

Aplicaciones de la biotecnología para la mejora de los cítricos

El control del material vegetal de cítricos tiene un carácter estratégico para España

Actualmente, todos los nuevos patrones y variedades que se están produciendo en el mundo se someten a procesos de patente y su utilización está muchas veces restringida por intereses comerciales. Además, en diversos países como EE.UU., Japón, Israel, Francia e Italia se están realizando grandes esfuerzos en la aplicación de nuevas biotecnologías para la mejora de los cítricos y las tecnologías desarrolladas también serán objeto de patente.

L. Navarro, J. Juárez, O. Olivares-Fuster, P. Aleza, J.A. Pina, J.F. Ballester-Olmos, M. Cervera, C. Fagoaga, J. Durbán, R.M. Pérez, L. Peña.

Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).

Los cítricos son el principal cultivo frutal en España, con una superficie total de cultivo cercana a las 300.000 ha y una producción en aumento que se acerca a los 6 millones de toneladas. Somos el cuarto país productor del mundo y el primer país exportador de fruta fresca. Actualmente se vende en el exterior aproximadamente el 50% de la producción, con unos ingresos de unos 2.000 millones de euros anuales.

El mantenimiento de la producción y la competitividad de este sector depende en gran medida de la disponibilidad de material vegetal de alta calidad, tanto en variedades como en patrones. Las variedades suponen sin ninguna duda la principal prioridad de los citricultores españoles, que son un ejemplo a escala mundial en cuanto a la adaptación de la producción a las demandas de los mercados internacionales. La posición de liderazgo que ha mantenido hasta el momento nuestra citricultura en relación con la exportación de fruta fresca se debe en gran medida a la dinámica varietal, que ha experimentado una importante evolución y que ha permitido ofrecer en los mercados internacionales las mejores variedades existentes en cada momento a precios competitivos. Sin embargo, la competencia en estos mercados está aumentando de forma espectacular en los últimos años debido a distintos factores, entre los que se puede citar la mejora de calidad con costes inferiores de la producción de países terceros, la mayor eficacia y rapidez de los medios de transporte marítimo a largas distancias, la apertura de los mercados como consecuencia de los acuerdos sobre Globalización y la PAC de la Unión Europea.

La mejora sanitaria y genética de los cítricos por métodos convencionales tiene enormes dificultades debido a las características de los patógenos que los afectan y a su compleja biología reproductiva. Las biotecnologías basadas en el cultivo de tejidos in vitro presentan grandes posibilidades para la mejora sanitaria y genética de los cítricos, ya que permiten superar muchos de los

problemas de los métodos tradicionales y ofrecen nuevas posibilidades que no podían abordarse hasta ahora. En este trabajo se hace una breve descripción de las aplicaciones de estas tecnologías para la mejora de los cítricos que un amplio grupo de investigadores está realizando en el IVIA.

Mejora sanitaria

La presencia de enfermedades causadas por virus y viroides era hasta hace unos años la principal limitación de las variedades españolas, ya que causaban una disminución de la cantidad y calidad de los frutos producidos e impedían la utilización de los portainjertos mejor adaptados a las condiciones de cultivo. La puesta a punto de la técnica de microinjerto de ápices caulinares in vitro y su aplicación para la realización de un amplio programa de saneamiento por nuestro grupo ha resuelto el problema. En la actualidad todas las variedades españolas propagadas por los viveros comerciales están libres de los patógenos conocidos.

La necesidad de disponer de las mejores variedades existentes en otros países llevó igualmente a nuestro grupo a establecer un nuevo procedimiento de cuarentena basado nuevamente en técnicas biotecnológicas de cultivo in vitro. El procedimiento permite importar variedades sin el riesgo de introducir nuevas plagas y enfermedades. Mediante este procedimiento se han importado más de 200 especies y variedades que se han puesto a disposición de los viveristas de cítricos.

Los programas de saneamiento y cuarentena han permitido el establecimiento de un banco de germoplasma constituido por cerca de 470 genotipos, que contiene el material inicial para la propagación comercial de todos los viveros de cítricos españoles. A partir de este banco de germoplasma, los viveros han suministrado a los agricultores alrededor de 100 millones de plantas desde 1982, lo que representa cerca del 80% de la citricultura española y una superficie de más de 200.000 hectáreas. Estas plantas sanas producen más fruta y de mayor calidad que las plantas originales infectadas, lo que da idea de la importancia de este programa. La técnica del microinjerto (**Foto 1**) se está utilizando actualmente en la mayoría de los países citrícolas del mundo y es el desarrollo de I+D de los últimos 50 años que ha tenido un mayor impacto en la citricultura española y mundial.

Mejora genética

A pesar de la amplia colección de variedades disponibles para la propagación comercial en España, existen lagunas importantes en algunas especies, por lo que es necesario abordar programas de mejora para la obtención de nuevas variedades. En todas las especies cultivadas es necesario disponer de variedades más productivas y de mayor calidad que maduren a lo largo de toda la campaña, como única forma de mantener la competitividad en los

mercados internacionales ante las crecientes demandas de los consumidores de fruta de mayor calidad a precios estables.

Los patrones también presentan una importante problemática en la citricultura española, ya que hay muy pocos genotipos que se adapten a nuestras condiciones de cultivo y no existen genotipos adecuados para suelos con elevados contenidos de caliza o sales minerales.

La problemática planteada debería intentar resolverse mediante programas de mejora genética. Sin embargo, la mejora genética tradicional tiene problemas muy importantes en los cítricos, debido a diversos factores entre los que destacan su biología reproductiva compleja, la embrionía nucelar (apomixis parcial), la elevada heterocigosis, el desconocimiento genético básico sobre la herencia de la mayoría de los caracteres agronómicos de interés y el periodo juvenil prolongado. 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.

Los desarrollos espectaculares de diversas técnicas de biotecnología que se han producido en los últimos años están cambiando las perspectivas de mejora genética. En el caso concreto de los cítricos, la puesta a punto de estas tecnologías es mucho más rápida que en otras especies leñosas y ya se están iniciando programas de mejora basados en las mismas en varios países, incluyendo España. Entre estas técnicas cabe destacar las basadas en técnicas de cultivo de tejidos, como la variación somaclonal, la hibridación somática, el cultivo de embriones de semillas abortadas y la transformación genética. Estas biotecnologías presentan grandes posibilidades para la mejora genética de los cítricos, ya que permiten superar algunos de los problemas de la mejora tradicional y ofrecen nuevas posibilidades que no podían abordarse hasta ahora.

Variación somaclonal

Algunas especies de cítricos son genéticamente inestables y producen mutaciones espontáneas con cierta frecuencia. La mayoría de las mutaciones tienen caracteres perjudiciales, pero algunas pueden presentar características deseables para el cultivo. El estudio y selección de estas mutaciones ha sido hasta ahora el origen de la mayoría de las variedades cultivadas. Algunos grupos de variedades son especialmente inestables lo que favorece la aparición de nuevos cultivares. Como ejemplos se pueden citar las naranjas de tipo navel y las clementinas. A pesar del importante papel de las mutaciones espontáneas, es evidente que la mejora genética de los cítricos debe además realizarse de forma dirigida, ya que no podemos simplemente esperar que se produzcan mutaciones que resuelvan nuestros problemas.

La variación somaclonal (formación de plantas mutantes) obtenida mediante cultivo in vitro es una tecnología de importancia

creciente en mejora genética y en el caso de los clementinos, que son bastante inestables, puede permitir la obtención de un elevado número de mutantes. Si el procedimiento funciona correctamente, puede permitir reproducir de forma más controlada los fenómenos naturales que han originado las variedades cultivadas. En los trabajos actualmente en ejecución se están obteniendo plantas mediante los procesos de embriogénesis somática y de organogénesis adventicia, procedimientos que favorecen la variación somaclonal. Además, se han utilizado sustancias mutagénicas y radiaciones gamma para potenciar la variación.

Obtención de híbridos triploides mediante rescate de embriones in vitro

Una condición básica que deben tener las variedades de cítricos dedicadas al consumo en fresco es la carencia de semillas. Para ello, las variedades deben ser autoincompatibles y además no presentar problemas de polinización cruzada con otras variedades. Estos caracteres son extraordinariamente difíciles de incorporar en nuevas variedades, ya que entre otras razones se desconocen cuáles son los mecanismos genéticos que los controlan.

Una alternativa con gran potencial es la obtención de híbridos triploides, con 27 cromosomas en vez de los 18 de las variedades normales diploides. Las plantas triploides son generalmente estériles y en consecuencia no producen semillas, ni siquiera por polinización cruzada. Esto es debido a que en la meiosis los gametos reciben distinto número de cromosomas, lo que causa esterilidad y en consecuencia no producen semillas o éstas abortan en su mayoría. Además, estas plantas no presentan problemas de polinización cruzada con otras variedades. Las variedades triploides pueden obtenerse mediante los siguientes procedimientos:

a) Cruzamientos entre parentales diploides y tetraploides. Esta aproximación está limitada por el escaso número de parentales tetraploides disponibles y porque la mayor parte de las semillas procedentes de los cruzamientos abortan. El problema del

aborto de semillas se puede solucionar actualmente mediante el cultivo in vitro de los embriones procedentes de las semillas abortadas, de las que en muchos casos se puede extraer un pequeño embrión que es viable en condiciones de cultivo in vitro. Mediante este procedimiento se han obtenido en el IVIA más de 2.000 híbridos triploides, a partir de cruzamientos entre parentales monoembrionarios diploides, como las clementinas y algunos parentales tetraploides disponibles. Recientemente, hemos obtenido clementinas monoembrionarias tetraploides, lo que amplía enormemente las posibilidades de este tipo de cruzamientos.

b) Recuperación de triploides espontáneos. En cítricos se ha descrito hace tiempo que ocasionalmente se producen embriones triploides después de la hibridación de dos parentales diploides. El origen de estos triploides no está claramente demostrado y su formación depende de los genotipos. Hasta hace poco tiem-



Foto 1. Microinjerto de un apice caulinar de naranjo dulce sobre el portainjertos citrange Troyer al cabo de 6 semanas de cultivo.

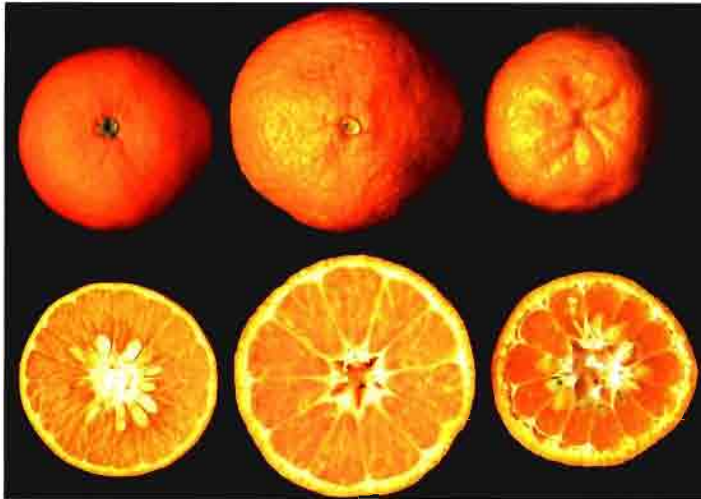


Foto 2. Centro: Híbrido triploide 96-31 obtenido por cruzamiento entre mandarino Fortune (izquierda) y mandarino Común (derecha).

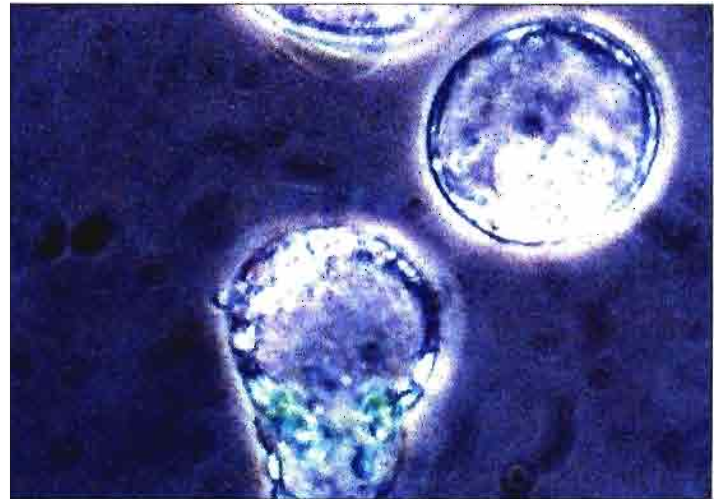


Foto 3. Inicio de la fusión de protoplastos de dos genotipos de cítricos.

po esta observación no tenía implicaciones prácticas, ya que las semillas con embriones triploides generalmente abortan y no dan lugar a plantas. Recientemente ha sido posible el aislamiento y cultivo de embriones de semillas abortadas, que después de la germinación dan lugar a plantas triploides en porcentajes variables. Esta aproximación tiene la ventaja de que el número de parentales que pueden utilizarse se amplía enormemente, lo que permite la elección de los mismos sobre la base de sus características agronómicas. En el IVIA se está utilizando el sistema en un programa muy ambicioso que ya ha permitido obtener más de 3.500 híbridos triploides entre parentales que incluyen las variedades con mejores características agronómicas en España.

Los híbridos obtenidos están actualmente en fase de evaluación en campo (**Foto 2**) y ya se han seleccionado algunos que producen frutos de excelente calidad y que podrán distribuirse a los agricultores a corto plazo.

Hibridación somática

Esta técnica permite la obtención de híbridos somáticos mediante la fusión de protoplastos (células sin pared celular) procedentes de dos parentales distintos. Como fuentes de protoplastos se utilizan distintos tipos de tejidos. De un parental se usa un callo embriogénico obtenido por cultivo in vitro de óvulos y del otro se usan trocitos de hoja. En ambos casos los tejidos se someten a un tratamiento con distintos enzimas que tienen como objetivo separar las células y posteriormente digerir la pared celular de las mismas, dando lugar a los protoplastos. La fusión de los proto-

plastos se realiza mediante la adición de productos químicos, que favorecen su aglutinación o mediante un tratamiento con corriente eléctrica que también favorece la unión de los mismos. El proceso de fusión da lugar a una célula híbrida que con los tratamientos in vitro adecuados es capaz de regenerar una nueva pared celular, dividirse, formar callo y embriones, que por germinación dan lugar a plantas que son híbridos somáticos (**Foto 3**). La ventaja de los híbridos somáticos es que incorporan los genomas de los dos parentales, por lo que deberían manifestar los genes dominantes de ambos y además, no presentan la dispersión genética típica de los híbridos obtenidos por hibridación sexual. Por ello, es posible reunir en un único genotipo los caracteres de interés de ambos parentales. Esta tecnología se está usando en el IVIA con los siguientes objetivos:

a) Obtención de híbridos somáticos entre patrones conocidos. El objetivo es incorporar en una sola planta los caracteres deseados de dos patrones distintos. Por ejemplo, la fusión entre naranjo amargo y un patrón resistente a tristeza podría dar lugar a un nuevo patrón tolerante a la enfermedad con las excelentes características agronómicas del naranjo amargo.

b) Obtención de cíbridos somáticos. La fusión de protoplastos con el núcleo inactivado de un parental con protoplastos intactos de otro permite obtener cíbridos, híbridos citoplasmáticos que poseen el núcleo de un parental y el genoma organular de ambos, su mezcla, o un nuevo fruto de procesos de recombinación génica. Se pretende obtener cíbridos que permitan estudiar por primera vez en cítricos las relaciones núcleo/citoplasma y la influencia del

CONCLUSIONES

El control del material vegetal de cítricos tiene un carácter estratégico para España. Actualmente, todos los nuevos patrones y variedades que se están produciendo en el mundo se someten a procesos de patente y su utilización está muchas veces restringida por intereses comerciales. Además, en diversos países como EE.UU., Japón, Israel, Francia e Italia se están realizando grandes esfuerzos en la aplicación de nuevas biotecnologías

para la mejora de los cítricos y las tecnologías desarrolladas también serán objeto de patente. En la actualidad, el nivel de desarrollo de estas técnicas en España es globalmente similar o superior al de otros países. Este nivel hay que mantenerlo y continuar con la aplicación de las mismas al desarrollo de nuevos genotipos para evitar que en el futuro el material vegetal de cítricos de nuestro país dependa en gran medida de investigaciones y

patentes realizadas en el exterior.

Como se ha indicado reiteradamente, la mejora genética de los cítricos es muy compleja y existen diversas metodologías para abordarla, cada una con sus ventajas y sus inconvenientes. Por ello la mejor solución no es apostar por una determinada metodología, sino aplicar todas ellas en programas coordinados que contemplen la mejora de este importante cultivo de forma integrada. ■

genoma citoplasmático sobre caracteres agronómicos en mandarinos, como esterilidad de polen o eficacia energética.

Transformación genética

La modificación de plantas mediante la introducción de genes específicos por diversas técnicas de transformación genética supone uno de los avances científicos más espectaculares de los últimos años. Mediante estas técnicas es posible introducir en plantas genes procedentes de la propia especie, de otras especies de plantas, e incluso genes procedentes de otros organismos como bacterias, levaduras o virus. Estas tecnologías se están utilizando a gran escala para la mejora de plantas, particularmente herbáceas, por grandes compañías privadas, que ya disponen de variedades comerciales. Actualmente se cul-

tivan en el mundo millones de hectáreas de plantas transgénicas, fundamentalmente de maíz, soja y algodón. La transformación genética ofrece enormes posibilidades para la mejora de especies frutales, ya que permite introducir en una variedad un gen que confiera caracteres específicos sin modificar el resto de las características de la misma.

En el IVIA hemos puesto a punto técnicas de transformación de distintas especies de cítricos, que son las más eficientes disponibles a nivel internacional. Además, se ha conseguido por primera vez en especies frutales la transformación de material adulto, lo que permite que las plantas transgénicas fructifiquen en un periodo de 1-2 años desde su obtención.

Para la transformación de cítricos se utiliza la bacteria común del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, que es capaz de infectar

plantas susceptibles y transformar las células infectadas. En esta bacteria se introducen los genes de interés, que posteriormente los transferirá al genoma de los cítricos. El procedimiento de transformación consiste en inocular con la bacteria entrenudos de plantas cultivadas en invernadero y cultivarlos in vitro durante varios días para permitir la transformación de células. Posteriormente los entrenudos se cultivan en medios que permiten la regeneración de brotes a partir de las células transformadas y estos brotes se injertan in vitro para la obtención de las plantas transgénicas.

La disponibilidad de métodos eficientes de transformación está permitiendo introducir genes de interés para evaluar las posibilidades reales de esta tecnología en la mejora genética de los cítricos. Como ejemplo, se puede citar que ya hemos obtenido plantas con mayor resistencia al virus de la tristeza de los cítricos, al hongo del suelo *Phytophthora* y plantas sin periodo juvenil (**Foto 4**). Es previsible que a medio plazo se disponga de genotipos mejorados mediante esta tecnología en diversos aspectos de interés. Su cultivo dependerá de la aceptación por parte del consumidor europeo de los alimentos transgénicos. ■



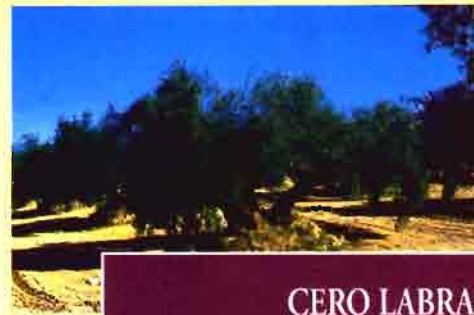
Foto 4. Plantas de citrange Carrizo procedentes de semillas de 13 meses de edad. Izquierda, Planta control. Derecha, planta que expresa el gen APETALA 1 de *Arabidopsis* con floración abundante que indica que no presenta caracteres juveniles.

Le interesa la Agricultura de Conservación

Carlos Crovetto Lamarca

Agricultura de conservación

El grano para el hombre, la paja para el suelo



34,86 €



CERO LABRANZA

Los rastrojos, la nutrición del suelo y su relación con la fertilidad de las plantas

Carlos C. Crovetto



25 €



Carlos Crovetto ha plasmado en estas dos obras su experiencia de más de 30 años de aplicación de estas técnicas en su propia explotación.

Solicite más información a nuestro departamento de suscripciones
(91 426 44 30 o suscripciones@eumedia.es)
o en nuestra web www.eumedia.es.

DESCUENTOS ESPECIALES PARA SUSCRIPTORES