

Estrategias biotecnológicas para el control del Huanglongbing

Berta Alquézar¹ y Leandro Peña^{1,2}

¹Laboratorio de Biotecnología de Cítricos (IBMCP; CSIC-UPV), Valencia

²Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Pesquisa & Desenvolvimento (Fundecitrus), Araraquara, São Paulo, Brasil

Muchos norteamericanos conocen Florida como el *Orange State* y es común ver en las matrículas de los coches dibujadas un par de naranjas con flores de azahar. Orlando es la capital del *Orange County* y su estadio de fútbol americano es el *citrus bowl*. En el siglo XVI el español Ponce de León plantó los primeros cítricos en San Agustín, desde donde los naranjos se extendieron por casi todo el centro y sur del estado, primero de manera silvestre y luego en huertos comerciales. Durante el siglo XX, con la invención del zumo de naranja industrializado y el desarrollo variedades más productivas, la producción se incrementó exponencialmente generándose una industria billonaria que en 2003/04 implicaba a más de 8.000 productores cultivando unas 225.000 Ha, producía 244 millones de cajas de fruta (de 40,8 kg, estándar de la industria) y daba trabajo a más de 76.000 personas. Lamentablemente, desde la llegada en 2005 de una enfermedad letal para los árboles, esas cifras se han desmoronado produciéndose en 2014/15 96,7 millones de cajas y con previsiones de 69 millones de cajas para 2015/16.

Esta enfermedad recibe el nombre de “Huanglongbing” (HLB; dragón amarillo en chino), se conoce desde hace más de un siglo en China y ha imposibilitado el desarrollo de industrias cítricas competitivas en el sur de China y en el sudeste asiático, donde se encuentra ampliamente diseminada. Se atribuye a una serie de especies de α -proteobacterias gram negativas que reciben los nombres de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. americanus* y *Ca. L. africanus*, según el continente donde primero se detectaron. Viven como parásitos obligados en el floema de las plantas huésped y aún no se han podido cultivar *in vitro*. La transmisión de la enfermedad se transmite a través de insectos chupadores de savia de las especies *Trypza erytrae* (Hemiptera: Trioizidae) en África, y *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Asia y América. El primero se encuentra también en Canarias desde hace años y en 2015 se ha encontrado en Galicia y el norte de Portugal. Afortunadamente, aún no se ha detectado la presencia de la bacteria ni en Canarias ni en la Península Ibérica. En la naturaleza *T. erytrae* transmite *Ca. L. africanus* y *D. citri* transmite *Ca. L. americanus* y *Ca. L. asiaticus*, aunque experimentalmente ambos insectos son capaces de transmitir las especies bacterianas asiática y africana, y es posible que en el nordeste de África *Ca. L. asiaticus* esté siendo trans-

mitida por *T. erytrae*. El HLB se manifiesta inicialmente con brotaciones amarillas y clorosis asimétrica en las hojas. Las ramas se van secando progresivamente y la producción de frutos se reduce. Los frutos son pequeños, asimétricos, presentan inversión de color al madurar (la desverdización comienza por el pedúnculo; por eso la enfermedad también se conoce como *greening*) y sabor amargo, con lo que pierden valor comercial (*Figura 1*). La bacteria africana es mucho menos agresiva que la asiática, debido a su bajo título y mala distribución en los árboles infectados, de manera que, si se detecta pronto, puede ser eliminada con poda. La especie americana se encuentra solo en el estado de Sao Paulo (Brasil) pero ha sido prácticamente extinguida por la presencia y expansión de la especie asiática, que es la >>>

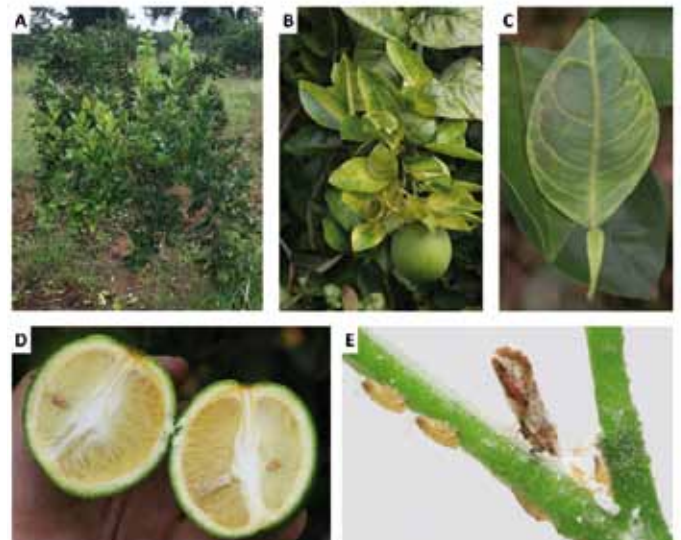


Figura 1

A) Naranjo con síntomas de infección por HLB **B)** Rama de árbol infectado en la que se aprecia el amarilleo de las hojas y la inversión de la desverdización del fruto **C)** Detalle de hoja con moteado amarillo asimétrico **D)** Fruto deformado de árbol infectado por HLB en el que se aprecia aborto de semillas y engrosamiento de la columela **E)** Insectos inmaduros de *D. citri* (amarillo, a la izquierda, en la parte inferior del tallo) e insecto adulto de *D. citri* (marrón, a la derecha, en la parte superior del tallo). Se aprecia también en la parte de bifurcación del tallo los túbulos cerosos secretados por los insectos. Fuente: Fundecitrus.

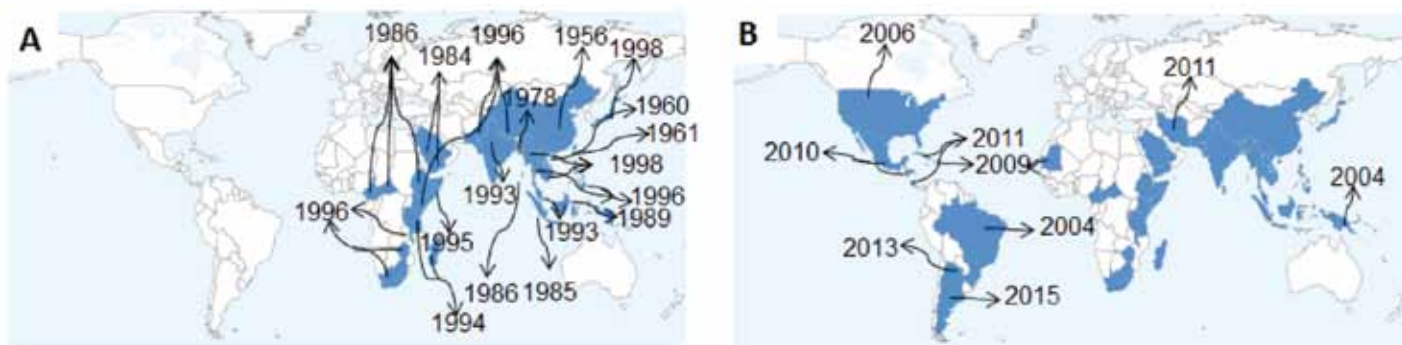


Figura 2

Países en los que se detectó la infección por HLB antes (A) y después (B) del año 2000. Se detalla la fecha en la que se publicó la presencia de la enfermedad en cada uno de los países.

>>> misma presente en Florida, Centroamérica y el Caribe. En Florida se ha intentado curar los árboles infectados con cócteles nutricionales y/o termoterapia y más recientemente con antibióticos, entre otros métodos. Hasta la fecha, estos tratamientos no han tenido éxito y el HLB se ha expandido hasta infectar a más del 80% de los árboles. En cambio en São Paulo (la región citrícola más importante del mundo y que también se encuentra seriamente amenazada por el HLB) el sistema de control está basado en tres acciones combinadas: inspección de los árboles y eliminación de cualquier individuo sintomático, replantación con material vegetal sano (procedente de viveros certificados) y, sobre todo, agresivos tratamientos insecticidas para limitar la expansión de *D. citri*. Con ello, se ha conseguido mantener la productividad de los huertos, con una incidencia en 2015 de “solo” un 18% de los árboles infectados, es decir, “solo” 35 millones de naranjos. En resumen, no existe ningún mecanismo eficaz de control del HLB a medio y largo plazo, por lo que esta enfermedad, que se expande rápidamente (Figura 2), está amenazando seriamente a la citricultura mundial.

En la naturaleza, la gama de huéspedes de la bacteria y del vector se encuentra restringida a cítricos y especies relacionadas de la familia Rutaceae, subfamilia Aurantoideae. No se ha encontrado en el germoplasma de cítricos ni en afines sexualmente compatibles ninguna fuente de resistencia genética a HLB. Por tanto, la única opción en el medio plazo para asegurar una citricultura rentable y respetuosa con el ambiente es el desarrollo de plantas genéticamente modificadas (GM) resistentes a la bacteria y/o a su insecto vector. Debido a las dificultades para trabajar con el patógeno, la interacción bacteria-huésped no se comprende suficientemente, lo que hace muy complicado diseñar estrategias eficaces para controlar las infecciones. Tampoco la secuenciación del genoma de todas las especies bacterianas ha permitido entender sus mecanismos de patogenicidad. Es pues, en la actuali-

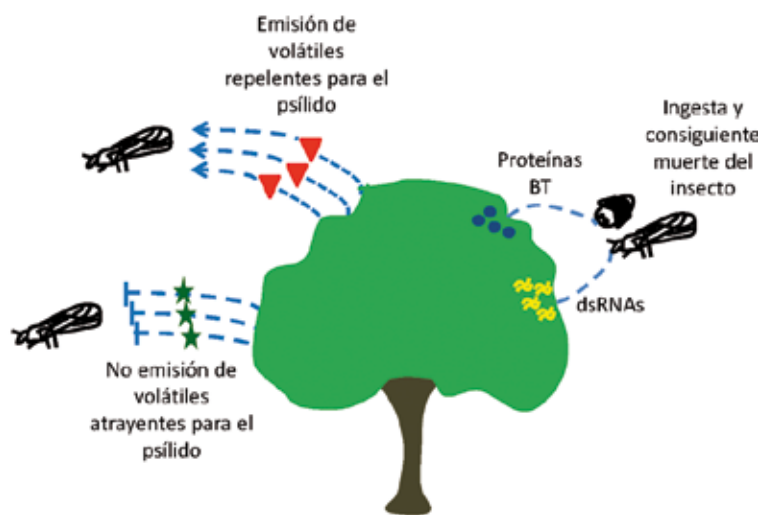


Figura 3

Posibles estrategias biotecnológicas encaminadas a controlar la infección por HLB reduciendo la población de *D. citri* así como su atracción por los cítricos.

dad, el control de la transmisión mediada por insectos el mejor punto sobre el que actuar. A este nivel podrían desarrollarse distintas estrategias para hacer frente al vector, reduciendo su población y/o limitando su predilección por los cítricos (Figura 3).

En la década de 1990 se desarrolló la tecnología Bt, basada en la generación de cultivos GM expresando una proteína (Cry) de *Bacillus thuringiensis*. Cuando los insectos se alimentan de cultivos Bt ingieren esta proteína que, procesada por el insecto, se une a receptores específicos situados en el intestino y conduce a su muerte. Esta dependencia de receptores específicos permite la utilización de distintas cepas de Bt para el control efectivo de distintas plagas. Además, ya que los humanos y la mayoría de los insectos beneficiosos carecen de estos receptores, la tecnología Bt es inocua para ellos. En condiciones de laboratorio se ha encontrado

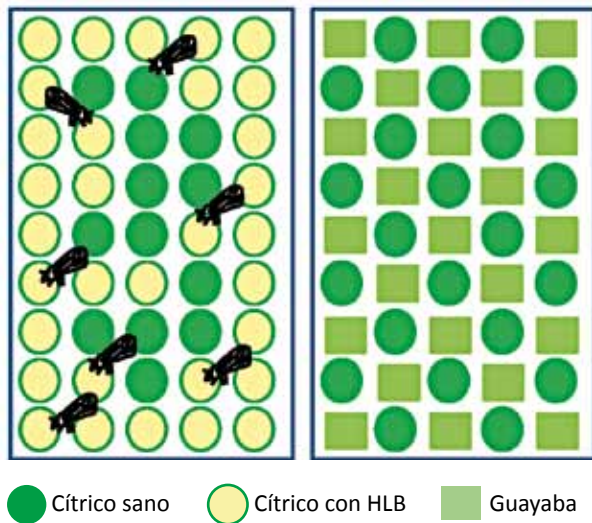


Figura 4

D. citri se siente fuertemente atraído por los volátiles de cítricos. En campos con monocultivo de cítricos (izquierda) la población de insecto es abundante y, en consecuencia, el número de árboles infectados por HLB. En campos donde los cítricos se encuentran plantados intercalados con guayabas (derecha) los volátiles de éstas repelen al insecto y limitan su presencia en la parcela, y, en consecuencia, la infección por HLB.

que 3 cepas Bt son capaces de matar a las ninfas de *D. citri*. Por tanto, la sobreexpresión en cítricos de los genes precursores de sus proteínas Cry podría generar plantas resistentes al insecto.

Otra técnica efectiva para el manejo de plagas es inducir, mediante interferencia de RNA (RNAi), el silenciamiento de genes esenciales para la vida del insecto (desarrollo, vuelo, reproducción, etc.) o que jueguen un papel fundamental en su interacción con el patógeno. Su efectividad para matar a *D. citri* se ha demostrado mediante la aplicación exógena de dsRNA específicos¹. Los conocimientos del genoma y del transcriptoma del insecto están permitiendo identificar diversos genes apropiados sobre los que inducir silenciamiento. El desarrollo de plantas transgénicas capaces de inducir RNAi frente a uno o más de estos genes diana supondrá una forma eficaz de limitar la supervivencia del insecto y, por tanto, la transmisión del HLB.

En los últimos años se ha dedicado mucha atención a los compuestos orgánicos volátiles (VOC) que juegan un papel importante en la defensa de las plantas, en la comunicación planta-otros organismos (beneficiosos o no), planta-planta e incluso entre distintas partes de una misma planta. *D. citri* es atraída por el aroma de las hojas de los cítricos y repelida por los compuestos sulfurados emitidos transitoriamente por las hojas de la guayaba en respuesta a herida². En Vietnam la presencia de guayabas junto a los cítricos en cultivos mixtos protegen a estos de la infección por HLB durante años (Figura 4), indicando que otros VOCs están implicados en la repelencia. Análisis de emisión de VOC de distintas variedades de cítricos y guayabas permitió identificar otros compuestos de guayaba que en ensayos olfatométricos repelen a *D. citri* a bajas dosis, como por ejemplo el β -cariofileno. Por tanto, la sobreexpresión de genes β -cariofileno sintasa en cítricos conduciría a la obtención de variedades super-emisoras de este compuesto y que resultarían repelentes (o al menos no atrayentes) para el insecto. La modificación de la emisión de volátiles mediante sobreexpresión de este tipo de genes y su uso potencial para controlar distintas plagas ya se ha demostrado eficaz en otras plantas. Otra alternativa para limitar la atracción del vector por los cítricos sería determinar qué compuesto/s volátiles son responsables de esta atracción y limitar su síntesis mediante RNAi o edición genómica con CRISPR/Cas9 en las hojas, o preferiblemente en los brotes, que son los que tienen un mayor poder de atracción. En ambos casos se usarían secuencias del propio genoma de los cítricos para realizar las modificaciones, facilitando probablemente su regulación y aceptación por el consumidor.

Aunque los primeros ensayos de campo con naranjos GM usando alguna de estas estrategias ya se están realizando en 2016, habrá que esperar al menos cinco años más para ver si estas estrategias (u otras desarrolladas por otros investigadores) pueden representar una posibilidad real para que podamos seguir bebiendo zumo de naranja barato y de buena calidad en el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Killiny, et al. (2014). Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. *PLoS one* 9 (10): e110536.
2. Rouseff, et al. (2008). Sulfur volatiles in guava (*Psidium guajava* L.) leaves: Possible defense mechanism; *JAFS* 56: 8905.