

Las enfermedades de los cítricos: riesgos y amenazas

Evaluación mediante marcadores moleculares de la susceptibilidad a *Alternaria alternata* en cítricos

José Cuenca, Andrés García-Lor, Antonio Vicent, Luis Navarro y Pablo Aleza (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia, Spain).
Patrick Ollitrault (UMR AGAP, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Station de Roujol - Petit-Bourg, Guadalupe).

La mancha marrón de los cítricos es una enfermedad importante producida por el hongo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. pv *tangerine*, que induce lesiones necróticas en frutos y hojas jóvenes (Figura 1a), defoliación y caída de frutos en las variedades susceptibles llegando a disminuir notablemente la producción (Akimitsu y col., 2003). Desde que se observó inicialmente en Australia en 1903 en el mandarino 'Emperor', la enfermedad se ha detectado progresivamente en la mayoría de las regiones productoras de cítricos del mundo, incluida España (Vicent y col., 2000). Esta circunstancia ha provocado que los productores reemplacen variedades susceptibles como 'Fortune', 'Nova' y 'Murcott' por otras resistentes a la enfermedad (Navarro y col., 2015). Actualmente, el control de la enfermedad en campo se basa en la aplicación sistemática de fungicidas; dependiendo de las condiciones climáticas de la zona de producción, es necesario realizar hasta 10-12 tratamientos durante la campaña para evitar pérdidas importantes de producción y producir frutos de calidad para el consumo en fresco (Vicent y col., 2007). Sin embargo, a pesar del elevado número de tratamientos que se realizan, la reducción de los daños ocasionados por el hongo no es siempre satisfactoria por lo que la resistencia genética es la mejor opción para el control de la enfermedad. En este contexto es imprescindible el desarrollo de métodos rápidos que permitan evaluar la resistencia de las variedades ya existentes así como las nuevas variedades obtenidas de los programas de mejora genética de cítricos.

Existen diferentes metodologías para evaluar la resistencia de una variedad a *Alternaria*. Los ensayos en campo permiten diferenciar las variedades resistentes de las susceptibles y además es el único método que permite cuantificar el grado de susceptibilidad de una variedad sensible. El IVIA dispone de parcelas diseñadas específicamente para inducir condiciones favorables para la enfermedad, donde con el tiempo se ha desarrollado una elevada cantidad de inóculo (Figura 1b). Otra de las metodologías más utilizadas consiste en pulverizar hojas jóvenes in vitro con una solución de esporas del hongo (Figura 1c). Esta técnica es sencilla, pero es muy agresiva y tiene el inconveniente de que algunas variedades resistentes, como las clementinas, pueden mostrar reacciones de susceptibilidad (Vicent y col., 2004). Además de estas dos metodologías, en el IVIA se ha puesto a punto un nuevo método para la inoculación de brotes jóvenes directamente en la planta. Esta metodología es más fiable que las inoculaciones de hojas in vitro, ya que permite identificar claramente tanto las variedades sensibles como las resistentes (Figura 1d) (Vicent y col., 2012). Sin embargo estos métodos requieren la disponibilidad de plantas cultivadas en parcelas con elevado inóculo de *Alternaria*, el cultivo de plantas en condiciones de invernadero para la producción de hojas y brotes en un estado fenológico adecuado para ser inoculadas con las esporas del hongo, lo cual limita este tipo de análisis a un momento determinado.

Cuando se obtienen marcadores moleculares ligados a un gen que controla

un carácter de interés agronómico (es decir, que segreguen juntos en la meiosis), la selección de este marcador resulta en la selección indirecta del gen de interés. Este hecho constituye la base de la selección asistida por marcadores moleculares (Marker Assisted Selection-MAS). El diagnóstico de la resistencia de una variedad a *Alternaria* con marcadores moleculares es una metodología muy rápida y sencilla. Requiere de una extracción de ADN, que se puede realizar a partir de cualquier tejido de la planta y de los frutos, y una reacción de PCR con los cebadores adecuados. Los resultados se obtienen en un día y en cualquier época del año mientras que los métodos comentados anteriormente son mucho más lentos y costosos.

La resistencia a *Alternaria* está determinada por un alelo recesivo (A: alelo susceptible; a: alelo resistente). Por tanto, las variedades que presentan el gen tanto en homocigosis susceptible (AA) como en heterocigosis (Aa) se muestran susceptibles a la enfermedad y únicamente son resistentes las variedades con el gen en homocigosis (aa) (Dalkilic y col., 2005; Cuenca y col., 2013). La susceptibilidad a *Alternaria* es un factor limitante en los programas de obtención de nuevas variedades de cítricos. Debido a la compleja biología reproductiva de los cítricos, como la monoembrionía y la frecuencia en la formación de gametos no reducidos, así como otros parámetros relacionados con la calidad de los frutos, en los programas de mejora genética a nivel nacional

NO DEJAR HUELLA DEJA HUELLA



CITROSOL A S UE es la cera de recubrimiento de cítricos que disminuye el **consumo energético** y la **emisión de gases** efecto invernadero (CO₂, CO, etc...).

Una solución ecoeficiente única en el mercado, que gracias a sus excelentes propiedades de secado reducen notablemente las temperaturas en el túnel de secado, manteniendo intacta la calidad y frescura original de la fruta.



 @Citrosol_com

www.citrosol.com



PRODUCTOS CITROSOL S.A.
Part. Alameda, parc C, 46721
Potries (Valencia) España
Tel: +34 96 280 05 12
citrosol@citrosol.com

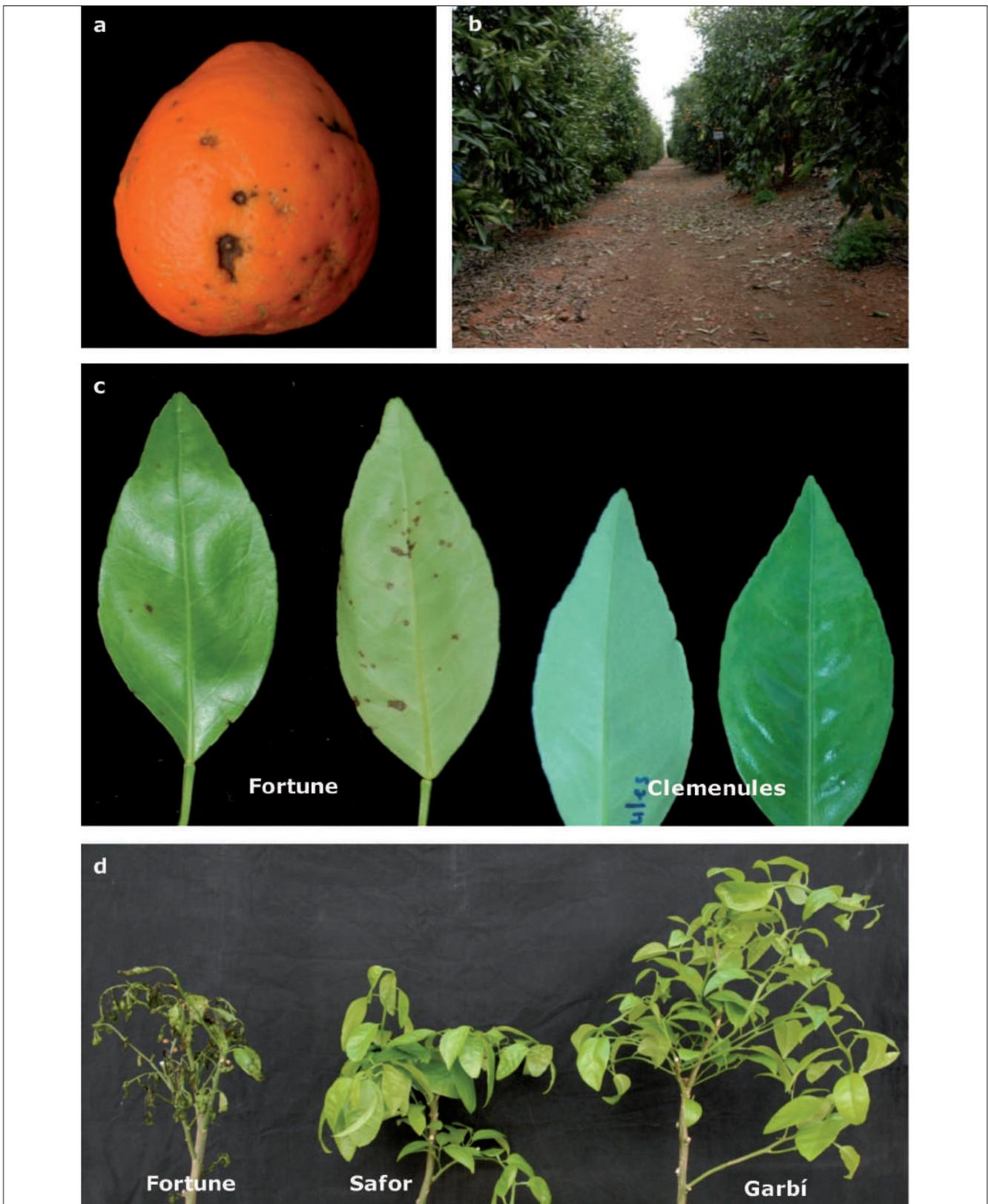


Figura 1. a) Lesiones originadas por *Alternaria* en frutos de mandarina 'Fortune'. b) Parcelas experimentales del IVIA con elevada cantidad de inóculo de *Alternaria*. c) Hojas de 'Fortune' y 'Clemenules' inoculadas in vitro con una solución de esporas de *Alternaria*. Las hojas de 'Fortune' muestran lesiones necróticas típicas de la enfermedad indicando que es una variedad susceptible mientras que 'Clemenules' no presenta síntomas y por lo tanto es resistente. d) Brotes de los mandarinos 'Fortune', 'Safor' y 'Garbí' inoculados con una solución de esporas de *Alternaria*. Los mandarinos 'Safor' y 'Garbí' no presentan ninguna lesión en los brotes (variedades resistentes) mientras que los brotes de 'Fortune' están completamente dañados por el hongo (variedad susceptible).

e internacional se han utilizado sistemáticamente como parentales variedades susceptibles a *Alternaria*, tanto a nivel diploide como a nivel triploide. Este es el caso de parentales como 'Fortune', 'Murcott', 'Ponkan', 'Dancy', 'Minneola', 'Nova', 'Fairchild', 'Fremont', 'Page', 'Orlando', 'Pixie' o 'Daisy' (Cuenca y col., 2013; Navarro y col., 2015).

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Citricultura y Producción Vegetal del IVIA estamos llevando a cabo un programa de obtención de híbridos triploides desde el año 1995 (Navarro y col., 2015). En el marco de este programa, se han utilizado rutinariamente parentales susceptibles a *Alternaria*, lo que ha permitido analizar la resistencia a la enfermedad en grandes poblaciones segregantes, así como desarrollar marcadores moleculares ligados a la misma. Para ello se analizaron híbridos diploides y triploides obtenidos a partir de diferentes hibridaciones sexuales entre parentales diploides e interploides. Estos híbridos, junto con sus parentales, se han cultivado en parcelas experimentales del IVIA con una elevada cantidad de inóculo y además se analizaron mediante la inoculación de hojas jóvenes in vitro con una suspensión de esporas del hongo. Estos resultados nos permitieron mapear el gen de susceptibilidad a *Alternaria* cerca del centrómero del cromosoma 3 (Cuenca y col., 2013) y desarrollar marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism) flanqueando al gen de interés a una distancia de 0.4 y 0.7 cM. Esta distancia indica que el error potencial en el diagnóstico de la resistencia genética de una variedad es de cuatro de cada 1000 híbridos analizados en el caso del marcador ubicado a 0.4 cM. La eficiencia en la selección de este marcador fue comprobada mediante el análisis de 40 variedades comerciales (20 resistentes y 20 susceptibles), obteniendo una asociación perfecta entre el perfil del marcador y la respuesta de las variedades a la enfermedad (Figura 2). Por su escasa recombinación con el gen de interés, este nuevo marcador desarrollado es muy eficiente para la selección temprana de nuevos híbridos resistentes, sin la necesidad de evaluar los híbridos en campo y/o realizar inoculaciones de esporas de *Alternaria* in vitro. Este marcador nos ha permitido seleccionar más de 2.000 híbridos resistentes de más de 4.500 analizados, evitando así el cultivo y posteriores análisis de más de 2.000 híbridos susceptibles que se eliminaron del programa en una fase temprana de evaluación lo cual supone un ahorro muy importante de espacio, tiempo, trabajo y dinero. Cabe destacar que el IVIA utiliza esta metodología en las variedades obtenidas en sus propios programas de mejora genética, para proporcionar una información debidamente contrastada antes de su distribución comercial y pone a disposición pública la utilización de este marcador para realizar un diagnóstico rápido y fiable de la resistencia o susceptibilidad genética de

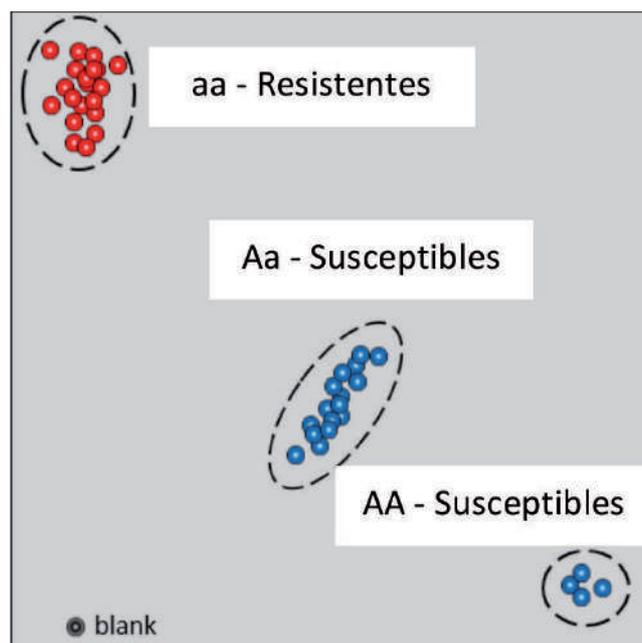


Figura 2. Selección de variedades resistentes a *Alternaria* utilizando el nuevo marcador SNP desarrollado ubicado a 0.4 cM, analizado mediante la técnica KASPar.

cualquier nueva variedad que se obtenga o se importe desde otros países. En las variedades importadas o procedentes de otros programas que están protegidas o patentadas, salvo que exista un acuerdo previo con sus propietarios, el IVIA solo puede realizar estas pruebas una vez iniciada su distribución comercial.

Desde el punto de vista de la sanidad vegetal los marcadores moleculares permiten caracterizar rápidamente la susceptibilidad a *Alternaria* de las diferentes variedades de cítricos. El cultivo de variedades resistentes al hongo evita la realización de tratamientos fungicidas para el control de la enfermedad lo cual implica una reducción de los costes de producción, dispersión de productos químicos al medio ambiente y en el caso de la agricultura ecológica, esto es muy importante, ya que el uso de los tratamientos fungicidas está limitado.

BIBLIOGRAFÍA

- Akimitsu K., Peever T.L., Timmer L.W. (2003). Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Mol Plant Pathol* 4: 435-446.10.1046/j.1364-3703.2003.00189.x PubMed: 20569403
- Cuenca J., Aleza P., Vicent A., Brunel D., Ollitrault P., Navarro L. (2013). Genetically based location from triploid populations and gene ontology of a 3.3-mb genome region linked to *Alternaria* brown spot resistance in citrus reveal clusters of resistance genes. *PLoS One* 8:e76755. doi: 10.1371/journal.pone.0076755.
- Dalkilic Z., Timmer L.W., Gmitter F.G. (2005). Linkage of an *Alternaria* disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. *J Am Soc HortSci* 130(2): 191-195
- Navarro L., Aleza P., Cuenca J., Juárez J., Pina J., Ortega C., Navarro A., Ortega V. (2015) The mandarin triploid breeding program in Spain. *Acta Horticulturae* 1065(1): 389-395.
- Vicent A., Armengol J., Sales R., García-Jiménez J., Alfaro-Lassala F. (2000). First report of *Alternaria* brown spot of citrus in Spain. *Plant Dis* 84(9): 1044.10.1094/PDIS.2000.84.9.1044B
- Vicent A., Badal J., Asensi M.J., Sanz N., Armengol J., García-Jiménez J. (2004). Laboratory evaluation of citrus cultivars susceptibility and influence of fruit size on Fortune mandarin to infection by *Alternaria alternata* pv. citri. *Eur J Plant Pathol* 110: 245-251.10.1023/B:EJPP.0000019794.00000.02
- Vicent A., Armengol J., García-Jiménez J. (2007). Rain fastness and persistence of fungicides for control of *Alternaria* brown spot of citrus. *Plant Dis* 91: 393-399.10.1094/PDIS-91-4-0393
- Vicent A., Cuenca J., Aleza P., Navarro L. (2012) Consideraciones sobre la susceptibilidad de las mandarinas a la mancha marrón causada por *Alternaria*. *Levante Agrícola*, 410: 109-114.