

EL AROMA DE LOS CÍTRICOS: *clave para desarrollar estrategias biotecnológicas contra enfermedades emergentes*

Los progresos de las últimas décadas en las tecnologías de modificación genética y la cantidad creciente de datos genómicos de cítricos y especies afines son esenciales para acelerar los programas de mejora clásica y mejorar caracteres concretos mediante modificación de los genes que los determinan. El uso de estas tecnologías para introducir en variedades comerciales resistencia a plagas y/o enfermedades permite reducir (o incluso eliminar) la dependencia de fitoquímicos para combatirlas, reduciendo el coste económico y ambiental de la producción de cítricos. Frente a los agroquímicos, que pueden derivar en el desarrollo de resistencias, estas nuevas variedades ofrecen una solución duradera en el tiempo.

BERTA ALQUÉZAR, LEANDRO PEÑA

Departamento de Biotecnología y Mejora de Cultivos. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Universidad Politécnica de Valencia (UPV)

El desarrollo de cultivares resistentes a plagas y enfermedades es un objetivo de mejora desde el inicio de la citricultura moderna. Los programas de mejora clásica se basan en el cruzamiento sexual de dos parentales con características deseables y el análisis de la descendencia en busca de híbridos que combinen los rasgos deseados. Aunque mediante esta tecnología se han obtenido numerosos cultivares de mandarinas y portainjertos cítricos comerciales, posee importantes limitaciones, como el largo tiempo (mínimo 5 años para mandarinas, y superior para otros cítricos) hasta poder caracterizar la descendencia. Además, las particulares características reproductivas (esterilidad, incompatibilidad, etc.) de los cítricos hacen que muchos cruzamientos sexuales no sean posibles. Aun siendo

estos viables, en numerosas ocasiones hay que cruzar de nuevo el híbrido seleccionado con uno de los parentales, para recuperar características agronómicas o de calidad de fruta que pueden haberse perdido en el cruzamiento inicial, demorando aún más la obtención de la nueva variedad. La irradiación de yemas también se ha utilizado para generar nuevas variedades de cítricos (como pomelos rojos o mandarinas sin semillas) pero sus resultados ocurren totalmente al azar. En contraposición, las estrategias biotecnológicas de mejora permiten obtener de manera rápida y dirigida (modificando únicamente los caracteres deseado/s) nuevas variedades, independientemente de su capacidad de cruzamiento sexual.

Enfermedades emergentes

Nuestra citricultura afronta un escenario donde conviven enfermedades

históricas ya consolidadas con amenazas emergentes de gran potencial destructivo. Mientras que para las primeras ya existen mecanismos efectivos de control, por ejemplo, para el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) se ha establecido el uso de patrones tolerantes y normativa de control sanitario en viveros, las segundas suponen un riesgo cada vez mayor debido al creciente movimiento mundial de bienes y personas y al cambio climático, que facilitan la entrada y establecimiento de nuevos patógenos. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) mantiene como principal amenaza el Huanglongbing (HLB o “greening”), una enfermedad que ya ha devastado explotaciones en Asia, América y África y que ha llevado a la erradicación de más de 100 millones de árboles en el mundo. La enfermedad, asociada a bacterias del género *Candidatus Liberibacter* (CL) es transmitida de

los árboles infectados a los sanos mediante dos especies de insectos, *Trioza erytreae* y *Diaphorina citri*, ambos presentes en el continente europeo. Otras enfermedades que ocasionan enormes pérdidas y están consideradas por el MAPA como amenazas para nuestra citricultura son la mancha negra y el cáncer de los cítricos, causadas por el hongo *Phyllosticta citricarpa* y la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, respectivamente. Ambas están ampliamente extendidas en diversas regiones de América, África, Asia y Oceanía y son consideradas cuarentenarias en la UE.

Actualmente, el control de las tres enfermedades citadas se basa en vigilancia sanitaria, eliminación de árboles infectados, uso de material vegetal certificado, restricciones y cuarentenas en movimiento de plantas/frutos, control químico y cultural (de insectos transmisores de HLB) y aplicación rotativa de fungicidas para mancha negra. Sin embargo, muchas de estas medidas son costosas, requieren mantenimiento continuo y, en el caso de HLB, no evitan la infección por completo ni la diseminación sistémica del agente causal. Además, el uso de agroquímicos puede conducir al desarrollo de resistencia genética en los organismos patógenos y sus vectores, con lo que perderían su efecto de control al cabo de algunos años. Por ello hay un consenso creciente en la comunidad científica: es imprescindible generar variedades resistentes/tolerantes que reducirían la dependencia de fitosanitarios, limitarían pérdidas económicas y permitirían un manejo más sostenible a largo plazo.

Estrategias biotecnológicas de control

Las estrategias biotecnológicas para combatir el HLB se centran en dos enfoques: (a) manipular las rutas de defensa de los cítricos y (b) introducir moléculas que afecten directamente a la bacteria asociada (CL) o a sus insectos transmisores. En la primera aproximación se ha descrito que la inactivación de genes de los cítricos esenciales para la patogenicidad de

En nuestra citricultura conviven enfermedades históricas ya consolidadas con amenazas emergentes de gran potencial destructivo

CL, conduce a la obtención de plantas que, en laboratorio, presentan menor sintomatología. En relación a la segunda estrategia, la disruptión de genes esenciales para la supervivencia de *D. citri* reducen, también en laboratorio, su supervivencia y su capacidad de transmitir CL. Asimismo, cítricos modificados que producen moléculas antibacterianas serían capaces de reducir la multiplicación bacteriana y la sintomatología en las plantas infectadas. Sin embargo, los ensayos de campo realizados hasta la fecha para valorar estas estrategias son pequeños y sus resultados muy preliminares. En el caso de mancha negra las estrategias abordadas hasta el momento consisten en manipular la acumulación de hormonas señalizadoras de defensa por parte de la planta. Por último, a diferencia de las dos enfermedades anteriores, en el cáncer cítrico la interacción patógeno-huésped está bien caracterizada, y se han identificado genes de susceptibilidad, cuya disruptión mediante edición genómica conduce a la obtención de plantas altamente tolerantes a la infección por *X. citri* en condiciones de laboratorio. Alternativamente, la expresión de genes de resistencia provenientes de otras especies, o de moléculas antibacterianas, reduce el desarrollo de lesiones en condiciones de laboratorio.

En conclusión, para desarrollar variedades resistentes o altamente tolerantes a plagas/enfermedades es esencial una buena caracterización de la interacción planta/patógeno que permita la identificación de genes implicados. Sin embargo, adquirir este nivel de conocimiento sobre cada patosistema requiere una enorme inversión de tiempo y recursos en investigación que, además, no siempre resulta en la obtención de resultados exitosos. Éste es el caso de la mancha negra y del HLB, enfermedades para las que tras décadas y millones de euros invertidos aún no se ha identificado ningún gen de resistencia que pueda emplearse para generar nuevas variedades resistentes a la enfermedad, ni ningún tratamiento 100% eficaz para paliar su sintomatología. La inyección del antibiótico oxitetraciclina en el tronco de los árboles infectados es la única tecnología ampliamente utilizada hoy en día en Florida para aliviar los síntomas que produce el HLB.

En vista de la dificultad de conseguir resistencia a estas enfermedades relevantes de la citricultura, se plantea a continuación una novedosa estrategia de mejora biotecnológica y se resumen los últimos resultados relativos al control de HLB, cáncer cítrico y mancha negra.

Nueva estrategia biotecnológica de control de enfermedades de cítricos

En las últimas décadas, los compuestos volátiles producidos por los seres vivos han recibido una atención creciente en las investigaciones agrícolas, medioambientales y ecológicas debido a sus posibles aplicaciones en el control biológico de plagas y patógenos vegetales. Estos compuestos pueden difundirse en el aire y el suelo, influyendo, a corta y larga distancia, en las interacciones entre las plantas y otros organismos de su entorno. Así, pueden ejercer un efecto atrayente o repelente sobre aquellas plagas y patógenos que usan estímulos olfativos para localizar sus plantas huésped.

En el caso de los cítricos es bien conocido que tienen un perfil aromático

muy característico y, teóricamente atractante para aquellos insectos que ovipositán y/o se alimentan de ellos. Éste es exactamente el caso de la mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*), que es fuertemente atraída por el aroma de las naranjas maduras. Cuando se modifican los genes del naranjo para que no produzca el compuesto volátil mayoritario de la piel de su fruto (el limoneno) la mosca deja de ser atraída por el mismo. Este efecto es además extensible a otros patógenos, como el hongo *Penicillium digitatum* (causante de la podredumbre verde de los cítricos), al que le resulta mucho más difícil infectar las naranjas sin limoneno en la piel. También se ha descrito que estas naranjas con contenido reducido en limoneno son menos susceptibles a la infección por la bacteria causante del cáncer cítrico. Es decir, la modificación de un único gen de naranjo, dirigido a evitar la síntesis de un volátil en la piel del fruto, consigue plantas resistentes a una plaga y dos patógenos con impacto económico. Se trata además de una alteración que, según catas olfativas realizadas por consumidores habituales de zumo de naranja, no deprecia su valor comercial. Análisis posteriores indicaron que, la reducción de infección por *X. citri* de la fruta sin limoneno en la piel se debe, no a la reducción del contenido en limoneno, sino al consecuente aumento relativo del contenido en volátiles alcohólicos, que inhiben el crecimiento de la bacteria. De hecho, naranjas modificadas en las que se induce directamente una mayor producción de volátiles alcohólicos son igualmente resistentes a esta infección bacteriana, y confirman que la modificación de los volátiles de los cítricos puede alterar su relación con plagas/patógenos. Para validar, en condiciones reales de cultivo, la capacidad de control de enfermedades de las naranjas con menor limoneno en la piel, se estableció en Brasil un experimento de campo de 4 Ha en el que se evaluó la incidencia de mancha negra y cáncer durante varios años. Los resultados de la evaluación, en la

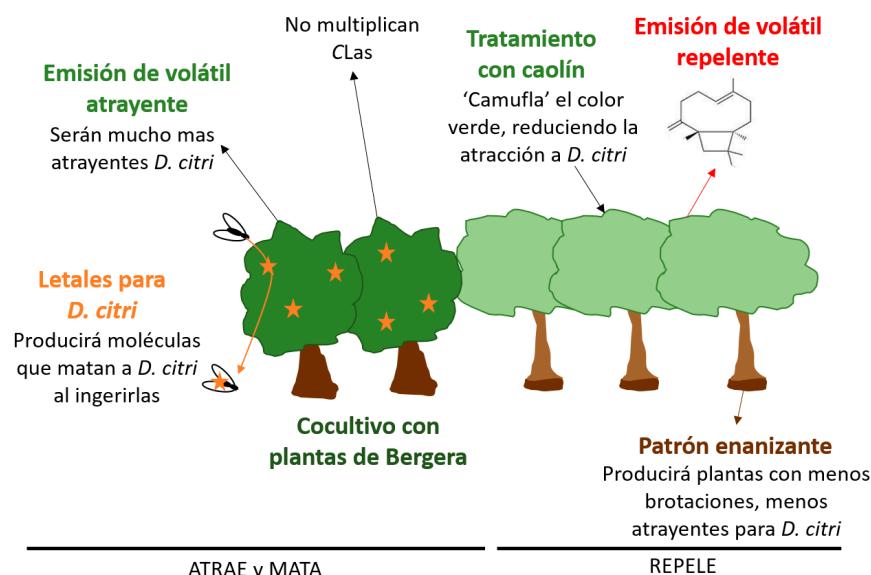


FIGURA 1
Planteamiento de la ‘plantación del futuro’ para controlar el HLB. La parte más externa de la parcela (ATRAE Y MATA) está dirigida a atraer a las poblaciones de *D. citri* y reducir su población utilizando un cultivo modificado en el que no se multiplica CLas (la especie más agresiva asociada al HLB). La parte del cultivo de naranjo (REPELE) se realizaría con naranjos que repelen al insecto, evitando su entrada a la plantación.

que se comparan naranjos modificados y controles, revelaron reducciones de incidencia en los primeros, del 45% en mancha negra y el 68% en cáncer cítrico. Aunque la resistencia generada no es total, el uso de esta estrategia permitiría reducir a la mitad el número de tratamientos fungí/bactericidas que se aplican habitualmente y eliminar la posibilidad de aparición de residuos de estos productos en los zumos de estas frutas.

En el caso del insecto *D. citri*, principal vector del HLB, su atracción por los volátiles de los brotes de los cítricos ha sido comprobada por distintos equipos de investigación. También se ha descrito cómo su mayor/menor atracción por diferentes variedades de cítricos se relaciona con el aroma de las mismas, sugiriendo que, modificando el aroma de una planta se puede modificar la respuesta de este insecto hacia ella. Así, hace unos años se planteó como estrategia modificar el aroma de los naranjos de forma que produjeran más β-cariofileno, un volátil identificado como responsable de que las plantas

de guayaba repelan a *D. citri*, y que es producido en cantidades mínimas por las hojas de cítricos. Inicialmente se realizaron pruebas con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, cuyos volátiles no producen ningún efecto en *D. citri* y que ejerce sobre el mismo una acción repelente cuando se la modifica genéticamente para que produzca β-cariofileno. Comprobado el efecto del volátil se procedió a modificar genéticamente naranjos para que emitieran este volátil, obteniéndose plantas que producen hasta 40 veces más cantidad de β-cariofileno que las no modificadas. Cuando, en ensayos controlados, se estudió la respuesta de *D. citri* a las naranjas modificadas se vio que éstas eran tan repelentes para el psílido como las guayabas. Estas naranjas productoras de β-cariofileno se plantaron en campo en Brasil donde, tras casi 7 años de evaluación en un ensayo de casi 40 Ha, se ha determinado que son mucho menos propensas a infectarse por HLB que las plantas control. Se trata por tanto de la primera estrategia biotecnológica



FIGURA 2

Aspecto de cítricos tratados con caolín. La fotografía corresponde a un ensayo de campo dirigido a evaluar la influencia de este compuesto en el comportamiento de *D. citri*.

gica que ha demostrado ser eficaz en campo para controlar el HLB. A fin de mejorarla y conseguir reducir aún más la incidencia de HLB se plantea el uso combinado de estas plantas repelentes con otras estrategias que han demostrado ser eficaces en condiciones reales de cultivo (**Figura 1**). Una de ellas es tratar las plantas con un polvo blanco derivado de la arcilla llamado caolín (**Figura 2**), de forma que, además de alterar los estímulos olfativos que guían a *D. citri* hacia su huésped, se interfiere también en los estímulos visuales, dificultando aún más su llegada. Además, cultivar las plantas modificadas sobre patrones enanizantes, que reducen el vigor y la capacidad de brotación, contribuiría también a disminuir la atracción del psílido, que tiene predilección por los brotes tiernos. Por último, es bien conocido que la particular forma de desplazamiento de este insecto favorece la infección de los árboles que se encuentran en los bordes de las parcelas. Sustituir estos árboles de los bordes por naranjos convenciona-

les (más atractivos) constituiría una buena manera de concentrar el mayor número de insectos en los mismos, de forma que tratamientos fitoquímicos en estas filas serían suficientes para reducir la población del insecto. Más aún, en lugar de naranjos en estas filas podría plantarse *Bergera koenigii*, de la misma familia botánica que los cítricos, pero mucho más atractivo para *D. citri*. Tiene además la ventaja de que la principal bacteria asociada al HLB (CLas) no puede multiplicarse en ella, de forma que se interrumpe, o como mínimo se disminuye, el ciclo de transmisión de la enfermedad. Además, se está trabajando activamente para transformar genéticamente *B. koenigii*, de forma que produzca moléculas insecticidas de origen vegetal capaces de matar al insecto cuando se alimente de ellas.

En definitiva, el uso de las nuevas herramientas biotecnológicas y genómicas para modificar convenientemente la acumulación de compuestos producidos/emitidos naturalmente por los propios cítricos, u otras plantas, está

abriendo las puertas a la posibilidad de conseguir resistencia/repelencia genética a algunas de las enfermedades más limitantes para el futuro de la citricultura mundial, sin afectar a la calidad de sus frutos y de forma sostenible. Gran parte de las estrategias aquí planteadas se basan en el desarrollo de transgénicos, cuyo cultivo no se autoriza fácilmente en la UE y en otros países. Es por ello que, como alternativa con los mismos fines, se está trabajando en estrategias basadas en otras tecnologías consideradas legalmente como equivalentes a la mejora convencional y más aceptadas por los consumidores, como la cisgenésis (usando genes propios de la planta) o la edición genómica (sin adición de genes), para las cuales la legislación en Europa se prevé que sea mucho más flexible, como ya lo es en el resto del mundo.

Bibliografía

Queda a disposición del lector interesado en el correo electrónico: redaccion@editorialagricola.com