

Fundamentos y aplicaciones posibles de la **genómica de cítricos**

Manuel Talón, José Antonio Carrillo, Manuel Cercós, José Manuel Colmenero-Flores, Ana Conesa, Domingo J. Iglesias, Francisco R. Tadeo y Javier Terol.

Centro de Genómica. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Moncada. Valencia.

Identificación de los genes desde un punto de vista agronómico y alimentario.

IMPORTANCIA DE LOS CÍTRICOS

Las exportaciones cítricas son, desde el punto de vista económico, las más importantes de nuestra Comunidad y por ende de nuestro país, y generan un montante aproximado de 1.800 millones de euros por campaña. De hecho, los cítricos constituyen el principal cultivo frutal de España, con una superficie de cultivo próxima a las 300.000 ha y una producción cercana a los 6.000 millones de toneladas. Nuestro país es el 4º productor de cítricos del mundo y el primer exportador de fruta fresca. La Comunidad Valenciana aporta aproximadamente el 68% de la producción total española y, de entre todas las variedades de cítricos, la mandarina Clementina es el cultivo representativo de nuestra citricultura.

El mantenimiento de la industria cítrica hoy día, probablemente como consecuencia de la globalización actual, parece depender crítica-

mente de la disponibilidad de cultivos mejorados que posean una gran capacidad de adaptación. En la mejora de los cítricos hay que atender a dos partes genéticamente distintas: la variedad y el patrón o portainjertos. Esto es así porque los cítricos se cultivan en una combinación compuesta por la variedad, que produce frutos, y el patrón, que se adapta al suelo y a los requerimientos ambientales del área en donde se desarrolla. Sin embargo, la experiencia acumulada hasta la fecha nos indica que la biología reproductiva de los cítricos constituye una seria limitación a la hora de introducir mejoras en el cultivo. De hecho, la mayoría de requerimientos actuales parecen ser muy difíciles de alcanzar, sino imposibles, sin el uso o la aplicación de las nuevas herramientas que nos ofrece la genómica y de los nuevos procedimientos biotecnológicos.

Nuestro centro tiene como finalidad principal estudiar el genoma de los cítricos, tomando como base la variedad Clementina, en torno a un objetivo básico: la identificación de

los genes relevantes desde un punto de vista agronómico y alimentario. Esta información permitiría orientar y dirigir la selección genética de los cítricos hacia nuevas variedades más saludables, productivas y resistentes a las condiciones ambientales adversas.

LIMITACIONES DE LA MEJORA DE CÍTRICOS

En los cítricos, la mejora genética tradicional se enfrenta a un buen número de limitaciones que reducen considerablemente su eficacia. En principio, se observan impedimentos insalvables de tipo biológico asociados a los distintos grados de esterilidad sexual, tanto masculina como femenina, a los problemas de auto-incompatibilidad y a la gran extensión del período juvenil. Por otro lado, el gran tamaño de la planta o del árbol hace necesario el uso de grandes extensiones, y como consecuencia de programas caros de mejora debido a los gastos que se requieren para el mantenimiento y cultivo desde el estado juvenil al estado de adulto, momento en que se efectúa la selección. En su conjunto, todas estas limitaciones reducen en gran medida la probabilidad de seleccionar genotipos con características mejoradas.

La biología y las pautas reproductivas que muestran los cítricos de interés comercial es bastante inusual, incluso en el mundo vegetal. La mayoría de las variedades de cítricos con semillas, como naranjos dulces, pomelos, limones y mandarinos se reproduce por apomixis (partenogénesis), un proceso que se define como un modo de reproducción asexual por el que se produce progenie del óvulo sin fecundar, generándose clones idénticos a la planta materna. Este tipo de reproducción en general puede producir un número alto de semillas, aunque como son asexuales no son eficaces

en la mejora convencional. Un problema también muy limitante en los programas de mejora de cítricos es la presencia de variedades partenocárpicas con esterilidad gamética masculina y/o femenina, como nuestros naranjos y satsumas, que producen desarrollo del fruto sin polinización, fertilización o fecundación, y por tanto no rinden semillas ni descendencia. Las clementinas, por otro lado, son auto-incompatibles y los distintos cultivares que poseemos no se pueden cruzar entre ellos para obtener nuevas variedades. Otra limitación de estos programas es el extenso periodo de juvenilidad que la mayoría de los cítricos muestra. En general, transcurren entre cinco y diez años antes de producir la primera flor. Por otro lado, es preciso señalar que la mayoría de los grupos de cítricos económicamente importantes, entre ellos las naranjas, los pomelos, los limones y las satsumas, parece ser que se originaron a partir de plantas individuales únicas, mientras que todas las diversificaciones posteriores de estos grupos probablemente se han realizado a través de procesos de hibridación y mutación espontáneas. Este hecho parece ser la causa de la mínima diversidad genética y alélica que se presenta en los distintos grupos de cultivos, y reduce en gran medida las oportunidades para introducir nuevas variables y características genéticas. Es cierto que algunos de estos obstáculos pueden minimizarse mediante los métodos actuales de selección asistida por marcadores, la mejora mediante mutaciones o bien a través de hibridaciones somáticas, aunque estos procedimientos, en general no son aplicables a todos los grupos de cítricos ni a todas las poblaciones.

Así, tras muchos años de esfuerzos, parece claro que para retener las características esenciales de los cítricos y para introducir mejoras significativas en las características cí-

tricas es preciso desarrollar otras técnicas de mejora diferentes de la mejora clásica, entendiendo por ésta los métodos de hibridación y de selección.

LA GENÓMICA Y EL ABORDAJE GENÓMICO

Las nuevas tecnologías que se están desarrollando en el área de la biología se basan, en gran parte, en el conocimiento que aporta la genómica. En su vertiente académica y desde una óptica formal la finalidad de la genómica es doble. Por una parte pretende conocer la estructura génica, es decir la secuencia, el orden y disposición de los genes en el genoma de un determinado organismo. Por otra, intenta desentrañar la función de cada uno de estos genes. La información que se deriva de la genómica permite aproximaciones globales al funcionamiento de los seres vivos y como fin último persigue la comprensión de su funcionamiento. De este mismo enunciado se puede deducir, por tanto, el inmenso potencial que posee esta información y predice, también, las numerosas aplicaciones que desde un punto de vista práctico se derivan directamente de la misma. Así, el conocimiento de la secuencia genómica de un vegetal y del análisis funcional de los genes que la integran proporcionará las bases para un progreso rápido en diversas áreas de la investigación aplicada. La publicación de las secuencias de los genomas de la mitocondria (UNSHELD y col., 1997) y del cloroplasto (SATO y col., 1999) de *Arabidopsis thaliana*, la planta modelo más utilizada en la experimentación en biología vegetal, culminada con la secuenciación de su ADN nuclear (ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000), ha abierto la puerta a la comprensión de cómo está estructurado el genoma de las plantas, de cuántos y de qué genes cuentan para sobrevivir, y de qué manera se ma-

nifiestan o se expresan globalmente estos genes a lo largo de un proceso biológico concreto. Recientemente, ha sido completada la secuenciación del genoma de las dos subespecies de arroz más extendidas en el mundo, la índica y la japónica (YU *y col.*, 2002; GOFF *y col.*, 2002). El gran esfuerzo e inversión económica que supone la secuenciación por duplicado del arroz son indicativos de la potencialidad científica y económica que supone este conocimiento y, además, son el resultado del desarrollo de extensos programas de investigación financiados por varios gobiernos y entidades privadas. El conocimiento de la secuencia del arroz, como modelo de cereales, está asociado tanto al desarrollo de los numerosos marcadores que se utilizan en los programas de mejora como también a la generación de extensas colecciones de mutantes con caracteres agronómicos mejorados. A estas secuencias seguirán las de otros genomas cuyos Programas de Secuenciación y Análisis Funcional han comenzado ya a desarrollarse (Plant Genome Databases: <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/plant-gen-db.html>). La Comunidad Valenciana se ha unido a estas iniciativas genómicas y varios centros de investigación radicados en la provincia de Valencia, como el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas “Eduardo Primo Yúfera” (IBMCP) y el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), a través del Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología y del Centro de Genómica, están desarrollando el Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos, financiado a nivel local por la Conselleria d’Agricultura, Peixca i Alimentación y a nivel estatal por el Ministerio de Ciencia y Tecnología. Además, estas instituciones están promoviendo el Proyecto Internacional de Secuencia-

ción del Genoma de los Cítricos (IGLESIAS y TALÓN, 2003).

El análisis estructural de los genomas vegetales está basado en la aplicación de diferentes aproximaciones metodológicas tales como la generación de ADNs marcadores, la construcción de genotecas genómicas (conjunto de fragmentos de ADN nuclear), la generación de mapas físicos de los genomas y la secuenciación propia de los mismos genomas. El primer paso para la caracterización estructural de un genoma consiste en generar mapas genéticos en los que se encuentren integrados el mayor número posible de ADNs marcadores. El segundo paso consiste en alinear (ordenar) los clones genómicos (las secuencias) en función de la información facilitada por los ADNs marcadores. El sistema de clonación (de conservación o almacenamiento de las secuencias) más utilizado para la construcción de genotecas genómicas es el sistema de cromosomas artificiales de bacterias o BAC (Bacterial Artificial Chromosome; SHIZUYA *y col.*, 1992). El ADN presente en cada clon BAC puede utilizarse directamente para la secuenciación (la lectura ordenada). La secuencia de nucleótidos (cada una de las unidades que componen un ácido nucleico) obtenida puede analizarse con la ayuda de potentes herramientas informáticas y, mediante la comparación frente a otras secuencias conocidas, podremos llegar a clasificar los genes que la integran y a asignarles una posible función. A este proceso se le denomina anotación funcional y constituye una fuente de información muy interesante para realizar el análisis funcional del genoma.

El análisis funcional de los genomas puede basarse bien en la información estructural de los genes que lo componen, si es que ese genoma está ya secuenciado, o bien en la

información obtenida a partir del análisis de secuencias génicas expresadas o análisis de ESTs (Expressed Sequences Tags). El análisis de ESTs permite caracterizar una amplia colección de secuencias de ADN que provienen en general de genotecas de ADN complementario (ADNc) originadas a partir de ARN presente en uno o varios órganos de plantas cultivadas en diferentes condiciones (ADAMS *y col.*, 1991). En la actualidad, la hibridación de macro o de micromatrices de ADNc o de oligonucleótidos (fragmentos cortos de nucleótidos específicos de un gen) permite visualizar el “transcriptoma” de una planta (*Figura 1*) y ver cómo distintos grupos de genes que puede utilizar una planta se “encienden” (activan) o se “apagan” (desactivan) durante un proceso fisiológico o en respuesta a un estímulo (SCHENA *y col.*, 1995; LOCKHART *y col.*, 1996; CELIS *y col.*, 2000). La tecnología de las micromatrices está basada en la hibridación del ADN (en la posibilidad de que dos secuencias complementarias de ADN se reconozcan y se unan entre sí) y combina la miniaturización y la aplicación de sustancias marcadoras fluorescentes que absorben y emiten luz a longitudes de onda diferentes. Las colecciones de ESTs pueden imprimirse en un soporte físico formando una matriz ordenada. Si tenemos en cuenta que cada punto de esa matriz (que corresponde a un EST de la colección) puede estar separado de otro por una distancia de entre 100–250 μ m (milésimas de milímetro), podemos fácilmente imaginar que en una superficie muy reducida tendremos representados todos nuestros ESTs. En general, las micromatrices de ADNc se fabrican sobre superficies de vidrio similares en tamaño a los portaobjetos utilizados en microscopía óptica. Una vez preparada la muestra problema de ADN, formada por dos grupos de ARNs marcados con un compuesto fluo-

rescente diferente, se realiza la hibridación con el ADNc depositado en la micromatriz y se visualiza el resultado con la ayuda de cámaras CCD e instrumentos de escaneo confocal. Los datos resultantes del análisis de la micromatriz se almacenan a continuación y se tratan con programas estadísticos específicamente diseñados para esas tareas.

GENÓMICA DE CÍTRICOS

En relación con los cítricos, la tecnología genómica puede proporcionar a los investigadores nuevas herramientas para enfocar los problemas y las limitaciones que se han expuesto más arriba. La genómica contempla métodos rápidos de identificación y de manipulación de genes que pueden influenciar características deseables. Es previsible que, cuando los mecanismos biológicos responsables de estas características se entiendan, los mejoradores de cítricos podrán desarrollar más rápidamente variedades mejoradas y también efectuar predicciones más realistas. El desarrollo de nuevas variedades a través del uso de herramientas genómicas beneficiará tanto a los consumidores, proporcionándoles frutos con sabores más apreciados o con otros valores añadidos en relación con la calidad, los constituyentes nutricionales o la salud, como a los agricultores, suministrándoles variedades más adaptadas, más productivas o más robustas y resistentes. Estos cambios sin duda beneficiarán a los agricultores, a los consumidores y a la sociedad en general. El desarrollo y la disponibilidad de herramientas genómicas es, por tanto, esencial para incrementar la eficiencia convencional de los métodos de desarrollo de nuevas variedades de cítricos.

Los objetivos del proyecto de genómica de cítricos son dos. En relación con genómica funcional, se propone revelar la función de los

genes de interés agronómico y alimentario de la variedad Clementina para su posterior uso en mejora genética y en aplicaciones biotecnológicas. La genómica estructural, por otro lado, propone desarrollar los mapas físicos de su genoma para iniciar la secuenciación con objeto de conocer el ordenamiento de sus genes y su estructura.

Los beneficios que puede proporcionarnos el desarrollo de la genómica de cítricos son de varios tipos. Los estudios de genómica pueden desentrañar la secuencia completa (incluyendo zonas reguladoras e intergénicas) de genes de interés agronómico, alimentario y farmacológico, y por tanto, ayudar a diseñar nuevas variedades y portainjertos, reduciendo el tiempo de generación e incorporando características específicas demandadas por los productores y consumidores. En concreto, existe la posibilidad de mejora genética dirigida molecularmente mediante el conocimiento de las secuencias génicas (identificación de marcadores, QTLs, etc.). Así, sería posible la reducción del período de obtención de nuevas variedades y patrones de cítricos de interés comercial, porque la genómica permite realizar una detección precoz de genes de interés en los bancos de germoplasma, en las colecciones de mutantes y de poblaciones de híbridos, eliminando de este modo el largo periodo de espera necesario para que afloren los fenotipos determinados por dichos genes, lo cual es el principal factor limitante para la mejora clásica. Otro de los beneficios destacables de la genómica es la generación de microchips o micromatrices, que portan información génica relacionada con propiedades y procesos biológicos relevantes para los cítricos (estados de desarrollo, reacciones a agentes estresantes bióticos y abióticos, etc.), y que podrán ser utilizados en diagnóstico varietal, nutricional y sani-

tario (*Figura 1*). La genómica, en definitiva, contribuirá al establecimiento de nuevas tecnologías para el desarrollo más rápido y eficiente de nuevos cultivares y métodos de cultivo.

PROCESOS PRIORITARIOS

Los problemas de naturaleza biológica que conciernen a la citricultura, al cultivo de los cítricos o la propia industria cítrica son muy importantes y susceptibles de ser abordados mediante técnicas genómicas. La comunidad científica dispone ya, en otros cultivos, de los primeros resultados de análisis funcional genómico, con ejemplos que van desde el estudio de los genes implicados en la producción de las sustancias aromáticas características de la fresa (AHARONI y col., 2000) al estudio de los genes relacionados con la resistencia a agentes patógenos (MALECK y col., 2000) o con la tolerancia a la salinidad (BOHNERT y col., 2001). La adquisición y la utilización de esta tecnología para el estudio de las especies que nos interesan, que se cultivan y generan riqueza en la Comunidad Valenciana nos permitirá avanzar aún más en el conocimiento teórico-práctico necesario para optimizar su cultivo, su producción y su calidad. La labor investigadora del Centro de Genómica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias está centrada en las siguientes líneas de investigación:

Desarrollo del fruto

Los estudios sobre el desarrollo reproductivo son importantes debido a la influencia decisiva que los factores que determinan el crecimiento tienen sobre el tamaño, la calidad y la producción de fruta (*Figura 2*). En este contexto, el cuajado del fruto tiene que ser mencionado con especial atención como una de las características más im-

portantes que deben ser mejoradas en el cultivo de los cítricos. El periodo de cuajado del fruto de los cítricos está caracterizado por el desprendimiento de un número variable de flores y de ovarios en crecimiento, fenómeno que se denomina abscisión. Este proceso, la abscisión, adquiere pues una especial relevancia debido a las repercusiones económicas y comerciales que tiene para el agricultor. Si la abscisión es masiva la cosecha será escasa, mientras que si cuaja un número excesivo de frutos su tamaño final no alcanzará el calibre comercial adecuado. Por otro lado, sería muy deseable, por ejemplo, contar con variedades con una gran capacidad para producir frutos sin semillas. Este es, de hecho, uno de los activos más importantes que deberían ser alcanzados mediante las herramientas genómicas. El fenómeno de la abscisión también se extiende, por ejemplo, a los procesos de maduración y de respuesta a los estreses ambientales. La maduración debilita la fuerza con la que los frutos están unidos al árbol. Si por razones comerciales es necesario retrasar la recolección, las posibilidades de desprendimiento de la fruta aumentan y el volumen de la cosecha puede verse así comprometido. Además, las condiciones medioambientales adversas también inciden sobre el proceso de abscisión: la falta de agua (estrés hídrico) o el exceso de sales en el suelo (estrés salino) son condiciones a las que los cítricos se enfrentan a menudo y suelen provocar el deterioro de hojas y frutos produciéndose, en último término, su abscisión (*Figura 3*).

Tolerancia a las condiciones ambientales adversas

Existen muchos ejemplos de tolerancia a los efectos causados por el ambiente físico circundante, para el que la ciencia de genómica podría

proporcionar información interesante y novedosa y también aproximaciones originales con objeto de minimizar o eliminar los daños producidos por los estreses ambientales. En algunas áreas, los cítricos poseen una calidad del agua muy baja. En otras zonas, los cítricos también pueden estar expuestos encharcamientos o por el contrario a períodos de sequía, dependiendo de las fluctuaciones atmosféricas. La calidad y la cantidad de agua son, de hecho, factores limitantes para la producción, que se puede ver afectada tanto por el tamaño de la fruta producida, como por el número de frutos desarrollados. Los cítricos crecen mayormente en zonas semiáridas donde las lluvias son escasas y están, por tanto, expuestos a un suplemento de agua limitado. En este cultivo, el riego es imprescindible, porque existe una fuerte competencia entre el crecimiento reproductivo y vegetativo y por otras razones fisiológicas o anatómicas, como el elevado número de estomas de las hojas o la presencia de un sistema radicular poco profundo y desarrollado. La deficiencia en agua generalmente disminuye el crecimiento de las hojas y altera la calidad del fruto. Cuando la sequía se produce durante el periodo reproductivo, la fertilidad y el cuajado y desarrollo del fruto pueden verse seriamente afectados.

Por otro lado, la demanda cada vez más alta de agua para consumo humano e industrial está generando una sobreexplotación de los acuíferos subterráneos y el uso de agua de peor calidad en los sistemas de riego. El agua de baja calidad eleva en el suelo circundante la concentración de sales y con ello contribuye a la salinización del terreno. La salinidad, de hecho, puede ir aumentando entre los periodos de riego, en base al tipo de suelo y a la frecuencia y método de irrigación.

En nuestra comunidad, en general, los suelos suelen contener exceso de calcio con valores altos de pH que provocan desequilibrios minerales y clorosis férrica. La clorosis férrica es una de las causas más importantes de estrés nutricional y abiótico que pueden sufrir los árboles frutales en los suelos cálizos. En estos suelos, un pH alto puede causar la precipitación de hierro a formas inmovilizadas. En estas situaciones, el mineral no está disponible para la planta, a pesar del alto contenido de hierro de la mayoría de los suelos. Esta circunstancia puede ser incluso peor si se utiliza agua del riego que contenga altos contenidos de bicarbonato. Esto significa que cada factor que afecta al suelo o a la disponibilidad de hierro en el suelo, o a la propia absorción, transporte y metabolismo de este mineral, puede inducir clorosis férrica y es, por tanto, un potencial blanco para la mejora del cultivo.

Los estudios genómicos pueden ayudar a comprender cuáles son los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos empleados por los cítricos, para responder y aclimatarse a las condiciones de estrés medioambiental que más impactan en la productividad de dicho cultivo, como se menciona arriba. En los cítricos se ha podido asociar claramente la tolerancia a la salinidad con la capacidad de limitar el paso del anión cloruro (Cl⁻) desde la raíz a la parte aérea. Para entender este mecanismo a nivel molecular y para poder manipularlo con vista a la obtención de portainjertos tolerantes a salinidad, se deben caracterizar los genes relacionados con la captación de Cl⁻ (desconocidos en el reino vegetal) y su transporte en la planta (*Figura 4*). Por otro lado, las técnicas de genómica funcional deben permitir identificar los genes cuya inducción está claramente asociada a las condiciones de estrés abiótico descritas.

Calidad del fruto

Existen innumerables aspectos fisiológicos o anatómicos que influyen la calidad de la fruta como por ejemplo, los atributos físicos relacionados con el tamaño del fruto, el color, la forma, la textura, el número de semillas, la facilidad de pelado o el periodo de perdurabilidad en el árbol. También determinan la calidad de la fruta otras muchas características bioquímicas, como son los contenidos en azúcares y ácidos, el color interno y externo, el sabor, los componentes de los aromas e, incluso, los constituyentes con valor añadido. En general, estas características se desarrollan a lo largo del crecimiento reproductivo y se relacionan con procesos fisiológicos que regulan el desarrollo, la maduración y la propia abscisión del fruto. La mayoría de estos aspectos se relaciona con la apreciación y la experiencia del consumidor de cítricos y tiene que ver poco con los cambios en la producción que pueden ser mejor valorados o apreciados por los agricultores. En este contexto, es la demanda del consumidor la que puede dirigir la mejora en las características relacionadas con la calidad de la fruta. En nuestro centro y mediante técnicas de genómica funcional estamos recopilando y analizando nueva información sobre los procesos fisiológicos que regulan la maduración, tanto externa como interna, y determinan la calidad del fruto en los cítricos (*Figura 5*). En este caso, el objetivo principal es identificar los genes implicados en la maduración de los frutos y conocer cómo se regula el control de su expresión con el fin de identificar aquellos procesos fisiológicos susceptibles de ser manipulados con objeto de mejorar la calidad de la fruta.

Generación de nuevas

variedades

Dado el interés prioritario que tiene para el sector la incorporación de nuevas variedades, en nuestro centro nos ocupamos de la generación y caracterización de colecciones de variedades que se han obtenido gracias al desarrollo de varios programas de mutagénesis en Clementina de Nules y en naranjos Navel (*Figura 6*). Estos estudios tienen dos finalidades complementarias. Por un lado, se persigue encontrar características novedosas o ventajosas desde un punto de vista agronómico, con el fin de obtener de forma rápida material vegetal mejorado. Por otro lado, estas nuevas variedades constituyen sistemas de modelos únicos que permiten, mediante técnicas genómicas, el aislamiento y estudio de los genes de cítricos de interés agronómico (*Figura 7*).

RESULTADOS OBTENIDOS Y HERRAMIENTAS GENÓMICAS GENERADAS

A continuación se describen los principales resultados obtenidos y las herramientas genómicas generadas hasta la fecha por el Centro de Genómica del IVIA.

Genotecas de cDNA

Se han construido 17 genotecas a partir de distintos órganos, estadios de desarrollo y tratamientos de estreses abióticos, principalmente de Clementina, aunque también se ha utilizado en algunos casos la variedad Navelina y los patrones citrange Carrizo y mandarino Cleopatra (*Figura 8*). En su conjunto, estas genotecas contienen mensajeros expresados en distintos procesos biológicos que son relevantes en el desarrollo o en el propio cultivo de los cítricos. Se ha construido, además, una genoteca normalizada y de longitud completa realizada a partir de mezclas de mRNA de órganos re-

productivos y vegetativos también de Clementina en diferentes estadios de desarrollo. Esta genoteca, a diferencia de las anteriores, deberá contener una proporción elevada de transcritos de abundancia menor y de clones de longitud completa.

Colecciones de ESTs

A partir de las librerías de cDNA, y hasta la fecha, se han aislado y secuenciado alrededor de 3.000 ESTs que han rendido aproximadamente 2.500 genes distintos, o unigenes. Esta información se ha incluido en la base de datos del proyecto español de genómica funcional de cítricos (CFGP; <http://citrusgenomics.ibmcp-ivia.upv.es>). Los análisis de redundancia realizados con las secuenciaciones efectuadas hasta ahora muestran que en prácticamente todas las genotecas se tiene un nivel relativamente bajo de redundancia interna, de aproximadamente no más del 20%, puesto que los ESTs analizados son pocos todavía. En la actualidad se está procediendo a la secuenciación de otros 14.000 ESTs, hasta lograr un total de 17.000 lecturas, un millar de ellas por librería. El objetivo de este trabajo de secuenciación es obtener unos 5.000 unigenes de cítricos. En general, los datos del análisis funcional de los ESTs de las distintas librerías muestran que entre el 60 y el 70% de los clones son similares o presentan similitud acusada con genes conocidos de *Arabidopsis thaliana*. El resto no presenta similitud con ningún gen de plantas. Por otro lado, se está procediendo a la secuenciación, en colaboración con el instituto Genoscope, perteneciente al Centro Nacional de Secuenciación de Francia, de 37.000 lecturas de la librería normalizada de longitud completa. De este trabajo se espera conseguir al menos 10.000 secuencias de unigenes. La información así generada junto con las aproximadamente 10.000 se-

cuencias que han aportado el resto de miembros del CFGP podrá probablemente acercarnos en un cálculo conservador a los 15.000 genes de cítricos, un número aceptable para realizar estudios globales de genómica.

Análisis de expresión génica mediante micromatrices

Los primeros estudios que se deben realizar cuando se está hablando de genómica son el intento por correlacionar la expresión génica con los distintos procesos biológicos bajo estudio. De la misma forma que una célula cambia en respuesta a los estímulos medioambientales o del propio desarrollo, la composición y la abundancia de sus mensajeros individuales cambian de forma acorde. Estos cambios dirigen las modificaciones necesarias en la producción de metabolitos y proteínas en respuesta a la influencia del desarrollo o del medioambiente. Las micromatrices nos permiten caracterizar los genes que están implicados en estos procesos. El CFGP ha generado y puesto a la disposición de sus miembros una primera micromatriz para análisis de la expresión génica construida aproximadamente 7.000 genes únicos (*Figura 1*). Cuando se contemple la información que se está elaborando en la actualidad se prevé construir una segunda generación de micromatrices que contenga prácticamente la totalidad de los clones aislados. Esta versión eliminará gran parte de la redundancia y será representativa de la casi totalidad de los genes del genoma de cítricos.

El objetivo de los estudios de expresión génica es caracterizar el transcrito de los cítricos, el conjunto de genes que se expresan o tornan operativos en un determinado momento, en respuesta a los cambios que ocurren durante los procesos biológicos. Los procesos bajo estu-

dio se relacionan principalmente con el crecimiento y desarrollo reproductivo, con la maduración, abscisión y senescencia de los frutos, con la calidad de la fruta y con los fenómenos de respuesta a estreses abióticos importantes para el desarrollo y producción de los cítricos, como la salinidad, la clorosis férrica y la sequía o carencia de agua. Mediante el uso de micromatrices se pretende identificar y estudiar los genes asociados a:

- los procesos de cuajado y desarrollo del fruto,
- los procesos de maduración externa,
- los procesos de maduración interna,
- los procesos de abscisión natural,
- los procesos de abscisión inducida por condiciones de cultivo adversas,
- los procesos que determinan la calidad de la fruta.
- los procesos de respuesta al estrés hídrico,
- los procesos de respuesta al estrés salino,
- los procesos de respuesta a la clorosis férrica,
- los procesos alterados en las nuevas variedades de cítricos.

Es muy conveniente que los resultados de los análisis de expresión génica se integren en una base de datos común para poder identificar o discriminar posteriormente mediante el estudio de las respuestas cruzadas entre los distintos experimentos, los genes marcadores de un proceso determinado de los genes que responden a un número amplio de condiciones. Este estudio también permitirá agrupamientos por clases génicas en base a diversas utilidades y conceptos para estudios de ontogenia, evolutivos, de familias génicas, de proximidad o función metabólica dependiente, de respuesta común, etc. Estas clases génicas pueden también ayudar a la caracterización de elementos regu-

ladores en los promotores de genes con respuestas idénticas o similares.

MAPA FÍSICO

El desarrollo de un mapa físico en los cítricos y su interrelación con un mapa de ligamento genético tiene una prioridad máxima por varias razones. En principio, será de gran utilidad para la aplicación de los abordajes más eficientes para clonar genes de importancia económica de los que sólo se conoce el efecto sobre su fenotipo. Este mapa integrado podría ser una herramienta muy poderosa también para la selección asistida por marcadores y, en definitiva, es imprescindible para estudiar y comprender los mecanismos moleculares y fisiológicos que determinan las características biológicas y económicas. Finalmente, un mapa físico de calidad proporcionará la base material sobre la que asentar la secuenciación del genoma de los cítricos. Con este objetivo se ha iniciado un programa para la elaboración de librerías de clones BAC a partir de material de Clementina que contengan un número de clones de tamaño de inserto suficiente como para asegurar una cobertura amplia de su genoma.

Herramientas bioinformáticas

Se ha generado un buen número de herramientas bioinformáticas que tienen como función principal proporcionar apoyo a los diferentes grupos de investigación en cualquier aspecto relacionado con el análisis, ensamblaje y anotación funcional de secuencias, obtención de consensos e identificaciones de pautas de lectura abierta (ORFs), búsquedas de similitudes, análisis evolutivos y de genómica comparada, interpretación de datos, diseño y análisis de macro- y micromatrices de ADNc, etc. Uno de los principales objetivos que actualmente perseguimos en esta área radica en el

diseño y puesta a punto de una base de datos, concebida como una herramienta de mejora de cítricos, que integre de un modo dinámico la información biológica, genética y genómica. La utilidad de esta base de datos estribaría en la capacidad para relacionar los fenotipos del material vegetal disponible (variedades, mutaciones, híbridos y distintas selecciones), las respuestas de expresión génica (obtenidas con las micromatrices y otros métodos de análisis) y las secuencias genéticas (ESTs, ADN genómico) con objeto de identificar de forma rápida y eficaz los genes de interés agronómico para la mejora y para las aplicaciones biotecnológicas.

CONCLUSIÓN

En resumen, la tecnología genómica está poniendo al servicio de la citricultura una batería de herramientas moleculares que en su conjunto poseen una gran capacidad para obtener información y un potencial amplio para mejorar productos actuales o producir nuevas selecciones de cítricos de interés comercial. Algunas de estas herramientas son la hibridación de micromatrices de ADNc de cítricos. La adquisición y la utilización de estas tecnologías en la Comunidad Valenciana permitirán generar el conocimiento teórico-práctico necesario para optimizar el cultivo de los cítricos.

Bibliografía

- ADAMS, M.D. y otros (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651-1656.
- AHARONI, A. y otros (2000). Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12, 647-661.
- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- BOHNERT H.J. y otros (2001). A genomic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 1-17.
- CELIS, J.E. y otros (2000). Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using microarrays and proteomics. *FEBBS Lett.* 408, 2-16.
- FAGOAGA, C., VIDAL, A.M., PINA, J.A., LLISO, I., TADEO, F.R., TALÓN, M., GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L., NAVARRO, L., PEÑA, L. (2003). Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA20-oxidase gene modifies plant architecture. 7th International Congress of Plant Molecular Biology, S10-78. Barcelona (Spain).
- GOFF, S.A. y otros (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296, 92-100.
- IGLESIAS, D.J., TALÓN, M. (2003). Fundación de Consorcio Internacional del Genoma de los Cítricos. *Agrícola Vergel* 257, 309-312.
- LOCKHART, D.J. y otros (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol.* 14, 1675-1680.
- MALECK, K. Y otros (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genet.* 26, 403-410.
- SCHENA, M. Y otros (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- SATO, S., NAKAMURA, Y., KANEKO, T., ASAMIZU, E., TABATA, S. (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 5, 283-290.
- SHIZUYA, H. y otros (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8794-8797.
- TALON, M., HEDDEN, P., PRIMO-MILLO, E. (1990). Gibberellins in *Citrus sinensis*: A comparison between seeded and seedless varieties. *J. Plant Growth Regul.* 9: 201-206.
- TALON, M., ZACARIAS, L., PRIMO-MILLO, E. (1992). Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiol.* 99: 1575-1581.
- TALON, M., JUAN DELHOM, M., SOLER, J., AGUSTÍ, M., PRIMO-MILLO, E. (1999). Criterios de racionalización de las aplicaciones de ácido giberélico para la mejora del cuajado del fruto de los cítricos. *Levante Agrícola* 347, 128-133.
- UNSELD, M., MARIENFELD, J.R., BRANDT, P., BRENNICKE, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genet.* 1, 57-61.
- VIDAL, A.M., LLISO, I., FAGOAGA, C., TADEO, F.R., GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L., PEÑA, L., NAVARRO, L., TALÓN, M. (2002). Modulation of gibberellin content and plant growth in citrus by sense and antisense expression of a gibberellin 20-oxidase gene. 13th FESPP Congress, P54. Hersonissos, Crete (Greece).
- YU, J. y otros (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* 296, 79-92.

rESUMEN/abstract

Resumen

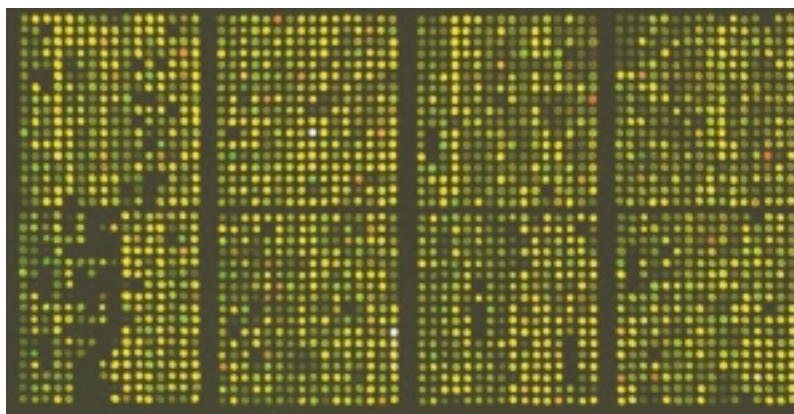
El Centro de Genómica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), dentro del marco del Consorcio Nacional de Genómica de Cítricos, está desarrollando diversos objetivos relacionados con la genómica de cítricos. La variedad objeto de estudio es la Clementina de Nules, la variedad más representativa de la Comunidad Valenciana, y el objetivo final en este proyecto es conocer la estructura y función de los genes de los cítricos que poseen elevado interés agronómico y alimentario. Para alcanzar este objetivo se están generando colecciones de miles de secuencias génicas (ESTs) con el fin de identificar genes responsables de la calidad de la fruta, las cualidades organolépticas, del desarrollo y maduración del fruto, y de la tolerancia a la salinidad, la sequía o a la clorosis férrica. Esta información es la base del desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas, como las micromatrices, y del conocimiento que podrá permitir la caracterización molecular de nuevas variedades, la reducción de los periodos de la mejora genética o el diagnóstico del cultivo. El IVIA, a su vez y como complemento a estos estudios, posee colecciones de nuevos genotipos (clones) de cítricos que están a la espera de su caracterización molecular para la identificación de las secuencias génicas relacionadas con las mejoras de características deseables por el mercado, el sector productor y el consumidor.

Abstract

The Centro de Genómica from the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), in the frame of the Consorcio Nacional de Genómica de Cítricos, is carrying out several goals related to citrus genomics. The Clementina de Nules, the variety representative of the Valencian Community, is the variety chosen for the study, and the final objective of the project is to know the structure and function of the citrus genes possessing high agronomical interest. To reach this objective, several collections of thousands of

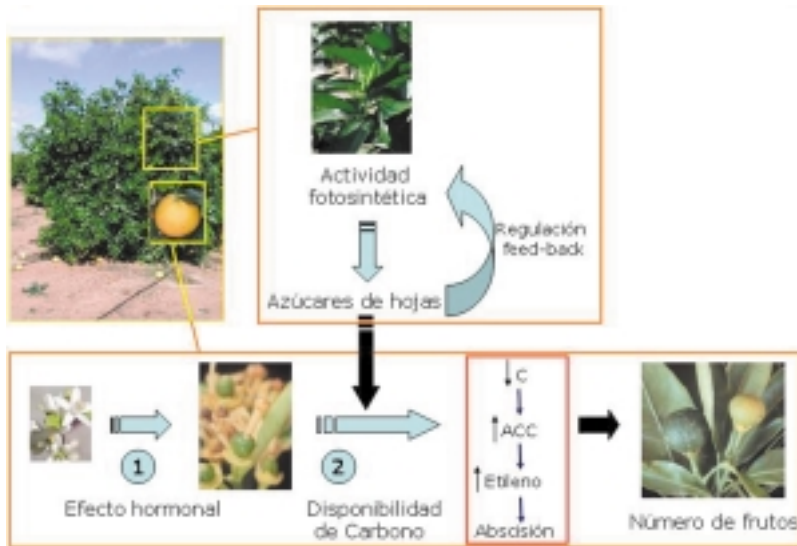
genetic sequences (ESTs) are been generated to identify genes responsible of fruit quality, organoleptic attributes, fruit development and ripening, tolerance to salinity, water deficit and iron chlorosis. This information is the base for the development of new biotechnological tools, such as microchips, and the knowledge that will allow the molecular characterization of new varieties, the reduction of the period for genetic breeding or the culture diagnoses. The IVIA, as a complement of these studies, possesses collections of new citrus genotypes (clones) waiting for their molecular characterization to identify the genetic sequences related to the characteristics desirable by the market, producers and consumers.

Figura 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA MADURACIÓN MEDIANTE MICROARRAYS DE CDNA DE CÍTRICOS



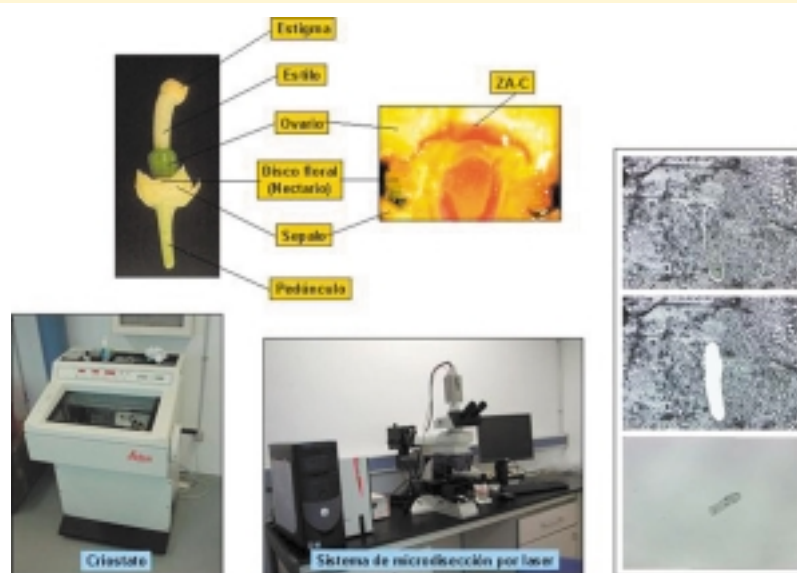
Microarray de cDNA de cítricos elaborado por el consorcio nacional que desarrolla el proyecto de genómica funcional de cítricos. La tecnología de las micromatrices está basada en la hibridación del ADN (en la posibilidad de que dos secuencias complementarias de ADN se reconozcan y se unan entre sí) y combina la miniaturización y la aplicación de sustancias marcadoras fluorescentes que absorben y emiten luz a longitudes de onda diferentes. Esta primera versión contiene aproximadamente 7.000 genes, representados por ESTs, impresos en un soporte de vidrio formando una matriz ordenada. Cada punto de esta matriz corresponde a un EST y está separado de otro por una distancia mínima de 100-250 milésimas de milímetro. En el ejemplo, la hibridación corresponde a una muestra de tejido de corteza de fruto maduro y otra de fruto inmaduro de Clementina de Nules y la imagen permite visualizar parte del "transcriptoma" de esta corteza. La figura muestra la intensidad con que los genes se expresan, en tonalidades intermedias entre el rojo (expresión en fruto maduro), verde (expresión en fruto inmaduro) y amarillo (expresión en ambos). El color blanco corresponde a respuestas saturadas y el negro a controles y falta de hibridación.

Figura 2. PROCESO DE FRUCTIFICACIÓN EN CÍTRICOS



El proceso de fructificación en los cítricos parece estar regulado inicialmente por las hormonas, principalmente giberelinas, que controlan la transición de ovario a fruto. Un segundo elemento limitante en este proceso lo constituye el aporte de carbono, en forma de fotoasimilados o azúcares. En principio, una mayor superficie foliar implica una mayor capacidad para realizar el proceso fotosintético, lo que se traduce en mayor crecimiento vegetativo y probablemente en mayor número de frutos. Existen mecanismos fisiológicos de ajuste mediante regulación por retro-alimentación o "feedback" entre los niveles de carbohidratos acumulados en las hojas y sus tasas de fotosíntesis, que maximizan el número de frutos que llegan al final de su proceso de crecimiento. El mecanismo regulador se basa en la capacidad de la hoja para modular la tasa fotosintética de acuerdo con la concentración foliar de carbohidratos. La carencia de carbono parece disparar la secuencia hormonal que activa la síntesis de etileno y dispara los procesos de abscisión del fruto.

Figura 3. MICRODISECCIÓN DE ZONAS DE ABCISIÓN DE CÍTRICOS



El proceso de abscisión implica la formación de una zona de abscisión entre el órgano que permanece y el órgano que se desprende. En la figura se muestra un ovario en desarrollo de naranjo y su lado la imagen al microscopio de la zona de abscisión del cáliz, ZA-C, teñida de color naranja. En la actualidad es posible estudiar la expresión génica que tiene lugar específicamente en tejidos poco representados y tan diminutos como las zonas de abscisión mediante un sistema de microdissección por láser como el presentado en la figura. En esta técnica las muestras se congelan y se escinden con un criostato y las distintas secciones se observan con un microscopio para, con la ayuda de un rayo láser, separar de forma rápida y no contaminante las microsecciones de interés. La técnica permite la separación y el aislamiento incluso de unas pocas células. En la imagen de la derecha se muestra una sección de ovario de cítrico antes y después de la microdissección de la zona de abscisión y su recuperación en un compartimento aparte.

Figura 4. POSIBLES TRANSPORTADORES DE IONES CLORURO (Cl⁻) IDENTIFICADOS EN COLECCIONES DE ESTs DE CÍTRICOS

CANALES

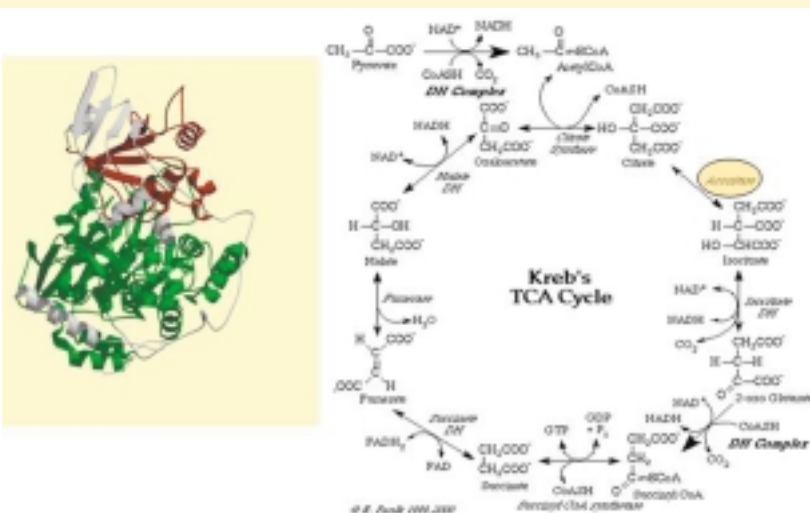
- Familia CLC (4 miembros, CLC-a, CLC-b, CLC-c, CLC-d).
- Familia de canales dependiente del voltaje (2 miembros).
- Proteína reguladora de la conductancia de Cl⁻

TRANSPORTADORES ACTIVOS

- Cotransportador de iones cloruro y cationes.
- Intercambiador anión/cloruro.
- Simporter anión/iones sodio.
- Permeasa cloruro/sulfato/oxalato.

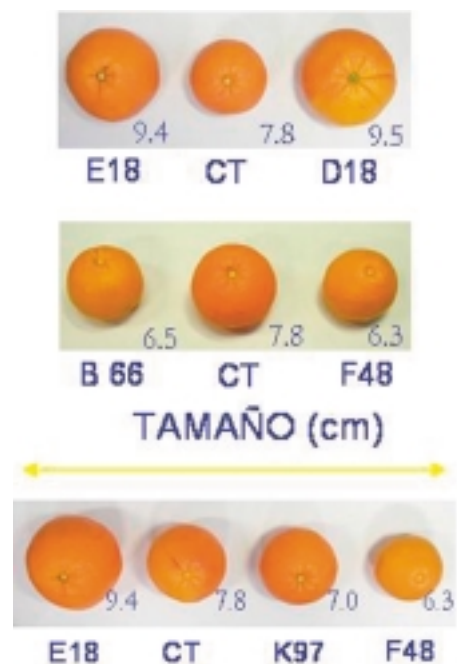
En los cítricos, la tolerancia a la salinidad parece estar relacionada con la capacidad de restringir la acumulación del anión cloruro (Cl⁻) en las hojas. Este proceso puede estar limitado a nivel de absorción por parte de la raíz o también a nivel de transporte desde ésta a la parte aérea. En las colecciones de ESTs de cítricos se han identificado diversos genes asociados al transporte de los iones cloruro. Algunos de estos genes se asemejan, por comparación con otros genes de plantas o animales, a canales de cloruro o a transportadores activos.

Figura 5. LA ACONITASA ES UN ENZIMA DEL CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS IMPLICADO EN LA TRANSFORMACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO



En el zumo de los frutos cítricos se produce una disminución progresiva de la concentración de ácidos totales. La síntesis de ácido cítrico, el más abundante, es máxima en los primeros estadios del desarrollo del fruto y, en momentos posteriores, su concentración desciende. En nuestro grupo estamos estudiando la implicación en este proceso de diversos enzimas del ciclo de Krebs, como la actividad citrato sintasa y la enzima aconitasa, encargada de la conversión de ácido cítrico a ácido isocítrico. La Figura también muestra la estructura de la proteína de la actividad aconitasa.

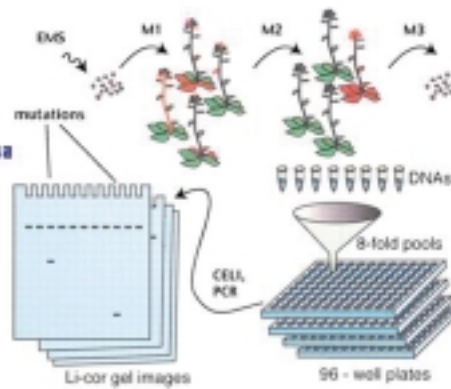
Figura 6. MUTANTES DE NAVEL. TAMAÑO



Nuestro grupo ha generado colecciones amplias de mutaciones de Clementina de Nules y naranjo Navel, dos variedades importantes de la citricultura española. Las mutaciones se llevaron a cabo mediante diversos agentes de tipo físico y químico y sobre diversos órganos, con objeto de ampliar el espectro de variabilidad inducida. En la actualidad, se poseen alrededor de 20-25.000 posibles mutantes en condiciones de campo. Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que algunos mutantes han mantenido diferencias constantes respecto de la media durante los años de estudio, tanto en relación a parámetros de calidad y producción como a los relativos al tamaño y a otros caracteres como, por ejemplo, la maduración interna. En la variedad Washington Navel, por ejemplo, y en relación al tamaño se ha detectado un número considerable de posibles mutantes, tanto de peso considerablemente inferior a la media como de tamaño y peso superior.

Figura 7. TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes)

- Aconitasa
- Fenilalanino-amonio liasa
- Inositol 3-fosfato sintasa
- Proteína sensora de Calcio
- Ácido cafeico metiltransferasa
- Catalasa
- ACC oxidasa
- Invertasa ácida
- Invertasa de pared celular
- Isoflavona reductasa
- Fitoquelatina sintetasa
- Cotransportador Na-dicarboxilato



El Tilling es una estrategia general de genética reversa que identifica mutaciones puntuales en genes de interés y permite por tanto la caracterización molecular de estas mutaciones. La Figura recoge un grupo de genes que están siendo testados en la actualidad en las colecciones de mutaciones de cítricos del IVIA. La técnica es rápida y de bajo coste, y en combinación con un método adecuado de detección, permite la identificación de mutaciones puntuales. El método de detección puede ser analítico o enzimático. En un procedimiento clásico se extrae ADN de plantas combinadas en grupos adecuados; se amplifica por PCR con cebadores específicos del gen de interés marcados con fluoróforos y se digiere con enzimas de restricción. Los productos de la reacción se detectan en un gel de acrilamida en donde las bandas procedentes de los desapareamientos se detectan con facilidad. Una vez detectado el grupo que posee un mutante se repite el proceso hasta detectar la planta portadora.

Figura 8. GENOTECAS

- 1 Flavedo. Senescencia
- 2 Flavedo. Cambio de color.
- 3 Flavedo. Fase II.
- 4 Frutos completos. Fase I.
- 5 Vesículas zumo. Fases II y III.
- 6 Estrés hídrico. Hojas Clemenules.
- 7 Estrés hídrico. Raíces Cleopatra.
- 8 Zona de abscisión A de ovarios.
- 9 Zona de abscisión C (estrés nutricional y control).
- 10 Zona de abscisión limbo-pecíolo de hojas en estrés. Sustraída.
- 11 Raíces de carrizo tratadas con paclobutrazol y auxinas.
- 12 Estrés salino. Hojas de navelina. Tiempo largo.
- 13 Clorosis férrica Raíces. Carrizo.
- 14 Clorosis férrica. Hojas.
- 15 Zona de abscisión – L/P en desarrollo
- 16 Abscisión precosecha Navel.
- 17 KCL_Raíces Cleopatra.



El análisis funcional de los genomas puede basarse bien en la información estructural de los genes que lo componen, si es que ese genoma está ya secuenciado, o bien en la información obtenida a partir del análisis de secuencias génicas expresadas o análisis de ESTs (Expressed Sequence Tags). El análisis de ESTs permite caracterizar una amplia colección de secuencias de ADN que provienen en general de genotecas de ADN complementario (ADNc) originadas a partir de ARN presente en uno o varios órganos de plantas cultivadas en diferentes condiciones. La Tabla enumera las 17 genotecas construidas hasta la fecha. Estas genotecas se construyeron a partir de material vegetal de cítricos en distintos estadios de desarrollo, a distintos tiempos y en distintos ambientes de estrés abiótico, englobando los procesos biológicos y fisiológicos más relevantes del cultivo de los cítricos.