

# Mejora biotecnológica del melocotonero

Las técnicas de ingeniería genética y las de transformación genética de plantas han propiciado la obtención en los últimos años de plantas modificadas genéticamente con nuevas características que representan un importante avance en la producción de nuevas variedades que, conservando sus características, incorporan un nuevo rasgo de interés agronómico. La ingeniería genética permite cambiar en un solo gen el patrimonio genético de una especie cultivada. Las modificaciones que se pueden conseguir no están limitadas por la barrera de la especie, son dirigidas y se pueden obtener de forma más eficaz que las producidas, al azar, por hibridación o mutagénesis. Esta tecnología no se debe ver como una alternativa a la domesticación de las plantas y a las técnicas de mejora tradicional sino como un complemento.

**Luis A. Cañas y José Pío Beltrán** • Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). Laboratorio de Biología del Desarrollo Floral. Ciudad Politécnica de la Innovación. Universidad Politécnica de Valencia

## Figura 1.

Regeneración *in vitro* de plantas de melocotonero a partir de diferentes explanaos: cotiledones inmaduros, cotiledones maduros, discos de hipocótilo, hojas y entrenudos. Las plántulas obtenidas se enraízan *in vitro* y se aclimatan en invernadero.



## Introducción

El ingeniero genético trabaja, en general, sobre variedades ya mejoradas. La ingeniería genética necesita disponer de métodos para identificar y aislar los genes responsables del carácter a modificar. Asimismo, necesita disponer o desarrollar tecnologías de transformación genética no sólo para la especie sino, a veces, para la varie-

dad que se desea mejorar. Sólo si disponemos de los genes adecuados, de las regiones promotoras para dirigir la expresión de los mismos a los órganos o tejidos “diana” y de los métodos de transformación específicos para la especie o incluso la variedad a mejorar, será posible construir estrategias para desarrollar plantas más productivas y con mayor valor nutricional, con un mejor comportamiento frente a condiciones adversas o, incluso, convertirlas en biofactorías para la producción de compuestos de interés farmacológico o médico.

El área total de cultivo dedicada a plantas genéticamente modificadas en el mundo ha sufrido un aumento de 60 veces desde el año 1996 al 2006 (de 1,7 a 102 millones de hectáreas). De hecho, este tipo de plantas han sido utilizadas en 2006 por 10,3 millones de agricultores de 22 países (James, 2006). Sin embargo, hasta el momento sólo se ha comercializado un frutal modificado genéticamente, una papaya resistente al virus PRSV (Lius *et al.*, 1997).

La mejora convencional de frutales de clima templado está bastante limitada por su largo ciclo reproductivo, con periodos juveniles (sin floración) de varios años, por su compleja biología reproductiva y por su alto grado de heterocigosidad. Existen una serie de ventajas ligadas al uso de la transferencia de genes para la mejora biotecnológica de árboles frutales. Por ejemplo, una vez se ha obtenido un transformante con expresión estable del transgén introducido, su propagación vegetativa mediante cultivo *in vitro* nos proporcionaría una producción ilimitada de dicha línea modificada genéticamente. Por otra parte, debido a que la producción de la mayoría de las especies de frutales se basa en unos pocos cultivos, el impacto de transformar uno de ellos sería muy importante. Recientemente se han producido grandes avances en el campo de la transformación de especies leñosas frutales, habiéndose descrito métodos aplicables al manzano, *Prunus spp.* (melocotonero, albarico-

# Expovicaman 07

## XXVII Feria Agrícola y Ganadera de Castilla-La Mancha

Del 17 al 20 de mayo Palacio Ferial del IFAB (Albacete)



quero, almendro, ciruelo, cerezo), cítricos, vid, kivi, olivo, papaya, peral, nogal, caqui, etc. La nota dominante es que la metodología desarrollada para cada especie es muy dependiente del genotipo, siendo la eficiencia de transformación en cada uno de ellos muy variable. Solamente se pueden transformar eficazmente unos pocos genotipos que, generalmente, no son de interés comercial. En este sentido, la regeneración y transformación de variedades de interés comercial debe derivar en un futuro próximo hacia el desarrollo de metodología genotipo independiente que permita de forma rutinaria la transferencia de genes independientemente del cultivar elegido.

El melocotonero (*Prunus persica* L.) es un miembro de la familia de las Rosáceas. Todos los cultivares comerciales pertenecen a la especie *P. persica* (L.) Batsch y generalmente se cultivan en zonas templadas del planeta. Los Estados Unidos, Italia, China, Francia, España y Grecia concentran el 70% de la producción mundial. Es de destacar la importancia que tiene la producción de melocotón precoz en nuestro país. España es el principal productor de melocotón precoz de la UE y la Comunidad Valenciana, junto con zonas de Huelva y Sevilla, concentran la producción nacional.

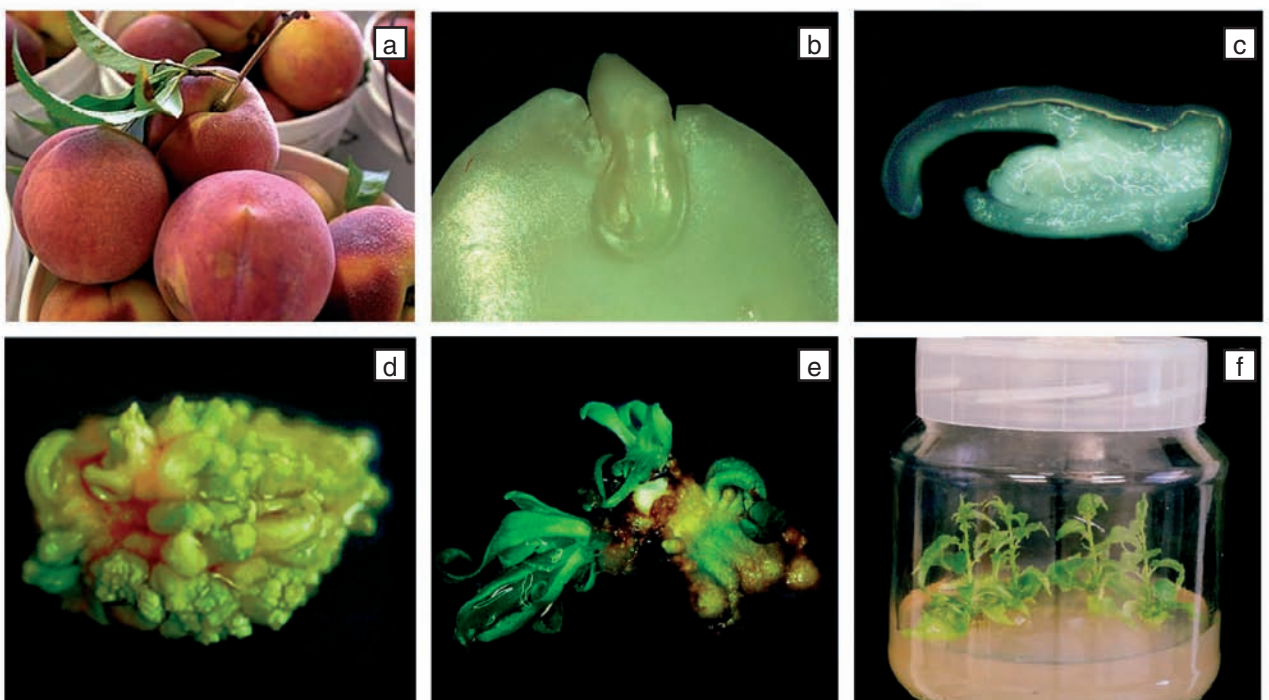
Frente a la ventaja del elevado precio que el agricultor obtiene con las variedades, existe una serie de problemas asociados a las mismas, como son el pequeño calibre del fruto, su escasa dureza con las consiguientes dificultades de manipulación, así como sus limitadas cualidades organolépticas. Por otra parte, se ha estimado en un 45% las pérdidas anuales de este cultivo debidas

fundamentalmente a plagas y enfermedades. Desde el punto de vista de la mejora genética de esta especie, resultaría interesante conseguir un adelanto estacional en la recolección (precozidad) de algunas variedades que, aún teniendo cualidades apropiadas, se están dejando de utilizar debido a su tardía recolección; la reducción del periodo juvenil del árbol (4-5 años) adelantando su floración con objeto de acelerar su entrada en producción; el incremento de aromas y sabor (monoterpenos) de algunas variedades precoces que son bastante insípidas o la obtención de plantas resistentes al virus de la Sharka (PPV) que tiene una fuerte incidencia sobre los Prunus. En este sentido, la utilización de técnicas de transformación genética que permitan la manipulación de un carácter de forma dirigida sin alterar las cualidades de la variedad previamente seleccionada resulta especialmente adecuada.

El principal requerimiento para desarrollar este tipo de programas de mejora es la existencia de un protocolo de transformación genética de plantas eficaz y reproducible. El melocotonero es una especie muy recalcitrante para la transformación genética. En diversos trabajos publicados se da cuenta de la consecución de eventos de transformación bien sea por bombardeo de partículas o por transformación mediada por *Agrobacterium*. Sin embargo, la regeneración de plantas a partir de tejidos transformados y la recuperación de plantas que no sean quimeras presenta gran dificultad. A este respecto, en nuestro laboratorio se ha puesto a punto un método de obtención de plantas de melocotonero modificadas genéticamente a partir de

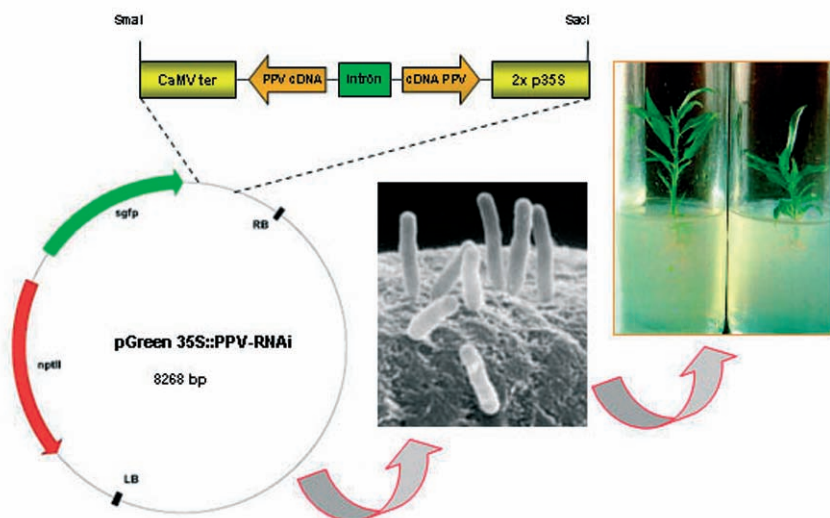
**Figura 2.**

Fases de la regeneración de plantas de melocotonero cv Miraflores a partir de secciones de embriones maduros mediante cultivo *in vitro*.



**Figura 3.**

Proceso de introducción de un nuevo gen en el melocotonero. Estrategia encaminada a la introducción de una construcción genética que produciría en la planta un RNA de interferencia que produciría el silenciamiento génico del virus de la Sharka (PPV) con el objeto de producir plantas resistentes o tolerantes a dicho virus. La construcción portadora del gen se introduce primero en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y esta bacteria transfiere el gen a la planta.



secciones de embrión maduro utilizando la proteína verde fluorescente (GFP) procedente de una medusa como marcador *in vivo* (Pérez-Clemente *et al.*, 2004) que representa un importante avance para la futura mejora biotecnológica de esta especie.

### Desarrollo de un método para la transferencia de genes en melocotonero

La mejora genética de los frutales de hueso mediante métodos clásicos es un proceso lento y difícil debido a los largos periodos generacionales así como al alto grado de heterocigosis de estas especies. La transformación genética está considerada como una herramienta muy prometedora para la mejora de determinados genotipos ya que permitiría manipular caracteres concretos respetando las características del cultivar seleccionado como material de partida. La disponibilidad de protocolos para la regeneración eficiente de plantas *de novo* es un prerrequisito para el desarrollo de técnicas de transformación genética mediada por *Agrobacterium* (Figura 1).

En nuestro grupo hemos puesto a punto un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* y transformación genética a partir de secciones de embriones maduros (Pérez-Clemente *et al.*, 2004) de varios genotipos de melocotonero (*Prunus persica* L.). La regeneración de plantas *in vitro* se inicia con en la obtención de semillas procedentes de frutos maduros (Figura 2a). Las semillas se esterilizan superficialmente con etanol y lejía, se par-

te el endocarpo leñoso y se aísla el cotiledón que porta el embrión (Figura 2b). A continuación el embrión se secciona longitudinalmente en varias láminas y se corta la zona de la radícula (Figura 2c). Las secciones del embrión se colocan sobre un medio de cultivo (MS) que lleva agua, sales minerales, vitaminas, sacarosa y fitohormonas (auxinas y citoquininas) que provocarán primero una proliferación celular formando un callo compuesto de una masa de células indiferenciadas (Figura 2d). Finalmente y mediante una variación en la composición de las fitohormonas, las células del callo se diferencian en meristemos que al crecer desarrollan brotes de tallos y hojas (Figura 2e). Por último esos tallos se separan del callo y se ponen a enraizar en un nuevo medio con auxinas para obtener una planta completa.

En cuanto al proceso de transformación genética, el protocolo seguido es el mismo sólo que una vez obtenidas las secciones de embriones estas son cultivadas en un medio líquido con una bacteria denominada *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria es un "ingeniero genético" natural que es capaz de introducir en la planta genes que una vez integrados en su genoma producen una serie de sustancias que contribuyen a la nutrición y desarrollo de la bacteria. Esto lo consigue gracias a un fragmento de ADN denominado de transferencia (ADN-T) que es capaz de separarse de la bacteria e integrarse en un cromosoma de la planta. La ingeniería genética de plantas se basa en esta propiedad y utiliza dicha bacteria y su ADN-T para transferir nuevos genes a la planta los cuales introducimos en el laboratorio en el trozo de ADN que *Agrobacterium* va a transferir. Los nuevos genes se introducen en el genoma de la planta y son utilizados como si fueran propios de la misma. La procedencia de los nuevos genes introducidos puede ser muy variada pudiendo ser su origen cualquier organismo vivo (Figura 3).

**El área total de cultivo dedicada a plantas genéticamente modificadas en el mundo ha sufrido un aumento de 60 veces desde el año 1996 al 2006**

Para poner a punto la metodología de transferencia de genes al melocotonero, hemos utilizado un gen marcador de selección denominado *sgfp* (GFP: proteína verde fluorescente). Este gen, que procede de una medusa, permite seleccionar aquellos brotes que lo han incorporado observando los cultivos *in vitro* con luz azul, ya que dicha proteína emite luz verde fluorescente al ser iluminada con ese tipo de luz. Este gen es una buena alternativa a la selección mediante genes de resistencia a antibióticos, y bajo el control de un promotor de expresión constitutiva (CaMV35S) se introdujo mediante electroporación en una estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* (C58-pMP90). A continuación la bacteria se usó como vector para introducir el gen en la planta mediante cocultivo con las secciones de embrión. Como se puede apreciar en la **Figura 4**, algunos de los brotes regenerados a partir de los callos cultivados *in vitro* (**Figura 4a**) mostraban fluorescencia verde (**Figura 4d**) en comparación con aquellos brotes que no habían incorporado el gen *sgfp* (fluorescencia roja). Incluso determinadas células de los callos que habían incorporado el gen mostraban la fluorescencia verde muy tempranamente (**Figura 4c**). La fluorescencia verde también era evidente al comparar hojas procedentes de plantas modificadas genéticamente con las de aquellas que no habían incorporado el transgen (**Figura 4e**). A nivel subcelular la GFP se apreciaba en el citoplasma y núcleo de las células modificadas mediante microscopía confocal (**Figura 4f**). Las plantas modificadas seleccionadas se enraizaron *in vitro* (**Figura 4b**) y se aclimataron en invernadero. Tras dos años de cultivo produjeron flores y frutos normales (**Figura 4g**) observándose la fluorescencia de la GFP en raíces (**Figura 4h**), pétalos (**Figura 4i**) o estambres (**Figura 4j**).

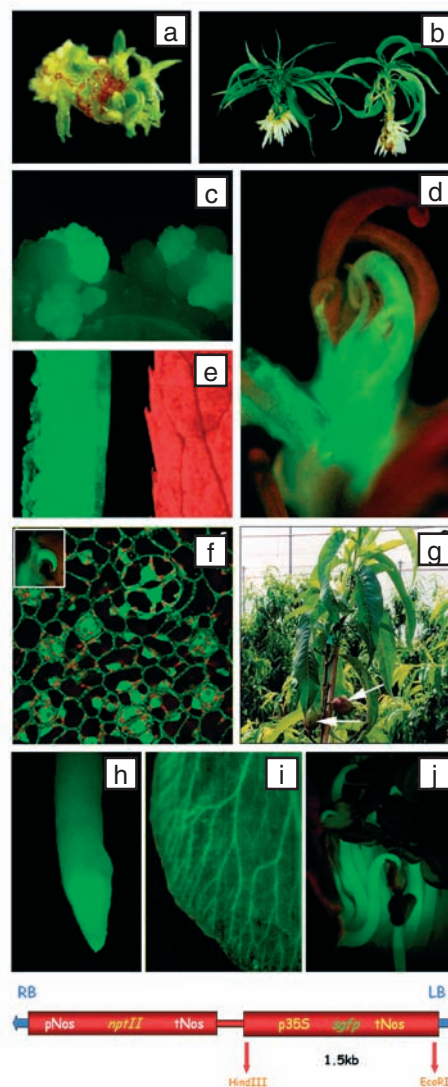
**Aplicaciones biotecnológicas: resistencia/tolerancia al virus de la Sharka, adelanto de la floración e incremento de cualidades organolépticas en frutos precoces**

Actualmente existen herramientas moleculares (genes y promotores) que permiten el abordaje de determinados problemas asociados a la mejora genética del melocotonero como son: retraso del proceso de ablandamiento durante la maduración del fruto, firmeza de la carne, color de la piel, tamaño del fruto, incremento de aromas y sabores, resistencia a enfermedades por virus, bacterias u hongos, tolerancia a estrés hídrico o salino, adelanto de la floración (acortamiento fase juvenil), etc.

En nuestro grupo estamos trabajando para producir plantas resistentes o tolerantes al virus de la Sharka (PPV) utilizando diferentes abordajes de silenciamiento génico mediante construcciones de RNA de interferencia (hpRNA), en el aumento de las cualidades organolépticas de frutos de variedades precoces mediante el uso combinado de promotores de expresión específica en fruto y el gen de la *S-linalol* sintetasa (*LIS*) y en el

**Figura 4.**

Selección de brotes de melocotonero cv Miraflores que han incorporado el gen de la proteína verde fluorescente (GFP).



adelantamiento de la floración para acortar la fase juvenil del árbol y acelerar su entrada en producción.

**Resistencia / tolerancia al virus de la Sharka**

La enfermedad viral que en la actualidad provoca una mayor alarma entre los productores de melocotonero es la enfermedad de la Sharka. La Sharka es una enfermedad de frutales de hueso causada por el virus *Plum Pox Virus* (PPV) y cuya importancia radica no sólo en las pérdidas económicas que produce sino también en el hecho de que se trata del único virus de frutales de hueso que se dispersa de forma natural por pulgones.

Existen dos aislados principales del virus que afectan al

melocotonero; el aislado Dideron (D) o común y el aislado Marcus o (M). Este último resulta especialmente agresivo, con una sintomatología que va desde manchas, anillos y clorosis en nervios de hojas, hasta los anillos depresores y deformaciones externas en los frutos, que suelen caer antes de la madurez (Cambra *et al.*, 2001). Además, los pétalos de las flores de algunas variedades muestran típicos síntomas de decoloración (**Figura 5**).

La mejora tradicional para obtener resistencia a la Sharka se ve dificultada por la escasez de cultivares resistentes y por la naturaleza poligénica de los caracteres de resistencia en los casos estudiados (Badenes *et al.*, 1996). Por medio de las técnicas de transformación de plantas se han desarrollado diversos métodos de inducción de resistencia al virus mediante silenciamiento génico (Guo and García, 1997). Asimismo, se han obtenido algunos resultados en árboles transgénicos de albaricoquero y ciruelo mediante la expresión de proteínas de la cápsida del virus (Scorza *et al.*, 1994; 1995; Ravenolandro *et al.*, 1997).

En los últimos años se han venido desarrollando otro tipo de estrategias para obtener resistencia frente a virus, basadas en el silenciamiento génico mediado por RNA de interferencia (RNAi). Esta técnica se fundamenta en la introducción de RNA de doble cadena en las células que es degradado por la acción de una RNAsa (DICER) en pequeños fragmentos de 21-23 nucleóticos (siRNAs). Estos siRNAs se incorporan al complejo RISC que degrada los mRNA complementarios a los mismos. Se trata de una valiosa herramienta caracterizada por su alta especificidad y gran eficiencia.

En nuestro laboratorio hemos generado las construcciones pGreen CaMV35S::PPV-RNAi y pBin CaMV35S::PPV-RNAi portadoras de un inserto de *hpiRNA* del PPV para inducir la resistencia/tolerancia a la enfermedad tanto en melocotonero como en albaricoquero. Para ello hemos utilizado un fragmento de su genoma (445 pb) que presenta la mayor homología entre las razas D y M, los dos aislados principales del virus, para intentar que el árbol sea resistente frente a las dos.

Cada una de las construcciones ha sido introducida en la cepa C58-pMP90 de *Agrobacterium tumefaciens*. Las construcciones fueron previamente ensayadas mediante expresión transitoria de fluorescencia (GFP) por agroinfiltración de hoja en plantas de *Nicotiana benthamiana* que ha mostrado ser una eficiente planta hospedadora modelo para el estudio de las interacciones planta-virus y de gran utilidad para la caracterización de silenciamiento génico. Con el fin de estudiar la capacidad de estas construcciones para inducir el silenciamiento del virus, se han realizado experimentos de transformación de plantas de *N. benthamiana* con dichas construcciones. Las líneas transgénicas (T2) obtenidas han sido sometidas a bioensayos de resistencia al PPV y se han identificado algu-

nas que presentan resistencia/tolerancia al virus (colaboración con Juan Antonio García, CNB Madrid).

### Incremento de cualidades organolépticas en frutos precoces

El S-linalool es uno de los diez compuestos más importantes que influyen en las cualidades organolépticas de numerosos frutos, aportándoles un aroma dulce, floral y ligeramente alcohólico. También es un componente importante de las esencias florales en muchas especies. El gen que codifica la S-linalool sintetasa (*LIS*), el enzima responsable de la presencia del monoterpeno S-linalool, ha sido aislado y caracterizado en la esencia de las flores de *Clarkia breweri*. Se ha comprobado que los frutos transgénicos de tomate que contienen el gen *LIS* bajo el control de un promotor específico (E8), sintetizan y acumulan S-linalool y 8-hidroxilinalol en frutos maduros, aumentando los compuestos volátiles encargados del aroma sin presentar ninguna otra alteración fenotípica. En nuestro laboratorio se están generando una serie de construcciones que portan el gen *LIS* bajo el control de diversos promotores de expresión específica en las distintas partes del fruto con objeto de intentar modificar la pérdida de sus cualidades organolépticas, una característica bastante común ligada a la producción de melocotones precoces.

### Adelanto de la floración

El conocimiento cada vez mayor de los mecanismos de inducción y desarrollo floral ha permitido la utilización de genes implicados en la regulación de estos pro-

**Un adelanto del proceso de floración traería consigo una entrada más temprana en producción del árbol con el consiguiente beneficio para el agricultor**

**Figura 5.** Síntomas de la infección por PPV en frutos, hojas y flores de melocotonero.



cesos para modificar la respuesta de las plantas en lo que respecta a la transición floral. Un ejemplo interesante, y que implica a una especie de frutal, es el trabajo desarrollado por Peña *et al.* (2001) en el que se consiguió alterar el patrón de tiempo de floración en cítricos mediante la sobreexpresión de los genes *AP1* y *LFY*, genes promotores de la iniciación floral en *Arabidopsis thaliana*. En nuestro laboratorio se han caracterizado diversos genes promotores de la iniciación floral de guisante (Ferrándiz, 1996; Navarro, 2001) y, en concreto, la expresión constitutiva del gen *PsMADS6* se ha demostrado que causa adelanto de floración en otras especies diferentes a las leguminosas como es el caso de Brásicas y Solanáceas (Berbel, 2002), por lo que sería un buen candidato para abordar este objetivo. En el caso del melocotonero el tiempo de generación varía entre cuatro y cinco años según la variedad de que se trate. Un adelanto del proceso de floración traería consigo una entrada más temprana en producción del árbol con el consiguiente beneficio para el agricultor.

### Bibliografía

- Badenes, M.L., Asins, M.J., Carbonell, E.A. y LLácer, G. (1996). Genetic diversity in apricot, *Prunus armeniaca*, aimed at improving resistance to plum pox virus. *Plant Breed.* 115, 133-139
- Berbel, A. (2002) Análisis funcional de genes reguladores del desarrollo floral de guisante (*Pisum sativum* L.) en sistemas heterólogos. Tesis doctoral Universidad de Valencia.
- Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T., Bertolini, E., Olmos, A., Martínez, M.C. (2001) Los frutales de hueso y el riesgo al virus de la Sharka tipo Marcus. *Vida Rural*, nº 139.
- Ferrándiz, C. (1996). Morfogénesis floral de mutantes homeóticos

de *Pisum sativum* L. Aislamiento y caracterización de molecular de genes de la familia MADS. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

Guo, H.S., García, J.A. (1997) Delayed resistance to plum pox potyvirus mediated by a mutated RNA replicase gene: Involvement of a gene silencing mechanism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 160-170.

James, C. (2006). Global status of commercialized transgenic crops: 2003. ISAAA Briefs No.35. International Service for the Acquisition of Agro-biotech Applications (ISAAA) Ithaca, NY.

Lius, S., Manshardt, R.M., Fitch, M.M.M., Slightom, J.L., Sanford, J.C. y Gonsalves, D. (1997). Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against papaya ring-spot virus. *Mol. Breeding* 3, 161-168.

Navarro, C. (2001). Genes reguladores del desarrollo floral en guisante (*Pisum sativum* L.). Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

Peña L., Martín Trillo M., Juárez J., Pina J.A., Navarro L., Martínez-Zapater J.M. 2001. Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in Citrus reduces their generation time. *Nature Biotech.* 19: 263-267.

Pérez-Clemente R.M., Pérez-Sanjuán A., García L., Beltrán J.P., Cañas L.A. 2004. Transformation and regeneration of peach plants (*Prunus persica* L.) from embryo sections using the green fluorescent protein (GFP) as a vital marker. *Molecular Breeding* 14: 419-427.

Ravenolandro, M., Scorza, R., Bachelier, J.C., Labonne, G., Levy, L., Damsteegt, V., Callahan, A.M. y Dunez, J. (1997) Resistance of transgenic *Prunus domestica* to plum pox virus infection. *Plant Dis.* 81, 1231-1235.

Scorza, R., Ravenolandro, M., Callahan, A.M., Cordts, J.M., Fuchs, M., Dunez, J. y Gonsalves, D. (1994). Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Rep.* 14, 18-22.

# RECURSOS FITOGENÉTICOS

# 15 EUROS

+ GASTOS DE ENVÍO

Haz tu pedido en:  
Editorial Agrícola Española S.A.  
c/ Caballero de Gracia, nº 24, 3º Izda.  
28013 Madrid  
Tel.: 91 521 16 33 • Fax 91 522 48 72  
administracion@editorialagricola.com

  
Editorial Agrícola  
Española S.A.

