

Título de tesis:

Towards application of genetic engineering in citriculture: 1) assessing dispersal, long-term stability and phenotypic impact of transgenes in citrus trees and 2) improving nutri-functional quality of orange fruit through metabolic engineering

Resumen

A pesar de los enormes beneficios potenciales que ofrecen los cítricos genéticamente modificados (GM), su liberación en campo suscita preocupaciones acerca de su potencial impacto ambiental y posibilidad de que muestren efectos deletéreos inesperados desde un punto de vista agronómico. Las principales preocupaciones que plantea el uso de la transformación genética para la mejora de este cultivo de vida larga, propagación vegetativa y compleja biología reproductiva son: (1) la transferencia de los transgenes vía polen a variedades compatibles de especies de *Citrus* y afines; (2) la estabilidad de los transgenes a largo plazo; (3) la aparición de efectos pleiotrópicos adversos derivados de la integración y la expresión de los transgenes sobre las principales características agronómicas y fenotípicas del cultivo. Todas estas cuestiones han sido ampliamente estudiadas en otros cultivos anuales GM que ya son o no comerciales. Sin embargo, puesto que el empleo de la transformación genética en la mejora de árboles frutales todavía se encuentra en sus inicios, actualmente se dispone de muy poca información al respecto para estos cultivos. Por todo ello, el futuro de los árboles transgénicos en el ámbito comercial permanece aún incierto, aunque actualmente se dispone de la tecnología para producirlos. Por otro lado, en el caso concreto de los cítricos, no existen variedades transgénicas comerciales ni evidencias inequívocas de que esta herramienta sea realmente útil para afrontar con éxito objetivos de mejora concretos. Lograr cumplir objetivos de mejora tan importantes como la mejora de la calidad nutri-funcional de los frutos cítricos mediante ingeniería genética podría contribuir a una mayor aceptación de esta tecnología por parte del público, puesto que se trata de una mejora dirigida primeramente al consumidor.

En este trabajo nos hemos planteado afrontar parte de los aspectos que en gran medida limitan la aceptación y comercialización de cítricos GM, mediante (1) la realización de un experimento de campo con cítricos GM para evaluar su seguridad ambiental y la ausencia de efectos agronómicos adversos (2) el abordaje de un objetivo de mejora de la calidad nutri-funcional de la naranja concreto mediante ingeniería metabólica con la finalidad de reforzar sus propiedades saludables.

El experimento de campo consistió en una plantación de cítricos transgénicos que portaban únicamente los genes marcadores *uidA* y *nptII* cuya finalidad fue estudiar la viabilidad de la transformación genética en la mejora de genotipos cítricos comercialmente importantes. Este huerto experimental nos sirvió para estimar la frecuencia máxima de dispersión de los transgenes por polen bajo condiciones de polinización abierta y estudiar los factores ambientales, genéticos y fenológicos que la determinan, para así poder proponer medidas de

contención apropiadas en futuras plantaciones de cítricos GM. También sirvió como primera aproximación para abordar cuestiones básicas como el estudio de la estabilidad de la expresión de los transgenes a largo plazo (tras 7 años de establecimiento en campo) bajo condiciones reales de cultivo y su potencial impacto sobre la morfología, fenología y calidad de la fruta de los cítricos transgénicos. Los estudios realizados, aunque no resuelven todas las preocupaciones concernientes a los cítricos GM, aportan información crucial relativa a su seguridad y comportamiento en campo, inexistente hasta el momento, que puede servir como base para futuros ensayos de campo con cítricos GM y como guía para las políticas de regulación de su plantación (caso-a-caso).

Por otro lado, en este trabajo se ha logrado desarrollar una estrategia para inducir producción temprana de fruta e incrementar el contenido de β -caroteno (pro-vitamina A, con elevada capacidad antioxidante) en la pulpa de una variedad de naranjo dulce mediante ingeniería metabólica. Dicha estrategia consistió en el silenciamiento mediado por RNAi del gen de una β -caroteno hidroxilasa de naranjo (*Cs β CHX*), implicada en la conversión de β -caroteno en xantofilas, combinado con la sobreexpresión del gen *FLOWERING LOCUS T* de naranjo (*CsFT*) en plantas transgénicas juveniles de naranjo dulce cv Pineapple. Posteriores ensayos con el animal modelo *Caenorhabditis elegans* demostraron que las naranjas enriquecidas ejercían un efecto antioxidante in vivo un 20% mayor que las naranjas control isogénicas. Este es el primer ejemplo exitoso de ingeniería metabólica para incrementar el contenido de β -caroteno (o cualquier fitonutriente) en naranjas y demuestra el potencial que tiene la ingeniería genética para el enriquecimiento nutricional de cultivos frutales leñosos.