

PARTE III
***Métodos para acelerar
programas de mejoramiento
e identificación varietal***

III. CAPÍTULO 1

Obtención de Plantas Doblehaploides

Polci, Pablo; Conti, Verónica; Miranda, Rubén; Gear, Nicolás

1 Introducción

Comentarios generales sobre los haploides

Para referirnos al término haploide es necesario conocer previamente el origen de dicha denominación, y definir algunos conceptos básicos sobre el tema. Si consideramos *haploide* al individuo que posee un solo juego de cromosomas de la especie, no estaríamos incluyendo en esta clasificación a aquellos individuos derivados de especies poliploides, cuya constitución genética es igual a la de los gametos normales de dicha especie. Por ejemplo, un autopoliploide AAAA ($2n = 4x$) daría lugar a individuos "haploides" AA ($n = 2x$), que por tener dos juegos cromosómicos (AA) no podrían ser incluidos en la definición. Por lo tanto, una solución sería denominar como haploides a los individuos originados a partir de especies *diploides*, que posean un solo juego de cromosomas ($n = x$), llamando *polihaploides* a aquellos individuos con una composición cromosómica igual que la gamética normal de la especie, que tengan dos o más juegos cromosómicos ($n > x$). Otra posibilidad sería considerar el término haploide en un sentido más amplio, comprendiendo en éste a todos los individuos que posean una constitución cromosómica igual a la de los gametos normales de la especie ($n = 2n/2$). Llamariamos de esta manera *monoploides* y *polihaploides* a los individuos provenientes de plantas diploides ($2n = 2x$) y poliploides ($2n > 2x$) respectivamente. De aquí en adelante, a los fines prácticos y en concordancia con la segunda definición, nos referiremos al término *haploide* indistintamente del nivel de ploidía de la especie en cuestión, como a aquellos individuos que poseen la mitad del número cromosómico normal contenido en las células somáticas de la especie.

Identificación de Haploides

Varios procedimientos facilitan la búsqueda de haploides en muestras grandes en número de individuos. Algunos de ellos son:

- *Morfología*: las plantas haploides son, en general, más pequeñas que las diploides, tanto en sus partes vegetativas como florales. Esto se debe principalmente a la disminución en el tamaño de sus células. Es lógico pensar que el fenotipo más pequeño de las plantas puede ser una primera aproximación en la búsqueda de haploides. Si esta disminución de tamaño fuera notable en las semillas, sería muy fácil realizar una selección mecánica, aunque esto sucede en pocas especies.
- *Poliembrionía*: la presencia de poliembrionía facilita la detección de embriones haploides. No obstante, debe realizarse el control citológico correspondiente. El porcentaje de embriones gemelos observados varía con la especie y el genotipo.
- *Genes marcadores*: con este fin puede utilizarse cualquier par de alelos cuyos fenotipos dominante y recesivo sean fácilmente distinguibles. En la práctica, conviene utilizar marcadores que posean manifestaciones fenotípicas claras en semilla o en plántula y de esta manera hacer una selección más económica en tiempo y esfuerzo. Para identificar haploides en una variedad que se supone homocigota, se realizan cruzamientos con otra variedad que sea homocigota para el alelo alternativo. La mayor parte de la descendencia será heterocigota (diploide), con fenotipo dominante. Los individuos que aparezcan con el fenotipo recesivo serían haploides, obtenidos por partenogénesis o androgénesis, según sea el fenotipo recesivo materno o paterno, respectivamente.

Antecedentes

El valor de los haploides se conoce desde 1922, cuando se descubrió la producción espontánea de los mismos, siendo superior a cien el número de especies vegetales capaces de producirlos *in-vivo*. Sin embargo, la frecuencia con la cual se producen es muy baja, con valores que van de 0,001 a 0,01%.

Entre los casos de *haploidía espontánea* es común la poliembrionía, que, con una gran va-

riación entre los distintos genotipos, ocurre en una amplia gama de especies, géneros y familias. En estos casos es frecuente la aparición de haploides procedentes de una sinérgida del saco embrionario, puesto que se ha comprobado en muchas especies que las células antipodas degeneran antes de la fecundación.

En 1966, Guha y Maheshwari descubrieron que las anteras de *Datura innoxia* Mill. generaban plantas haploides al ser cultivadas *in-vitro*. Este proceso, confirmado posteriormente por Nitsch y Nitsch (1969) en tabaco, se ha utilizado para producir haploides en numerosas especies. En el caso de *Datura innoxia*, las frecuencias de inducción son casi del 100% y el rendimiento es de más de mil plántulas o callos por antera en condiciones óptimas (figura 1).

En estudios de androgénesis *in-vitro* se ha detectado especial facilidad para regenerar haploides a partir de anteras aisladas o de granos de polen en miembros de la familia de las solanáceas. También se han encontrado resultados sorprendentes en numerosos géneros de las crucíferas, gramíneas y ranunculáceas, aunque resulta común observar diferencias significativas, incluso dentro de un mismo género. No se ha logrado, sin embargo, el mismo éxito en especies arbóreas y arbustivas.

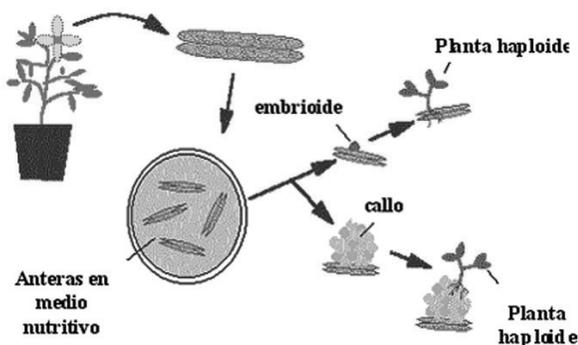


Figura 1. Obtención de plantas haploides por cultivo de anteras.

Importancia de los haploides y aplicaciones en el mejoramiento vegetal

Los métodos tradicionales para el mejoramiento vegetal han sido practicados por cientos de años. Actualmente se ha llegado a una etapa en donde estos métodos son insuficientes

para hacer frente a las demandas mundiales de producción. A pesar de que cada año se liberan al mercado numerosas variedades, estas no persisten demasiado. Los objetivos de mejoramiento a largo plazo no podrán ser alcanzados a menos que se genere mucha variabilidad genética que pueda ser utilizada con estos fines y que existan métodos que acorten el tiempo necesario para la obtención de variedades.

El advenimiento de las técnicas biotecnológicas y los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de nuevas herramientas de gran utilidad en el mejoramiento vegetal. Entre éstas, la producción de haploides y doblehaploides son herramientas interesantes ya que permiten acortar el tiempo requerido para la obtención de nuevas variedades, siendo un buen complemento para los programas de mejora tradicionales. Al carecer de genotipos heterocigotas, las poblaciones doblehaploides (DH) necesarias para encontrar genotipos raros pueden ser mucho menos numerosas, especialmente en el caso de caracteres recesivos, ya que éstos no quedan enmascarados por los alelos dominantes. Las poblaciones DH, si se las compara con poblaciones segregantes, presentan mayor variación genética aditiva y ausencia de varianza genética debida a la dominancia. Es decir que cuando se utilizan poblaciones doblehaploides se eliminan las complejidades del estado heterocigota y se facilita enormemente el análisis genético. De esta manera pueden distinguirse las mutaciones recesivas de forma inmediata, haciendo que el proceso de selección sobre una población de haploides resulte más eficiente (figura 2).

La producción de haploides es una alternativa biotecnológica de gran importancia y ha resultado exitosa en varios cultivos, entre ellos cebada, arroz, maíz y trigo.

Un sistema de producción de DH debe cumplir con tres requisitos básicos para su utilización en programas de mejoramiento:

1. Debe producir líneas DH eficientemente a partir de todos los genotipos.
2. Los DH obtenidos deben ser normales y estables.
3. Éstos deberían representar una muestra al azar del conjunto de gametos parentales.

Entre las aplicaciones más importantes de los doblehaploides en el mejoramiento vegetal podemos citar:

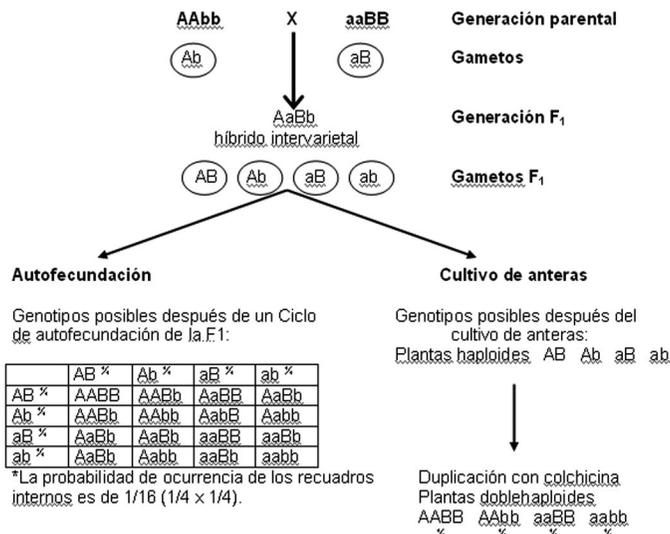


Figura 2. Ventaja del uso de haploides en el mejoramiento cuando los cultivares parentales difieren, teóricamente, en dos pares de genes. Si el genotipo buscado es, por ejemplo el doble recesivo aabb, por autofecundación convencional se tiene una probabilidad de 1/16 de encontrarlo. Si se induce haploidía, el mismo genotipo tendrá una probabilidad de ocurrencia de 1/4 porque no se producirán los genotipos heterocigotas.

1. Acortamiento de los programas de mejora: el desarrollo de nuevos cultivares por los métodos tradicionales actuales comprende tres etapas fundamentales: a) generación de variabilidad genética, ya sea por medio de hibridaciones sexuales intra e interespecífica, por inducción de mutaciones, o por transformación genética; b) recuperación de progenies homocigotas a través de generaciones repetidas de autofecundación o retrocruzamiento, seleccionando a favor de los caracteres de interés; c) evaluación del comportamiento de los nuevos materiales en ensayos comparativos a campo. Estos pasos son básicos en un programa de mejora, pudiendo existir otras etapas en función del modo reproductivo de la especie. Así por ejemplo, el tiempo requerido para la obtención de un nuevo cultivar de trigo de ciclo invernal es de aproximadamente diez años, a través del mejoramiento tradicional (figura 3). La biotecnología se presenta como una alternativa atractiva, no sólo para reducir el tiempo de obtención de los genotipos deseados, sino también para lograr una economía de mano de obra y espacio en el campo experimental.

- En las plantas *autógamas*, con los métodos convencionales de mejoramiento, la homocigosis práctica se logra recién luego de seis a ocho generaciones de autofecundación. Mientras que con una técnica de producción de haploides seguida de duplicación cromosómica, es posible llegar a homocigosis completa en solo una generación.
- En las plantas *alógamas*, la producción de homocigotas resulta de gran importancia. Al trabajar con especies de polinización cruzada se favorece naturalmente la heterocigosis, y, de ser posible la autofecundación, la obtención de homocigotas se ve dificultada por la endogamia.
- En plantas *bulbosas, árboles frutales y forestales* la homocigosis juega un rol muy importante en el aceleramiento de los programas de mejora. Debido al prolongado tiempo requerido para alcanzar la fase adulta, el proceso de mejora resulta extremadamente largo, aún siendo posible la autopolinización.

2. Generación de poblaciones de mapeo: para el mapeo genético de plantas, diversos tipos de poblaciones pueden ser utilizadas. La selección del tipo de población a usar se realiza en función de los objetivos de la investigación y del tiempo y recursos disponibles. Las poblaciones de mapeo con el mayor contenido de información son aquellas obtenidas a partir del cruzamiento entre dos individuos homocigotos contrastantes. En las plantas F₁ obtenidas, el desequilibrio de ligamiento es máximo, y las poblaciones derivadas a partir de estas plantas F₁ procuran explorar este desequilibrio. Para especies de autofecundación o que toleran la autofecundación pueden utilizarse poblaciones F₂, F_n, RILs (*Recombinant Inbred Lines*), derivadas de retrocruzas y doblehaploides. Las poblaciones de doblehaploides representan la variabilidad genética entre los progenitores luego de ocurrida una sola meiosis (F₁), y son especialmente indicadas cuando se realizan estudios con QTL (*Quantitative Trait Locus*), ya

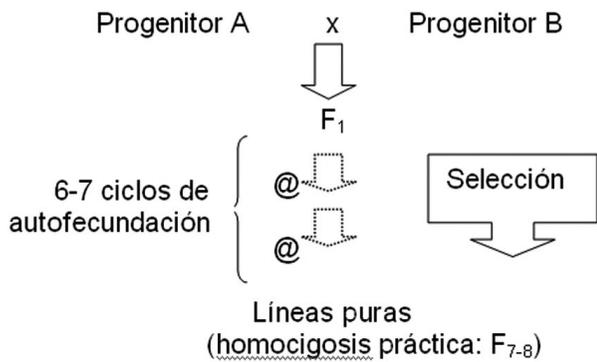


Figura 3. Representación esquemática de los pasos requeridos para la obtención de líneas puras en un programa de mejoramiento tradicional.

que al obtenerse genotipos 100% homocigotas se dispone de poblaciones estables o “inmortales” de mapeo, permitiendo analizar la misma población en diferentes años y localidades, debido a la constante disponibilidad de semilla.

3. Estudio de especies poliploides: la inducción de haploides en plantas poliploides facilita el trabajo de investigación y mejora, ya que permite manejar niveles de ploidía menores para los estudios de herencia y la combinación de caracteres de interés.

4. Fusión de protoplastos: al fusionar dos protoplastos haploides se origina uno diploide que puede duplicarse y llevar a la obtención de un híbrido interespecífico o intergenérico, siendo esto una ventaja importante cuando se trabaja en hibridación somática.

5. Variación gametoclinal: la androgénesis *in-vitro* provee un excelente sistema para analizar, a nivel esporofítico, la variación debida a recombinación y segregación meiótica. Las variantes gametoclonales expresan el carácter recesivo en la R₀, a diferencia de las somaclonales, que requieren de autofecundación y análisis de progenie. Algunos logros de esta técnica:

- Frutos de tomate con mayor contenido de sólidos.
- Plantas enanas de arroz con granos más largos y con elevados niveles de proteínas de reserva y más macolladoras.
- Plantas de *Datura innoxia* con contenidos más elevados de alcaloides en las hojas.
- Plantas de tabaco con mayor resistencia

a bajas temperaturas.

- Plantas de *Brassica napus* con mayor contenido de aceite del ácido erúrico en las hojas. Este aceite se usa como lubricante en la industria.

6. Mutagenesis: si se aplica mutagenesis a un sistema de haploides, se obtienen mutantes sólidos, lográndose la homocigosis del mutado rápidamente luego de la duplicación con colchicina. Entre los agentes mutagénicos más frecuentemente utilizados se encuentra la N-metil-N-nitrosurea (20 mM), los rayos γ (0,5 krad) y el etil metil sulfonato.

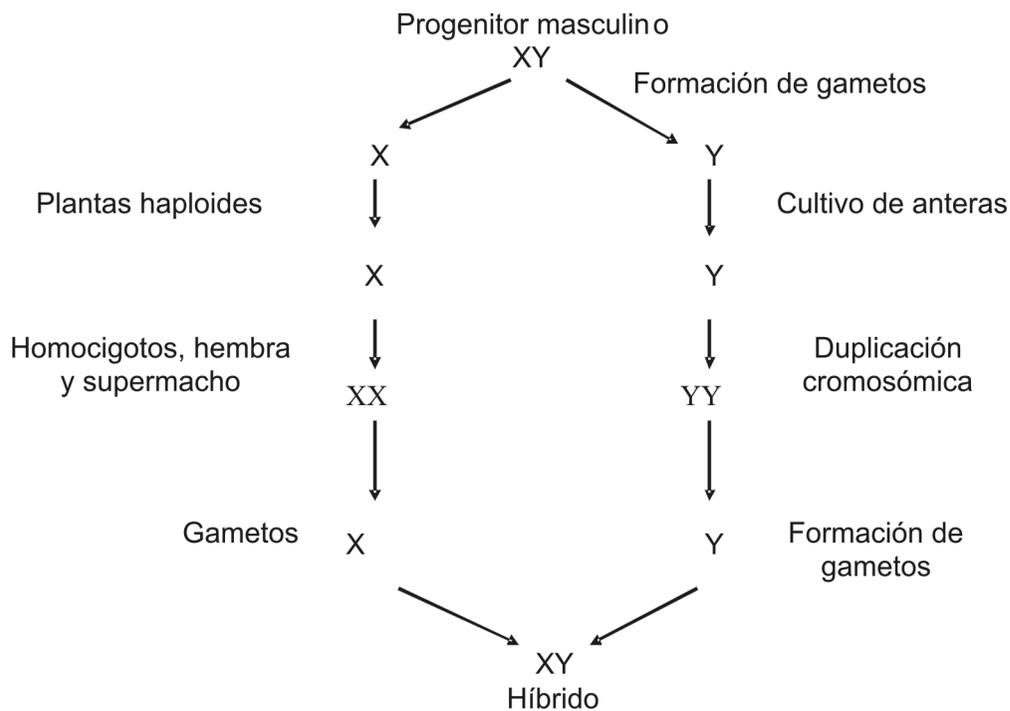
7. Transformación genética: rige el mismo principio que para mutagenesis. La transformación de haploides permite la obtención del transgén en homocigosis luego de la duplicación con colchicina. Puede realizarse con PEG (polietilenglicol), microinyección o utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

8. Producción de plantas homogaméticas: *Asparagus officinalis* es una especie cultivada, dioica, en la cual las plantas femeninas son XX y las masculinas son XY. De esta manera, para obtener una población de plantas deben cruzarse ambos tipos, lo que dará una progenie constituida por 50% de plantas XX y 50% de plantas XY. Sin embargo, desde el punto de vista del productor, es deseable la obtención de una población constituida solamente por plantas XY, que tienen un menor contenido de fibra y son, por lo tanto, preferidas por los consumidores. Para solucionar este problema y obtener 100% de plantas masculinas se ideó un sistema que consiste en el cultivo de anteras y diploidización de plantas YY, llamadas supermachos. La ventaja de estas plantas es que, al ser cruzadas con plantas XX darán 100% de plantas XY, como se muestra en el esquema 1.

Con este sistema, en 1990 fue liberada una variedad llamada Andrea (un híbrido obtenido como se mencionara anteriormente). Andrea es una variedad muy homogénea, de alto rendimiento y de excelente calidad.

Obtención de Haploides

Como se mencionara anteriormente, las plantas haploides aparecen en muy baja frecuencia en la naturaleza, siendo necesaria la



Esquema 1.

posterior ocurrencia de duplicación cromosómica para la obtención de semillas. Por ello, la producción artificial de haploides resulta siempre más efectiva.

- Origen de los haploides

I. Ginogénesis: desarrollo de un gameto femenino no fecundado. Se logra por:

1. Castración y aislamiento de las flores. Por este tratamiento se han obtenido haploides de *Triticum monococcum*.
2. Polinización retrasada: la castración de las flores y la posterior polinización en el límite de la madurez receptiva del estigma permiten obtener hasta un 30% de haploides en trigo.
3. Presencia de dos células espermáticas con diferente velocidad de desarrollo: el mecanismo involucrado en la generación de haploides estaría basado en la falta de fertilización de la oosfera durante la doble fertilización.
4. Polinización con polen inviable: a) utilizando polen extraño (típico de cruzamientos interespecíficos), incapaz de fe-

cundar a la especie en cuestión, puede servir de estímulo para inducir haploidía, como sucede en el cruzamiento entre *Solanum tuberosum* x *S. phureja* (papa silvestre). El polen de la papa silvestre contiene sólo un núcleo generativo, producto de una gametogénesis anormal, por lo cual la fertilización doble no logra producirse, pero se forman embriones haploides por partenogénesis; b) utilizando polen previamente irradiado.

5. Cultivo de ovarios: puede ser eficaz para obtener haploides a partir de cruzamientos interespecíficos.

II. Androgénesis: desarrollo de un gameto masculino. Se logra por:

1. Cultivo de anteras: se ha inducido haploidía en mono y dicotiledóneas, siendo más fácil en las últimas. Es una técnica simple que, dependiendo del genotipo y de las condiciones de cultivo permite obtener elevados números de plantas en tiempos relativamente cortos. Ha sido más difícil en los cereales, no obstante se obtuvieron haploides de arroz, trigo,

cebada con diferentes grados de dificultad.

2. Cultivo de microsporas: en 1974 Nitsch indujo la regeneración de plantas haploides de *Nicotiana tabacum* y *Datura innoxia* a partir de cultivos en suspensión de microsporas, previo choque térmico a baja temperatura de las flores. Este método tiene la ventaja de producir haploides masivamente (más de 7000 plantas por botón floral en tabaco), y de permitir la aplicación de diferentes tratamientos a las microsporas como transformación o mutagénesis para luego obtener plantas por embriogénesis partiendo de una única célula inicial. Para conseguir diferenciar plantas a partir de microsporas es necesario quebrar el mecanismo responsable de la asimetría en la primera mitosis del polen.
3. Técnica de gametofito indeterminado (*ig*): en 1969 J L Kermicle desarrolló una técnica en maíz basada en la ocurrencia de una mutación espontánea, encontrada en la línea W23. El gen *ig* provoca una disrupción en el desarrollo del gametofito femenino, generando, luego del proceso de polinización, que los núcleos espermáticos ocasionalmente se desarrollen androgenéticamente. El desarrollo embrionario de los núcleos espermáticos en el citoplasma materno resulta en la formación de haploides androgenéticos, o haploides paternos.

III. A partir de alguna célula haploide del saco embrionario distinta del gameto femenino (sinérgidas o antípodas).

IV. Cruzamientos interespecíficos o intergenéricos con eliminación cromosómica: se produce la fertilización de manera de que se forme un cigoto diploide, que a lo largo de las sucesivas divisiones mitóticas, va perdiendo el genoma del individuo que aportó el gameto masculino, como sucede en los cruzamientos entre *Hordeum vulgare* y *H. bulbosum*.

V. Interacción núcleo-citoplasma: utilizando líneas de sustitución y restauración nuclear se encontró que los individuos con citoplasma de *Aegilops caudata* y núcleo de *Triticum aestivum* o *Triticale* mostraban una frecuencia de

haploidía del 3,1% y del 52,9% respectivamente. Esto se debe a que ciertas interacciones entre un citoplasma y un núcleo extraño inducen haploidía.

VI. Semigamia: el núcleo del gameto masculino penetra en la ovocélula pero sin fusionarse con el núcleo femenino. Ambos núcleos comienzan a dividirse independientemente, produciendo un individuo haploide con tejidos de origen materno y paterno.

- Métodos más utilizados para la obtención de plantas haploides

Entre los métodos disponibles actualmente para la obtención de doblehaploides, los más utilizados son la hibridación interespecífica e intergenérica, la androgénesis, y recientemente la ginogénesis en maíz.

I. Cultivo de Anteras: consiste en el cultivo de anteras inmaduras en un medio de inducción donde las microsporas competentes originarán callos, que serán luego transferidos a un medio apropiado para la regeneración de plantas (figura 1). En algunas especies de dicotiledóneas el número de plantas obtenidas por cada cien anteras cultivadas es muy elevado. En cambio, en las gramíneas la técnica no ha sido tan exitosa. Sin embargo, los progresos en los métodos de cultivo *in-vitro* durante las últimas décadas han permitido obtener buenos resultados con gramíneas (figura 4), aún en aquellas consideradas recalcitrantes. La capacidad de respuesta al cultivo de anteras, denominada capacidad androgénica, puede ser evaluada a través de la producción de callos y de plantas verdes, y su eficiencia es altamente dependiente de:

1. El genotipo: es quizás el factor más importante que afecta al cultivo de anteras. En la naturaleza, la haploidía es controlada por el gen *hap*, llamado gen inhibidor de la haploidía. Existe suficiente evidencia que sugiere que la androgénesis *in-vitro* también está bajo control génico, y que este carácter puede ser transferido desde clones con alta respuesta a otros no respondedores. Se ha hallado variabilidad en la respuesta entre especies y aún dentro de ellas. En cebada y trigo los caracteres inducción de callos y regeneración de plantas son altamente hereda-

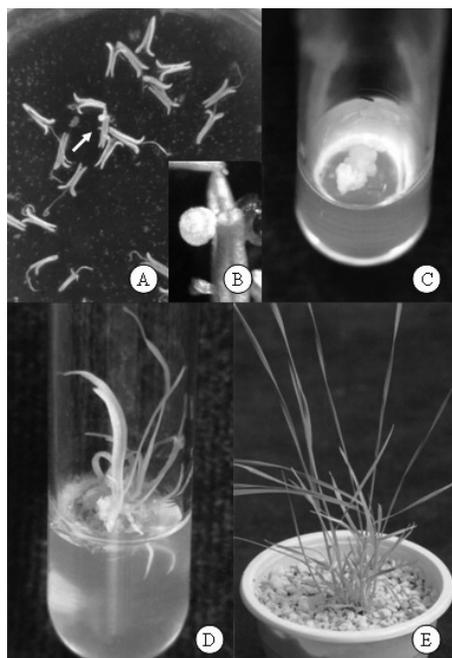


Figura 4. Producción de callos y plantas a partir del cultivo de anteras de *Triticum aestivum*. (A) Callo blanco y compacto sobre una antera (flecha). (B) Detalle del callo señalado en (A). (C) Callo transferido a medio de cultivo para regenerar planta. (D) Plántula de trigo regenerada a partir de callo, con sistema radicular en formación. (E) Planta haploide completa finalizando la etapa de rusticación, creciendo sobre sustrato inerte (Perlita).

bles, y se ha sugerido que ambos caracteres estarían controlados por muchos genes. Por lo tanto, el mejoramiento de la capacidad androgénica no parece difícil, siendo la identificación de genotipos con gran capacidad de respuesta un paso indispensable para su incorporación en los bloques de cruzamiento.

2. El % de albinismo: la ocurrencia de plantas albinas representa un serio problema para la aplicación del cultivo de anteras en programas de mejoramiento de cereales. La incidencia depende, no sólo de la especie, sino también de la variedad, citándose valores de 50, 70 y 100% para tres variedades diferentes de arroz. Bernard (1980) ha sugerido que las altas temperaturas incrementan la diferencia entre la velocidad de replicación del

material nuclear y el de las organelas, resultando en un desarrollo retardado o incompleto de los plástidos, lo cual conduciría a la producción de fenotipos albinos. De acuerdo a este autor, el desarrollo de un sistema fotosintético funcional es promovido por el tratamiento con bajas temperaturas, aunque no siempre un pretratamiento con frío reduce incidencia de albinismo.

3. Las condiciones de crecimiento de las plantas donantes: la edad y las condiciones ambientales en que crecen las plantas afectan considerablemente la capacidad androgénica de las mismas. Los factores ambientales más críticos son el fotoperíodo, la intensidad de luz, la temperatura, la nutrición y la concentración de CO_2 . Estos factores incidirían en la capacidad de producir las divisiones celulares morfogénicas que conducen al desarrollo de embrioides y la regeneración de plantas. Este último paso es crítico dentro de todo el proceso, es altamente dependiente de la calidad del callo, y está asociado fuertemente a toda la historia previa del cultivo. En general, se ha informado que la utilización de anteras de las primeras floraciones favorece la respuesta androgénica, mientras que las colectadas al final de la estación muestran una menor respuesta al cultivo, generando una menor cantidad de embrioides. En *Brassica napus*, el crecimiento de las plantas a bajas temperaturas mejora la producción de embrioides obtenidos a partir de anteras.
4. El estado de desarrollo de las microsporas: en la fase gametofítica de las plantas, que comienza luego de la meiosis, las microsporas sufren inicialmente una división mitótica asimétrica que da origen a dos células de distintos tamaños: la generativa (más pequeña y con un núcleo altamente condensado) y la vegetativa (más grande y con un núcleo difuso). En las gramíneas, el núcleo generativo se divide nuevamente originando dos núcleos espermáticos. Uno generará el endosperma triploide al fusionarse con

los dos núcleos polares del saco embrionario, mientras que el segundo fertilizará a la óosfera produciendo el cigoto diploide, que constituirá el primer paso de la nueva fase esporofítica. Los embrioides haploides se originan *in-vitro* a partir de una de las vías que se enuncian a continuación. Cuando la primera división mitótica de la microspora es asimétrica, los haploides se originan por repetidas divisiones de la célula vegetativa, de la generativa o de ambas. En cambio, cuando la primera división mitótica es simétrica, ambas células resultantes contribuyen al desarrollo del haploide. Por lo tanto, una célula gamética masculina puede revertir su desarrollo gametofítico hacia el grano de polen y dar origen directamente a un nuevo individuo. En general, las microsporas que se encuentran en la primera división mitótica son las que mejor responden. Esto varía levemente con la especie vegetal, pero esta reversión no es posible luego de iniciada la deposición de almidón. El estadio más apropiado para los cereales es el de microspora uninucleada media y tardía.

5. Los pretratamientos: distintos tipos de estrés aplicados durante el estadio adecuado pueden enmascarar el programa gametofítico e inducir la expresión de genes específicos del desarrollo esporofítico. Si bien las bajas temperaturas son consideradas como el mejor pretratamiento, también otros pueden estimular la androgénesis, como el calor, el choque osmótico, la centrifugación de las anteras o hasta una incisión en la parte superior de la inflorescencia donante. También se citan la poda, la pulverización con etrel, la irradiación, la reducción en la presión atmosférica, la anaerobiosis, el tratamiento en una atmósfera saturada de agua y la aplicación de gametocidas. Las bajas temperaturas aplicadas sobre la planta madre, sobre las yemas florales jóvenes o sobre las anteras, generalmente estimulan la embriogénesis. El frío estimula la división mitótica simétrica de las microsporas. Esto se debe-

ría a una alteración en la orientación del huso que conduciría a una primera mitosis anormal del grano de polen. Por otra parte, se ha mencionado que las bajas temperaturas retardan el envejecimiento de la pared de la antera, lo cual aumentaría la supervivencia y la viabilidad del polen. En general, las temperaturas citadas varían entre 2 y 10 °C y la duración del tratamiento de 2 a 30 días. Es importante determinar la temperatura adecuada para cada especie vegetal, aún para variedades dentro de la misma especie. En algunas especies, tales como *Capsicum annun*, avena y algunos genotipos de trigo se ha logrado éxito con un choque con alta temperatura. Temperaturas de 30 – 35 °C durante los primeros 1 a 4 días del cultivo ayudaron a inducir la androgénesis en varias especies de género *Brassica*.

6. La composición del medio de cultivo: es otro de los factores importantes para el éxito en el cultivo de anteras. No existe una recomendación general y las variaciones dependen de la especie a cultivar.
 - a) Medios de inducción: dos tipos de estrés, osmótico y nutricional, han sido identificados como causas disparadoras de la inducción de embriogénesis en las microsporas de mono y dicotiledóneas. En tabaco, el cultivo de las anteras en un medio carente de sacarosa durante los primeros 6 días de la etapa de inducción permitió una máxima respuesta androgénica. Los carbohidratos cumplen dos roles fundamentales en los medios de inducción, ya que actúan como osmolito y como nutriente. Los agentes gelificantes representan otro aspecto importante en la evolución de los medios de inducción. Tradicionalmente se utilizó agar como gelificante de los medios de cultivo debido a su disponibilidad y bajo costo. Pero en 1973 se detectó una mejor respuesta androgénica en tabaco cuando las anteras fueron cultivadas en un medio solidificado con agar y suplementado con carbón activado. En medios líquidos la adición de Ficoll (polímero sintético de

sacarosa, inerte, no iónico y de alto peso molecular) incrementa la tensión superficial y la viscosidad del medio. De esta manera, las anteras y callos flotan sobre el medio líquido y se desarrollan en condiciones aeróbicas, permitiendo elevadas tasas de embriogénesis y de producción de plantas verdes. En cuanto a los reguladores de crecimiento, la mayoría de los cereales requiere de la presencia de auxinas y de citocininas en el medio de cultivo y las respuestas parecen depender de los niveles endógenos de tales reguladores. Por ejemplo, para lograr la inducción en trigo es indispensable el uso de 2,4-D en concentraciones de 1,5 a 2 mg/l. Existen otras sustancias que, adicionadas al medio de cultivo, ayudan en la estimulación de la androgénesis, como la glutamina y el inositol. También se citan otros compuestos inespecíficos como extracto de papa, de batata, de mandioca, de trigo germinado y de endospermas de arroz y de maíz. En ocasiones, si el medio es suplementado con leche de coco los granos de polen desarrollan directamente en embrioides.

- b) Medios de regeneración: la variedad de medios de regeneración citada es menor cuando se la compara con la de los medios de inducción. Los más utilizados son modificaciones derivadas del medio MS, con concentraciones de carbohidratos similares a las utilizadas en los medios de cultivo de tejidos tradicionales (30g/l de sacarosa), utilizando agar (0,6%) como gelificante, auxinas menos poderosas, y un balance hormonal a favor de las citocininas
7. Las condiciones de incubación: las características ideales de cultivo son específicas para cada especie, y aún para cada genotipo dentro de una misma especie. Estas afectan particularmente la tasa de absorción final de nutrientes y la regeneración de plantas verdes. La duración e intensidad lumínica, la temperatura y la orientación de las anteras sobre el medio de cultivo pueden tener un efecto considerable en algunas especies.

II. Cultivo de Microsporas: comprende la obtención de individuos haploides a partir de microsporas aisladas. Las espigas son pretratadas y las microsporas liberadas son colocadas en un medio de cultivo donde desarrollarán embriones haploides que serán luego transferidos a un medio de regeneración para originar plántulas (figura 5). Este sistema es considerado el de mayor potencial para la producción de doblehaploides, debido a que induce a las miles de microsporas que contiene una flor a dividirse y producir embriones. La ausencia de la pared de la antera podría mejorar la nutrición y eliminar las restricciones físicas para la androgénesis. El cultivo de microsporas tiene la ventaja de originar embriones de similar tamaño y etapa fisiológica debido a que pueden separarse las microsporas de tamaños semejantes por centrifugación diferencial. La optimización de los diferentes pasos críticos para el éxito de esta técnica puede llevar a la obtención de una alta cantidad de plantas verdes con menores costos y esfuerzos. Entre los fac-

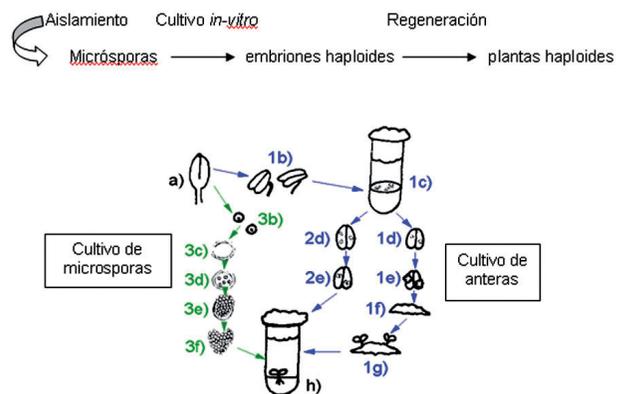


Figura 5. El diagrama muestra las diferentes etapas del cultivo de anteras y de microsporas aisladas. Para el cultivo de anteras, las etapas requeridas a partir de anteras hasta la obtención de las plantas haploides pueden describirse como sigue: a) yema floral previo a la antesis, 1b) anteras, 1c) anteras en cultivo, 1d) y 1e) proliferación de las anteras, 1f) callo haploide, 1g) diferenciación de callo, h) planta haploide. Para el cultivo de microsporas aisladas: a) yema floral previo a la antesis, 3b) microsporas aisladas de una antera, 3c) cultivo de microsporas, 3d) estado multinucleado, 3e) y 3f) embrión en desarrollo.

tores determinantes de la eficiencia del método podemos citar:

1. Genotipo: se han citado cultivares de cebada con una alta respuesta al cultivo de microsporas, en contraste con otros menos respondedores.
2. Albinismo: al igual que en el cultivo de anteras, el número de plantas albinas depende del genotipo, y también se ve influido por la densidad de cultivo de las microsporas.
3. Condiciones de crecimiento de la planta donadora: el mantenimiento de las plantas en condiciones controladas de fotoperíodo y temperatura es esencial y debe ser ajustado en función de la especie. Se han citado excelentes resultados en cebada cuando las plantas son cultivadas en ambientes libres de patógenos, con alta humedad relativa (60-80%), fotoperíodo de 16 hs de luz, y adecuado régimen de fertilización y riego. Cuando las plantas crecen estresadas, ya sea por riego excesivo, sequía, enfermedades, o la aplicación de algún plaguicida, la respuesta al cultivo de microsporas es menor.
4. Estadio de las microsporas: como se citara anteriormente para el cultivo de anteras, es imprescindible el chequeo del estadio correcto de las microsporas para que conserven su capacidad androgénica.
5. Pretratamientos: los más utilizados consisten en el uso de frío, estrés osmótico, presencia o ausencia de determinados nutrientes, etc. Se ha demostrado que los nutrientes disponibles para las microsporas durante el pretratamiento constituyen un factor decisivo que determina la calidad de los embriones originados.
6. Densidad de cultivo de las microsporas: la densidad de las microsporas en cultivo afecta el desarrollo de las mismas y el número de microsporas que entrarán en división. Existe una concentración mínima para el desarrollo de las microsporas, y una densidad óptima para una mayor regeneración. Las condiciones más favorables deben ser ajustadas en cada caso

y para cada genotipo en particular.

7. Medio de inducción: se han estudiado diferentes concentraciones de azúcares, distintas fuentes de nitrógeno orgánico, y la adición de diferentes de auxinas al medio. En general se sugiere la sustitución de sacarosa por maltosa como fuente de carbohidratos, la disminución de la concentración de nitrato de amonio, el agregado de glutamina, y el empleo de APA (ácido fenil acético) como auxina para favorecer la inducción.
8. Medio de regeneración: la composición del medio de regeneración puede afectar el vigor y supervivencia de las plántulas. Kasha et al. (2001), trabajando con cebada, encontraron en este método una manera eficiente de producción de DH, con una mejor respuesta y una menor dependencia del genotipo que en el caso del cultivo de anteras. A esto se le suma la ventaja de contar con una elevada cantidad de microsporas haploides en un estado fisiológico uniforme, que constituyen excelentes blancos para la mutagénesis, la selección y la transformación.

III. Hibridación Interespecífica e Intergenética: en este caso los haploides se originan a través de la eliminación del genoma del polinizador. El sistema de hibridación de trigo x *Hordeum bulbosum*, inicialmente descubierto y empleado con éxito en cebada, ha sido considerado superior al cultivo de anteras por tres razones:

1. La producción de haploides es más fácil.
2. El tiempo requerido para la regeneración de plantas es menor.
3. La eficiencia en la regeneración de plantas parece ser mayor. La gran limitante de este sistema lo constituye el hecho de que la mayoría de los cultivares de trigo no pueden cruzarse con *H. bulbosum* debido a la presencia de los genes de incompatibilidad, *Kr1* y *Kr2*, y al desconocimiento del estado de estos genes en los genotipos de trigo y de *H. bulbosum* involucrados en los cruzamientos, debido a que los genotipos se seleccionan en base a criterios agronómicos y no a un sistema de compatibilidad de cruzamien-

tos con *H. bulbosum*. Para sortear estos inconvenientes, se ha sugerido como alternativa realizar los cruzamientos de trigo utilizando maíz como polinizador (figura 6). Luego de la fertilización del óvulo de trigo por el polen de maíz, durante las primeras mitosis del cigoto, los cromosomas del maíz son eliminados. Esto se debe a una incompatibilidad entre los cinetocoros de estos cromosomas y las fibras de los husos acromáticos que hace que en las primeras anafases los cromosomas de maíz vayan quedando

rezagados en el citoplasma, donde finalmente son degradados. El resultado de este proceso es un embrión haploide de trigo. Seguidamente, los embriones inmaduros deben ser rescatados en un medio de cultivo apropiado. A través de las cruza con maíz se han obtenido haploides de trigo de cultivares tanto compatibles como incompatibles con *H. bulbosum*, lo cual sugiere que el sistema de incompatibilidad no afecta al método de trigo x maíz, por lo que sería menos dependiente del genotipo.

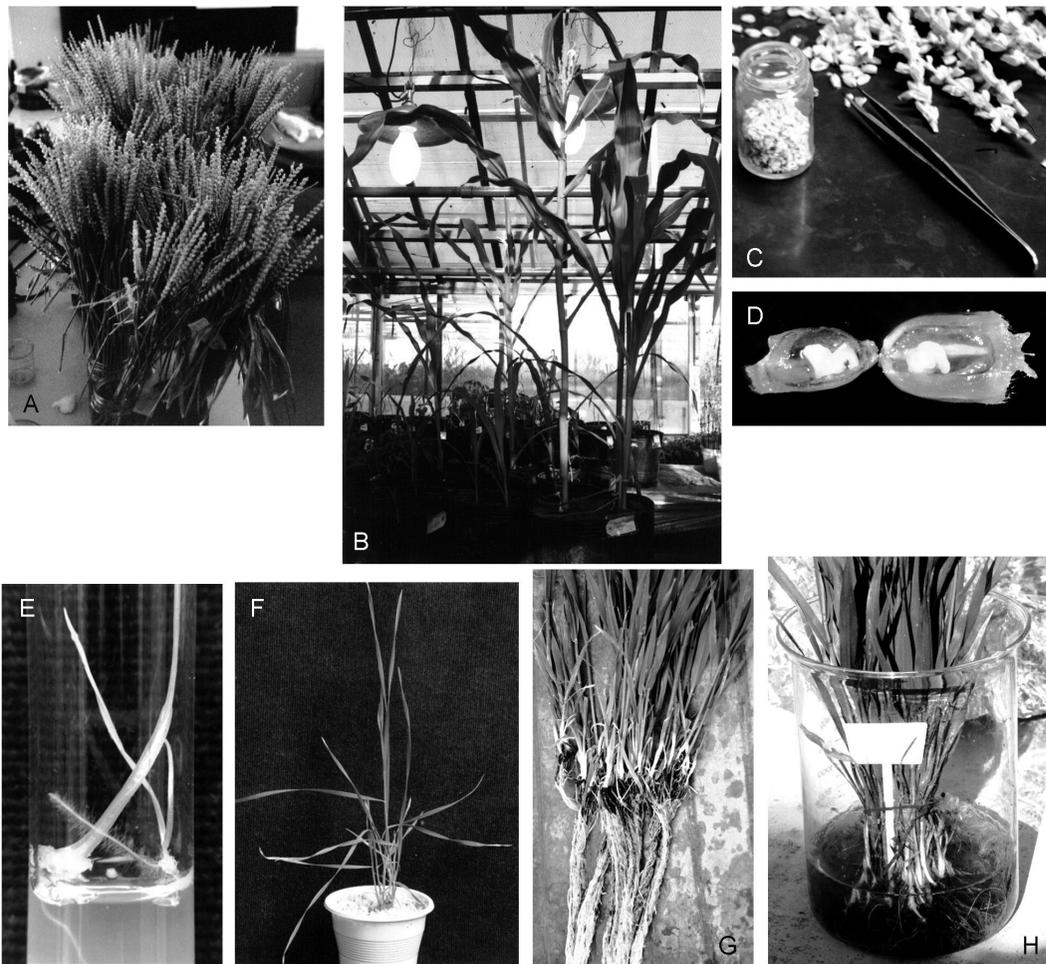


Figura 6. Producción de haploides de *Triticum aestivum* por cruzamientos de trigo x maíz (*Zea mays*). (A) Espigas de trigo cortadas en el campo y castradas en el laboratorio. (B) Plantas de maíz (donantes de polen) crecidas en invernáculo. (C) Desgrane de espigas para realizar la desinfección de los granos y posterior rescate de embriones. (D) Grano con dos embriones haploides (poliembriónía). (E) Embriones inmaduros rescatados y creciendo *in-vitro*. (F) Planta rusticada. (G) y (H) Plantas con 3-5 macollos con sus raíces sumergidas en solución de colchicina para la duplicación cromosómica. I. Plantas tratadas con colchicina y llevadas a macetas con tierra en cámara de crecimiento

IV. Ginogénesis *in vivo* en maíz: el empleo de líneas con elevada frecuencia de haploides como polinizadores motivó al desarrollo de la tecnología para la obtención de haploides maternos *in-vivo*. Este hallazgo abrió nuevas posibilidades para el empleo de polinizadores seleccionados en función de su capacidad de incrementar las frecuencias de haploides. Líneas inductoras fueron desarrolladas a partir del germoplasma de Stock 6 de “elevada haploidía”. El mecanismo involucrado en la generación de haploides estaría basado en la falta de fertilización de la oosfera durante la doble fertilización. En relación a este fenómeno se ha planteado la hipótesis en que se asume que las líneas inductoras de haploidía presentan dos células espermáticas con diferente velocidad de desarrollo (figura 7).

El método de generación de haploides maternos *in-vivo* involucra los siguientes pasos:

1. Generación del cruzamiento del cual se desean obtener líneas homocigotos (Generación parental).
2. Fecundación de la F1 con polen proveniente del inductor de haploidía.
3. Identificación de granos haploides.

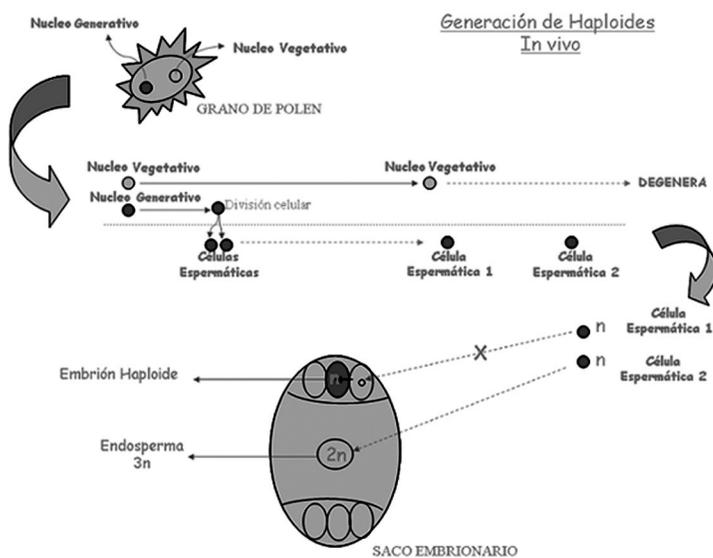


Figura 7. Generación de haploides *in-vivo* a través de fecundación incompleta. La célula espermática se une a los núcleos polares dando como resultado la formación del endosperma ($3n$). La otra célula no logra fecundar a la oosfera produciendo un embrión haploide (n)

4. Duplicación de los individuos haploides.
5. Autofecundación de las plantas haploides duplicadas.

La identificación de los granos haploides se realiza mediante el empleo de genes marcadores de color en embrión y endosperma, siendo el alelo rojo navajo ó *Navajo crown (R-nj)* el más frecuente. Aquellos cariopses con un embrión haploide ($r-nj$), resultantes de la falta de fecundación de la oosfera, pueden distinguirse claramente debido a la falta de expresión del marcador antociánico dominante *R-nj* en el embrión. Es decir que la expresión específica del gen *R-nj* en el endosperma (*Navajo crown*) y en el embrión permite de manera rápida y precisa identificar aquellos granos con la potencialidad de producir plantas haploides (figura 8).

Duplicación cromosómica

Después de la duplicación cromosómica, ya sea espontánea o inducida, se logra la homocigosis y se restaura la fertilidad. La planta haploide, sin duplicar, es estéril por lo que no podría producir semillas. Entre las técnicas que han sido utilizadas para la duplicación de haploides cabe mencionar:

1. La duplicación espontánea durante la etapa de callo o de rescate de embriones.
2. La regeneración de plantas doblehaploides a partir de callos de médula de plantas haploides de tabaco.
3. Sustancias químicas: aunque se conocen casos utilizando agentes químicos tales como acenafteno, hidrato de cloral, sulfanilamida, etc., la mayor eficacia se ha logrado con la colchicina y el óxido nitroso. La aplicación del óxido nitroso bajo presión (2-6 atmósferas) resulta de especial interés por su fácil penetración en los tejidos y la rápida desaparición de los mismos cuando cesa la presión. Puede utilizarse en flores recién polinizadas. La ventaja que presenta este tratamiento es que, al poder ser aplica-

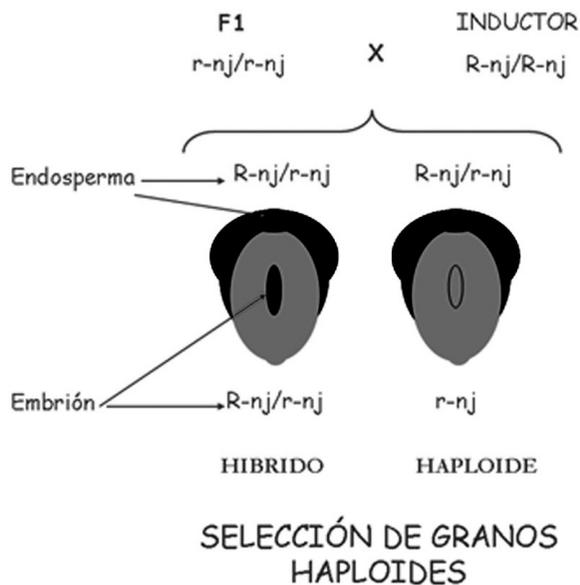


Figura 8. Marcadores de color en embrión y endosperma que permiten la selección de granos haploides

do durante la primera división mitótica del óvulo fecundado, se ve reducida la aparición de quimeras. Por otro lado, los residuos de este agente resultan menos tóxicos para la planta que otros que se aplican en forma líquida, aunque la frecuencia de aneuploides puede ser muy elevada. La acción de la colchicina fue descubierta en 1937 y desde entonces ha pasado a ser prácticamente el agente diploidizante más importante. Esta droga actúa impidiendo el autoensamblaje de la tubulina, inhibiendo así la formación de los microtúbulos del huso y, en consecuencia, la segregación anafásica de las cromátides. Afecta por lo tanto sólo a las células que se encuentran en división. Puede aplicarse a plántulas, plantas adultas, semillas, microsporas y anteras. El tratamiento puede realizarse utilizando una solución acuosa donde se sumergen las raíces, dejando fuera la parte aérea. También se puede hacer llegar la solución al interior de la planta utilizando una jeringa con la dosis deseada (microinyección), o por absorción de la solu-

ción a través de los tallitos decapitados, sobre los que se vierte. Otra forma es tratar los callos con colchicina antes de trasladarlos al medio de regeneración. Este último método permite la obtención de gran número de doblehaploides, pero presenta la desventaja de que la mayoría de las plantas así obtenidas son mosaicos cromosómicos. Otra alternativa, para microsporas y anteras, es la adición del agente duplicador directamente en el medio de inducción, antes de la primera mitosis. La diploidización en este momento requiere menos tiempo y esfuerzo y ha sido utilizada en programas de mejoramiento de trigo, maíz, *Tritordeum* y arroz. El problema de la suplementación del medio de inducción con colchicina es que reduce la embriogénesis en trigo, si bien en *Oryza sativa* y *Brassica* la puede incrementar. La duración del tratamiento y la concentración de la solución varían para cada especie.

Cualquiera sea el método con que se duplique la planta, un macollo o sólo una yema floral, lo importante es lograr que las semillas que éstas produzcan sean viables.

Consideraciones finales

La elección de los progenitores y la selección son etapas decisivas en un programa de mejoramiento que avanzará luego, generación tras generación, hacia una homocigosis que permita entrar en las etapas de evaluación. Ganar tiempo en estos casos puede significar una reducción de costos muy importante y una más temprana entrada en el mercado de la nueva variedad. En el caso de una especie autógama, como el trigo, es posible ganar generaciones haciendo dos cosechas en un año, especialmente en aquellos cultivares de corto ciclo vegetativo. Esto, sin embargo, dificulta la observación de algunas características agronómicas importantes, que no pueden ser observadas en los genotipos en esas condiciones, atentando contra una selección eficiente. Para los trigos de tipo invernacional y facultativos, con ligeros requerimientos de vernalización, esta ganancia de generaciones no es posible o es compleja. La producción de individuos

doblehaploides que puedan participar anticipadamente en la etapa de evaluación agronómica se plantea como una solución promisoriosa a este problema, reduciendo los tiempos y presupuestos.

Muchos interrogantes quedan aún sin resolver, limitando la aplicación extensiva de esta tecnología a algunos modernos programas de mejoramiento vegetal. Algunas preguntas a las que debemos encontrar respuestas son:

En que generación segregante se aplica el método de doblehaploides?

¿Cuál es el número de individuos doblehaploides derivados de un cruzamiento, representativo de la variabilidad gamética creada en la cruce, que permita un aprovechamiento integral, comparable al logrado con el método convencional de selección a campo?

¿Cómo superar la escasa cantidad de semilla producida?

¿Es una técnica alternativa, o complementaria del mejoramiento tradicional?

¿La eficiencia en la producción de doblehaploides, justifica su alto costo dentro de un plan de mejora?

De acuerdo a Mujeb-Kazi (1998), las generaciones segregantes adecuadas para producir doblehaploides son la F2 y F3. Si eligiéramos individuos F3, que ya cuentan con un año de selección a campo durante la F2 -generación que ha mostrado la mayor varianza genética entre los dos padres- estaríamos evitando producir un gran número de plantas doblehaploides que no serán agronómicamente promisorias. No obstante, debemos considerar que serían necesarios varios cientos de individuos DH para que el proceso tenga posibilidades de éxito agronómico.

En general, la producción de doblehaploides resulta en un gasto excesivo en comparación a los métodos tradicionales de mejoramiento, por lo cual en la mayoría de los programas sólo genotipos élite son sometidos a este sistema. Si bien el costo de producción de los DH depende directamente del método elegido y la eficiencia lograda, la aplicación de esta metodología al mejoramiento vegetal se vislumbra más bien como una herramienta complementaria al mejoramiento tradicional, y que de ningún modo intentaría reemplazarlo.

Lecturas Recomendadas

- Atanassov, A.; Zagorska, P.; Boyadjiev, P.; Djilianov, D. 1995. *In vitro* production of haploid plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 11, 400-408.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. 1996. Haploid Production. En: *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, Capítulo 7. S.S. Bhojwani y M.K. Razdan (eds.) Elsevier, Amsterdam. pp.167-213.
- Coe E. H. Jr., Neuffer M. G., Hoisington D. A. 1988. The Genetics of Corn. En: *Corn and corn Improvement 3ra Edición.* (Sprague C. F., Dudley J. W. eds) pg 81-258. A.S.A., C.S.S.A., S.S.S.A, Madison Winsconsin, pp 81-258.
- Lacadena, J.R. 1988. Variaciones cromosómicas numericas. En: *Genética*, Capítulo 15. Lacadena, J.R. (ed.) A.G.E.S.A., Madrid. pp. 683-719.
- Snape, J., Simpson, E., Parker, B., Friedt, W., Foroughi-Wher, B. 1986. Criteria for the selection and use of doubled haploid systems in cereal breeding programmes. En: *Genetic manipulation in plant breeding. Proc. Int. Symp. Eucarpia* W. Horn, C. Jensen, W. Odenbach, O. Schieder (eds). W. De Gruyter, Berlin. pp. 217-229.

III. CAPÍTULO 2

Aplicaciones de los marcadores moleculares

Alicia Carrera; Gabriela Tranquilli;
Antonio Garayalde; Marcelo Helguera

Los marcadores moleculares, herramientas básicas de la biotecnología vegetal descritas en Parte I Capítulo 5 de este libro, se utilizan en la actualidad en numerosas áreas relacionadas con el mejoramiento vegetal y el análisis de la biodiversidad. A continuación se describen algunas de esas aplicaciones. Cada uno de estos campos posee una base teórica en ocasiones compleja y muchos de ellos requieren del uso de programas de estadística avanzada. De este modo, el presente capítulo debe ser considerado como una introducción a los temas presentados.

Identificación de genotipos – Pureza varietal

El control de la pureza varietal y la discriminación de variedades protegidas requieren de una adecuada identificación de los materiales. Esta identificación se ha basado tradicionalmente en el uso de caracteres morfológicos y fisiológicos. Desafortunadamente, la utilización de recursos genéticos de origen común en diferentes programas de mejoramiento ha reducido la eficiencia de discriminación por marcadores fenotípicos (descriptores), que si bien son importantes, presentan limitaciones (bajo polimorfismo, influencia ambiental, dependencia del estadio de desarrollo de planta, etc.). Como alternativa para resolver este problema, los marcadores moleculares resultan de gran utilidad por su número virtualmente ilimitado y por su habilidad para explorar variabilidad genética a nivel del ADN. ISTA (*International Seed Testing Association*) y UPOV (*Union Pour La Protection Des Obtentions Végétales*) son entidades internacionales que han distribuido información para estandarizar los análisis de laboratorio para la identificación de cultivares, y para reglamentar la utilización de diferencias moleculares en la evaluación de homogeneidad intra-varietal, la discriminación de varie-

dades y el otorgamiento de nuevas patentes. En la actualidad se dispone de patrones moleculares varietales para una extensa lista de especies. Frecuentemente, un grupo de *loci* polimórficos de un marcador molecular, tales como microsatélites o AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) es suficiente para generar un perfil molecular de identificación, o “huella dactilar” de ADN, única para cada cultivar. Como ejemplo, podemos mencionar al trigo pan (*Triticum aestivum* L.) para el que se desarrolló una Matriz de Identificación Varietal en base a marcadores microsatélites de ADN, que permite la individualización de las distintas variedades argentinas. Por otro lado, a partir de datos moleculares es posible obtener distintos índices de similitud o distancia genética y generar dendrogramas que ponen en evidencia las relaciones entre los materiales. Esta información puede ser altamente valiosa en caso de litigios por derechos de obtención. Para más detalles sobre identificación de genotipos se recomienda la lectura de Parte III, Capítulos 4 y 5 de este libro.

La pureza varietal es uno de los principales requisitos de la semilla comercial. En la producción de semilla híbrida la heterogeneidad intralote puede originarse por falta de uniformidad en las líneas parentales, polinización cruzada espontánea o mezcla de semillas durante la siembra, cosecha o embolsado. Los individuos fuera de tipo pueden identificarse mediante el patrón molecular. Del mismo modo, pueden establecerse las relaciones de descendencia entre una serie de líneas parentales y sus híbridos. Asimismo, la caracterización molecular de líneas puras permite conocer el nivel de variabilidad genética presente en la colección, confirmar homocigocis, precisar la identificación y asistir en la planificación de los cruzamientos destinados a producir híbridos de características superiores.

Bancos de germoplasma

El proceso de selección para mejora y las prácticas de la agricultura moderna han generado una pérdida notable de diversidad en la mayoría de las especies cultivadas. El reemplazo paulatino de las variedades primitivas por los nuevos cultivares de indudables ventajas económicas ha producido una reducción en el número de genotipos que se cultivan. La ero-

sión genética puede tener graves consecuencias para el cultivo, principalmente en relación con su vulnerabilidad sanitaria. Este proceso puede ser atenuado mediante la creación de bancos de germoplasma, que constituyen un componente vital de los programas de mejora. Las colecciones pueden mantenerse como bancos de semilla, a campo, *in-vitro* o criopreservadas. Esta actividad se vuelve particularmente relevante para el Continente Americano y el Caribe, que constituyen los centros de origen de cultivos importantes como maíz, poroto, cacao, papa, maní, pimienta, tomate, zapallo, además de numerosas medicinales, aromáticas, frutales y forestales.

Los recursos genéticos de una especie cultivada comprenden: i) cultivares antiguos y de reciente obtención; ii) poblaciones locales mantenidas por los productores, "*landraces*"; iii) poblaciones silvestres de la misma especie o formas maleza; iv) especies relacionadas. Los marcadores moleculares permiten caracterizar accesiones cultivadas y silvestres, estudiar el proceso de domesticación, establecer relaciones filogenéticas, y contribuir en la toma de decisiones para la elección de estrategias de conservación. El procedimiento consiste básicamente en analizar los materiales mediante marcadores proteicos o de ADN, y calcular medidas de diversidad (nivel de polimorfismo, riqueza alélica, presencia de alelos únicos) y de similitud genética. Esta información luego se integra a datos geográficos (procedencia de las accesiones, distribución), pedigrí, taxonomía y variabilidad en caracteres morfológicos, fenológicos, fisiológicos, etc.

Una gran parte de los polimorfismos moleculares se encuentra en regiones no codificantes del genoma, carece de expresión fenotípica y es selectivamente neutra. En contraste, los genes que codifican los rasgos morfológicos y/o agronómicos poseen un fuerte efecto fenotípico y han estado sometidos a intensas presiones de selección en las distintas etapas del mejoramiento. Por lo tanto, estos caracteres representan grupos de genes sometidos a diferentes fuerzas de cambio a lo largo del proceso de domesticación. Los marcadores moleculares combinados con datos morfológicos, agronómicos y de origen, conforman una base de

datos integral que permite describir la variación genética en colecciones de germoplasma.

Veamos algunos ejemplos. En casos como el girasol (*Helianthus annuus*), originario de Estados Unidos, el análisis de diversidad ha demostrado que el proceso de domesticación ha reducido considerablemente la base genética de los materiales cultivados en relación a las poblaciones silvestres. Por el contrario, en poroto (*Phaseolus vulgaris*) y olivo (*Olea europaea*), las formas cultivadas conservan gran parte de la variabilidad presente en las poblaciones de los centros de origen en América y Europa, respectivamente. La comparación entre los materiales silvestres y cultivados de una especie permite además identificar los lugares de origen del cultivo, conocidos como centros de domesticación. Una vez que los recursos genéticos disponibles han sido caracterizados, es posible decidir cuáles serían los cruzamientos que más contribuirían a la expansión de la base genética.

Aunque frecuentemente el proceso de domesticación involucra una pérdida importante de diversidad que es revelada por marcadores moleculares dispersos en el genoma, los cambios más significativos en el paso de formas silvestres a cultivadas pueden ser explicados por unos pocos genes. Por ejemplo, Dubcovsky y Dvorak (2007) describen un fenómeno llamado síndrome de domesticación, que es mayoritariamente adjudicado a genes que controlan la arquitectura morfológica de la espiga y el mecanismo de dispersión de las semillas. Uno de ellos es el gen *Br* (*brittle rachis*) que determina un raquis quebradizo (ancestral) o firme de la espiga; otro es el gen *Tg* (*tenacious glume*) que determina glumas firmemente adheridas al grano (ancestral) o granos desnudos y el tercero es el gen *Q*, que gobierna el libre desgrane de la semilla madura y la forma cuadrada de la espiga. El alelo *q* produce una espiga piramidal de raquis elongado (espeltoide) cuyas semillas no se desgranar fácilmente al madurar. La espiga del trigo moderno es la resultante de la combinación de los alelos *br* (raquis firme), *tg* (grano desnudo) y *Q*, que generan una espiga cuadrada, que permite el libre desgrane de la semilla madura desnuda, facilitándose enormemente la cosecha del grano.

Desde el punto de vista del mejoramiento, la información generada por los marcadores resulta de inmediata aplicación en los procesos de acopio (dónde coleccionar, qué intercambios realizar), conservación (identificación de duplicados en las colecciones, monitoreo de los cambios en la composición genética que puedan ocurrir durante la multiplicación o conservación de los materiales), caracterización (diversidad genética de la colección) y distribución eficiente de los recursos genéticos hacia los usuarios.

Mapas Genéticos

Un mapa genético de una especie animal o vegetal muestra la distribución lineal de marcadores en cada uno de los cromosomas que constituyen el genoma de un organismo. Este mapa está basado en el concepto clásico de *ligamiento*: si dos o más genes o marcadores están físicamente cercanos sobre el mismo cromosoma, sus alelos se transmiten usualmente juntos a través de la meiosis. Las proporciones en que estos genes segregan en una población se apartan de las esperadas bajo la ley de segregación independiente. La mayor parte de los gametos contendrán las mismas combinaciones alélicas que los padres; sólo aquellos meiocitos que experimenten un intercambio entre cromátidas no hermanas o *crossover* generarán gametos con combinaciones alélicas diferentes de las parentales (*recombinantes*).

El fundamento del mapeo genético reside en la *relación entre la frecuencia de recombinación y la distancia física entre los loci*. La frecuencia de recombinación entre dos genes se convierte en una estimación de la distancia de mapa que los separa. La unidad de medida de los mapas genéticos es el "centimorgan" (cM), que es una medida de la cantidad de eventos de recombinación entre marcadores, ocurridos en una población segregante (de mapeo). Para más detalles sobre construcción de mapas genéticos se recomienda la lectura del Capítulo 6, Parte I de este libro.

El aporte de los marcadores moleculares en la construcción de mapas genéticos es fundamental, ya que han permitido incrementar la probabilidad de identificar regiones cromosómicas que determinan rasgos agronómicamente importantes, en comparación con los mapas obtenidos mediante el uso de marcadores morfológicos o isoenzimáticos. Consecuentemente, cuanto mayor sea el número de marcadores incorporados a un mapa genético mayor será su capacidad de resolución y utilidad como marco de referencia para incorporar genes asociados a características de interés económico.

Para incorporar un carácter de interés agronómico en un mapa genético es necesario cumplir con las siguientes etapas:

1. Desarrollar una población segregante para el carácter agronómico en cuestión.

2. Caracterizar la población segregante utilizando marcadores moleculares polimórficos (con diferencias en la secuencia de ADN entre los parentales). Para construir un mapa mínimo es deseable disponer de al menos cuatro marcadores moleculares por cada cromosoma del genoma en estudio.

3. Evaluar fenotípicamente el carácter agronómico sobre los individuos de la población segregante. Este punto es crucial, ya que si la evaluación del carácter en la población de mapeo no es precisa, el mapeo del carácter será erróneo o irrealizable.

4. Identificar marcadores ligados al carácter agronómico en cuestión (co-segregación entre fenotipo del carácter y fenotipo del marcador). Para esta instancia, al igual que para la construcción del mapa genético, se pueden utilizar herramientas informáticas específicas tales como los programas Mapmaker, MapmakerQTL, Genemap, etc.

Cuanto mayor sea la distancia genética entre los parentales que darán origen a la población de mapeo, mayor será la probabilidad de detectar marcadores polimórficos, que es un punto crítico para identificar marcadores ligados al carácter en estudio.

En el contexto del mejoramiento vegetal los mapas genéticos posibilitan:

- La cobertura y análisis de genomas completos.
- La localización de regiones genómicas

que controlan caracteres de importancia agronómica o industrial.

- La cuantificación del efecto de estas regiones en la característica estudiada.
- La descomposición de caracteres genéticos complejos (QTLs) en componentes mendelianos.

En los últimos años ha comenzado a usarse una nueva estrategia de mapeo denominada *mapeo por asociación*, que utiliza el concepto de desequilibrio de ligamiento (LD), definido como la asociación no al azar de alelos de diferentes *loci*. La hipótesis de base considera que en poblaciones grandes, con apareamientos al azar (panmixis), con los *loci* segregando independientemente y en ausencia de selección, mutación, o migración, los *loci* polimórficos están en equilibrio: la frecuencia de un cierto haplotipo depende del producto de las frecuencias alélicas en cada locus. En este caso el LD será cero. La existencia de ligamiento físico aumenta los niveles de LD, aunque procesos de selección y migración generan igualmente valores de LD distinto de cero. Una ventaja importante de este método es que puede prescindir de poblaciones de mapeo clásicas, tales como F2 o RILs (*Recombinant Inbred Lines*) pudiendo utilizarse la variación en poblaciones naturales de una especie o colecciones de cultivares, producto del mejoramiento. Este enfoque aprovecha la historia de recombinación natural de la especie y los procesos ocurridos de selección, lo cual incrementa el grado de asociación entre los marcadores y el carácter de interés.

Si un marcador resulta estar asociado a un gen que controla un carácter de interés agronómico, la selección de este marcador resulta en la selección indirecta del gen de interés. La comparación de mapas genéticos entre especies genera información básica sobre la estructura y evolución de los genomas. Por otro lado un mapa genético constituye el punto de partida para proyectos de clonado de genes.

Selección asistida por marcadores

El desarrollo de múltiples técnicas moleculares ha facilitado el análisis genético de caracteres de interés agronómico y la selección

de individuos con características ventajosas. La selección asistida por marcadores (MAS) es un proceso de selección indirecta basado en la existencia de *co-segregación* entre marcadores y un gen determinado. Su eficiencia depende de la distancia entre el marcador y el gen, y de la contribución de ese gen al fenotipo. En términos amplios, el marco de aplicación que brindan los marcadores moleculares comprende la introducción y seguimiento de genes o QTLs (*Quantitative Trait Locus*) de interés, así como la agilización del proceso de recuperación de homocigosis en fondos genéticos particulares. En el primer caso, la estrategia se basa en focalizar el análisis sobre el gen de interés en una población segregante mediante el uso de marcadores previamente desarrollados sobre porciones de secuencias de dicho gen, o con marcadores localizados en las regiones adyacentes que se encuentren ligados al carácter en cuestión. El segundo caso tiene que ver con que la transferencia de genes de interés se realiza comúnmente mediante cruza amplias, que requieren luego del cruzamiento inicial, una serie de retrocruzas hacia el parental elite o recurrente. El producto final es un material que posee el fondo genético original con la nueva característica incorporada. En este caso, la estrategia se basa en un análisis más amplio de la población segregante, ya que el uso de marcadores no sólo se aplicará para la identificación del gen asociado a la característica de interés, sino que también se caracterizarán otras regiones del genomas, a fin de identificar aquéllas que provengan del parental elite. Las herramientas moleculares permiten acelerar este proceso, dado que poseen alta densidad y cubren en forma uniforme el genoma.

Con relación al seguimiento de genes de interés, un argumento frecuentemente utilizado en contra de la selección asistida por marcadores es que el mejoramiento de caracteres de herencia simple no precisa de marcadores para selección si los fenotipos son fácilmente identificables. Si bien esto es correcto, aún en estos casos, la utilización de marcadores moleculares en un programa de mejoramiento puede representar una ventaja importante, y es que la selección se independiza del fenotipo

y el ambiente. Estas características permiten identificar rápidamente genotipos únicos en poblaciones segregantes e incorporar varios genes de interés en un fondo genético, proceso también denominado "piramidización" o "apilamiento" de genes.

Por lo descrito anteriormente, puede decirse que la utilidad potencial de los marcadores moleculares en el proceso de mejoramiento genético es alta. Sin embargo, factores de orden técnico y/o económico han limitado su adopción. Dentro de los primeros, corresponde mencionar la disponibilidad de marcadores moleculares que permitan, por un lado, mejorar la cobertura del genoma en cuestión, y por otro lado, que resulten factibles de ser implementados bajo procesos automatizados, tales como extracción de ADN o reacciones de amplificación a gran escala. En este sentido, es importante destacar que cada vez es mayor la cantidad y variedad de marcadores moleculares desarrollados para cultivos de importancia económica. Por otro lado, la implementación de un marcador para la selección de un carácter agronómico en un programa de mejoramiento requiere de una serie de estudios previos relacionados con: (1) material a utilizar (variedades, poblaciones F2, retrocuzas, líneas avanzadas, etc.), (2) condiciones óptimas de la reacción de PCR –*Polymerase Chain Reaction*- (número de ciclos de PCR, temperatura y extensión de cada ciclo, concentración de los componentes que conforman la reacción de PCR, etc.), (3) detección del marcador (geles de agarosa, acrilamida, secuenciado, etc.), (4) tipo de información a obtener (marcador dominante o codominante), (5) posibilidad de eventos de recombinación entre marcador y carácter, etc., proceso que se denomina validación.

Desde el punto de vista del mejoramiento, sin dudas el mejor marcador es aquel que detecta sitios polimórficos que estando dentro del gen son los determinantes de la variación fenotípica observada. Estos marcadores, también llamados de diagnóstico o funcionales, pueden ser usados en forma confiable en poblaciones en las que no se hayan mapeado previamente, sin correr el riesgo de que la información de interés se pierda por recombinación. Como ejemplo podemos mencionar un marcador de-

sarrollado para el gen *Pinb-D1* de trigo. Este gen codifica una de las proteínas relacionadas con textura de grano y se ha demostrado que el cambio de un aminoácido (glicina a serina) da origen a una variante alélica cuyo fenotipo es un grano con textura dura. Tanquilli y col. (1999) desarrollaron un marcador que detecta dicha mutación en cualquier población segregante que sea polimórfica para el gen *Pinb-D1* y es de gran utilidad para el mejoramiento de trigos blandos (figura 1). Desafortunadamente, la disponibilidad de marcadores funcionales se ve restringida por el limitado número de genes caracterizados molecularmente que controlan caracteres agronómicos. Sin duda, la disponibilidad de marcadores funcionales aumentará progresivamente a partir del conocimiento generado de los proyectos de genómica en especies modelo (*Arabidopsis*, arroz) así como del número creciente de secuencias codificantes mapeadas y caracterizadas.

Dentro de los factores de índole económico, la principal limitante en la adopción generalizada de esta tecnología ha sido la relación entre el costo del dato molecular (*data point*) y el valor comercial de la semilla mejorada. En los programas de mejoramiento de aquellas especies donde el material de cultivo es híbrido, en general se observa mayor uso de selección asistida por marcadores moleculares. Es esperable que esta limitante se vaya superando con el tiempo por el permanente avance tecnológico. En este sentido el amplio desarrollo de marcadores basados en amplificación (SSRs –*Simple Sequence Repeats*-, SNPs –*Single Nucleotide Polymorphisms*-) ha permitido simplificar las metodologías a aplicar, en comparación con aquellos marcadores basados en hibridación (RFLPs –*Restriction Fragment Length Polymorphism*-, por ejemplo), reduciendo costos y también aumentando la eficiencia en el proceso de selección.

Para mas detalles sobre selección asistida por marcadores se recomienda la lectura de Parte III, Capítulo 3 de este libro.

Mapas comparativos

El tamaño del genoma de plantas es muy variable entre especies, y gran parte de esa diferencia está dada por secuencias de ADN

A

```
5'- AAACAACATTGAAAAC ATG AAG ACC TTA TTC CTC CTA GCT CTC CTT GCT CTT
GTA GCG AGC ACA ACC TTC GCG CAA TAC TCA GAA GTT GGC GGC TGG TAC AAT
GAA GTT GGC GGA GGA GGT GGT TCT CAA CAA TGT CCG CAG GAG CGG CCG AAG
CTA AGC TCT TGC AAG GAT TAC GTG ATG GAG CGA TGT TTC ACA ATG AAG GAT

                                     Gly
TTT CCA GTC ACC TGG CCC ACA AAA TGG TGG AAG GGC GGC TGT GAG CAT GAG
                                     AAG AGC GGC
                                     Ser
GTT CGG GAG AAG TGC TGC AAG CAG CTG AGC CAG ATA GCA CCA CAA TGT CGC
TGT GAT TCT ATC CGG CGA GTG ATC CAA GGC AGG CTC GGT GGC TTC TTG GGC
ATT TGG CGA GGT GAG GTA TTC AAA CAA CTT CAG AGG GCC CAG AGC CTC CCC
TCA AAG TGC AAC ATG GGC GCC GAC TGC AAG TTC CCT AGT GGC TAT TAC TGG
TGA TGATATAGCCTC
TATTTCGTGCCAATAAAAATGTCACATATCATAGCAAGTGGCAAATAAGAGTGCTGAGTGATGATCTATGAA
TAAAATCACCCCTTGATATATTGATCTGTGTTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'
```

B

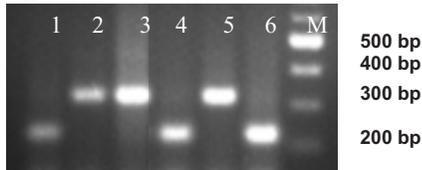


Figura 1. (A) Secuencia nucleotídica del gen *pinb-D1*, mostrando el cambio de aminoácido Glicina → Serina (Gly → Ser) resultante de la mutación de la base guanina (G) a adenina (A) que diferencia a los alelos asociados a texturas blandas y duras, respectivamente. Con un recuadro se indican las zonas donde hibridan los *primers*, y en negritas y subrayado las bases que forman el sitio de restricción de *Bsr*BI (GAGCGG/CCGCTC) presente en el alelo asociado a textura dura en grano de trigo. (B) Fotografía de electroforesis en gel de agarosa 2% de productos de PCR amplificados con *primers* señalados en figura anterior digeridos con la enzima de restricción *Bsr*BI. En calles 1, 4 y 6 patrón del alelo de *pinb-D1* asociado a textura blanda; en calles 2, 3 y 5, patrón del alelo de *pinb-D1* asociado a textura dura.

repetitivo, que difiere entre especies (especie-específico). Contrastando con esta situación, los genes tienden a ser altamente conservados a nivel de secuencia de ADN y esta característica permite utilizar los genes como sondas para identificar secuencias de genes ortólogos (genes con funciones similares, presentes en diferentes especies, que derivan de una secuencia ancestral). A partir de esta información (presencia/ausencia de genes ortólogos) se construyen los denominados *mapas comparativos*. En general, al comparar mapas genéticos de dos especies emparentadas, se han detectado regiones cromosómicas donde los genes mantienen el orden y las relaciones de ligamiento, fenómeno conocido como *colinealidad* o *sintenia*. Esta sintenia se va perdiendo a medida que se comparan especies más alejadas filogenéticamente. Ejemplos de genomas con regiones colineares se han observado en grupos de especies pertenecientes a la familia *Solanaceae* (tomate, papa, pimiento), entre *Arabidopsis sp.* y cultivos del género *Brassica*, y también dentro de las gramíneas entre especies pertenecientes a la tribu *Triticeae* (trigo, cebada, centeno) así como entre especies pertenecientes a distintas subfamilias taxonómicas, tal el caso de arroz, maíz y sorgo.

La utilidad de los mapas comparativos puede apreciarse desde distintos puntos de vista. Por un lado, aportan información valiosa para detectar cambios producidos en la estructura cromosómica, que ocurrieron durante el proceso evolutivo, ya que cuando se comparan la posición y el número de *loci* entre los mapas de dos especies se hace evidente la ocurrencia de rearrreglos como inversiones, translocaciones y duplicaciones. En otros casos se ha podido detectar la ocurrencia de eventos de poliploidización muy antiguos. Por ejemplo, el maíz presenta un comportamiento meiótico que corresponde al de una especie diploide típica. Sin embargo, el mapa molecular muestra que numerosos *loci* RFLP de arroz están presentes dos veces en el genoma de maíz por lo que actualmente se considera que el maíz descende de un poliploide ancestral.

Por otro lado, los mapas comparativos posibilitan la transferencia de información molecular de especies modelo con genomas simples,

completamente secuenciados, tales como *Arabidopsis* y arroz (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; International Rice Genome Sequencing Project, 2005), a especies con genomas más complejos tales como trigo, cebada, avena, etc. Este ha sido tal vez el objetivo principal para impulsar el desarrollo de estos mapas. Las notables similitudes observadas entre genomas fue la base sobre la que se postuló el uso de especies modelo, a partir de las cuales estudiar y avanzar en el conocimiento de genomas más complejos. Asimismo, partiendo del supuesto de que los genes que gobiernan aspectos fundamentales de la biología vegetal muy probablemente están conservados entre distintas especies, y el hecho que la variación en el tamaño de los genomas de especies relacionadas se debe fundamentalmente a variación en la cantidad de ADN no codificante y no a una variación en el número de genes, la idea de llegar a la identificación, clonado y caracterización de genes en las especies modelo se ha visto fortalecida. De este modo la información generada podría hacerse extensiva a una amplia gama de especies, incluyendo las cultivadas. En este sentido, la información molecular proveniente de los genomas de *Arabidopsis* y arroz ha sido clave para clonar genes de interés agronómico en especies de genomas complejos como el trigo, como por ejemplo, *Vrn-1*, *Vrn-2*, *Q*, *Ph1*, *Ppd-D1*, *Lr10*, etc.

Clonado posicional

El clonado posicional consiste en el aislamiento de un gen responsable de un carácter particular a partir del conocimiento de su localización en el genoma. El proceso utiliza información genética (modo de herencia del carácter y ubicación del gen/es en una región específica de un mapa), molecular (secuencia nucleotídica de aquellos genes presentes en la región cromosómica asociada con el carácter), y de función o expresión de los genes.

El primer paso para lograr esto es seleccionar parentales que sean contrastantes para el carácter vinculado al gen en cuestión, por ejemplo, una variedad de trigo susceptible y otra resistente a la roya de la hoja. Una vez seleccionados los parentales se desarrolla una población segregante, la más sencilla es una

F2, a partir de la cual se construye un *mapa genético* utilizando marcadores moleculares, y sobre este marco se identifican las regiones cromosómicas asociadas al control de dicha resistencia.

Una vez identificada dicha región, para avanzar hacia el clonado posicional, es necesario mejorar el grado de resolución del mapa en esa zona. Esto se logra saturando dicha región con nuevos marcadores moleculares e incrementando el número de individuos de la población, a fin aumentar las posibilidades de encontrar recombinantes entre marcadores estrechamente ligados. El objetivo es reducir el intervalo del genoma analizado al fragmento mínimo posible que contenga al gen de interés. Muchos de estos marcadores pueden obtenerse del mapeo comparativo en regiones cromosómicas ortólogas de especies emparentadas con genomas menos complejos. En el caso de trigo, serían arroz, cebada, sorgo, *Triticum monococcum*, *Triticum tauschii*, etc.

Una vez reducido al mínimo el intervalo de genoma portador del gen de interés, el paso siguiente es obtener la secuencia nucleotídica del mismo. Una forma de hacerlo es mediante una *caminata cromosómica*, para lo cual es necesario contar con un *mapa físico* (secuencia nucleotídica) de la región. Para el ejemplo que estamos considerando, la caminata se inicia seleccionando de una "biblioteca" del genoma de trigo (*BAC library*) aquellos clones (tomos) que hibriden con los marcadores que flanquean al intervalo portador del gen. Los clones seleccionados en la hibridación contra la biblioteca son digeridos con enzimas de restricción para identificar en cada caso fragmentos compartidos y no compartidos. Se estima que los clones seleccionados con un mismo marcador deben tener en común al menos un fragmento de digestión (el fragmento que posee la secuencia del marcador). Los fragmentos no compartidos corresponden a los extremos de estos clones parcialmente solapados entre sí. Estos extremos se utilizan como nuevos marcadores para extender la caminata cromosómica hacia el gen, reiniciando la búsqueda de clones en la biblioteca genómica. Este proceso se hace simultáneamente en ambos sentidos, hasta lograr que el mapa físico (secuencia nu-

cleotídica) que se ha iniciado desde cada marcador flanqueante forme un continuo o "*contig*" de fragmentos de ADN genómico de trigo. Este *contig* contiene la secuencia del gen en estudio. El paso siguiente consiste en la secuenciación del *contig*. A partir de esta información, y por análisis de secuencia con herramientas bioinformáticas, se determinan los genes presentes y aquellos posibles candidatos del carácter en estudio. La prueba definitiva para establecer el hallazgo del gen en cuestión es la prueba de complementación. Esto consiste en transformar una planta que carece del carácter en estudio (siguiendo con el ejemplo, una variedad de trigo susceptible) con cada uno de los genes candidatos y determinar cual de ellos le confiere el carácter (en este caso resistencia al patógeno).

A partir de la secuenciación completa del genoma de arroz es posible obtener una primera estimación de los genes presentes en nuestro *contig*, con algunas salvedades, como son la presencia de genes específicos de arroz (que no estarán en el *contig* de trigo) y trigo (que no estarán en el genoma de arroz), ruptura de la colinearidad de genes entre genomas por rearrreglos cromosómicos, etc. Como ejemplo, en el clonado posicional del gen *Vrn-1* en *Triticum monococcum* se utilizó una población de 3095 individuos F2, para llegar a delimitar un intervalo de 0,04 cM en el cromosoma 5A^m que contenía dos genes candidatos. Posteriormente, mediante estudios de expresión de estos genes se observó que sólo uno de ellos (*Ap-1*) presentaba un patrón de expresión idéntico al gen *Vrn-1*. Para llegar a esto se trabajó con marcadores provenientes de las bibliotecas de los genomas de cebada, sorgo, arroz y *Triticum monococcum* (figura 2).

Distribución de la variabilidad genética en poblaciones naturales y conservación

Las especies están constituidas por unidades o demos más o menos aislados denominados poblaciones. Una especie vegetal raramente se extiende en forma continua e ininterrumpida. En general adopta una distribución en parches. El número de individuos en cada población, el modo reproductivo (autogamia-alogamia), las distancias inter-demos, el tipo de polinización

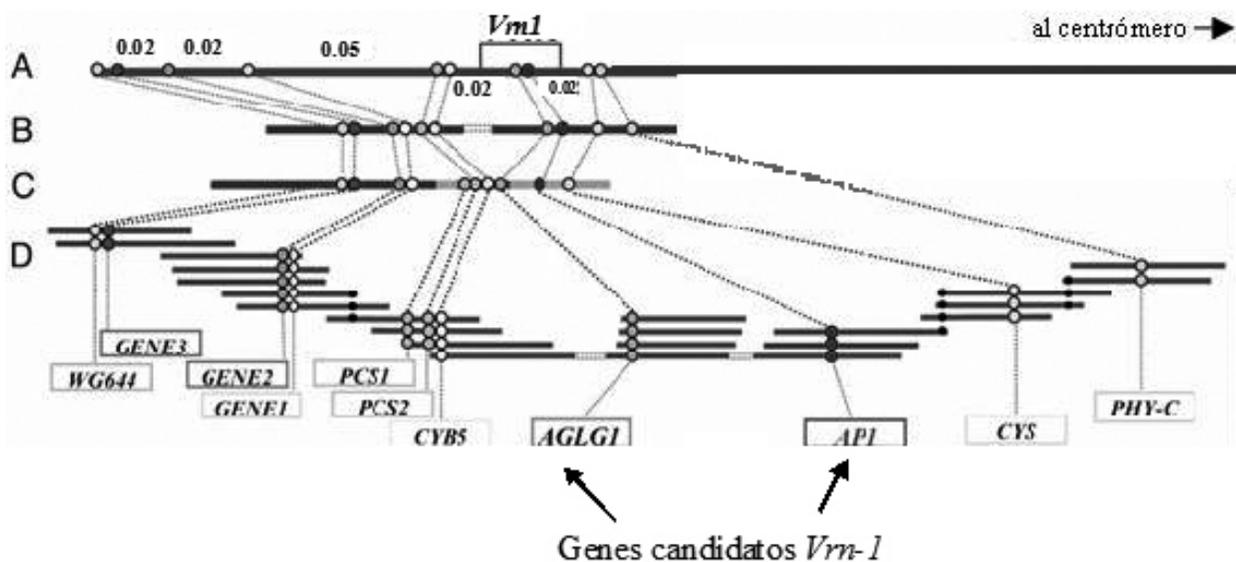


Figura 2. A. Mapa genético de la región genómica del cromosoma 5A de *T. monococcum* que incluye el gen *Vrn-1*. Las distancias genéticas están en cM. B-D Mapas físicos de la region colineal a *Vrn-1* en los genomas de arroz, sorgo y *T. monococcum*. B, BACs de arroz; C BAC de sorgo, D contig de BACs de *T. monococcum*. En círculos de distintos tonos de gris se indican genes conservados entre genomas. *AGLG1* y *AP1* son genes completamente ligados a *Vrn-1*. Figura adaptada de L. Yan et al. (2003). Positional cloning of wheat vernalization gene *VRN1*. PNAS 100: 6263-6268.

(gravedad-anemófila-entomófila), la acción del hombre en la fragmentación del hábitat y el origen (especies nativas-especies introducidas) determinan en conjunto una distribución de la variación genética propia de cada especie.

Los programas de conservación utilizan a menudo información acerca de la distribución de la variación genética para establecer prioridades y estrategias de manejo. Las variaciones dentro y entre poblaciones colaboran en la definición de las unidades a conservar y se convierten en elementos importantes para la toma de decisiones relacionadas con la protección de la biodiversidad. Es deseable que las poblaciones seleccionadas para formar parte de las áreas protegidas, contengan la mayor diversidad genética posible de modo de asegurar el mayor potencial evolutivo.

A partir de marcadores *codominantes* como las isoenzimas y microsatélites, pueden obt-

nerse parámetros de diversidad: P, número de *loci* polimórficos/número total de *loci* analizados; A, número promedio de alelos por locus; H_o , heterocigocidad observada; y H_e , heterocigocidad esperada ($1 - \sum p_i^2$, p_i : frecuencia alélica del alelo *i*). Dado que los genotipos homo y heterocigotos pueden ser reconocidos, es posible probar si la población se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg. Con los datos de frecuencias alélicas disponibles se calculan índices tales como Nei, Rogers, o Prevosti y se construyen matrices de distancia genética (D), a partir de las cuales es posible realizar análisis de agrupamientos que permiten visualizar las semejanzas o diferencias genéticas entre poblaciones.

En el caso de marcadores *dominantes* como los RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) el genotipo heterocigoto no

puede ser reconocido y se asume para una especie diploide que cada banda corresponde a un locus con dos alelos, A y a. El homocigoto dominante (AA) y el heterocigoto (Aa) corresponden a la presencia de la banda y la ausencia corresponde al homocigoto recesivo (aa). Los parámetros de diversidad pueden ser estimados: P de la misma manera que para marcadores codominantes; A es dos, por definición; sólo es posible calcular He a partir de las frecuencias alélicas estimadas, asumiendo equilibrio. Entonces $q = \sqrt{q^2}$ donde q es la frecuencia del alelo a y q^2 la frecuencia de individuos con ausencia de banda; luego $p = 1 - q$ siendo p la frecuencia del alelo A. Con estos datos, para calcular la He se procede de la misma manera que para marcadores codominantes.

El estudio de variabilidad con marcadores dominantes no permite determinar si una población está o no en equilibrio de Hardy Weinberg. Las diferencias genéticas entre poblaciones pueden igualmente ser estimadas con métodos que no utilizan frecuencias alélicas y que por lo tanto no asumen equilibrio. Uno de estos métodos se basa en el cálculo de distancias binarias entre pares de individuos, que

consideran la proporción de bandas compartidas. El paso siguiente comprende un análisis de la varianza molecular (AMOVA) que permite particionar esta varianza en sus componentes dentro y entre poblaciones a diferentes niveles. El programa GenAlEx disponible en <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>, permite realizar AMOVA y otros análisis de variabilidad, distancia genética y correlaciones a partir de datos moleculares. Posee un sólido soporte teórico, es de acceso libre y de fácil manejo dado que se agrega a la barra de herramientas Office Excel.

El siguiente es un ejemplo simplificado de uso de este programa.

Paso 1) Confección de la tabla de datos en formato para GenAlEx conteniendo registro de marcadores RAPD de dos poblaciones vegetales.

- Número de loci RAPD: 11 (A1)
- Número de individuos totales: 10 (B1)
- Número de poblaciones: 2 (C1)
- Número de individuos de la población A: 5 (D1)
- Número de individuos de la población B: 5 (E1)

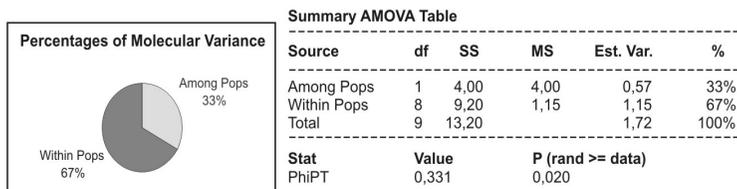
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	11	10	2	5	5									
2														
3	ind	pob	P2 240	P2 260	P2 330	P2 400	P2 440	P6 520	P6 550	P6 590	P6 650	P6 660	P6 800	
4	1	A	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	
5	2	A	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
6	3	A	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
7	4	A	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	
8	5	A	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
9	6	B	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	
10	7	B	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
11	8	B	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	
12	9	B	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
13	10	B	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
14														

Paso 2) Cálculo de las distancias binarias entre individuos.

GenAlEx ⇒ Distance ⇒ Genetic (binary) ⇒ OK

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	1	10	2	5	5	1	10					
2		Hoja1	Binary D	Pop1	Pop2							
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
4	0											1
5	3	0										2
6	3	2	0									3
7	2	1	3	0								4
8	3	2	0	3	0							5
9	5	4	6	5	6	0						6
10	5	2	4	3	4	2	0					7
11	4	1	3	2	3	3	3	0				8
12	2	1	3	2	3	3	3	2	0			9
13	5	2	4	3	4	2	0	3	3	0		10
14												

Paso 3) A partir de la matriz de distancia se realiza el análisis de varianza molecular GenAlEx ⇒ AMOVA (tri or square distance matrix; 999 permutations) ⇒ OK



Del análisis se concluye que la diferenciación molecular entre las poblaciones representa un 33 % de la varianza total, y que esa diferencia es significativa ($p=0,02$).

La diversidad genética cuantificada por marcadores moleculares puede mostrar, por ejemplo, que en una especie nativa de interés forestal todas las poblaciones presentan altos niveles de variabilidad genética y son bastante similares entre si. En este caso, la decisión de cuáles poblaciones formarán parte del programa de conservación podría basarse en consideraciones exclusivamente prácticas ya que las poblaciones son genéticamente equivalentes. Por el contrario, una especie compuesta de poblaciones con niveles bajos de variabilidad en cada unidad pero con alto grado de diferenciación entre poblaciones, requerirá que los esfuerzos de protección sean dirigidos hacia tantas poblaciones como sea posible, ya que cada una de ellas posee una identidad genética diferente. Poblaciones de especies endémicas, con niveles de diversidad genética extremadamente bajos y un reducido número de individuos, son normalmente ingresadas a la categoría de especies en peligro de extinción.

En este punto, es importante recordar que los marcadores moleculares representan variación genética esencialmente neutra, es decir se encuentran sometidos a la acción de fuerzas evolutivas no selectivas tales como deriva o flujo génico. Las decisiones finales de un programa de conservación deberían por lo tanto combinar los datos obtenidos a partir de marcadores moleculares junto con la evaluación de ciertos rasgos morfológicos, fisiológicos o reproductivos, que son críticos en el proceso de adaptación y supervivencia de las poblaciones en su hábitat.

Las malezas de mayor impacto en la agricultura mundial son en general especies introducidas. En el nuevo territorio, libre de presiones selectivas tales como especies competidoras o patógenos característicos del ecosistema de origen, la especie introducida es capaz de establecerse y colonizar todos los territorios que reúnan determinadas condiciones ambientales. La caracterización genética de las poblaciones de malezas puede aportar información de utilidad en los programas de control. Mediante marcadores moleculares puede establecerse si las poblaciones actuales provienen de un solo evento de introducción, con unos pocos individuos iniciales o por el contrario, ocurrieron múltiples eventos de introducción. Además, determinados marcadores informativos pueden establecer con bastante precisión cuál es el lugar de origen de las poblaciones introducidas, y en este caso rastrear “enemigos naturales” que pudieran ser útiles en el control biológico de la especie invasora.

El tipo de reproducción de una especie vegetal determina en gran parte la distribución de variabilidad genética entre poblaciones. Los mecanismos reproductivos pueden clasificarse en los tres tipos básicos: alogamia, autofecundación y apomixis. En realidad, existen combinaciones de estos tipos básicos, con porcentajes variables de cada uno de ellos según las especies y aún dentro de las poblaciones, con formas obligadas o facultativas. El estudio de marcadores moleculares en diferentes plantas de una población y su progenie ha contribuido a determinar el tipo de reproducción de numerosas especies vegetales

Estimación del flujo génico

El flujo génico entre poblaciones vegetales ocurre mediante el movimiento de polen o de

semillas. La morfología de semilla y polen, los mecanismos de dispersión, el tipo de polinización, etc., hacen que la contribución de estas dos vías al flujo total varíe de acuerdo a la especie. Los marcadores moleculares permiten cuantificar cada uno de estos procesos. Si el flujo génico se produce básicamente a través de polen, los marcadores de ADN de organelas, como por ejemplo cloroplastos, no serán transferidos de una población a otra porque este tipo de información es sólo heredada vía materna. En contraste, si el flujo génico se realiza principalmente a través de semillas, tanto los marcadores de herencia materna como los de herencia biparental o nuclear, serán transmitidos entre poblaciones. Mediante el uso de marcadores altamente polimórficos como los microsátélites es posible determinar cuál ha sido la planta donadora del polen de cada semilla de una planta madre, por ejemplo en especies arbóreas. En este caso, por un lado se obtiene información acerca de la distancia de transporte de polen y además constituye un test de "paternidad".

La estimación del flujo génico ha cobrado especial relevancia en los estudios tendientes a evaluar el efecto sobre el ambiente de los materiales genéticamente modificados. De esta manera, es factible analizar la posibilidad de que poblaciones silvestres cercanas a las formas cultivadas, adquieran el transgén mediante fecundación cruzada, generando cambios en la dinámica poblacional, competitividad o relación con otros miembros de la comunidad biótica tales como polinizadores, patógenos, etc. Esta potencial transferencia de genes se torna preocupante cuando se trata de flujo génico hacia poblaciones silvestres catalogadas como malezas. En este escenario, los marcadores moleculares de ADN o isoenzimas constituyen herramientas muy útiles. Los individuos de una determinada población pueden ser analizados y comparados con su progenie, producto de una polinización libre. Los alelos que no estaban presentes en la población materna son atribuidos al ingreso externo de polen del cultivo. Evaluando poblaciones a distancias crecientes desde una determinada fuente de polen, el flujo génico puede ser cuantificado, y cuando esta información se complementa con

datos de compatibilidad sexual, polinizadores y clima se arriba a una serie de conclusiones que pueden aplicarse al cultivo en gran escala de variedades transgénicas.

Se trate de variedades transgénicas o no, los procesos de hibridación de formas cultivadas y silvestres, alteran los niveles de diversidad genética de las poblaciones naturales, produciendo una erosión de los recursos genéticos vegetales, con potencial aplicación en mejora. Nuevamente la estimación del flujo génico y la determinación de la variabilidad genética mediante marcadores pueden contribuir a atenuar los procesos de "homogenización" genética y dar tiempo a la evaluación de las poblaciones naturales en cuanto a rasgos como resistencia a enfermedades o parámetros de calidad.

Filogenia

La filogenia intenta reconstruir las relaciones jerárquicas de descendencia entre especies o grupos de especies y utiliza esta información como criterio de clasificación biológica. El conocimiento de la filogenia y diversidad genética de los recursos silvestres permite optimizar los procesos de hibridación con los materiales cultivados. Cultivos importantes como trigo, girasol, tomate, poroto, o arroz cuentan con numerosas especies o géneros silvestres relacionados, con potencial uso en el mejoramiento genético mediante cruzamientos.

Los marcadores moleculares han aportado nuevas formas de análisis para la resolución de incógnitas filogenéticas o taxonómicas. Los marcadores RFLP son particularmente útiles dado que están basados en reacciones de hibridización, lo que garantiza la homología de los segmentos que se comparan entre los diferentes *taxa*. RAPDs no requiere un conocimiento previo del genoma en estudio y puede ser aplicado a diferentes especies pero la interpretación de los datos parte de asumir que los productos de amplificación de igual tamaño son homólogos.

Uno de los métodos de análisis filogenético a partir de marcadores, consiste en calcular un índice de distancia genética en base al número de bandas en común, y luego realizar un análisis de agrupamiento (UPGMA) o árbol filogenético (Neighbour Joining), que refleje las

relaciones entre los *taxa*. Establecer cuál es el árbol correcto entre todos los posibles es una tarea difícil que en parte es resuelta mediante el uso de métodos estadísticos, como técnicas de re-muestreo, que generan índices de consistencia o confiabilidad para cada árbol. Las relaciones establecidas de este modo se cotejan luego en relación a las vías filogenéticas propuestas a partir de datos citogenéticos, morfológicos, ecológicos, cruzamientos, etc.

Por otro lado, la comparación de mapas moleculares entre especies ha permitido conocer el tipo de reorganización genómica que ha operado durante el proceso de especiación. Cuando se compara el orden de los marcadores moleculares del girasol, *Helianthus annuus*, y especies relacionadas como *H. petiolaris* o *H. argophyllus* se observa que estas especies poseen zonas colineares y zonas no colineares, originadas estas últimas en cambios estructurales. Cuando se incluyó en el mapeo comparativo a *H. anomalus* se pudo inferir que: i) esta especie ha surgido por hibridación entre *H. annuus* y *H. petiolaris*; ii) conserva el número cromosómico de las especies parentales (especiación homoploide); iii) cambios en la estructura cromosómica han sido un mecanismo importante en la evolución de las especies anuales de *Helianthus*.

Mediante marcadores es posible elucidar las especies parentales ancestrales de una especie aloploiploide, como el tabaco o el algodón. Basta con examinar las variantes moleculares de las especies candidatas diploides y compararlas con las de la especie poliploide derivada. El modo en que segrega un marcador codominante en una progenie interespecífica, permite inferir el comportamiento disómico o polisómico, lo que permite caracterizar una especie en cuanto a su origen alo- o autoploiploide, respectivamente.

En la evolución del género *Citrus* ha operado la hibridación natural a través de reproducción sexual pero también están presentes mecanismos apomícticos que constituyen barreras al intercambio de genes. La taxonomía de este grupo resulta particularmente compleja ya que no puede ser aplicado el concepto biológico de especie. Marcadores de ADN han permitido esclarecer las relaciones de este polimórfico

grupo que incluye naranjas, limones, limas y mandarinas.

Los estudios moleculares más recientes han colocado al tomate, previamente denominado *Lycopersicon esculentum*, dentro del género *Solanum*, cambiando su denominación por *Solanum lycopersicon*. Los estudios sobre ADN de cloroplasto y la similitud de los mapas de ligamiento constituyen evidencias de que el tomate y la papa comparten un antecesor común muy reciente. Esta información resulta de gran aplicación en el mejoramiento de estos cultivos así como en la comprensión de la evolución de los genomas.

En los últimos años, ha tomado gran importancia la filogenia basada en datos de secuencias de ADN, en la que cada base de un grupo de secuencias alineadas, constituye un carácter a comparar. La velocidad de cambio del ADN a lo largo del proceso evolutivo difiere en las distintas porciones de un genoma, encontrándose algunas secuencias altamente conservadas y otras con elevadas tasas de sustitución. Si los taxones a comparar han divergido recientemente, será conveniente utilizar secuencias altamente variables, que hayan experimentado suficientes cambios en cortos períodos de evolución. Por el contrario, si las especies a comparar llevan mayores tiempos de divergencia (especies poco relacionadas) deben utilizarse secuencias más estables, con menores tasas de sustitución. Por otro lado, la existencia de genomas nucleares, mitocondriales y plastídicos que evolucionan a tasas específicas, representan herramientas adicionales para estudiar las relaciones filogenéticas entre especies con distintos grados de parentesco.

Lecturas recomendadas

Andersen J. R., Lübberstedt T. 2003. Functional markers in plants. Trends in Plant Science, 8, 554-560.

Angiolillo A, Mencuccini M, Baldoni L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment polymorphisms. Theor. Appl. Genet., 98, 411-421.

Arabidopsis Genome Initiative 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature, 408, 796-815.

Bagge M., Xia X., Lübberstedt T. 2007. Functional

- markers in wheat. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 211-216.
- Buerkle C. A, Rieseberg L.H. 2008. The rate of genome stabilization in homoploid hybrid species. *Evolution*, 62, 266-275.
- Carrera A, Pizarro G, Poverene M, Feingold S, Berry S, León A. 2002. Variability among inbred lines and RFLP mapping of sunflower isozymes. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 65-72.
- Devos K.M. and Gale M.D, 2000. Genome relationships: The grass model in current research. *The Plant Cell*, 12, 637-646.
- Dubcovsky J. and Dvorak J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316, 1862-1866.
- Godt M, Hamrick J. 1998. Allozyme diversity in the grasses. En: G.P. Cheplick (ed). *Population biology of grasses*. Cambridge University Press. pp 1998-399.
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 927-934.
- International Rice Genome Sequencing Project 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436, 793-800.
- Manifeto M.M., Schlatter A.R., Hopp H.E., Suárez E.Y., and Dubcovsky J. 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers, *Crop Science*, 41, 682-690.
- Moore G. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends in Genetics*, 17, 536-540.
- Paterson A, Tanksley S, Sorrells M. 1991. DNA markers in plant improvement. *Advances in Agronomy*. 46, 39-90.
- Peakall R, Smouse P.E. 2006. GenAEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Rieseberg L, Seiler G, 1990. Molecular evidence and the origin and development of the domesticated sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Economic Botany*, 44, 79-91.
- Sherry A. Flint-Garcia, Jeffry M. Thornsberry and Edward S. Buckler IV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 357-74.
- Soltis E, Soltis P. 2000. Contribution of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant Molecular Biology*, 42, 45-75.
- Stein, N; C. Feuillet, T. Wicker, E. Schlagenhauf, and B. Keller. 2000. Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the Lr10 resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97 (24), 13436-13441.
- Tohme J, Gonzalez D, Beebe S, Duque M. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sci.*, 36, 1375-1384.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T. and J. Dubcovsky 2003. Positional cloning of wheat vernalization gene VRN1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6263-6268.

III. CAPÍTULO 3

Marcadores moleculares y mejoramiento genético de cultivos

Carlos Sala; Mariano Bulos; Analia Fresco; Emiliano Altieri

Introducción

El mejoramiento genético es un conjunto de principios científicos, métodos, técnicas y estrategias aplicadas a la obtención de genotipos o grupos de genotipos con características deseables según objetivos previamente definidos. El proceso fundamental que subyace en el mejoramiento es el de cambio adaptativo por sustitución alélica bajo selección. La mutación, la hibridación interespecífica y la transgénesis pueden aportar nuevos caracteres a la diversidad de un cultivo, no obstante el proceso fundamental, luego que tales caracteres son incorporados al germoplasma, no se modifica.

El mejoramiento genético es un proceso cíclico. En cada ciclo, se evalúan todos los individuos de una población determinada. Como resultado de esta evaluación, se seleccionan los individuos deseables y los restantes son descartados. Finalmente, los individuos seleccionados se cruzan entre sí (se recombinan) para dar origen a una nueva generación en que se reinicia un nuevo ciclo.

Un excelente medio para organizar una discusión en torno a cómo maximizar el progreso genético y distribuir eficientemente los recursos dentro de un programa de mejoramiento es la ecuación de ganancia genética por selección:

$$Gy = \frac{k \sigma_A^2}{y \sigma_P}$$

Esencialmente, esta ecuación indica que el progreso genético de cualquier programa de mejora (Gy) es directamente proporcional a la variabilidad heredable (σ_A^2) disponible y a la intensidad de selección que se aplique (k). La variabilidad genética disponible refleja el grado de diversidad de los materiales genéticos que posee el programa de mejora. En el extremo,

un programa que carece de variabilidad ($\sigma_A^2 \rightarrow 0$) no tendrá posibilidad de generar nuevos genotipos por recombinación y selección por lo que su progreso genético se verá severamente disminuido ($Gy \rightarrow 0$). Por otra parte, el progreso por selección es inversamente proporcional al número de años que se tarda en completar un ciclo de selección (y) y al desvío fenotípico (σ_P). El desvío fenotípico refleja básicamente el grado de interacción entre el genotipo y el ambiente para expresar un dado fenotipo. En otras palabras, es una medida de la correlación existente entre genotipo y fenotipo.

Consideremos un determinado carácter (por ejemplo, la resistencia a una enfermedad) el cual está gobernado por un solo gen con dos alelos, el alelo de resistencia es incompletamente dominante, el patógeno está siempre presente y las condiciones ambientales para que se produzca la infección son siempre favorables. Por lo tanto, si se observa una planta sin síntomas puede concluirse que la misma es homocigota para el alelo de resistencia. En forma similar, si se observa una planta muy afectada por la enfermedad se concluirá que la planta es homocigota para el alelo que confiere susceptibilidad, y todas las plantas que muestren fenotipos intermedios podrían considerarse heterocigotas. En este caso ideal, el fenotipo estaría indicando exactamente cuál es el genotipo de cada individuo, la correlación entre fenotipo y genotipo tendería a 1 y el desvío fenotípico tendería a cero. Bajo esas condiciones el progreso genético por elección sería máximo. Lamentablemente, en la práctica este tipo de ejemplo jamás ocurre. Los caracteres de importancia económica no siempre están gobernados por un único gen, sino por varios, y las relaciones de dominancia y de epistasia (interacción entre genes) suelen ser bastante complicadas. Asimismo, el patógeno puede o no estar presente, y el ambiente puede o no ser favorable para el desarrollo de la enfermedad. Por todas esas razones, la asociación entre fenotipo y genotipo es en general escasa, lo que hace que al evaluar individuos a través de su fenotipo no se esté seleccionando el genotipo adecuado y la recombinación incluirá muchas cruces entre individuos que no portan el/los gen/es deseados. El resultado es que el

incremento de los alelos favorables dentro de la población se hace a tasas más lentas y, por ende, el progreso genético es mucho menor.

La tecnología de marcadores moleculares se puede aplicar para optimizar o hacer más eficiente todos y cada uno de los factores determinantes de la ganancia genética o del progreso genético por selección. Así, los marcadores moleculares pueden utilizarse para:

Organizar, mantener e incrementar la diversidad genética. De este modo se verá incrementado el numerador de la ecuación y, por ende, el progreso genético.

Disminuir la interacción genotipo/ambiente. Si en lugar de seleccionar por el fenotipo se seleccionara por el genotipo de cada individuo, tendería a disminuir drásticamente el denominador de la ecuación de ganancia genética, con el consiguiente incremento del progreso por selección. Este tipo de selección se denomina “selección asistida por marcadores moleculares” o, simplemente, “selección asistida”.

Disminuir el tiempo requerido para completar los ciclos de selección. Si para incorporar un carácter dentro del germoplasma del cultivo se tarda usualmente 6 a 7 generaciones, los marcadores moleculares permiten acortar esos plazos a 3 generaciones, por lo que el progreso genético se verá incrementado. Adicionalmente, los marcadores permiten la introgresión de tales caracteres con un mínimo de incorporación de genes provenientes del individuo dador, garantizando de ese modo, que no se reduzcan las medias poblacionales para aquellos caracteres que no están relacionados con el gen introducido. Este tipo de método de incorporación de variabilidad al germoplasma se denomina “retrocruzadas asistidas por marcadores moleculares” o, simplemente, “conversiones”.

A lo largo de este capítulo se analizarán con mayor detalle los modos de implementación de los marcadores moleculares en todas estas áreas lo que, en última instancia, contribuye a maximizar el progreso genético.

Selección asistida por marcadores moleculares

La aplicación de marcadores moleculares en el mejoramiento de cultivos fue inicialmente propuesta al comienzo de la década de

1980 cuando se utilizaron algunos marcadores isoenzimáticos para acelerar la introgresión de caracteres monogénicos desde el germoplasma exótico hacia trasfondos cultivados. Pocos años después, Beckmann & Soller (1986) describieron el uso de marcadores RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) en el mejoramiento de cultivos, incluyendo los aspectos teóricos relacionados con las retrocruzadas asistidas por marcadores para el mejoramiento de caracteres cualitativos. Lande & Thompson (1990) fueron los primeros en considerar los aspectos teóricos de la *selección asistida por marcadores (MAS*, por su acrónimo inglés) para los caracteres cuantitativos, y catalizaron una serie de publicaciones de estudios de simulación en la década del 90. Más recientemente, se han publicado resultados de la aplicación de MAS en programas de mejora y algunas consideraciones teóricas adicionales, incluyendo la optimización de los sistemas de *retrocruzadas asistidas por marcadores (MABC*, por su acrónimo inglés); y las estrategias para la piramidización o apilamiento de alelos favorables en esquemas de selección recurrente. Todos estos estudios han contribuido a nuestro entendimiento de muchos aspectos básicos a tener en cuenta al implementar MAS, tales como el tipo de poblaciones, el tamaño de la muestra, el tamaño genómico, y el número de marcadores. Asimismo, hay varias revisiones que comparan el uso de distintos tipos de marcadores en mejoramiento.

La figura 1 muestra los pasos para realizar selección utilizando marcadores moleculares microsatélites (si bien, cualquier otro tipo de marcador podría ser usado). Básicamente, de cada planta a evaluar se extrae su ADN, se amplifica el marcador que esté asociado al gen de interés utilizando la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), y el producto de amplificación se somete a una corrida electroforética en geles para su observación. Se muestra un ejemplo de selección asistida para desarrollar resistencia a una enfermedad denominada “Mancha ojo de rana” producida por *Cercospora sojina* en soja. En el gel que se muestra a la derecha del esquema pueden observarse los fragmentos de ADN obtenidos para un progenitor resistente (R), un individuo susceptible (S)

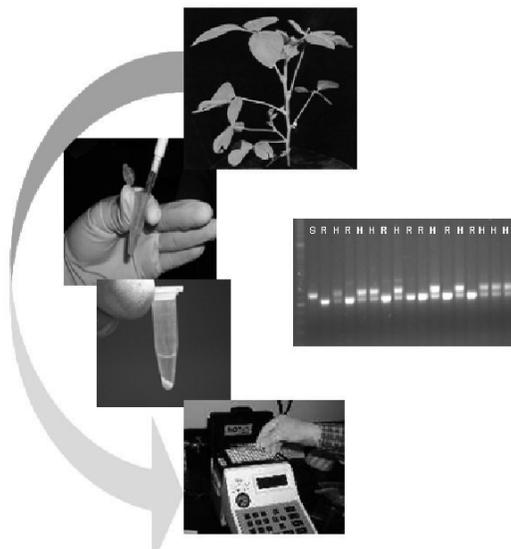


Figura 1. Etapas de la selección asistida por marcadores moleculares. Los individuos a evaluar son muestreados y el material foliar es acondicionado de acuerdo al método que se utilice para la extracción del ADN. El ADN obtenido es utilizado como molde para realizar el proceso de amplificación por PCR del marcador elegido. Los fragmentos obtenidos para cada individuo son resueltos mediante electroforesis. Los resultados son leídos e interpretados para decidir la selección de los individuos que presenten el alelo de interés. Actualmente, una o más etapas de este proceso pueden ser automatizadas.

y varios descendientes de la primera retrocruza con el padre resistente. Tales descendientes muestran el fragmento que indica la presencia del gen de resistencia, o bien, ambos fragmentos, lo que indica que son heterocigóticos para el gen de resistencia.

Existen algunos aspectos importantes que deben considerarse para la implementación de la selección asistida por un carácter en un programa de mejora. Ellos son: a) el tipo de marcador elegido; b) la distancia genética entre el marcador y el gen de interés; c) la/s fuente/s posible/s para el carácter o gen de interés. Respecto del primer punto, cuando se practica selección asistida por marcadores es necesario evaluar cientos o miles de plantas en forma eficiente y ello determina la elección de los mismos. Cierta tipo de marcadores (como por ejemplo aquellos basados en la hibridación del ADN, como los RFLPs) no se adaptan bien

a este fin dado que son técnicamente más laboriosos. En general, los marcadores basados en PCR son los más indicados para este tipo de aplicación. Por esta razón, en muchas oportunidades se convierten marcadores RFLPs en marcadores basados en PCR. Dentro de los marcadores basados en PCR, los marcadores multipunto (como los AFLPs –*Amplified Fragment Length Polymorphism*-, RAPDs –*Randon Amplification of Polymorphic DNA*- o ISSRs –*Inter Simple Sequence Repeats*-) presentan dos dificultades: son en general dominantes y no es eficiente amplificar y leer múltiples fragmentos para detectar sólo el que nos interesa. Esta última dificultad se resuelve diseñando marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) a partir del fragmento polimórfico que está asociado al gen o carácter de interés. De este modo, la amplificación del ADN con cebadores específicos produce patrones simples y de fácil lectura. Sin embargo, los SCARs son en general dominantes, lo que involucra una dificultad adicional. Si el marcador es codominante, como el que se muestra en el ejemplo de la figura 1, se puede determinar inmediatamente si cada individuo resistente es homocigótico o heterocigótico para el gen en cuestión. Si, en cambio, el marcador fuese dominante, únicamente se podrían distinguir los individuos portadores del gen de resistencia de aquellos que no lo presentan. En esos casos, posteriormente se deberá determinar si cada individuo es o no homocigótico mediante análisis de la descendencia de cada planta. Para solucionar este inconveniente lo que se hace es diseñar un marcador CAPs (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) o bien utilizar la técnica de PCR en tiempo real. El segundo punto importante se relaciona con la distancia genética existente entre el marcador molecular y el gen de interés. Idealmente, se deberían utilizar marcadores específicos de alelo. No obstante, en general no es posible disponer de tales tipos de marcadores. A medida que la distancia entre el marcador y el gen de interés se acrecienta, mayor será la probabilidad de cometer errores de evaluación (tomar a un individuo como positivo cuando en realidad no lo es). Esta dificultad puede solucionarse de dos formas básicas. En primer lugar, se debe

tratar de saturar la región de interés con un mayor número de marcadores para hallar uno que esté más cercano al gen. Si ello no fuera posible o los nuevos marcadores hallados no se encuentren suficientemente cercanos al gen de interés, se puede optar por utilizar dos marcadores -uno por “encima” y otro por “debajo” del gen en cuestión- para reducir la probabilidad de cometer errores de evaluación. Finalmente, la tercera consideración a realizar es acerca de la fuente del carácter o gen de interés. Cuando en un dado cultivo un carácter o un gen tienen un solo ancestro dador (o sea, hay una sola fuente original), existirá un solo tamaño de fragmento para el alelo de interés y uno o varios fragmentos de diferente tamaño para los otros alelos. En consecuencia, los resultados obtenidos de la población de mapeo del carácter en cuestión son inmediatamente utilizables o trasladables a otras poblaciones y líneas. No obstante, lo usual es que existan diferentes fuentes. Si esto es así, primero hay que determinar los tamaños de fragmento tanto para las diferentes fuentes de resistencia como para aquellos individuos que no portan el alelo de interés, ya que en muchas oportunidades el tamaño de fragmento puede variar entre diferentes fuentes de resistencia. Asimismo, en otras poblaciones o en otro sector del germoplasma, un marcador detectado previamente como polimórfico en la población de mapeo original puede ser monomórfico entre individuos contrastantes para el carácter, lo que puede inducir a errores de evaluación.

Justificaciones para el uso de selección asistida por marcadores en mejoramiento genético.

Las justificaciones para el desarrollo y uso de MAS en mejoramiento genético pueden agruparse en 6 categorías diferentes las cuales son relevantes para casi todos los cultivos:

Cuando la heredabilidad del carácter que se está evaluando es baja (o sea, cuando la expresión de un carácter se halla altamente influida por el ambiente) ya sea porque la genética del carácter es compleja, la penetrancia es baja o la expresividad es variable.

Cuando no hay métodos efectivos, precisos o rutinarios de selección fenotípica o convencional, o éstos son caros, su determinación es en-

gorrosa, o bien depende de ambientes específicos o estados de desarrollo que influyen la expresión del fenotipo. Asimismo, para el caso de resistencia a enfermedades, cuando el patógeno está ausente en el lugar donde se realiza la selección o su frecuencia de aparición (su incidencia) varía mucho entre años.

Cuando se necesita un elevado número de individuos para evaluar fenotípicamente el carácter en cuestión (ejemplo: calidad panadera en trigo), los marcadores permiten realizar tal evaluación sobre un solo individuo y en las primeras generaciones de endocría.

Cuando es necesario apilar o “piramidizar” varios genes o QTLs que determinan un solo carácter, como por ejemplo la resistencia a roya de la hoja o a la fusariosis de la espiga en trigo, lo que puede ser muy engorroso o virtualmente imposible si se utilizan métodos fenotípicos solamente.

Cuando se necesita individualizar eficazmente las fuentes de resistencia a patógenos existentes en el germoplasma y buscar nuevas fuentes para complementar las anteriores. Esta prospección de recursos genéticos mediante el uso de marcadores no está limitada a las resistencias a patógenos sino que puede emplearse para otros caracteres, como por ejemplo la calidad del producto.

Los marcadores moleculares, finalmente, debido a que permiten determinar la genética subyacente detrás de un dado fenotipo garantizan la generación del mismo en forma recurrente. En otras palabras, los marcadores permiten reobtener las combinaciones de genes o QTLs cuya interacción gobierna un determinado fenotipo, proceso que -si librado al azar- sería de una ocurrencia altamente improbable.

En la tabla 1 se ejemplifican algunos de los caracteres en distintos cultivos cuya selección se realiza por medio de marcadores moleculares. Como puede apreciarse, estos caracteres van desde resistencias a enfermedades hasta caracteres que están relacionados con la calidad del producto, incluyendo caracteres de herencia simple (por ejemplo, la resistencia a *Cercospora sojina* en soja) hasta caracteres de herencia compleja (por ejemplo, la calidad panadera en trigo o la resistencia a la virosis conocida como Mal de Río Cuarto en maíz).

Tabla 1. Ejemplos de caracteres para los cuales se realiza selección asistida utilizando marcadores moleculares agrupados por rasgo. Los ejemplos fueron escogidos para representar la diversidad de ámbitos donde esta metodología encuentra aplicación.

Ref.: 1) Guo et al. (2005) *Theor. Appl. Genet.* 111, 965-971. 2) Dedryver et al. (1996) *Genome* 39, 830-835. 3) Sala et al. (2005) *Sol. Pat. Arg.* INPI AR038302 4) Pankovic et al. (2008) *Plant Breed.* 126, 440-444. 5) Zhu et al. (2006) *Crop Sci.* 46:1094-1099. 6) Sutka (2001) *Euphytica* 119, 169-177. 7) Lee et al. (2004) *Theor. Appl. Genet.* 109, 1610-1619. 8) Magalhaes et al. (2004) *Genetics* 167, 1905-1914. 9) Yan et al. (2003) *PNAS* 100, 6263-6268. 10) Mohler et al. (2004) *Euphytica* 138, 33-40. 11) Salvi et al. (2002) *Plant Mol. Biol.* 48, 601-613. 12) Ellis et al. (2002) *Theor. Appl. Genet.* 105, 1038-1042. 13) Ahmad (2000) *Theor. Appl. Genet.* 101, 892-896. 14) Distelfeld et al. (2006) *New Phytologist* 169, 753-763. 15) Lillemo & Ringlund (2002) *Plant Breed.* 121, 210-217. 16) Kim et al. (2006) *Euphytica* 152, 361-366. 17) Bilyeu et al. (2006) *Crop Sci.* 46, 1913-1918. 18) Gunnar et al. (2006) *Mol. Breed.* 17, 241-256. 19) Sala et al. (2008). *Crop Sci.* (en prensa). 20) Yang et al. (2007) *J. Agric. Food Chem.* 55, 14-24. 21) Terry & Harris (2001) *Eur. Food Res. Technol.* 213, 425-431.

Tipo de Rasgo	Cultivo	Ejemplos	Marcador	Ref
Resistencias a enfermedades y plagas	Soja	Resistencia a Nematodo del Quiste	SSR	1
	Trigo	Resistencia a Roya de la hoja	SCAR	2
	Maíz	Resistencia a Mal de Rio IV	SSR	3
	Girasol	Resistencia a <i>Plasmopara</i>	CAPS	4
	Soja	Resistencia a insectos	SSR	5
Resistencias a estrés abiótico	Trigo	Tolerancia a heladas	RFLP-AFLP	6
	Soja	Tolerancia a salinidad	SSR	7
	Sorgo	Tolerancia a aluminio	RFLP	8
	Trigo	Requerimiento de frío para florecer	RFLP	9
Adaptación	Trigo	Requerimiento fotoperiódico para florecer	AFLP-SCAR	10
	Maíz	Días a floración	AFLP	11
	Trigo	Enanismo	SCAR	12
Calidad del producto	Trigo	Calidad panadera	SCAR	13
	Trigo	Porcentaje de proteína en el grano	SCAR	14
	Trigo	Dureza del grano	CAPS	15
	Soja	Inhibidor de tripsina (Kunitz)	SSR	16
	Soja	Bajo contenido de ácido linolénico	SNP	17
	Girasol	Alto contenido de ácido oleico	SCAR	18
Resistencia a herbicidas	Girasol	Resistencia a imidazolinonas	INDEL	19
	Maíz	Resistencia a glifosato	SCAR	20
	Soja	Resistencia a glifosato	SCAR	21

Conversiones

Se denomina *retrocruza asistida por marcadores moleculares* o *conversión* al proceso de introducir un carácter controlado por uno o pocos genes desde un genotipo dador o donante a un genotipo recurrente, de modo tal de obtener el trasfondo genético del recurrente con el carácter deseado.

Los marcadores se utilizan para realizar la selección por el carácter de interés y, aún más importante, para seleccionar las plantas de modo tal de recuperar más rápidamente el trasfondo genético del padre recurrente. Para entender mejor la importancia de este método como así también su implementación, lo mejor es comenzar por analizar el método convencional o tradicional de retrocruzas.

El método de mejoramiento por retrocruzas

El método de retrocruzas es un método muy antiguo de mejoramiento y consiste en el cruzamiento repetido de la progenie híbrida derivada de una cruce con uno de sus parentales. El objetivo principal es mejorar a una línea, cultivar o variedad ya existente por una o más características para la cual es deficiente. Por ejemplo, una variedad de soja tiene buen rendimiento y estabilidad del rendimiento, pero es susceptible a una enfermedad importante de herencia simple, mientras que otra variedad es resistente a tal enfermedad pero es deficiente en muchos otros aspectos. Un objetivo del mejoramiento podría ser obtener una nueva variedad con las características deseables de rendimiento y estabilidad de la primera y con el/los gen/es de resistencia de la segunda.

El esquema general de implementación del método de retrocruzas es el siguiente (figura 2.A). Una

línea pura (el padre *recurrente*, R) de muy buenas características agronómicas, pero deficiente para un carácter, se cruza con un individuo que exhibe el carácter en cuestión (individuo *dador*, D), y se obtienen descendientes F1. Estas plantas F1 se retrocruzan con el progenitor R. La progenie obtenida se denomina "retrocruza 1" (BC1). En esta generación BC1 se seleccionan las plantas que muestran el carácter de interés y se retrocruzan con "R", obteniéndose la "retrocruza 2" (BC2). Se repite de nuevo este proceso de selección por el carácter y retrocruzamiento con el progenitor "R" hasta llegar a una generación (usualmente la retrocruza 6, BC6) en la cual se han recuperado todas las características del progenitor R, se seleccionan los individuos que presenten el carácter de interés y se autofecundan. En la próxima generación (BC6F2) se seleccionan aquellas plantas homocigóticas para los genes que gobiernan el carácter en cuestión y se autofecundan de nuevo. De este modo, se ha obtenido la línea R original con el carácter del dador incorporado. La figura 2.B es un esquema en el que se puede apreciar lo descrito en forma gráfica. Se simboliza con una ba-

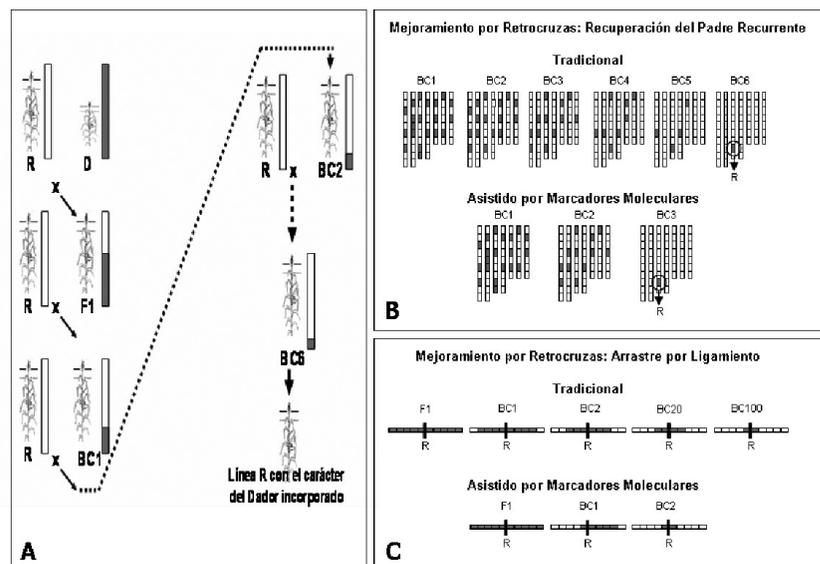


Figura 2. Método de retrocruzas. (A) Esquema del método tradicional de retrocruzas. (B) Comparación de los niveles de recuperación del trasfondo genético del padre recurrente utilizando el método tradicional de retrocruzas y el asistido por marcadores. (C) Comparación de los niveles de eliminación del arrastre por ligamiento utilizando retrocruzas convencionales y asistidas por marcadores. D progenitor donante del carácter a incorporar, R progenitor recurrente. BC1, BC2, BC6, generaciones sucesivas de retrocruzas hacia el progenitor recurrente.

rra vertical el genotipo de cada individuo, negro para el dador y blanco para el recurrente. Como puede observarse, la F1 tiene una contribución de 50% de cada progenitor. En la BC1, la contribución del dador ha disminuido a un 25%. O sea, en promedio, la generación BC1 presenta el 75% de contribución genética del recurrente (la ecuación que permite calcular la proporción del genotipo del padre recurrente recuperado –RPR- luego de un número determinado de n generaciones de retrocruzas es, en ausencia de selección y ligamiento: $RPR = (1 - 0.5^{(n+1)}) * 100$). La generación BC2 a su vez presentará, en promedio, un 87,5% de contribución del recurrente. De esta forma, en cada generación de retrocruzas la contribución genética del dador va decreciendo a la mitad de la generación previa. De esta forma, al llegar a BC6 la población de plantas tendrá, en promedio, el 99,2% de los genes del progenitor recurrente y, en la práctica, se considera que cada individuo es igual al recurrente salvo por el carácter incorporado. Este método de mejora fue originalmente propuesto por Harlan y Pope en 1922, pero hasta hace pocos años no fue extensivamente utilizado en los programas de fitomejoramiento. La razón de esta baja adopción es bastante simple: la incorporación del carácter (o sea, la recuperación del trasfondo genético del progenitor elite R con el carácter en cuestión suministrado por D) tarda más o menos 7 generaciones, lo que para cultivos anuales implica 7 años si no se pueden cultivar generaciones de contra-estación. Por lo tanto, al cabo de 7 años se obtendrá el mismo material genético, pero que expresa un carácter adicional. Como resulta lógico, durante este período el trabajo de mejoramiento en el mismo programa en el que se obtuvo a “R” habrá producido nuevos materiales que superen ampliamente a ese genotipo. Más aún, se pueden haber obtenido genotipos nuevos que expresen el carácter que se deseaba incorporar mediante cruzas simples y posterior selección. En resumidas cuentas: la aplicación del método convencional de retrocruzas habrá obtenido un genotipo “viejo” con un carácter nuevo o, en palabras de muchos mejoradores, se habrá detenido el progreso genético por 7 generaciones. Los marcadores moleculares permiten acelerar este proceso, como se explica a continuación.

Retrocruzas asistidas por marcadores

Para realizar una retrocruza asistida por marcadores se sigue un esquema de trabajo similar al presentado en la figura 3, en la cual se describen los pasos utilizados para implementar dicha conversión. Luego de obtener la BC1 entre una línea recurrente y una línea dadora del gen de interés, se extrae el ADN de cada segregante. En primer lugar, se selecciona por el carácter de interés. Esta selección puede ser fenotípica o, más comúnmente, mediante marcadores ligados al gen/es de interés (selección asistida por marcadores). Se descartan todos los individuos que no presentan el/los alelos de interés y, a partir del ADN de los restantes individuos, se procede a amplificar los marcadores para todas las regiones del genoma para las cuales difieren los parentales D y R (o sea, para todos los marcadores polimórficos entre las líneas D y R). Luego de leer los geles, se calculan las similitudes genéticas de cada individuo segregante con respecto al padre recurrente y se seleccionan aquel/aquellos individuos con los mayores porcentajes de similitud. Esos individuos son los que se retrocruzan con el padre recurrente para obtener la generación BC2.

Como se describió previamente, los porcentajes de recuperación del genotipo recurrente en cada generación de retrocruzas son valores promedio de toda la población. De hecho, existe una gran variabilidad entre individuos respecto de este porcentaje. Así, en la figura 3 se muestra, para el caso del maíz, el porcentaje de similitud de los segregantes en BC1 con respecto al padre recurrente, evaluados por medio de un gran número de marcadores moleculares dispersos a través de todo el genoma. Se puede observar, como ejemplo, que en la BC1F1 hay individuos que sólo presentan un 40% de similitud con el recurrente, mientras que hay otros que muestran más del 80%. Individualizando y cruzando sólo los individuos que presentan los mayores niveles de similitud para obtener la siguiente generación de retrocruzas, se logra disminuir el número de generaciones necesarias para recuperar el trasfondo genético del padre recurrente.

Obsérvese que si se elige el individuo con 84,3% de similitud para retrocruzar, el mínimo

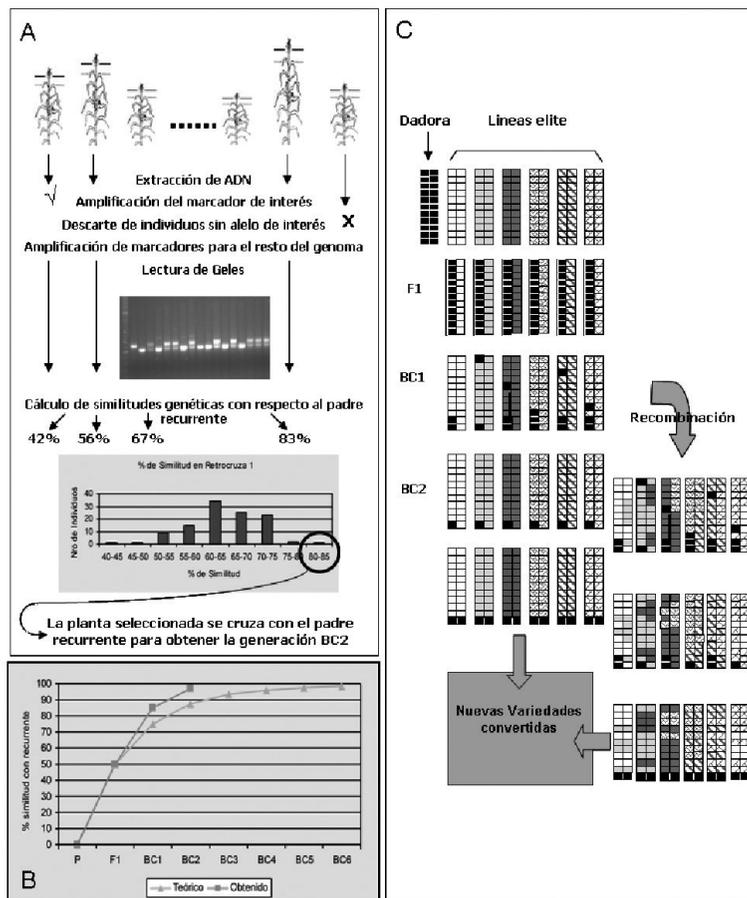


Figura 3. Conversiones asistidas por marcadores moleculares. (A) Etapas del proceso de análisis de la generación BC1 durante una conversión asistida por marcadores. (B) Porcentaje de recuperación del trasfondo genético del progenitor recurrente a través de las generaciones para el método convencional de retrocruzas (teórico) y el método asistido por marcadores (obtenido). (C) Las conversiones dentro de un programa de mejora. Se inician múltiples conversiones para un mismo carácter sobre distintos trasfondos genéticos, con el objetivo de obtener los mismos genotipos con el carácter incorporado. Como estrategia para obtener genotipos nóveles con el carácter incorporado, es posible iniciar la recombinación en etapas intermedias del proceso de conversión.

porcentaje de similitud que, en promedio, tendrán los individuos en la BC2 será del 92% (según el número de plantas que se obtengan se pueden lograr individuos con el 98-99% de similitud). Repitiendo el mismo procedimiento en la BC2, se autofecundan los individuos con los mayores porcentajes de similitud para obtener la BC2F2. En esta generación se terminan de seleccionar los segregantes que presentan el gen de interés en estado homocigótico e identidad genética con el padre recurrente para el

resto del genoma. De esta forma, se habrá obtenido la línea recurrente convertida por el carácter de interés en sólo dos generaciones de retrocruzas. La figura 3.C muestra los resultados obtenidos en el laboratorio de los autores para el caso del cultivo de maíz, luego de convertir decenas de líneas endocriadas por mutantes (por ejemplo, resistencia a herbicidas), transgenes (resistencia a insectos) o QTLs (*Quantitative Trait Locus*) para resistencia a enfermedades. Como norma, la recuperación del trasfondo genético del padre recurrente se logra en BC2, 4 generaciones antes de lo que requerido por el método tradicional. De hecho, los porcentajes de similitud promedio de las mejores plantas seleccionadas de la BC1 fueron del 89,3% y de la BC2, del 98,5%.

La descripción anterior del método de retrocruzas se ha realizado considerando que el carácter en cuestión es de herencia monogénica, que el estado favorable del carácter está controlado por el alelo dominante, y que la selección puede realizarse antes de que florezcan las plantas. En este caso, la implementación del método de retrocruzas (supongamos que se desea incorporar la re-

sistencia a una enfermedad a una variedad de trigo) es relativamente simple. En la práctica real del mejoramiento, los casos son en general un poco más complicados. Así, por ejemplo, si se desea incorporar un carácter controlado por un alelo dominante que se expresa en la semilla (ejemplo: alto contenido de ácido oleico en la semilla de girasol), no se pueden seleccionar las plantas en cada generación de retrocruzas antes de que éstas florezcan. En este caso, se deben hacer todos los cruzamientos posibles

con el padre recurrente y evaluarlos cuando se obtengan las semillas de cada planta. Recién en ese momento se podrán descartar aquellas cruces con las plantas que no presentaban el carácter de interés. La mayor dificultad en este ejemplo radica en la cantidad de cruzamientos que se deben realizar para asegurar que al menos una de las plantas que se retrocruzan lleve el carácter en cuestión. Ahora bien, si el carácter que se desea incorporar está controlado por un alelo recesivo (por ejemplo, la dureza del grano en trigo), no sólo se debe retrocruzar cada planta con el padre recurrente, sino también autofecundarla (o hacerle un cruzamiento de prueba o “*testcross*”) para determinar cuál de las plantas de cada generación de retrocruzas lleva el carácter en cuestión. En este caso, no sólo se deben hacer gran cantidad de cruces sino también perder una generación adicional entre cada generación de retrocruzas para evaluar el carácter de interés. Existe, finalmente, otro tipo de complicaciones. Todos los casos anteriores se refieren a ejemplos en los que el fenotipo de cada planta se puede analizar en forma individual. Existen muchos ejemplos (uno de ellos es la calidad panadera en trigo) donde se necesitan cientos de semillas para evaluar el fenotipo. En estos casos, para evaluar cada individuo en las generaciones de retrocruzas, se deberían obtener dos generaciones de autofecundaciones antes de decidir cuáles son los individuos con los determinantes genéticos correctos para continuar retrocruzando.

El empleo de marcadores moleculares reduce notablemente las complejidades descritas ya que todos los ejemplos mencionados (seleccionar individuos después de la floración, hacer cruzamientos de prueba, o multiplicar la semilla para poder evaluar) se reducen al caso más simple de seleccionar el carácter de interés por marcadores antes de la floración.

El arrastre por ligamiento y su eliminación

Cuando se incorpora un carácter desde un genotipo dador a una línea recurrente, todos los genes ligados al gen incorporado pasan con éste de generación en generación. Ese *arrastre por ligamiento* puede que no tenga consecuencias fenotípicas o bien, como ocurre

generalmente, puede deprimir el rendimiento potencial o la calidad del producto, dependiendo de las características del genotipo dador (si es una especie silvestre se esperan mayores consecuencias fenotípicas que si el dador es una línea elite). Así, por ejemplo, cuando se transfirió al trigo el gen *Lr19* que confiere resistencia a roya de la hoja desde *Thinopyrum ponticum*, también se incorporó un gen ligado (Y) que determina el amarillamiento de la harina, un carácter indeseable para la industria alimenticia. Otro ejemplo es el de la transferencia a trigo de la resistencia a varias enfermedades conferidas por distintos genes en el cromosoma 1R de centeno (*Secale cereale* L.), el cual también presenta genes que disminuyen diversos parámetros de la calidad panadera.

En el método convencional de retrocruzas la eliminación del arrastre por ligamiento se va logrando por la “erosión” del segmento incorporado a través de recombinación por entrecruzamiento. Se ha estimado a través de experimentos de simulación que este proceso puede tardar hasta 100 generaciones (figura 2.C). El uso de marcadores, en cambio, permite eliminar el arrastre por ligamiento en sólo dos generaciones de retrocruzas siempre que se disponga de un mapa saturado de esa región genómica y del suficiente número de plantas en cada generación de retrocruzas. En una primera generación de retrocruzas, por ejemplo, se pueden eliminar todos los individuos que presenten alelos del genotipo dador para los marcadores situados a más de 1 cM río arriba del gen. En la segunda generación de retrocruzas se hace lo mismo pero río abajo del gen deseado. De esta manera el arrastre por ligamiento disminuye drásticamente hasta niveles aceptables en tan solo dos generaciones de retrocruzas, tal como se muestra en la figura 2.C. Una vez incorporado el gen con esta metodología, la línea obtenida se utiliza como fuente para los sucesivos proyectos de conversión, de modo tal que el arrastre por ligamiento alrededor de ese gen en particular no constituye un problema adicional en los proyectos posteriores.

Estimaciones de diversidad genética

Las estimaciones de diversidad genética de un programa de mejoramiento son fundamen-

tales para planificar los cruzamientos entre parentales. Así, la diversidad dentro del programa puede incrementarse si se planifican cruza entre individuos que exhiban escaso parecido genético. La genealogía de los individuos o su parecido fenotípico son de escaso valor para determinar si dos individuos están o no estrechamente relacionados genéticamente. Las estimas de similitudes genéticas basadas en marcadores, en cambio, proveen un indicador bastante ajustado de las similitudes o distancias genéticas reales. Se puede cuantificar la diversidad global que presentan los genotipos en estudio a partir de las huellas dactilares ("fingerprinting") de ADN de los individuos a analizar, las cuales incluyen un gran número de marcadores. Mediante los algoritmos de Índice de Contenido de Polimorfismo (PIC) ($PIC = 1 - \sum p_i^2$) se puede determinar cuáles son los marcadores más discriminantes de los individuos en estudio. Así, un PIC igual a 0 indica que el marcador en cuestión es monomórfico y un PIC alto (por ejemplo, mayor a 0,7) indica que el marcador en cuestión es altamente polimórfico y que tal polimorfismo está distribuido uniformemente entre los individuos estudiados. El valor promedio de PIC para todos los marcadores analizados permite realizar estimaciones de Diversidad Genética (D) ($D = 1 - \sum \sum p_{ij}^2$). Mediante la comparación de sucesivos valores de D, es posible determinar si la diversidad ha cambiado a través del tiempo, o si se ha modificado por la introducción al cultivo de nuevo germoplasma. La utilización de un gran número de marcadores adecuadamente dispersos en el genoma permite construir Matrices Básicas de Datos (MBD). Mediante programas estadísticos apropiados se calculan a partir de ellas relaciones tales como la de similitud genética entre genotipos. Esta relación puede obtenerse usando el "Simple Matching Coefficient" (SMC) ($SMC = m/(m+n)$), el cual se define como el número de alelos de marcadores que dos genotipos tienen en común (m) sobre el número total de alelos analizados (m+n). De este modo, se pueden generar matrices de similitud genética entre genotipos sobre las que, mediante programas de análisis multivariado, se construyen dendrogramas que comparan gráficamente las relaciones genéticas entre los

individuos. Ello permite agrupar a aquellos que exhiben mayor similitud genética en conjuntos coherentes.

En la figura 4.A se comparan las estimaciones de similitud genética entre individuos basadas en el uso marcadores moleculares con aquellas derivadas de información fenotípica. La gráfica muestra la relación entre la distancia morfológica (abscisas) y la distancia molecular (ordenadas) para 50 líneas de sorgo granífero (*Sorghum bicolor*). Puede apreciarse que se obtiene un diagrama típico de dispersión triangular: si dos individuos están muy relacionados a nivel de marcadores es muy probable que también lo estén a nivel morfológico. Por el contrario, una gran distancia molecular entre dos individuos no permite realizar ninguna inferencia acerca de su parecido morfológico

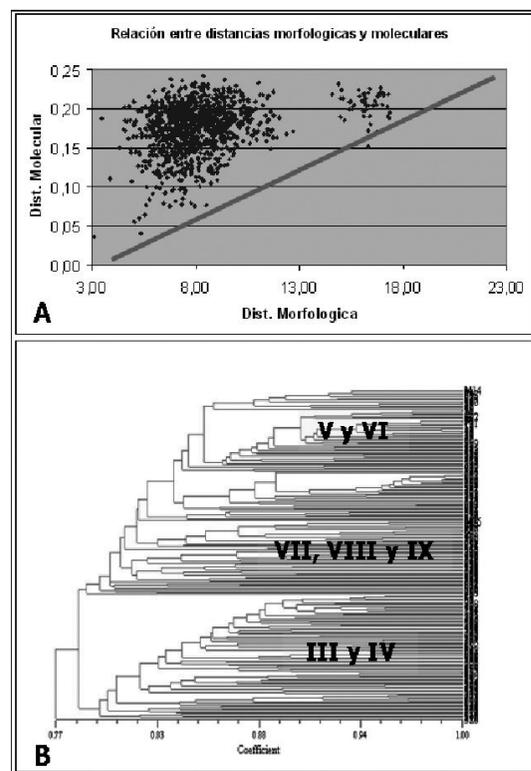


Figura 4. Estimaciones de diversidad genética mediante el uso de marcadores moleculares. (A) Relación entre las distancias evaluadas sobre la base de información morfológica y molecular para 50 líneas de sorgo granífero. (B) Análisis de agrupamiento para 214 variedades argentinas de soja utilizando marcadores microsatélites.

(éste puede ser muy alto o muy bajo). Esta relación puede explicarse por el determinismo generalmente poligénico de los caracteres que se utilizan en la estimación de las distancias morfológicas, que puede conducir a fenómenos de convergencia. Por ejemplo, si se considera que un carácter está controlado por 4 *loci* bialélicos con efectos iguales y se denotan respectivamente + y - los alelos favorables y los desfavorables, las líneas portadoras de las combinaciones de alelos ++-- y --++ presentarán el mismo fenotipo pero diferirán para los 4 *loci* considerados. En síntesis, lo anterior indica que el parecido morfológico entre materiales genéticos tiene escaso valor para realizar un manejo eficiente de la diversidad genética de un cultivo.

El análisis de agrupamiento que se muestra en la figura 4.B se realizó evaluando 214 genotipos de soja representativos del germoplasma disponible en Argentina analizados a través de 30 *loci* de microsatélites seleccionados por su capacidad discriminante. Luego de calcularse la similitud entre los genotipos, se realizó el análisis de agrupamiento cuyo dendrograma se muestra en la figura. Pueden definirse tres grandes grupos, los cuales están asociados a los grupos de madurez al que pertenecen los cultivares. De esta forma, los cultivares de los grupos de madurez V y VI están más asociadas entre sí que con los individuos de los grupos de madurez III y IV. Esto indica que los diferentes grupos de madurez tienen ancestros diferentes y refleja una práctica común en el mejoramiento de la soja consistente en cruzar cultivares del mismo grupo de madurez al desarrollar nuevas variedades. La conclusión de este tipo de análisis es que para incrementar la diversidad genética y, por ende, el progreso genético en soja, se deberían realizar cruces entre genotipos pertenecientes a distintos grupos de madurez.

Estos son sólo algunos ejemplos de los estudios de variabilidad que se pueden realizar para monitorear la diversidad genética de un cultivo y el impacto que, sobre la misma, pueden tener diferentes estrategias de mejoramiento.

Diseño de genotipos y de germoplasma

Se denomina “diseño de genotipos o de

germoplasma” a la utilización de todas las herramientas previamente descritas para la obtención de cultivares o germoplasma de alto potencial de rendimiento (creados por selección convencional en ambientes agronómicos de alta oferta potencial con respecto a agua, nutrientes, fungicidas e insecticidas) a los que se le introducen caracteres por selección asistida y conversiones que incrementan su estabilidad (resistencia a enfermedades o a estrés ambiental), calidad del producto final y/o rango de adaptación (como por ejemplo, obtención de cultivares de ciclo más corto o más largo dependiendo de la estación de crecimiento).

El diseño de germoplasma comprende el uso de genotipos dadores que presentan caracteres de interés (resistencias o mejor calidad) pero que, en general, son agronómicamente muy deficientes (representada en color negro en la figura 3.C). Estos dadores se utilizan para introgresar tales caracteres en líneas elite de alto potencial de rendimiento que no los poseen (representadas con diferentes tonos de grises en la gráfica para señalar sus diferencias genéticas). Por otra parte, las líneas elite, se eligen de modo tal que exhiban entre ellas escaso parecido genético. A medida que el proceso de conversión de cada línea avanza (o sea, se minimiza la contribución genética del dador como se aprecia en la gráfica desde F1 hacia BC2), se comienzan a cruzar entre sí a las líneas elite en proceso de conversión de modo de obtener recombinantes entre los materiales elite y que lleven el gen de interés (representadas en la gráfica como individuos que presentan combinaciones de colores de diferentes líneas y la región del genoma que lleva el gen de interés de la línea dadora). De esta forma, si bien las conversiones continúan de modo tal de obtener cultivares aptos para el mercado, se genera al mismo tiempo germoplasma de alto rendimiento con los genes aportados por la línea dadora. Ese germoplasma ingresa al programa de mejora convencional para continuar el proceso de mejoramiento del rendimiento por selección.

Por todo lo expuesto anteriormente, el mejoramiento genético en la actualidad debe ser el resultado de la estrecha colaboración y del sinergismo entre los programas de mejora

convencional y molecular. Como se ha mostrado previamente, los ciclos de evaluación, selección y recombinación del mejoramiento convencional continúan siendo el corazón del proceso, pero ahora cuentan con el aporte de la tecnología de marcadores moleculares a través de la selección asistida y del análisis de la diversidad del germoplasma (figura 5). Tales aportes contribuyen a una mejora significativa del progreso genético por selección a través del mantenimiento e incremento de la diversidad y de la reducción de la interacción genotipo x ambiente. Por otro lado, la base genética puede actualmente enriquecerse en forma continua con nuevos genotipos y con nuevos caracteres por medio de las conversiones asistidas por marcadores.

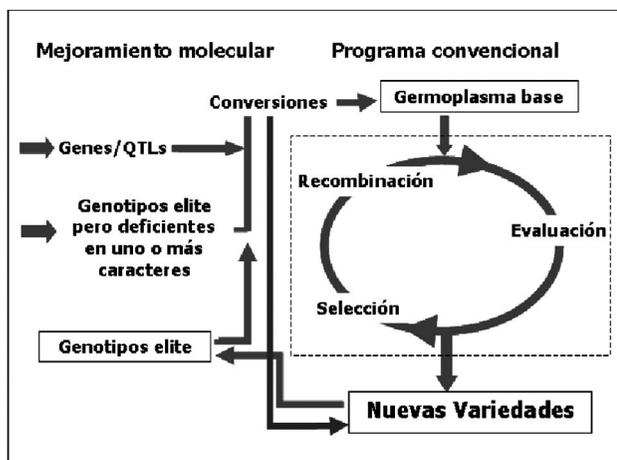


Figura 5. Interacción entre el mejoramiento convencional y el mejoramiento molecular. En el recuadro se esquematiza la naturaleza cíclica del mejoramiento convencional y, por fuera del mismo, los aportes proporcionados por el mejoramiento molecular.

Lecturas recomendadas

- Awise JC. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Beckmann J.S. and Soller M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 3, 196-250.
- Bernardo R., Moreau L. and Charcosset A. 2006. Number and fitness of selected individuals in marker-assisted and phenotypic recurrent selection. *Crop Sci.*, 46, 1972-1980.
- Charcosset A. and Gallais A. 1998. Intérêt des marqueurs en sélection. In: *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. de Vienne D. (ed.) INRA.
- Dubcovsky J. 2004. Marker-assisted selection in public breeding programs: The wheat experience. *Crop Sci.*, 44, 1895-1898.
- Echarte M., Bulos M., Rossi R., Ferrari B., Sala G. and Sala C. 2004. Pattern of molecular genetic diversity in Argentine soybean germplasm. VII World Soybean Res. Conf., Foz do Iguassu, Brasil, pp 126.
- Fehr, W. 1987. Principles of Cultivar Development. Theory and Technique. McGraw-Hill.
- Frisch M. and Melchinger A.E. 2001. Marker-assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. *Crop Sci.*, 41, 1716-1725.
- Frisch M. and Melchinger A.E. 2005. Selection theory for marker-assisted backcrossing. *Genetics*, 170, 909-917.
- Gimelfarb A. and Lande R. 1994. Simulation of marker-assisted selection for non-additive traits. *Genet. Res.*, 64, 127-136.
- Gimelfarb A. and Lande R. 1994. Simulation of marker-assisted selection in hybrid populations. *Genet. Res.*, 63, 39-47.
- Gimelfarb A. and Lande R. 1995. Marker-assisted selection and marker-QTL associations in hybrid populations. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 522-528.
- Guimarães E.P., Ruane J., Scherf B.D., Sonnino A. and Dargie J.D. 2007. Marker-assisted selection, current status, and future perspectives in crops, livestock, forestry, and fish. FAO, Rome.
- Harlan H.V. and Pope M.N. 1922. The use and value of backcrosses in small grain breeding. *J. Hered.*, 13, 319-322.
- Hospital F. 2002. Marker-assisted backcross breeding: A case study in genotype building theory. pp 135-141. In: M.S. Kang (ed.) *Quantitative gene-*

- tics, genomics, and plant breeding. CABI Publishing.
- Hospital F. and Charcosset A. 1997. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics*, 147, 1469-1485.
- Hospital F., Goldringer I. and Openshaw S. 2000. Efficient marker-based recurrent selection for multiple quantitative trait loci. *Genet. Res.*, 75, 1181-1189.
- Koebner R.M. 2004. Marker assisted selection in the cereals: The dream and the reality. pp 317-329. In: P.K. Gupta and R.K. Varshney (ed.) *Cereal genomics*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Koornneef M. and Stam P. 2001. Changing paradigms in plant breeding. *Plant Physiol.* 125:156-159.
- Kumlay A.M., Baenziger P.S., Gill K.S., Shelton D.R., Graybosch R.A., Lukaszewski A.J. and Wesenberg D.M. 2003. Understanding the Effect of Rye Chromatin in Bread Wheat. *Crop Sci.* 43: 1643-1651.
- Lande R. and Thompson R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 124, 743-756.
- Paterson A.H., Tanksley S. and Sorrells M. 1991. DNA markers in plant improvement. *Advances in Agronomy*, 44, 19-89.
- Prins R., Marais G.F., Pretorius Z.A., Janse B.J.H., Marais A.S. 1997. A study of modified forms of the *Lr19* translocation of common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 424-430.
- Ribaut J.M. and Hoisington D. 1998. Marker-assisted selection: New tools and strategies. *Trends Plant Sci.*, 3, 236-239.
- Sala C., Bulos M. and Echarte M. 2005. "Agrobiotecnología. Curso de grado para estudiantes de biología y agronomía". Mentaberry A. (ed) Universidad de Naciones Unidas, Programa Biolac.
- Servin B., Martin O.C., Mézard M. and Hospital F. 2004. Toward a theory of marker-assisted gene pyramiding. *Genetics*, 168, 513-523.
- Simmonds N.W. *Principles of Crop Improvement*. 1979. Longman, UK.
- Tanksley S.D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1, 3-8.
- Tanksley, S.D. and Rick, C.M. 1980. Isozyme gene linkage map of tomato: Applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 57, 161-170.
- Whittaker J.C., Halley C.S. and Thompson R. 1997. Optimal weighting of information in marker-assisted selection. *Genet. Res.*, 69, 137-144.
- Xu Y. 2002. Global view of QTL: Rice as a model. pp 109-134. In: M.S. Kang (ed.) *Quantitative genetics, genomics, and plant breeding*. CABI Publishing.
- Xu Y. 2003. Developing marker-assisted selection strategies for breeding hybrid rice. *Plant Breed. Rev.*, 23, 73-174.
- Xu Y., McCouch S.R. and Zhang Q. 2005. How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? *Plant Mol. Biol.*, 59, 7-26.
- Yazdi M.H., Sonesson A.K., Woolliams J.A. and Meuwissen T.H. 2008 Combined detection and introgression of quantitative trait loci underlying desirable traits. *J. Anim. Sci.*, 86, 1089-1095.
- Young N.D. and Tanksley S.D. 1989. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, 77, 95-101.
- Zhang W. and Smith C. 1992. Computer simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 813-820.
- Zhang W. and Smith C. 1993. Simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium: The effects of several additional factors. *Theor. Appl. Genet.*, 86, 492-496.

III. CAPÍTULO 4

Identificación y registro de variedades

Ana Laura Vicario, Marcelo Labarta y
María Alicia Loray

El registro de variedades en la República Argentina

Introducción

En la República Argentina, la legislación en materia de semillas y creaciones fitogenéticas es la establecida por la Ley N° 20.247 (1973), su Decreto Reglamentario N° 2183 (1991) y la Ley N° 24376, de aprobación del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (1994). El organismo encargado de aplicar esta legislación es el Instituto Nacional de Semillas (INASE).

En lo referido a variedades vegetales, esta legislación, las define como *“el conjunto de plantas de un solo taxón botánico del rango más bajo conocido que pueda definirse por la expresión de los caracteres resultantes de un cierto genotipo o de una cierta combinación de genotipos y pueda distinguirse de cualquier otro conjunto de plantas por la expresión de uno de esos caracteres por lo menos”*. Asimismo, se define el término obtentor, como *“la persona que crea o descubre y desarrolla una variedad”*. Por otra parte, se define el término creación fitogenética como *“toda variedad o cultivar, cualquiera sea su naturaleza genética, obtenido por aplicación de conocimientos científicos al mejoramiento heredable de las plantas”* (Decreto N° 2183/1991 – Reglamentario de la Ley N° 20.247, de semillas y creaciones fitogenéticas).

Estos términos y definiciones, nos permiten reconocer claramente a dos partes integrantes de un sistema de propiedad intelectual que se conoce internacionalmente como Derecho de obtentor, siendo la variedad vegetal el objeto de ese derecho y el obtentor el sujeto del mismo. Se trata de un sistema de propiedad intelectual independiente, conocido como *“sistema sui-generis”*, ya que ha sido específicamente

diseñado para el objeto de protección al que se aplica: las variedades vegetales.

Es sabido que al tratarse de sistemas biológicos, las variedades vegetales presentan características particulares (ya sea en cuanto a fisiología, propagación, etc.) que no podrían ser equiparadas a las que presentan otros objetos de derecho. De allí la necesidad de contar con un sistema de propiedad específico y acorde a las necesidades de los obtentores y usuarios.

Este sistema no es nuevo. Deriva de la Convención de París en materia de propiedad intelectual y su Acta específica es la de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) que data del año 1961/72. La UPOV es la organización internacional intergubernamental, de donde emanan las directrices tanto técnicas como jurídicas en materia de derecho de obtentor. Los miembros de esta Unión, son los Estados y/u organizaciones intergubernamentales (como por ejemplo la Unión Europea) y cuenta con una organización específica que es la Oficina de la UPOV con sede en Ginebra, Suiza, integrada por un Secretario General, un Vice-Secretario General, su cuerpo técnico y su personal administrativo.

La República Argentina actualizó en el año 1991 su legislación en materia de derecho de obtentor mediante el Decreto Reglamentario N° 2183 (se la conoce como Acta de 1978 de la UPOV). De esta forma pudo acceder a ser miembro de la UPOV en el año 1994. Vale hacer esta aclaración ya que luego, fue adoptada y puesta en vigencia una tercera versión del Acta de UPOV que es la que se conoce como Acta de 1991, a la que Argentina aún no adhirió.

Independientemente de esto, de los 64 miembros parte de UPOV a diciembre de 2007, 24 son parte del Acta 1978 -incluido Argentina-; 1 es parte del Acta de 1961/72 y 39 miembros son parte del Acta de 1991. Todas estas Actas cuentan con principios básicos que son comunes y nuevas regulaciones que se han incorporado como consecuencia de los avances técnicos y tecnológicos en la obtención de variedades vegetales (Miembros de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales – Status al 18 de junio de 2007 – UPOV).

Desde su adhesión al Convenio de UPOV – Acta de 1978, la República Argentina participa

activamente en los diferentes órganos de decisión de la UPOV: Consejo; Comité Consultivo; Comité Administrativo y Jurídico y Comité Técnico, como así también en los diferentes cuerpos técnicos específicos y grupos de trabajo.

Registro de variedades

La Ley N° 20.247, creó dos Registros Nacionales referidos a variedades vegetales, el primero es el Registro Nacional de Cultivares (RNC) y el segundo es el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares (RNPC).

El RNC es de carácter obligatorio para todo cultivar que se identifica por vez primera y se va a exponer al público o entregar a usuarios a cualquier título con un rótulo identificatorio. Este Registro Nacional no da ningún derecho de propiedad sobre el cultivar en cuestión, pero habilita a la comercialización del mismo.

El RNPC es optativo. Es el Registro Nacional por el que se inscribe una variedad concediéndole un Título de Propiedad a su obtentor. Por si sólo no habilita a que una variedad pueda comercializarse, pero reconoce el derecho que su obtentor posee sobre la misma.

Consecuentemente, si una persona desea poder comercializar su variedad y, a la vez, tenerla protegida mediante el sistema de derecho de obtentor, en ese caso deberá realizar el trámite de inscripción en ambos Registros Nacionales. Esto no significa un trámite por duplicado, sino que la misma solicitud de inscripción, prevé la opción de inscripción en ambos Registros.

Examen técnico

Todo cultivar que se registra, es objeto de un examen, tanto de los aspectos formales (examen de forma) como de los técnicos específicamente (examen técnico o DHE).

La solicitud de inscripción de una variedad vegetal, cuenta con diferentes Anexos, entre los que podemos destacar el de la Descripción (aspectos morfológicos, fisiológicos, fenológicos, de comportamiento sanitario y de características industriales) que va a permitir, mediante la combinación de la expresión de los diferentes caracteres que la integran, la identificación de esa variedad. Otros Anexos técnicos de importancia son el del origen genético y

la historia del mejoramiento de la variedad; el del procedimiento para el mantenimiento de la pureza varietal y el que solicita la información correspondiente a la expresión OGM (organismo genéticamente modificado) de la variedad y su evento incorporado, en el caso en que corresponda (INASE – Formularios generales para inscripción de cultivares – 2006).

Vamos a referirnos específicamente al examen técnico de la solicitud, ya que tanto para la inscripción en el RNC como para RNPC, es condición que todo cultivar sea sometido a este examen.

El examen técnico es conocido internacionalmente como examen DHE (o DUS por sus siglas en inglés) y se refiere a determinar las condiciones de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad del cultivar cuya protección se pretende.

Estas condiciones provienen de los requisitos internacionales para conceder un derecho de obtentor, que exigen que la variedad cumpla con los siguientes:

Novedad: en sentido comercial.

Distinción: que permita distinguirla claramente por medio de una o más características de otra variedad cuya existencia sea materia de conocimiento general al momento de completar la solicitud.

Homogeneidad: que sujeta a las variaciones previsibles originadas en los mecanismos particulares de su propagación, mantenga sus características hereditarias más relevantes en forma suficientemente uniforme.

Estabilidad: que sus características hereditarias más relevantes permanezcan conforme a su definición luego de propagaciones sucesivas o, en el caso de un ciclo particular de propagación, al final de cada uno de dichos ciclos.

Además, la variedad debe contar con una denominación genérica que permita su identificación sin inducir a error o confusión respecto de la identidad de otras variedades u obtentores, ni sobre las características que esta posee, entre otras condiciones (Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales UPOV – Actas de 1978 y 1991).

En concreto, las diferentes “Oficinas de Protección” se ocupan de determinar los aspectos referidos a la novedad, la denominación y efec-

tuar el examen DHE. Para esto último, existen diferentes posibilidades y alternativas para los Estados a fin de poder llevar adelante el examen técnico DHE.

Una opción es la que se conoce como examen oficial, en el que es la misma oficina la que se encarga de conducir el ensayo a campo (colección de variedades), agrupar a la variedad inédita con las más parecidas en virtud de los caracteres de agrupamiento que el obtentor informa, tomar las observaciones y expresiones de cada carácter siguiendo la guía técnica correspondiente, determinando su distinción y producir la descripción oficial del cultivar. Para esta opción, es necesario contar con recursos económicos y humanos, estaciones de evaluación en diferentes localidades, personal de campo, etc. La mayoría de los países europeos utilizan esta forma de examen técnico.

Otra opción es la reconocida como examen realizado por terceras partes, en el que personal acreditado por la oficina o el mismo obtentor, es el encargado de llevar adelante los ensayos de campo, tomar los datos, comparar las variedades similares, presentar una descripción completa del cultivar (morfológica, fisiológica, fenológica, de comportamiento sanitario y de cualidades industriales si corresponde), con las verificaciones efectuadas por el personal técnico de la oficina para su control. En este caso la oficina ya no necesita contar con recursos económicos tan elevados como en el caso anterior, ni con sitios de realización de ensayo ni personal de campo. Un cuerpo de técnicos especializados en los diferentes grupos de especies, puede efectuar los controles necesarios a fin de verificar el cumplimiento de las condiciones de protección. Los países latinoamericanos y centroamericanos miembros de UPOV, utilizamos esta forma de examen técnico, al igual que Canadá, Estados Unidos de América y Australia, entre otros.

Examen técnico en Argentina

En el caso nacional, el solicitante u obtentor, debe presentar debidamente completos los formularios de solicitud de inscripción y sus Anexos a la Dirección de Registro de Variedades del INASE. Esta Dirección es el Área técnica responsable de conducir el RNC y RNPC,

y está organizada mediante grupos de especies con un profesional técnico responsable de cada uno: cereales, oleaginosas, forrajeras, industriales, hortícolas, frutales, forestales, ornamentales.

1. Cada técnico evalúa la solicitud en sus aspectos de forma y de fondo, la denominación propuesta para el cultivar y, las características diferenciales del mismo en comparación con las descripciones de todos los cultivares de la misma especie, ya registrados o en trámite de registro. Esta primera comparación de caracteres se efectúa mediante un programa que permite la comparación entre las diferentes expresiones de los caracteres que forman parte de un descriptor.
2. Estos caracteres, pueden ser más o menos influenciados de acuerdo con las condiciones del medio en el que se está efectuando la descripción. Así, existen caracteres de tipo cualitativo que son los menos influenciados por condiciones externas y, consecuentemente, más deseables para poder efectuar la comparación. Los otros caracteres, denominados cuantitativos pueden variar o varían en virtud del ambiente (por ejemplo, altura de planta; largo de hoja, etc.).
3. Consecuentemente, luego de efectuada la comparación primera, el técnico examinador debe analizar el resultado y, de ser necesario, verifica a campo los caracteres y sus expresiones diferenciales o incluso, está facultado para efectuar ensayos oficiales.
4. Estos últimos, son efectuados por los técnicos de la Dirección de Registro de Variedades en los casos en que poder establecer la distinción se haya convertido en un estudio no del todo sencillo, como es el caso de la soja, para la que desde el año 1994, el INASE conduce sus propios ensayos por medio de la Dirección de Registro de Variedades, cuyos resultados luego son comparados con los declarados por el obtentor.

Estos ensayos y verificaciones a campo, también son efectuados para otras especies con el fin de poder corroborar las declaraciones

de los obtentores y realizar el seguimiento del mantenimiento de la pureza varietal a lo largo de los años.

En cuanto a los descriptores varietales, existe uno por especie y todos ellos incluyen los caracteres utilizados a nivel internacional para efectuar los exámenes DHE. Estas directrices técnicas de la UPOV, son efectuadas por los expertos de los diferentes miembros que participan de los grupos técnicos específicos. En las mismas, se explica claramente la forma de ejecución del examen, la toma de observaciones y datos y las expresiones de cada carácter en base a las observaciones efectuadas. Todos los descriptores están integrados por caracteres que son, como ya dijimos, de tipo morfológico, fisiológico, fenológico, de comportamiento a enfermedades y que, en determinadas especies, incluyen a los referidos a calidad industrial.

Cada variedad, cuenta con su descriptor, que no es ni más ni menos que la combinación de las expresiones de cada carácter que lo integra. Esa combinación de caracteres nos da la expresión de la identidad varietal. Hace que esa variedad sea esa y no otra. Nos permite identificarla mediante estos caracteres contenidos en el descriptor y la combinación de sus expresiones.

Cuando el técnico que realiza el examen DHE compara la descripción de variedad inédita contra todas las anteriormente registradas o en trámite de registro, lo que está haciendo es comparar identidades morfológicas, fisiológicas, fenológicas, etc. para poder establecer el cumplimiento de una condición previamente establecida: la diferenciación (TG/1/3 – Introducción General a las Directrices de examen – UPOV 2005/06).

En este sentido y, hasta la fecha, la UPOV ha recomendado que los exámenes DHE se efectúen mediante la utilización de caracteres de tipo morfológico, hasta tanto se pueda establecer la técnica y qué tipo de marcadores moleculares podrían ser utilizados a efectos de la diferenciación. Para ello, y en el seno de la UPOV, se encuentran trabajando el grupo de técnicas biomoleculares (BMT) y subgrupos de trabajo específico para diferentes especies, a fin de poder establecer estas premisas. La UPOV sí se ha manifestado respecto del uso de técnicas

moleculares para determinar la identidad. En este sentido se ha recomendado la posibilidad de uso de estas metodologías.

En el caso de la República Argentina, el examen DHE como vimos anteriormente, se efectúa mediante “marcadores morfológicos” es decir, caracteres morfológicos, fenológicos, fisiológicos, etc. Aún no se utilizan técnicas moleculares a efectos de establecer la diferenciación entre cultivares. Pero sí, aceptamos que como información complementaria a la descripción, el obtentor presente el patrón molecular de su inédito, indicando la metodología técnica y los marcadores utilizados. Así y ante un eventual conflicto, el obtentor ya cuenta con esta información molecular en el INASE y podría utilizarla a efectos de la identificación de su cultivar llegado el caso.

En sesiones recientes de la UPOV de los Cuerpos de decisión, se ha considerado el tema referido a la utilización de las técnicas moleculares para otros fines, además del de la identificación, como por ejemplo en la determinación de variedades esencialmente derivadas.

Por supuesto que las recomendaciones de la UPOV son guías técnicas que cada miembro puede tomar e incorporar en su país, no siendo obligatorias per-se, pero es sumamente importante que en ese ámbito se esté discutiendo en los cuerpos técnicos correspondientes, la utilidad de las técnicas moleculares con miras a que el sistema de derecho de obtentor cuente con otra herramienta que colabore en su implementación y ejercicio.

Por último, la Federación Internacional de Semillas (FIS) que nuclea a los obtentores (participan dos organizaciones argentinas), considera que hasta tanto no se puedan definir distancias mínimas para la distinción, el impacto que esas técnicas tendrán en los requisitos de uniformidad y estabilidad y, la disponibilidad de marcadores públicos, no es posible que puedan ser utilizados para el examen DHE por sí solos. Pero la FIS considera que sí pueden ser utilizados en la identificación de una variedad protegida y/o en la determinación de una variedad esencialmente derivada (Federación Internacional de Semillas – Documentos de posición sobre propiedad intelectual - 2006).

La noción de variedad esencialmente derivada, aparece en el artículo 14.5. del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales – UPOV Acta de 1991.

En ese sentido *“Se considerará que una variedad es esencialmente derivada de otra variedad – la variedad inicial – si i) se deriva principalmente de la variedad inicial, o de una variedad que a su vez se deriva principalmente de la variedad inicial, conservando al mismo tiempo las expresiones de los caracteres esenciales que resulten del genotipo o de la combinación de genotipos de la variedad inicial; ii). se distingue claramente de la variedad inicial, y iii) salvo por lo que respecta a las diferencias resultantes de la derivación, es conforme a la variedad inicial en la expresión de los caracteres esenciales que resulten del genotipo o de la combinación de genotipos de la variedad inicial”*. Por otra parte, pero en ese mismo sentido, el Convenio agrega que: *“Las variedades esencialmente derivadas podrán obtenerse, por ejemplo, por selección de un mutante natural o inducido o de un variante somaclonal, selección de un individuo variante entre las plantas de la variedad inicial, retrocruzamientos o transformaciones por ingeniería genética”* (Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales – Acta 1991).

Esta noción pretende introducir una mejor relación de derechos entre obtentores y titulares de derecho. El Convenio, tal como está, contiene en todas sus versiones vigentes, una excepción al derecho del obtentor, reconocida como *“excepción del fitomejorador”* o *“breeder's exemption”*. Por esta excepción al derecho, un fitomejorador puede tomar como fuente de variación inicial el material de propagación de una variedad que se encuentra con titularidad vigente (inscripta en el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares en el caso de la República Argentina) y sin solicitar autorización al titular de ese derecho vigente (el obtentor) utilizar ese material de propagación de esa variedad protegida como fuente de variación a partir de la que podrá obtener una nueva variedad, siempre y cuando no deba utilizar en cada nuevo ciclo de producción de su nueva variedad, al material de propagación de la variedad protegida.

Si pensamos, por ejemplo en variedades obtenidas por recombinación de ADN, se podría suscitar una relación de desequilibrio en cuanto a los derechos de obtentores y titulares de otros derechos. Así, el obtentor de una variedad protegida, queda exceptuado de su derecho ante la utilización de su variedad como fuente de variación inicial para otra mejora. En cambio, el titular de un derecho de, por ejemplo, patente sobre un gen modificado, producto o procedimiento determinado, podrá ejercer su derecho ante la utilización de un tercero.

Sin duda, el desbalance entre derechos y titulares es notable. Por esta razón, el Acta de 1991 de la UPOV introduce la noción de variedad esencialmente derivada por el que: *“En la práctica, el nuevo sistema ha creado un marco dentro del cual, las partes interesadas pueden negociar:*

a) aquel que desea emprender una selección “mejorante” (con inclusión de un trabajo de transformación mediante ingeniería genética) sobre una variedad protegida, concertará un acuerdo con el obtentor de esta variedad antes de comenzar sus trabajos (esos acuerdos ya se han concertado entre empresas de ingeniería genética y obtentores “tradicionales”);

b) cuando un trabajo de selección resulte de forma imprevista en la creación de una variedad esencialmente derivada, los dos obtentores se entenderán sobre la explotación de esta última si constituye un verdadero mejoramiento; el precio que ha de pagar el usuario no será una regalía doble, sino una suma determinada por las leyes del mercado (por la competencia). Si no hay mejoramiento, o bien el obtentor de la variedad esencialmente derivada decidirá que no la va a explotar, o bien el obtentor de la variedad inicial ejercerá su derecho para negar al segundo obtentor el derecho a explotar la variedad; c) los obtentores de variedades resultantes de una selección “innovante” y los inventores de productos o de procedimientos que dan lugar a variedades esencialmente derivadas tienen derechos de valor sensiblemente equivalente y, por consiguiente, se ven obligados a concertar acuerdos equilibrados” (Ley tipo sobre la protección de las obtenciones vegetales – UPOV – 1996).

“La noción de variedad esencialmente derivada hace intervenir el grado de semejanza

entre una de las variedades parentales (la variedad inicial) y la variedad derivada. Para que exista derivación esencial, este grado de semejanza debe ser muy grande y el número de caracteres heredados del segundo genitor (si lo hay) debe ser muy pequeño; en última instancia, se modifica un sólo carácter” (Ley tipo sobre la protección de las obtenciones vegetales – UPOV – 1996).

Para las oficinas de protección de variedades, la situación es clara: si una variedad es nueva, diferente, homogénea, estable, cuenta con una adecuada denominación y ha cumplido con las formalidades administrativas, esa Oficina no tiene motivo para no otorgar el título de obtentor o de propiedad de variedades vegetales.

Al momento en que el obtentor de la variedad esencialmente derivada, pretenda realizar alguno de los actos a los que se extiende el derecho del obtentor de la variedad inicial sobre ésta, es en ese caso en que deberá solicitar permiso para ello al obtentor de esa variedad inicial.

“Todas las partes interesadas se han puesto de acuerdo en que las relaciones de dependencia deberán ser administradas por los propios obtentores, sin que intervengan las autoridades encargadas de administrar el sistema de protección de las obtenciones vegetales. Las grandes organizaciones nacionales e internacionales de obtentores, están elaborando ya recomendaciones sobre las condiciones prácticas en las que una variedad será considerada como esencialmente derivada” (Ley tipo sobre la protección de las obtenciones vegetales – UPOV – 1996).

Marcadores moleculares y la UPOV

Antecedentes

A la luz de los avances en biología molecular y en las técnicas de mejoramiento, la UPOV decidió que era necesario incorporar un nuevo grupo que pudiera estudiar la aplicación de los marcadores moleculares en los estudios DHE. En el año 1993 se llevó a cabo la primera reunión del Grupo de Trabajo en Técnicas Bioquímicas y Moleculares y de perfiles de ADN en particular, conocido como Grupo BMT.

El BMT es un grupo de expertos en el examen DHE, especialistas en técnicas bioquímicas y moleculares, y obtentores cuya función actual consiste en:

1. Examinar la evolución general de las técnicas bioquímicas y moleculares.
2. Informar acerca de las aplicaciones pertinentes de las técnicas bioquímicas y moleculares al fitomejoramiento.
3. Estudiar la posible aplicación de las técnicas bioquímicas y moleculares al examen DHE e informar sobre sus conclusiones al Comité Técnico.
4. Si procede, elaborar directrices para metodologías bioquímicas y moleculares y su armonización y, en particular, contribuir a la elaboración de un documento referido a “nuevos caracteres”. Estas directrices se elaborarán en colaboración con los Grupos de Trabajo Técnico (o sus siglas en inglés TWP).
5. Examinar las iniciativas de los Grupos de Trabajo Técnico sobre el establecimiento de subgrupos sobre cultivo específicos, tomando en consideración la información disponible y la necesidad de métodos bioquímicos y moleculares.
6. Elaborar directrices en relación con la gestión y la armonización de bases de datos sobre información bioquímica y molecular, en colaboración con el Grupo de Trabajo en Computación (TWC).
7. Recibir informes de los Subgrupos sobre Cultivos y del Grupo de Consulta del BMT.
8. Constituir un foro para debatir la utilización de técnicas bioquímicas y moleculares en el examen de las variedades esencialmente derivadas y la identificación de las variedades.

(UPOV TC/38/16, 2002)

En la 6ta. Reunión del BMT, llevada a cabo en Angers, Francia en marzo de 2000, el Grupo BMT consideró que existían (y existen aún) una serie de problemas de tipo legal y político referidos al uso de estas técnicas, que deberían ser discutidos en el ámbito de un grupo específico. En octubre del mismo año el CAJ aceptó la formación de dicho grupo, y en 2001

se acordó el mandato de lo que se denominó Subgrupo Especial de Expertos Técnicos y Jurídicos sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares o también conocido como Grupo de Consulta del BMT, y que contiene los puntos que se describen a continuación.

1. El Grupo de Consulta del BMT deberá evaluar los posibles modelos de aplicación propuestos por el Comité Técnico, sobre la base de los trabajos realizados por el BMT y los subgrupos sobre cultivos, para la utilización de las técnicas bioquímicas y moleculares en el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad en relación con:
 - a). la conformidad con el Convenio de la UPOV.
 - b). las posibles repercusiones en la eficacia de la protección, comparada con la obtenida mediante los métodos actuales del examen, y pronunciarse sobre la eventual disminución de la eficacia de la protección ofrecida mediante el sistema de la UPOV.
2. Al realizar su evaluación, el Grupo de Consulta del BMT podrá remitir cuestiones concretas al Comité Administrativo y Jurídico o al Comité Técnico para proveer de aclaraciones o información complementaria, según se considere apropiado.
3. El Grupo de Consulta del BMT informará al Comité Administrativo y Jurídico sobre su evaluación, tal como consta en el párrafo 1, pero esta evaluación no será vinculante para la postura del Comité Administrativo y Jurídico.

4.
(UPOV TC/38/14 – CAJ/45/5, 2002)

A lo largo de los 15 años de existencia del grupo BMT, se han formado diversos subgrupos de trabajo específicos por cultivo o grupos de cultivos, denominados formalmente Subgrupos de Cultivos. Los que existen actualmente son los siguientes: papa; rosa; caña de azúcar; trigo y cebada; maíz; colza; raigrás; soja; tomate y el grupo horizontal de cultivos de propagación vegetativa.

Estos grupos analizan el tema según las características específicas de cada especie o

grupo de especies, facilitando la discusión y agilizando la toma de decisiones.

Modelos para la posible introducción de técnicas moleculares en los estudios DHE

En el año 2001, durante la 7ma sesión del Grupo BMT, éste consideró de importancia que el Grupo de Consulta del BMT pudiera tomar sus decisiones legales y políticas sobre la base de diversos modelos para el uso de marcadores moleculares en los ensayos DHE, y que además éstos deberían estar definidos por los expertos de los Subgrupos de Cultivos.

Los modelos para el uso de técnicas bioquímicas y moleculares en los estudios DHE aceptados son los siguientes:

1. Las características moleculares como predictivas de características tradicionales. Utilización de caracteres moleculares que se vinculan directamente con los caracteres tradicionales (marcadores genéticos específicos): los marcadores moleculares que se vinculan directamente con los caracteres tradicionales pueden resultar útiles para examinar los caracteres tradicionales que no pueden observarse fácilmente o de manera coherente en el terreno, o requieren disposiciones especiales adicionales (por ejemplo, los caracteres de resistencia a las enfermedades). Deberá demostrarse que existe un vínculo fiable entre el marcador y la expresión del carácter. Por ejemplo el carácter de tolerancia a herbicidas, introducido por modificación genética. Este modelo tiene una serie de supuestos:
 - el ensayo para el marcador debe realizarse sobre el mismo número de plantas individuales, la misma cantidad de años y los mismos criterios que para los ensayos a campo.
 - debe verificarse que realmente el marcador está ligado al gen.
 - si se tienen distintos marcadores para la misma característica, éstos se considerarán como distintos métodos para evaluar esa característica.
 - si se tienen distintos genes que confieren la misma característica, éstos se considerarán como distintos métodos para

evaluar la misma característica.

- si existen distintos marcadores ligados a diferentes elementos regulatorios para el mismo gen, estos marcadores serán considerados como distintos métodos para evaluar la característica.

Sobre estos dos últimos puntos se deja asentado que se podrán hacer consideraciones, en tanto que pueden existir distintos mecanismos de acción de los genes (que otorguen ciertas diferencias) y que algunos elementos regulatorios son comunes a varios genes.

2. Comparación de niveles de umbral para caracteres moleculares con la distancia mínima en caracteres tradicionales para el manejo de colecciones de referencia: la clave consiste en determinar si pares de variedades, que no se consideran distintas utilizando caracteres tradicionales, pueden juzgarse distintas al utilizarse caracteres moleculares, y si dichas decisiones podrían ser aceptables para conservar el valor de la protección. Las propuestas presentadas deberán basarse en una evaluación de la distancia genética en lugar de en un enfoque carácter por carácter y podrán ser utilizadas en la gestión de las colecciones de referencia. Es decir, lo que busca esta opción es llevar menor cantidad de variedades de la colección a campo, de manera de minimizar costos. Lo importante de este sistema es que se debe establecer un nivel de distinción, que se denomina Distinción Plus, en el que la diferencia entre dos variedades sea altamente evidente. Aquellas variedades que resulten no distintas en esta primera evaluación, serán evaluadas en un examen a campo, donde se podrá determinar si realmente son distintas o no a las variedades nuevas que se requiere ensayar. La propuesta de esta opción es la obtención de un umbral de Distinción Plus basado en características moleculares. En esta propuesta, el primer paso es evaluar las características tradicionales y establecer una diferencia

fenotípica entre dos variedades. Luego, se establece la diferencia entre variedades utilizando una distancia molecular. Si la correlación entre ambas distancias es fuerte, se verá algo similar a la figura 1.

En este caso el umbral de Distinción Plus para marcadores moleculares, puede ser extrapolado a partir del umbral basado en características tradicionales. De esta forma, se tomarán las mismas decisiones sin importar cual de los métodos haya sido el utilizado. En los casos reales, las correlaciones no son tan buenas, observándose una nube de puntos mas dispersa (figura 2):

Los métodos no coinciden en el grado de distinción para los pares de variedades que

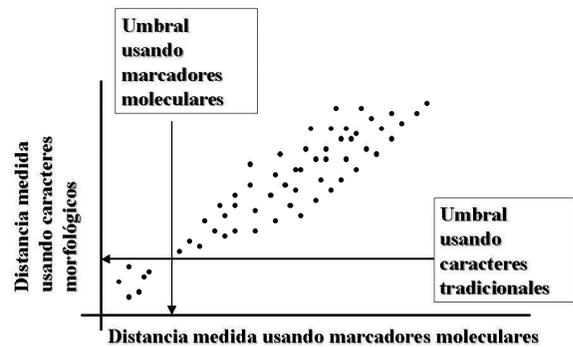


Figura 1. (Adaptado de TC/38/14 – CAJ/45/5, Anexo página 5).

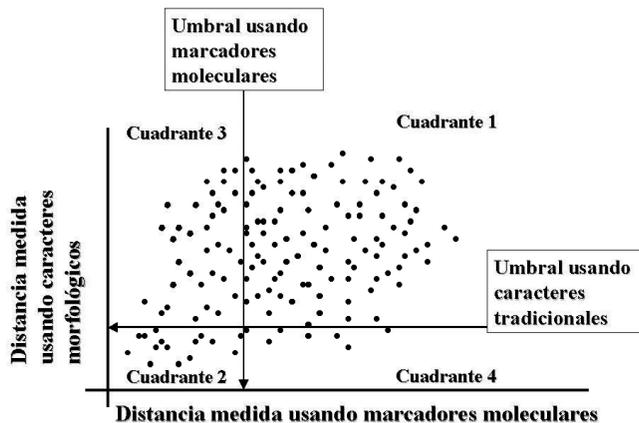


Figura 2. (Adaptado de TC/38/14 – CAJ/45/5, Anexo página 5).

caen dentro de los cuadrantes 3 y 4. Para los pares de variedades que caen dentro de los cuadrantes 1 y 2, las decisiones tomadas no tendrán impacto en la protección. Respecto del cuadrante 3, las decisiones tampoco tendrán impacto en la protección, ya que esos pares de variedades deberán pasar por la evaluación a campo. En el caso del cuadrante 4, los pares de variedades están por debajo del umbral de distinción tradicional (por lo tanto serían similares), pero resultan distintas utilizando características moleculares. Para evitar posibles inconvenientes al poner en práctica este método, ambos sistemas deben ser corridos en paralelo y se deberán determinar umbrales lo suficientemente altos (con marcadores moleculares) de manera de minimizar estos casos. Este sistema ha sido calibrado en Francia para el caso del maíz utilizando caracteres basados en proteínas. Los supuestos de esta opción son los siguientes:

- Se supone que las diferencias calculadas entre variedades utilizando marcadores moleculares, incluyen a las diferencias encontradas dentro de las variedades.
 - Esta opción será utilizada para establecer la Distinción Plus para el manejo de las colecciones de referencia.
 - La metodología utilizada es lo suficientemente robusta y repetible.
3. Creación de un nuevo sistema: esta opción se basa en la utilización de caracteres moleculares del mismo modo en que se utilizan los caracteres no moleculares existentes. Este enfoque significa que las diferencias claramente distinguibles en los caracteres moleculares se considerarían niveles de umbral para evaluar la Distinción. Para esta opción es fundamental analizar las repercusiones que podría tener el nuevo sistema, en el nivel de la protección, en comparación con el sistema actual. Esto se puede llevar a cabo mediante la revisión de las posibles diferencias en las decisiones tomadas utilizando uno u otro sistema. Este nuevo sistema se ha ensayado utilizando fundamentalmente marcadores SSR (Short Sequence Repeat o microsátélites) y más recientemente marcadores SNP (Single

Nucleotide Polymorphism o polimorfismo de nucleótido simple) en rosa y también existen algunos ejemplos en trigo y vid, ninguno de ellos actualmente aceptado por la UPOV. Como ejemplo, a continuación se describe brevemente como sería el ensayo en el caso de rosa. Para esta especie se han preseleccionado 7 marcadores SSR. La prueba se lleva a cabo sobre dos plantas individuales de cada variedad candidata. Si ésta tiene al menos 3 bandas o picos, diferentes respecto de las otras variedades, se la considera distinta, y se podrá luego realizar el ensayo a campo para evaluar la estabilidad y la homogeneidad. En el caso de que no sea distinta, se la evaluará con otros 7 marcadores SSR. Si se encuentran al menos 3 bandas o picos de diferencia, entonces se la considerará distinta y se la evaluará a campo para determinar si es homogénea y estable. Si no se logra la distinción, se considera que es una variedad ya existente o una mutante y se la evaluará a campo tanto para determinar la homogeneidad y la estabilidad como para determinar la distinción, siempre utilizando características no moleculares. El riesgo, en cuanto a mantener el nivel de protección, de esta opción es que puede ocurrir que variedades que no hayan sido consideradas distintas usando las características tradicionales, sean consideradas distintas basándose en esta opción. Si bien la probabilidad de que eso ocurra es baja, la UPOV aún no ha aceptado a este nuevo sistema (UPOV TC/38/14 – CAJ/45/5, 2002).

Otros modelos de uso de las técnicas bioquímicas y moleculares

El grupo BMT tiene dentro de su alcance la posibilidad de discutir temas de identificación de variedades y referidos a las variedades esencialmente derivadas. Además de la posibilidad de usar a los marcadores moleculares para los exámenes DHE, éstos también pueden ser utilizados para la identificación de variedades a fin de dar respuesta a dos temas de gran interés para la UPOV:

- a. Hacer valer el derecho del obtentor.
- b. Evaluar la derivación esencial.

Estos posibles usos de los marcadores de ADN tienen una definición más reciente en el ámbito de la UPOV, discutiéndose las diferentes propuestas técnicas dentro del grupo BMT.

Hacer valer el derecho del obtentor, técnicamente significa que se deberá establecer un sistema tal que se pueda realizar una identificación única de cada variedad de interés (por ejemplo todas las de la colección de referencia de un país, o una región o más ambiciosamente, a nivel mundial). Para esto es necesario contar no sólo con material original (provistos por las empresas criadero o por los organismos oficiales), sino también de marcadores técnicamente validados, en lo posible en el ámbito regional o mundial. Los marcadores a utilizar deberán ser de uso público, así como también las metodologías de análisis y se utilizarán la menor cantidad de marcadores posible tal que se pueda identificar a las variedades que ya tengan título de propiedad, a la vez que haya un margen para que se puedan incorporar nuevas variedades al sistema. Estos sistemas requerirán la construcción de bases de datos compatibles entre países para poder realizar cualquier intercambio de información.

Actualmente, en el ámbito de ISTA (International Seed Testing Association), se están llevando a cabo ensayos de validación de marcadores SSR sobre 4 especies de interés económico mundial.

En el caso de la derivación esencial, se busca determinar si una variedad deriva de otra que ya tiene título de propiedad. Esto actualmente es posible realizarlo llevando a cabo un ensayo a campo que puede durar entre 2 y 3 años. Los marcadores de ADN pueden acortar estos tiempos a unos pocos meses si se cuenta con un sistema adecuado de evaluación de la derivación.

En este caso la propuesta es evaluar gran cantidad de marcadores (no menos de 150 a 200 marcadores) de manera tal de "saturar" el genoma y así determinar el grado en que se distinguen una variedad de la otra. Para eso debe definirse un umbral de distinción, que se establece usando pares de variedades de genealogía conocida o pares de aquellas que han sido pro-

ducidas usando los métodos que pueden llevar a derivación, y calculando la similitud. Su magnitud dependerá de la especie, de la variabilidad genética y del proceso de mejoramiento.

Si al evaluar dos plantas, la similitud de las mismas está por debajo del umbral, se puede decir que las plantas son distintas. Pero si la similitud supera al umbral, estaremos en una zona de "posible derivación" y entonces se deberán llevar a cabo los ensayos a campo (figura 3).

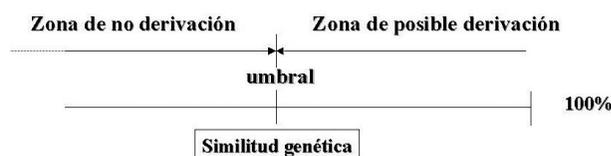


Figura 3. Esquema de umbrales de distinción para variedades esencialmente derivadas. (Adaptado de Le Buanec, 2007).

Selección de marcadores moleculares y construcción de bases de datos: directrices del BMT

Durante la 8va sesión del grupo BMT en 2003, se entendió que era necesario comenzar a armonizar metodologías para la generación de datos moleculares a fin de asegurar la calidad de los datos producidos y para que éstos además sean aceptados universalmente a fin de ser usados en la caracterización de variedades. También se consideró fundamental poder establecer normas o ejemplos de diseños de bases de datos, específicas para datos moleculares de distinto tipo. Estas consideraciones se plasmaron en los borradores de las Directrices del BMT.

Este texto, que aún sigue en discusión, contiene lo siguiente:

- definiciones generales.
- criterios básicos para la selección de metodologías adecuadas.
- criterios generales para la selección de marcadores y criterios específicos por tipo de marcador.
- consideraciones sobre el origen y tipo de material a analizar y sobre la cantidad de

plantas o semillas requeridas en cada caso (tamaño de muestra según tipo de propagación del material).

- consejos sobre el uso de materiales de referencia y la calidad de ADN requerido.
- Consejos sobre la forma de interpretación de los datos y de los resultados.

A continuación se presenta un resumen de los diversos puntos sobre selección y uso de marcadores de ADN para poder generar datos de calidad y que sean universalmente aceptados:

- a. considerar un análisis basado en estudios de especie por especie.
 - b. acordar el tipo de marcador.
 - c. acordar sobre el equipamiento a utilizar y la plataforma de detección.
 - d. acordar sobre los laboratorios que se incluyan en un posible ensayo entre laboratorios.
 - e. acordar sobre criterios de calidad.
 - f. verificar la fuente del material vegetal con el que se trabaja.
 - g. acordar qué marcadores se utilizarán en un primer ensayo colaborativo, cuáles laboratorios y sobre qué plataformas distintas.
 - h. conducir un ensayo colaborativo.
 - i. desarrollar un protocolo para evaluar los datos moleculares.
 - j. acordar sobre el material vegetal y el grupo de materiales de referencia a ser analizado y el origen del mismo (por especie).
 - k. analizar la colección de referencia en diferentes laboratorios, con diferentes sistemas de detección, realizando análisis por duplicado, e intercambiando muestras y extracciones de ADN si ocurre algún problema.
 - l. utilizar variedades, muestras de ADN y/o alelos de referencia en los análisis.
 - m. verificar cada etapa, incluyendo la entrada de datos. En lo posible automatizar.
 - n. llevar adelante un ensayo “ciego” en diferentes laboratorios utilizando la base de datos.
 - o. adoptar un procedimiento de manera tal de poder incluir nuevos datos.
- (UPOV BMT Guidelines-proj-8, 2007)

En definitiva este texto indica que los ensayos que se realicen utilizando marcadores de ADN, deben estar validados a través de un ensayo inter-laboratorio.

En este sentido la Asociación Internacional de Análisis en Semillas (ISTA), comenzó en 2007 a conducir ensayos inter-laboratorio con fines de identificación de variedades mediante la técnica de microsatélites (SSR) para cuatro especies de interés comercial mundial: trigo, soja, maíz y arroz.

Consideraciones finales

La postura de la UPOV respecto de los marcadores moleculares es objeto de evaluación continua debido a la evolución constante de estas técnicas y a las nuevas posibilidades que ofrecen en línea con los criterios del organismo.

Conforme a la actual postura de la UPOV, es posible aplicar los planteamientos del punto 1. (las características moleculares como cualidades predictivas de características tradicionales) ya que basándose en las premisas de la propuesta, ésta está en conformidad con el Convenio de la UPOV y no mermaría la eficacia de la protección suministrada en virtud del actual sistema. También es posible aplicar lo descrito en el punto 2. (comparación de niveles de umbral para caracteres moleculares con la distancia mínima en caracteres tradicionales), ya que cuando se utilizan para la gestión de colecciones de referencia está en conformidad con las disposiciones del Convenio de la UPOV y no mermaría la eficacia de la protección suministrada en virtud del sistema actual.

Sin embargo, la UPOV considera que no se ha alcanzado un acuerdo respecto de los planteamientos del punto 3. (creación de un nuevo sistema basado en marcadores de ADN). Se ha observado que no existe consenso en relación con la aceptación de dicha opción ya que se considera que no hay conformidad con el Convenio de la UPOV. Tampoco hay acuerdo respecto de si mermaría la eficacia de la protección suministrada en virtud del actual sistema. Asimismo se ha expresado la preocupación de que si se adopta dicho enfoque, podrían utilizarse un número ilimitado de marcadores para encontrar diferencias entre variedades que estén en el plano genético que no necesariamente se reflejen en caracteres morfológicos (caracteres en los que se basa el sistema actual de la UPOV).

Finalmente se han observado una serie de cuestiones generales, como por ejemplo la ac-

cesibilidad a las técnicas protegidas por patentes, la necesidad de tener en cuenta la relación costos-beneficios de estos nuevos enfoques, la importancia de la relación que existe entre los caracteres fenotípicos y las técnicas moleculares y, finalmente, la necesidad de examinar también la Homogeneidad y la Estabilidad en los mismos caracteres que se utilizan para examinar la Distinción (UPOV TC/41/7, 2005).

Lecturas recomendadas

Decreto N° 2183/1991. Reglamentario de la Ley N° 20.247, de Semillas y Creaciones Fitogenéticas.

Federación Internacional de Semillas. 2006. Documentos de posición sobre propiedad intelectual.

INASE. 2006. Formularios generales para inscripción de cultivares.

Inase.gov.ar: www.inase.gov.ar

Le Buanec, M. 2007. Use of Molecular techniques in relation to essential derived varieties. Proceedings of the International Symposium on the application of molecular techniques for plant breeding and plant variety protection. Seoul, noviembre de 2007.

UPOV. 2005/06. TG/1/3. Introducción General a las Directrices de examen.

UPOV. 1978. Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales.

UPOV. 1991. Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales.

UPOV. 1996. Ley tipo sobre la protección de las obtenciones vegetales.

UPOV. 2002. TC/38/14 – CAJ/45/5. Ad Hoc subgroup of technical and legal experts on biochemical and molecular techniques (The BMT review group).

UPOV. 2002. TC/38/14 – CAJ/45/5. Ad Hoc subgroup of technical and legal experts on biochemical and molecular techniques (The BMT review group). Anexo página 5.

UPOV. 2002. TC/38/16. Informe del Comité Técnico.

UPOV. 2005. TC/41/7. Técnicas Moleculares.

UPOV. 2007. Miembros de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. Status al 18 de Junio de 2007.