalmente de origen nucelar, ya que el embrión sexual se desarrolla en pocos casos en los genotipos poliembrionarios.



Foto 3. Frutas procedentes de un híbrido entre clementina y naranjo dulce. La elevada heterocigosis es responsable de la falta de similitud del híbrido con los parentales.

ción es el grupo de los mandarinos donde se ha producido una importante diversificación mediante hibridaciones. La diversidad fenotípica de los cítricos es muy alta, y se conserva en bancos de germoplasma que son la base para los programas de mejora genética (**foto 1**).

Los cítricos se cultivan en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo entre los 40° de latitud norte y sur, en una gran diversidad de condiciones climáticas y de tipos de suelos, lo que implica que están afectados por diversos estreses abióticos, como salinidad, sequía, inundaciones, clorosis férrica o acidez. Las heladas y las temperaturas muy altas también causan pérdidas importantes en muchas zonas de producción.

Los cítricos también están afectados por numerosas enfermedades causadas por nematodos, hongos, bacterias, fitoplasmas, virus y viroides. Las enfermedades "leves" simplemente causan una reducción de la producción y la calidad de la fruta, pero otras pueden destruir la citricultura de las zonas afectadas. Algunas enfermedades están presentes en la mayoría de las zonas de producción, como la tristeza o la *Phytophthora*, que impiden la utilización de determinados patrones con excelente comportamiento agronómico. Otras enfermedades están presentes en zonas de producción específicas, aunque algunas se están diseminando rápidamente a nuevas áreas. La cancrrosis causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* producía daños importantes en países asiáticos y latinoameri-

canos, pero en los últimos años se está diseminando sin control en Florida. La clorosis variegada de los cítricos, causada por la bacteria *Xylella fastidiosa* y la muerte Súbita, probablemente causada por el *Citrus sudden death associated virus*, causan daños importantes en Brasil. El Huanglongbing (*ex greening*), causado por la bacteria *Candidatus Liberibacter* sp., y difundido de forma natural por el vector *Diphorina citri*, es la principal limitación para el cultivo de los cítricos en los países del sudeste asiático donde está presente y su reciente diseminación en Brasil y Florida está afectando a millones de árboles y amenazando seriamente el futuro de la citricultura de estos países, y en general en toda América porque el vector y la enfermedad ya se han detectado en diversos países, como Méjico.

La susceptibilidad de la producción cítrica a enfermedades emergentes invasivas es muy importante, ya que la mayor parte de la producción está basada en una variabilidad genética muy escasa, por lo que no hay resistencias y las enfermedades pueden establecerse fácilmente de forma generalizada y causar daños catastróficos.

Las variedades suponen sin ninguna duda la principal prioridad de los citricultores de los países que dedican su producción al consumo en fresco, ya que es imprescindible adaptar la producción a las demandas cada vez más exigentes en calidad de los mercados internacionales. La competencia en estos mercados está aumentando de forma es-

pectacular en los últimos años debido a la mejora de calidad en la producción de muchos países, la mayor eficacia y rapidez de los medios de transporte marítimo a largas distancias y la apertura de los mercados como consecuencia de los acuerdos sobre globalización y la PAC de la Unión Europea.

Las características de calidad que debe reunir una variedad de cítricos para el consumo en fresco están determinadas fundamentalmente por las exigencias de los mercados, que en muchas ocasiones no se corresponden con caracteres intrínsecos de calidad. Además, los consumidores finales están perdiendo peso en la determinación de la calidad y están siendo sustituidos por las grandes cadenas de distribución, que son las que realmente establecen las condiciones que debe reunir la fruta que comercializan. Las características más importantes de calidad de los frutos cítricos son las siguientes:

- a)** Ausencia de semillas. Los consumidores de los países desarrollados no aceptan los frutos cítricos con semillas, particularmente en mandarinas, naranjas y pomelos. Muchas variedades de excelente calidad organoléptica, particularmente de mandarinos, no pueden cultivarse debido a este rechazo, por lo que la obtención de variedades sin semillas es el principal objetivo de mejora.
- b)** Época de maduración. Los mercados demandan variedades de un determinado tipo durante periodos de tiempo prolonga-

dos. La conservación en cámaras disminuye la calidad, por lo que es necesario disponer de variedades de todas las especies con épocas de maduración escalonadas.

- c) **Tamaño adecuado.** El tamaño se ha convertido en un factor muy importante que determina el precio de los frutos, tanto para el agricultor como para el consumidor. El tamaño óptimo depende de cada especie.
- d) **Facilidad de pelado en mandarinos.** Los mandarinos están asociados por el consumidor al pelado manual, por lo que este carácter es imprescindible. Además de la fácil separación de la corteza es necesario que el flavedo no tenga una excesiva cantidad de aceites esenciales, que éstos no tengan un aroma desagradable y que las glándulas que los contienen no se rompan con facilidad. Ello es necesario para evitar que las manos se impregnen con los aceites esenciales y que su sabor pase a los gajos.
- e) **Fácil separación de los gajos.** Esto evita su ruptura y la consiguiente impregnación de las manos con zumo.
- f) **Color de corteza atractivo.** El color óptimo depende de las especies. Así, el naranja intenso es valorado para las naranjas, el naranja rojizo para las mandarinas, el amarillo para limones, el amarillo rojizo para pomelos y el verde para limas.
- g) **Aroma, sabor y textura agradables.** Estos aspectos son los que clásicamente determinan la calidad de la fruta, pero no son universales y dependen de distintos grupos de consumidores. Por ejemplo, los consumidores franceses o alemanes prefieren mandarinas con una relación acidez/azúcar relativamente alta, por lo que demandan clementinas, mientras que consumidores británicos o japoneses prefieren mandarinas con baja acidez, por lo que prefieren las satsumas. Esta diversidad obliga a producir variedades adaptadas a mercados geográficos concretos.
- h) **Buena aptitud para la manipulación y el transporte.** Es importante que la fruta no tenga pérdidas de calidad durante estos procesos.

Los datos anteriormente expuestos indican que existe una gran necesidad en la citricultura mundial de realizar programas de mejora genética para obtener nuevas variedades y patrones resistentes o tolerantes a estreses



Foto 4. Planta juvenil de un híbrido de mandarina y naranjo, que muestra una elevada espinosidad y ausencia de flores y frutos.

bióticos y abióticos y que produzcan fruta de calidad creciente y adaptada a las demandas específicas de cada zona de producción.

Problemática de la mejora genética convencional

La mejora genética tradicional de los cítricos tiene problemas específicos, además de los comunes a todas las especies leñosas. Entre los más importantes, destacan los siguientes:

- a) **Biología reproductiva compleja:** muchos genotipos de interés presentan esterilidad parcial o total de polen y/u óvulos, por lo que no pueden usarse en programas de hibridación. Además, existen muchos casos de incompatibilidad entre genotipos y de autoincompatibilidad, lo que también limita enormemente la transmisión de caracteres deseables mediante hibridación sexual.

La embriónía nucelar (apomixis parcial) es una característica muy extendida en cítricos y es uno de los mayores impedimentos para la recombinación genética (foto 2). En estos casos, la formación de embriones nucleares impide o restringe el desarrollo de los embriones sexuales,



Foto 5. Fruta de la variedad Shiranui, híbrido de los mandarinos Kiyomi y Ponkan, cultivada en invernadero en Japón.



Foto 6. Frutos de variedades de clementina del Banco de Germoplasma de cítricos del IVIA obtenidas por selección de mutaciones espontáneas en campo.

lo que dificulta enormemente la obtención de poblaciones grandes para seleccionar genotipos recombinantes de calidad superior. Además, es necesario utilizar análisis moleculares para separar las plantas cigóticas de la nucelares. La consecuencia es que en la práctica se usan fundamentalmente los escasos genotipos monoembriónicos no apomícticos como parentales femeninos para la obtención de poblaciones elevadas de híbridos.

- b) **Heterocigosis.** Diversos estudios han demostrado la elevada heterocigosis de la mayoría de las especies. Esto ocasiona una gran segregación genética en la progenie, por lo que hay una baja probabilidad de obtener descendientes con las complejas combinaciones genéticas deseadas de los parentales (foto 3).
- c) **Desconocimiento genético básico.** Hay un desconocimiento casi total sobre la herencia de la mayoría de los caracteres agronómicos de interés, particularmente los relacionados con la calidad de la fruta, lo que impide una adecuada planificación de las estrategias para elegir los cruzamientos más adecuados. Además, no existen marcadores moleculares ligados a estos caracteres, lo que no permi-

te su uso en la evaluación precoz de la progenie.

d) Juvenilidad. Los cítricos tienen un largo periodo juvenil y la mayoría de las especies requieren entre 5 y 8 años para iniciar la floración y fructificación (**foto 4**). Esto dificulta enormemente la evaluación de caracteres relacionados con las características del fruto y la posibilidad de obtener sucesivas generaciones segregantes.

e) Producción de semillas. La experiencia indica que la mayoría de los híbridos de cítricos producen frutos con un elevado número de semillas, incluso cuando los parentales no producen habitualmente semillas. Esto limita la mejora de variedades ya que, como se indicó anteriormente, los mercados rechazan los frutos con semillas.

f) Variabilidad genética. Los cítricos tienen una amplia variabilidad que se conserva *ex situ* en bancos de germoplasma (**foto 1**). Los más importantes están en Japón, China, EE.UU., Francia y España. El banco del IVIA es el único que tiene un programa de eliminación de patógenos de todos los genotipos mediante la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* y solo conserva plantas sanas (Navarro *et al.*, 2005b).

Esta amplia variabilidad es útil para programas de mejora de portainjertos esencialmente dirigidos a obtener nuevos genotipos resistentes o tolerantes a estreses bióticos y abióticos. Sin embargo, pocas especies son comestibles, por lo que su utilización para mejorar la calidad de las variedades es muy difícil. Sin embargo, las especies cultivadas proceden de híbridos ancestrales que se han mantenido con una escasísima variabilidad genética gracias a la apomixis y la propagación vegetativa y en las que la diversificación varietal se ha producido por acumulación de mutaciones sin intervención de la recombinación sexual. La heterocigosis es generalmente elevada y no se encuentra polimorfismo intervarietal. Con la excepción del grupo de las mandarinas, la variabilidad existente para la mejora de la calidad de las otras especies cultivadas (naranjos, limoneros, pomelos, limas) es muy escasa.

Toda esta problemática obliga a obtener un gran número de híbridos de cada combinación de parentales, cultivarlos durante periodos mínimos de diez años para iniciar una evaluación eficaz y normalmente eliminar la gran mayoría

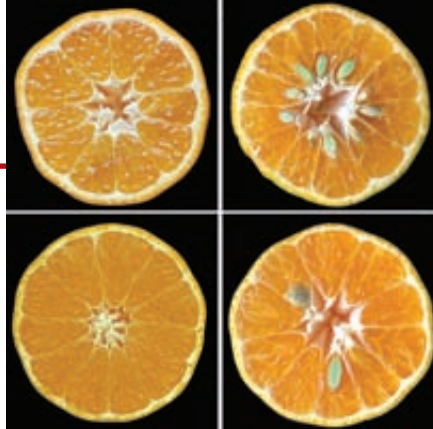


Foto 7. Arriba: frutos de Clementines; abajo: frutos de Nulesin. Izquierda: Frutos producidos en condiciones de aislamiento; derecha: frutos producidos en condiciones de polinización cruzada muy alta.

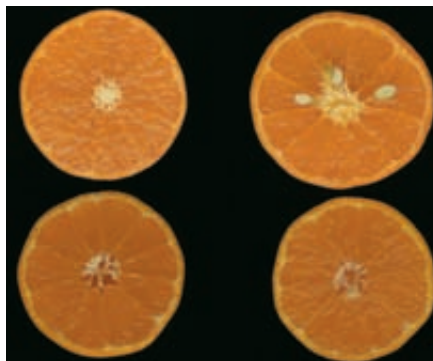


Foto 8. Arriba: frutos de Nadorcott; abajo: frutos de Tango. Izquierda: Frutos producidos en condiciones de aislamiento; derecha: frutos producidos en condiciones de polinización cruzada.

porque no reúnen los caracteres deseados.

Debido a estas dificultades, no es de extrañar que existan pocos programas de mejora genética en el mundo y que los resultados de los mismos hayan sido escasos, a pesar de que algunos se están realizando desde finales del siglo XIX. El número de variedades cultivadas procedentes de programas de mejora es muy pequeño y ninguna de ellas se cultiva de forma extensiva en el mundo. La práctica totalidad de las variedades cultivadas proceden de selección de mutaciones espontáneas que se producen con relativa frecuencia en los cítricos y en algunos casos de híbridos espontáneos obtenidos por azar. La situación de los patrones es similar y tan solo los citranges Troyer y Carrizo (*Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*), obtenidos en 1909 por casualidad en un programa que tenía como objetivo obtener variedades tolerantes a heladas, son utilizados a gran escala. El resto de los patrones usados extensivamente son especies silvestres de cítricos no mejoradas.

A pesar de estos inconvenientes, en los últimos años ha crecido de forma importante el interés por la mejora de los cítricos, tanto en instituciones de investigación públicas como en empresas privadas, como consecuencia de varios factores:

- ▶ La disponibilidad de diversas biotecnologías basadas en el cultivo de tejidos *in vitro* y en la transformación genética que permiten superar algunos de los problemas de la mejora tradicional y ofrecen nuevas posibilidades que no podían abordarse hasta ahora. Hay que destacar especialmente la puesta a punto de técnicas para la obtención de híbridos triploides sin semillas, para la fusión de protoplastos, para la transformación genética y el desarrollo de numerosos marcadores moleculares. La reciente secuenciación del genoma de un genotipo haploide de clementino de Nules procedente de nuestro laboratorio aportará nuevas herramientas y conocimientos que facilitarán la mejora de los cítricos.
 - ▶ El desarrollo legislativo que da una mayor seguridad a los obtentores, lo que permite a los mismos un mejor control de las variedades protegidas y su explotación para la obtención de regalías que compensen la inversión económica de los programas de mejora, e incluso produzcan beneficios importantes en algunos casos.
 - ▶ Las nuevas formas de explotación de variedades protegidas para limitar la producción de las mismas a la demanda de los mercados, lo que permite obtener precios de venta de fruta elevados que producen beneficios económicos tanto a agricultores como a comercializadores.
- En este trabajo se revisan brevemente las distintas tecnologías usadas actualmente para la mejora genética de los cítricos y se discute la relación de estas tecnologías con las normas derivadas de la normativa legal para la protección de variedades.

Métodos de mejora de los cítricos

Mejora genética por hibridación convencional

A pesar de los inconvenientes de la mejora genética convencional por hibridación sexual indicados anteriormente, se sigue utilizando actualmente en diversos programas de mejora. En el caso de los patrones se puede mencionar el interesante programa que se lleva a cabo el IVIA por el grupo del Dr. Forner, que ha producido varios patrones que se han protegido y que se están empujando a propagar comercialmente.

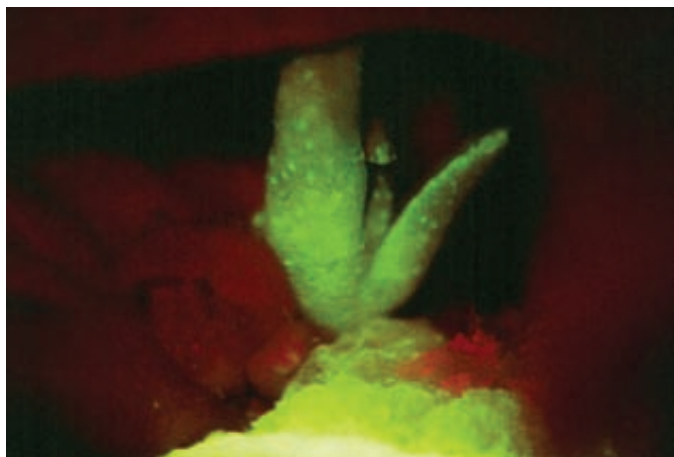


Foto 9. Brote transgénico que contiene el gen *gfp* que produce una proteína que emite fluorescencia verde cuando se observa con luz azul. Las zonas rojas de la foto corresponden a células y brotes no transformados.

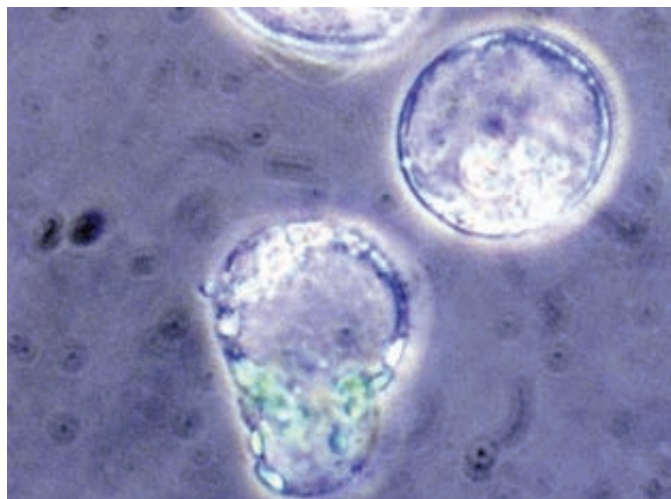


Foto 10. Inicio de la fusión de un protoplasto de hoja y un protoplasto de callo.

La hibridación sexual convencional no se utiliza apenas en la actualidad para la mejora de variedades porque la mayoría de los híbridos diploides son fértiles y en consecuencia producen semillas. Sin embargo, en Japón siguen existiendo programas activos de obtención de mandarinos mediante hibridación convencional. Estos programas están basados en la utilización de parentales partenocárpicos y con esterilidad gamética femenina o masculina y en un profundo conocimiento de la biología reproductiva de los cítricos adquirido en más de un siglo de trabajos sobre el tema. Han obtenido variedades de calidad adaptadas a las características del mercado japonés, como Kiyomi, Setoka y Shiranui (foto 5), que son autoincompatibles y no producen semillas si se cultivan en condiciones de aislamiento o intercaladas con plantaciones de satsuma, que no produce polen viable y que son predominantes en el país. Fruta de alta calidad de alguna de estas variedades alcanza precios astronómicos en mercados de lujo del país.

Selección de mutaciones espontáneas

Los cítricos tienen cierta inestabilidad genética y producen mutaciones espontáneas con cierta frecuencia. La selección de estas mutaciones espontáneas en campo es el método más antiguo y con mayor éxito para la obtención de nuevas variedades. Por ejemplo, la totalidad de las variedades cultivadas de naranjos Navel o Valencia, de satsumas o de clementinas (foto 6) se han producido por este procedimiento. Las mutaciones tie-

nen las características generales de las variedades de origen y cambian aspectos puntuales relacionados fundamentalmente con la época de maduración, el tamaño y otras características de calidad de los frutos. Aunque muchas mutaciones pueden diferenciarse con cierta facilidad por caracteres morfológicos, la variabilidad genética entre las mismas es muy baja, razón por la que normalmente no pueden identificarse mediante marcadores moleculares.

Mutación artificial

La utilización de agentes físicos o químicos para inducir mutaciones en el ADN de las plantas en un procedimiento clásico de mejora que se ha usado en muchas especies para producir variabilidad. Los agentes más usados son los rayos gamma y X y las radiaciones ultravioleta. Las mutaciones inducidas afectan generalmente a uno o pocos genes y se realizan al azar.

En cítricos la mutación artificial se utiliza para intentar modificar caracteres específicos puntuales de variedades existentes. Fundamentalmente se dirige a reducir el número de semillas debido a que la irradiación afecta ocasionalmente a genes relacionados con la reproducción, lo que disminuye la producción de semillas. El procedimiento más usado es muy sencillo, ya que consiste en irradiar varetas con rayos gamma procedentes de una fuente de cobalto con una irradiación total de 30-50 Grays (unidad de medida de la radiación) con dosis de 10 a 50 Grays/minuto (Roose y Williams, 2007). Exis-

ten empresas que realizan este tipo de tratamientos a precios relativamente bajos. Las yemas irradiadas se propagan por injerto y los árboles resultantes se evalúan en condiciones de campo. Obviamente y dado que las mutaciones se producen al azar, sólo en algunas ocasiones se obtienen resultados deseados y se obtiene una variedad derivada de la original con sus mismas características y con menos semillas. Ello implica que hay que evaluar muchos árboles. Además, en ocasiones las mutaciones no son estables y hay reversión a la variedad original, por lo que es necesario comprobar las características no solo en el árbol original, sino en varias propagaciones del mismo.

Actualmente existen algunas variedades producidas por irradiación que tienen interés comercial. Por ejemplo, la variedad Nulesin, obtenida por nuestro grupo mediante irradiación de ápices caulinares de la variedad Clementules (Asins *et al.*, 2002) o la variedad Tango (Roose y Williams, 2006), producida en la Universidad de California por irradiación de yemas de la variedad Nadorcott. En condiciones de cultivo aisladas no existen diferencias entre las variedades originales y las obtenidas por irradiación, ya que ninguna produce semillas. Sin embargo, en condiciones de polinización cruzada las variedades originales producen muchas más semillas que las irradiadas (fotos 7 y 8). Tampoco existen diferencias entre los frutos producidos por las variedades originales en condiciones de aislamiento y los frutos producidos por las variedades irradiadas en cualquier situación de cultivo.

Transformación genética

La transformación genética de plantas ofrece enormes posibilidades de mejora, ya que permite introducir caracteres únicos en genotipos de élite sin alterar su fondo genético. De hecho, la superficie de cultivo de plantas transgénicas está aumentando de forma continua y en 2010 se alcanzaron 148 millones de hectáreas en el mundo, tan solo quince años después del primer cultivo comercial en 1996. El incremento anual de superficie cultivada con plantas transgénicas es superior al 10% en los últimos años y está aumentando tanto el número de países que cultivan estas plantas, como las especies cultivadas y los caracteres de mejora introducidos. Los principales caracteres introducidos mediante transformación genética son la resistencia a herbicidas y a insectos, pero está aumentando la liberación de plantas resistentes a virus y a corto plazo se prevé la liberación de plantas resistentes a sequía y con caracteres relacionados con la salud, como la soja con altos contenidos de Omega-3 o el

arroz dorado con provitamina A. Los principales cultivos transgénicos son las plantas de gran cultivo (soja, maíz, algodón, colza), pero en EE.UU. y China ya se están comercializando papayas y calabacines transgénicos resistentes a virus.

En cítricos se han desarrollado métodos muy eficientes de transformación, fundamentalmente en el IVIA, para la mayoría de las especies cultivadas (Peña *et. al.*, 2008). Para la transformación de cítricos se usa la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, la cual infecta a las plantas en lugares donde hay heridas produciéndoles agallas. En la naturaleza, *Agrobacterium* transfiere un segmento de su ADN a las células vegetales y lo integra en su genoma, es decir, transforma estas células. Actualmente mediante técnicas de ingeniería genética es posible modificar esta bacteria para que introduzca en el ADN de las células vegetales los genes deseados en lugar de los genes de la propia bacteria. Se usan técnicas de cultivo de tejidos para la regeneración de brotes transgénicos

(foto 9), que se injertan para la producción de plantas.

La transformación genética se vislumbra como una de las técnicas de mejora más importantes para la mejora de los cítricos. Actualmente se están realizando importantes proyectos relacionados con la introducción de resistencia o tolerancia al virus de la tristeza y a cancrisis, para controlar el tamaño de los árboles, para inducir una floración precoz que puede producir aumentos de la producción, y para incrementar el contenido de compuestos relacionados con la salud, como carotenoides (β -caroteno y licopeno). También se están realizando grandes esfuerzos de investigación para intentar introducir resistencia al Huanglongbing, ya que la transformación genética es posiblemente la única técnica capaz de conseguir este objetivo.

Para la mejora genética mediante esta tecnología se pueden usar genes procedentes de los propios cítricos, pero también de otras plantas y organismos. La reciente secuenciación del genoma del clementino con-



DÚPLEX TORNADO

LA PERFECCIÓN EN LA PULVERIZACIÓN

Atomizador Dúplex Tornado Torre especial olivar

Atomizador Dúplex Tornado especial cítricos

Modelo patentado

Dos ventiladores de rotación invertida.

Un deflector central móvil crea movimientos oscilantes del aire.

El sistema TORNADO evita la creación de pantallas en el árbol.

Llegará donde otros no pueden llegar.

Con el DÚPLEX TORNADO ahorrará tiempo y dinero.

No hay plaga que se le resista.

Vídeo demostrativo en www.marisan.es



ATOMIZADOR DÚPLEX TORNADO

Evita la formación de pantallas de hojas, permitiendo la entrada del producto nebulizado hasta las zonas más internas y difíciles de los árboles. Versátil para cualquier tipo de cultivo, sea de alta o baja estatura.



ESPECIAL CÍTRICOS



Turbina



Acabado delantero



Fácil regulación de la velocidad Tornado

MODELO POLIÉSTER CON TORRE

Olivar y árboles de gran altura



Acabado delantero



Torre

BALBASTRE Y SANJAIME S.L.

Tel.: 96 225 00 54 • 96 225 03 67 • Fax: 96 292 71 59 • C/ Marxillent, 49. La Pobla del Duc (Valencia) • www.marisan.es • marisan@marisan.es

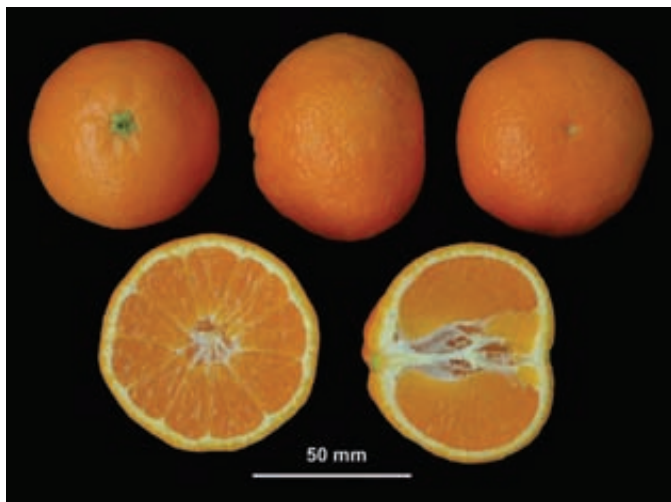


Foto 11. Mandarino Safor, híbrido triploide entre Fortune y Kara.

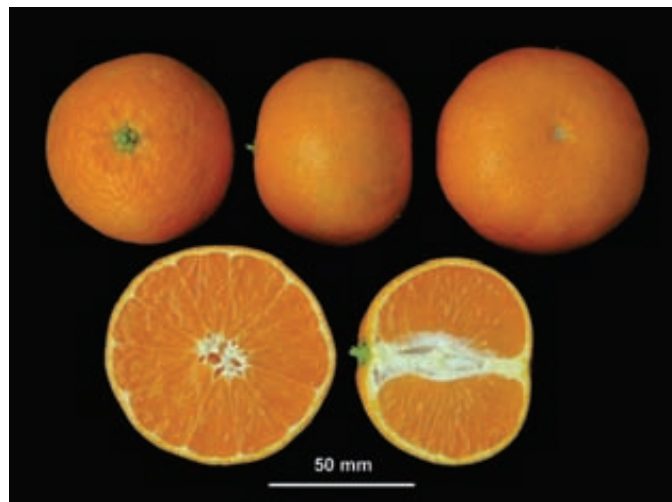


Foto 12. Mandarino Garbí, híbrido triploide entre Fortune y Murcott.

tribuirá sin duda a localizar genes de interés para la mejora mediante transformación.

Para la transformación genética se usan patrones o variedades ya existentes a los que se les realiza una modificación puntual, de forma que el genotipo original y el transformado solo se diferencian en el carácter introducido. Por ejemplo, la fruta de una hipotética variedad resistente a Huanglongbing obtenida por esta técnica sería exactamente igual a la de la variedad original.

Hibridación somática

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. 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, mientras que en la hibridación somática hay una adición de los genomas de ambos parentales para producir un híbrido tetraploide.

En la hibridación somática se aíslan en el laboratorio dos células no sexuales de una

planta, se fusionan, y en unas condiciones de cultivo *in vitro* determinadas se dividen y regeneran los tejidos y órganos de una nueva planta. 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 (Olivares *et al.*, 2005). Por un lado, se aíslan células de hoja, y por otro lado células procedentes de callo nucelar (proliferación celular) originado por cultivo *in vitro* de la nucela que se encuentra en las semillas de los frutos inmaduros de los cítricos. 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 nucleares requiere un proceso mucho más laborioso, que dura al menos un año de cultivo *in vitro* y requiere muchos recursos para su conservación.

Antes de fusionar las células somáticas es necesario eliminar su pared celular mediante enzimas (celulasas, hemicelulasas, pectinasas) capaces de degradar la pared celular, aislando células “desnudas” que se denominan protoplastos. La fusión de los protoplastos se consigue mediante métodos químicos o eléctricos (foto 10). La nueva célula procedente de la fusión, denominada heterocarionte, se cultiva *in vitro* para que se regenere la pared celular, se divida y formen embriones que producen una nueva planta híbrida.

Mediante este proceso se producen híbridos somáticos que contienen toda la in-

formación 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 tienen pues la particularidad de expresar las características de los dos parentales en una única planta con escasa o nula recombinación. De esta forma se supera el problema de la heterocigosis mencionado en la introducción y se simplifica enormemente el proceso de evaluación, ya que todas las plantas procedentes de una única hibridación son prácticamente iguales y en consecuencia hay que evaluar un pequeño número de las mismas.

Esta técnica tiene su principal aplicación en la obtención de nuevos patrones ya que se generan genotipos nuevos que expresan caracteres de ambos parentales. Por ejemplo, un híbrido somático entre citrange Carrizo y *Citrus macrophylla* podría tener la tolerancia a tristeza y la buena calidad de la fruta del citrange y la tolerancia a salinidad y caliza, y la elevada productividad del *C. macrophylla*. Otra aplicación de la fusión de protoplastos es la obtención de parentales tetraploides para la producción de híbridos triploides.

Obtención de híbridos triploides

La obtención de variedades sin semillas es el único objetivo de mejora de la calidad que se puede abordar de forma dirigida con la tecnología y conocimientos contrastados en cítricos actualmente existentes. La partenocarpia es necesaria para la formación de

frutos sin semillas, pero este carácter está ampliamente presente en el germoplasma de cítricos.

La gran mayoría de los cultivares de cítricos son diploides ($2n=2x=18$), aunque variantes poliploides, particularmente triploides y tetraploides, se encuentran de forma espontánea. A nivel diploide la ausencia de semillas en los cítricos está asociada a caracteres de esterilidad masculina y femenina y de autoincompatibilidad. La esterilidad masculina se produce por aberraciones cromosómicas, por aborto de anteras o por degeneración de los granos de polen. La esterilidad femenina es heredable y en algunos genotipos como las satsumas parece que esté controlada por más de dos genes principales. La autoincompatibilidad en cítricos es de tipo gametofítica y está presente en la mayoría de los genotipos de pummelo, de clementino y en muchos híbridos.

La producción de fruta sin semillas de forma regular en las plantaciones de cítricos sólo está garantizada en los casos en que simultáneamente una variedad tenga esterilidad masculina y femenina, como sucede con los naranjos del grupo navel y con las satsumas. Las variedades con un solo tipo de incompatibilidad o con autoincompatibilidad pueden causar problemas de formación de semillas por polinización cruzada cuando se cultivan en plantaciones cercanas a otras con variedades compatibles. En la práctica, es muy difícil realizar programas de mejora dirigidos a la obtención de variedades que incorporen esterilidad masculina y femenina, ya que no existen suficientes conocimientos ni fuentes de variabilidad para estos caracteres.

Los híbridos triploides ($3x=27$) son la mejor solución al problema de la formación de semillas en los cítricos. Las plantas triploides están asociadas a esterilidad masculina y femenina y tienen muy baja fertilidad, debido a que en la meiosis se originan asociaciones multivalentes y como consecuencia se producen gametos, tanto femeninos como masculinos, con distintas dotaciones cromosómicas que reducen la viabilidad de los mismos. Por ello normalmente no producen semillas ni inducen la formación de semillas en otras variedades por polinización cruzada.

Se conoce desde los años setenta del pasado siglo que los híbridos triploides de cítricos ($3x=27$) se pueden obtener mediante hibridación sexual entre parentales diploides y tetraploides y de forma espontánea en cruzamientos entre parentales diploides como consecuencia de la formación de gametos femeninos no reducidos. En todos los casos se usan parentales femeninos monoembrionicos para evitar los efectos desfavorables de la apomixis indicados anteriormente.

Hasta hace poco tiempo estos conocimientos no tenían aplicaciones prácticas debido a tres grandes problemas para obtener poblaciones elevadas de híbridos triploides. Los embriones triploides se encuentran normalmente en semillas pequeñas o en semillas de tamaño normal pero parcialmente abortadas, que raramente germinan incluso en las mejores condiciones de invernadero. El análisis del nivel de ploidía de plantas de cítricos por métodos histológicos clásicos es extremadamente lento y poco eficaz, por lo que no puede aplicarse a grandes poblaciones. Finalmente, existen muy pocos genotipos tetraploides de calidad que puedan usarse para las hibridaciones interploides. Por estas razones se ha tardado mucho tiempo en incorporar los conocimientos sobre obtención de triploides en programas de mejora amplios.

Estos problemas se han podido resolver mediante biotecnologías

UniRam®

Tubería integral autocompensante de pared gruesa de última generación.

Con UniRam te aseguras la calidad del riego durante toda la vida de tu árbol.

Diseñado para el riego en cítricos con aguas superficiales.



Regaber

www.regaber.com

basadas en el cultivo in vitro para la germinación de embriones y la obtención de parentales tetraploides y en el análisis de ploidía mediante citometría de flujo, lo que ha permitido a nuestro grupo el establecimiento de un amplio programa de mejora para la obtención de mandarinos triploides sin semillas que se inició en 1996 (Navarro et al, 2007). Hasta el momento se han obtenido más de 4.600 triploides mediante cruzamientos 2x X 2x, más de 4.300 triploides de cruzamientos 2x X 4x y más de 4.700 triploides de cruzamientos 4x X 2x de un total de 300 combinaciones de parentales diferentes. La evaluación de las poblaciones de triploides ha permitido hasta el momento la selección de 14 variedades que se han protegido y dos de ellas, Safor (**foto 11**) (Cuenca et al., 2010) y Garbí (**foto 12**) (Aleza et al., 2010) ya se están propagando comercialmente. Son variedades tardías de elevada calidad organoléptica que no producen semillas.

Relaciones entre las leyes de protección de variedades y los métodos de obtención

El régimen jurídico de protección de las obtenciones vegetales está regulado en la Unión Europea por el Reglamento (CE) 2100/94 del Consejo de 27 de julio y en España por la Ley 3/2000 de 7 de enero y modificaciones posteriores, que armoniza la legislación sobre el tema. La Ley tiene como objetivo fundamental el reforzamiento de los derechos de los obtentores y define con precisión las facultades de los mismos relativas a la explotación de sus variedades protegidas. También define con claridad las limitaciones al derecho del obtentor, entre las que se encuentra la denominada "excepción del agricultor" (que no afecta a los frutales) y la utilización de variedades protegidas para la creación de nuevas variedades.

Este último aspecto es el más relacionado con el presente artículo. La Ley permite la utilización de variedades protegidas para la creación de nuevas variedades sin el permiso del obtentor con el fin de evitar limitaciones a la investigación en este campo. Sin embargo, en el caso de que las nuevas variedades sean esencialmente derivadas de la original, se requiere la autorización del obtentor de la variedad original para todos los aspectos relacionados con la comercialización de la variedad derivada. En este

sentido se considera que una variedad es esencialmente derivada de otra variedad inicial, cuando tenga las siguientes características:

- a) Se deriva principalmente de la variedad inicial, o de una variedad que a su vez deriva principalmente de la variedad inicial, conservando al mismo tiempo las expresiones de los caracteres esenciales que resulten del genotipo o de la combinación de genotipos de la variedad inicial.
- b) Se distingue claramente de la variedad inicial.
- c) Se distingue claramente de la variedad inicial y, salvo por lo que respecta a las diferencias resultantes de la derivación, es conforme a la variedad inicial en la expresión de los caracteres esenciales que resulten del genotipo o de la combinación de genotipos de la variedad inicial.

En otras palabras, se considera que una variedad es esencialmente derivada de otra cuando mantiene todos sus caracteres y solo se diferencia de la misma por el carácter diferencial introducido.

Los métodos de mejora descritos se pueden dividir en dos grupos. Por una parte están los que permiten crear una nueva variedad por recombinación o expresión de los caracteres de los parentales usados para su creación. En este grupo se encuadran la hibridación convencional, la hibridación somática y la hibridación a nivel triploide. Las plantas obtenidas por estos procedimientos presentan solo algunas de las características de los parentales, por lo que no son esencialmente derivadas. Ello implica que para la obtención de nuevas variedades por estos métodos se pueden usar variedades protegidas como parentales sin la autorización sus obtentores y que las nuevas variedades obtenidas también se pueden comercializar sin su autorización.

El otro grupo de métodos incluye la mutación espontánea, la mutación artificial y la transformación genética. La esencia de estos métodos es la utilización de una variedad previamente existente y modificarla puntualmente para eliminar algún defecto o añadir alguna propiedad de interés, pero manteniendo esencialmente las características de la variedad inicial. Esto implica que la mayoría de las nuevas variedades obtenidas por estos métodos se pueden considerar variedades esencialmente derivadas y no pueden comercializarse sin la autorización del obtentor de la va-

riedad inicial. Algunos ejemplos mencionados anteriormente, como mutaciones espontáneas de clementinas, las variedades irradiadas Nulesin y Tango, o una hipotética variedad resistente a Huanglongbing obtenida por transformación genética, serían variedades esencialmente derivadas. Obviamente, para la aplicación de estas técnicas de mejora es recomendable la utilización de variedades iniciales de dominio público o la autorización previa de los obtentores de las variedades iniciales para evitar problemas en la comercialización de las variedades obtenidas. ●

Bibliografía ▼

- ▶ Aleza, P., Cuenca, J., Juárez, J., Pina, J.A., Navarro, L. 2010. 'Garbí' mandarin, a new late-maturing triploid hybrid. *HortScience* 45:139-141.
- ▶ Asins, M.J., Juárez, J., Pina, J.A., Puchades, J., Carbonell, E.A., Navarro, L. 2002. Nulesin, una nueva clementina. *Levante Agrícola* 359:36-40.
- ▶ Cuenca, J., Aleza, P., Juárez, J., Pina, J.A., Navarro, L. 2010. 'Safor' mandarin: a new mid-late citrus triploid hybrid. *HortScience* 45:977-980.
- ▶ Navarro L., Juárez J., Aleza P., Pina J.A. 2003. Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from 2n x 2n and 2n x 4n crosses by embryo rescue and flow cytometry, pp.541-544. In I.K. Vasil (ed.), *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*, Kluwer Acad. Pub., Dordrecht.
- ▶ Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P., Cuenca, J., Julve, J.M., Pina, J.A. 2007. Nuevas variedades triploides de mandarinos de maduración tardía. *Vida Rural* 257:30-35.
- ▶ Navarro L., Juárez J., Aleza P., Pina J.A., Olivares-Fuster O., Cuenca J., Julve JM. 2005a. Programa de obtención de híbridos triploides de mandarina en España. *Phytoma* 170: 97-104.
- ▶ Navarro, L., Pina, J.A., Juárez, J., Arregui, J.M., Ortega, C., Navarro, A., Ballester-Olmos, J.F., Vives, M.C., Montalt, R., Duran-Vila, N., Guerrí, J. Moreno, P., Cambra, M., Medina, A., Zaragoza, S. 2005b. El programa de mejora sanitaria de variedades de cítricos en España: 30 años de historia. *Phytoma* 170: 66-79.
- ▶ Peña, L., Cervera, M., Fagoaga, C., Romero, J., Ballester, A., Soler, N., Pons, E., Rodríguez, A., Peris, J., Juárez, J., Navarro, L. 2008. Citrus, pp. 1-62. In: C. Kole and T.C.Hall (eds.), *Compendium of Transgenic Crop Plants: Vol. 5, Transgenic Tropical and Subtropical Fruits and Nuts*, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- ▶ Roose, M.L., Williams, T.E. 2006. A new seedless mid-late season irradiated selection of W. Murcott mandarin developed by the University of California Citrus Breeding Program. <http://www.plantbiology.ucr.edu/faculty/Tango%20Information%20Sheet-4-12-009.pdf>
- ▶ Roose, M.L., Williams, T.E. 2007. Mutation breeding, pp. 345-352. In: I. Khan (ed.), *Citrus Genetics, Breeding, and Biotechnology*. CAB International Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.