

# MARCADORES MOLECULARES EN LA MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS

J. Moreno-González

Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Apartado 10, 15080 La Coruña

La posibilidad de usar marcadores morfológicos como una ayuda en la selección de caracteres cualitativos y cuantitativos en plantas fue sugerida por Sax (10) hace ya más de 70 años. A lo largo de la historia de la mejora de plantas, se han hecho intentos para seleccionar caracteres con utilidad agronómica utilizando marcadores morfológicos (denominados también alelos mutantes en contraposición al alelo normal). De hecho, se han observado asociaciones entre los caracteres seleccionados y determinados marcadores morfológicos. Por ejemplo entre el mayor rendimiento del grano del trigo y la menor talla de las plantas, y directa también entre el mayor rendimiento de híbridos de maíz y el ángulo más agudo de inserción de las hojas en el tallo, etc. La contribución de estos mutantes al personaje seleccionado no está cuantificada, pero es muy probable que en estos casos el incremento de rendimiento no se deba a su asociación directa con los marcadores sino a una causa indirecta como es permitir un aumento de la densidad de plantas y del nivel de fertilización en el cultivo. Otros mutantes como *elbm3* del maíz (pigmento pardo en el nervio de la hoja) proporciona un forraje con menos contenido en lignina y por tanto más alto valor nutritivo, sin embargo produce simultáneamente efectos desfavorables como son una reducción del rendimiento y un mayor encamado del cultivo. Hay otros muchos ejemplos en los que los mutantes producen al mismo tiempo efectos positivos y negativos en los caracteres a seleccionar. Tanto la selección con base en marcadores morfológicos ha sido utilizada de forma muy limitada en la mejora genética de plantas.

## TIPOS DE MARCADORES

Además de los marcadores morfológicos, en los últimos años se han descubierto otro tipo de marcadores genéticos como los isoenzimas en la década de los años 70, y marcadores moleculares como los RFLPs (restricted fragment length polymorphisms) en los años 80, y los RAPDs (ADN polimórfico amplificado aleatorio) en los años 90. Estos marcadores han permitido confeccionar mapas de ligamiento de alta densidad en el genoma. Existen hoy mapas de ligamiento con marcadores moleculares muy completos en varios cultivos como el tomate, maíz, trigo, cebada, soja, almendro, *Brassica*, etc. Estos marcadores con un efecto neutro o al menos no adverso en la planta pueden ser una ayuda valiosa en la selección.

## CARACTERÍSTICAS DE LOS MARCADORES

Los atributos ideales de un gen marcador son: (a) polimorfismo; (b) herencia mendeliana y sin epistasia; (c) insensibilidad a la influencia y efectos ambientales; (d) ausencia de efectos en el desarrollo de la planta, es decir comportamiento como un gen neutro; (e) facilidad en la expresión, y simplicidad en la identificación y análisis; (f) codominancia; y (g) posibilidad de detección en las primeras fases de desarrollo de la planta.

Los isoenzimas y los RFLP son los que más se acercan a estos atributos ideales. Los isoenzimas tienen el inconveniente de que su número es limitado, y por tanto no tienen una presencia suficientemente densa en todas las regiones del genoma. Los RFLP son unos buenos marcadores moleculares que permiten una densidad de mapeo alta en todo el genoma. Sin embargo, tienen el inconveniente de que su análisis en el laboratorio es actualmente costoso y frecuentemente necesitan isótopos radiactivos para su resolución, aún cuando los costes están reduciéndose progresivamente y las nuevas técnicas limpias de fluorescencia pueden sustituir a los isótopos radiactivos. Los RAPD son muy fáciles de analizar (después de la extracción del ADN solo necesitan de 4-6 h. para amplificación y separación electroforética) y al igual que los RFLP pueden cubrir densamente el genoma, tienen sin embargo el inconveniente de que no poseen el atributo de codominancia, por lo que no es posible distinguir el genotipo homocigótico dominante del heterocigótico. Esta distinción es imprescindible para realizar la separación de individuos en la generación F2.

En el genoma del maíz existen actualmente descritos más de 700 marcadores, de los cuales aproximadamente unos 450 son RFLPs, 200 son morfológicos y 70 isoenzimáticos. En el maíz como en otros cultivos, continuamente se van descubriendo nuevos marcadores, especialmente RFLPs y RAPDs.

## USOS DE LOS MARCADORES

Los marcadores moleculares se han utilizado o se pueden utilizar en los siguientes aspectos de la mejora genética de plantas:

(A) Estimación de distancias genéticas entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos (3). Esto permite: (i) la clasificación taxonómica de ecotipos o muestras que acceden a los Bancos de Germoplasma como un complemento de los datos morfológicos que han sido utilizados desde los tiempos de Linneaus; y (ii) la asignación de líneas puras a grupos heteróticos con objeto de predecir el valor de los híbridos resultantes del cruce. Las distancias genéticas mas usadas son la modificada de Rogers (9) utilizada con poblaciones segregantes y la de Nei-Li (7) utilizada con líneas puras e híbridos.

(B) Identificación y distinción de variedades, líneas puras e híbridos para proteger los derechos del obtentor vegetal en el Registro de Variedades Protegidas. Los marcadores de DNA permiten una distinción mas precisa de genotipos que los "descriptores" morfológicos requeridos hoy día. Sin embargo estos marcadores moleculares no han sido todavía adoptados por los organismos oficiales encargados de la protección de variedades.

(C) Establecimiento de relaciones de parentesco o "pedigree" entre líneas o variedades para realizar estudios genéticos. El método es similar al utilizado en las pruebas de paternidad y parentesco en genética humana.

(D) Localización e identificación de genes cualitativos o mayores y también de genes con efectos pequeños afectando a caracteres cuantitativos (los así llamados QTLs).

## IDENTIFICACION Y SELECCION DE QTLs

La identificación de los QTLs se basa en la teoría de ligamiento y recombinación desarrollada en el primer tercio de este siglo. La posibilidad de marcar densamente el genoma de plantas y animales ha hecho resurgir el interés por esta teoría (6). Una población segregante en desequilibrio de ligamiento es necesaria para localizar los QTLs. Las poblaciones más aptas son las derivadas del cruce de dos líneas puras. La base teórica es como sigue: Consideremos dos líneas puras P1 y P2 con genotipos marcadores MM y mm, respectivamente y QTLs, QQ y qq, respectivamente. El cruce F1 tiene la siguiente disposición cromosómica:

donde  $r$  es la frecuencia de recombinación entre  $Q$  y  $M$ ;  $r$  es menor o igual que 0,5 y determina el grado de asociación entre  $Q$  y  $M$  en las generaciones segregantes. En la generación  $F_2$  se detectan las clases marcadoras  $MM$ ,  $Mm$  y  $mm$ . La clase  $MM$  esta asociada al alelo  $Q$  con una frecuencia  $(1-r)$  mayor que la frecuencia ( $r$ ) de asociación al alelo  $q$ . Esto significa que al seleccionar para la clase marcadora  $MM$ , al tiempo se selecciona para el alelo  $Q$  con interés agronómico. Si los genotipos portadores de una clase marcadora en un locus se diferencian significativamente de los de otra para un carácter poligénico determinado quiere decir que esos marcadores están asociados a un QTL para ese carácter.

En los últimos cinco años se han desarrollado métodos estadísticos y biométricos para analizar la presencia y efectos de los QTLs (1). Tres tipos básicos de análisis pueden mencionarse: (a) contraste de clases marcadoras, (b) regresión múltiple (5) y (c) método de máxima verosimilitud (2 y 4). Los dos últimos métodos tienen mayor potencia discriminante que el primero. Existe un programa de ordenador muy extendido llamado MAPMAKER basado en la máxima verosimilitud que permite la identificación y mapeo de los QTLs. Debido a las limitaciones encontradas en los métodos de análisis se están haciendo grandes esfuerzos para progresar en este área.

## APLICACIONES PRACTICAS DE LOS MARCADORES

Además de la identificación de genes mayores asociados a marcadores moleculares (1), se han detectado QTLs en varios cultivos, por ejemplo en tomate, maíz, soja, cebada, etc. Se han identificado QTLs responsables del contenido de los sólidos solubles del tomate en la generación de retrocruzamiento derivada del cruce entre dos líneas que diferían ampliamente en el contenido de los sólidos solubles (8 y 12). También, varios QTLs del maíz controlando el rendimiento y otros caracteres agronómicos (altura de la planta, longitud de la espiga, etc.) han sido identificados y localizados en las regiones cromosómicas del híbrido B73 x Mo17, cultivado extensamente en todo el mundo (11). Otros QTLs responsables de la resistencia del maíz al gusano europeo del taladro del tallo (*Ostrinia nubilalis*) han sido detectados en poblaciones segregantes. Otros muchos ejemplos podían citarse.

Las regiones cromosómicas portadoras de los QTLs identificados mediante los marcadores son demasiado largas (5-30 cM) para aislar, clonar y manipular el DNA informativo del QTL por sí mismo. Por tanto la estrategia que se sugiere en la mejora de plantas es seleccionar individuos portadores de marcadores con QTLs favorables y asistir o ayudar en la selección cuando se empleen los métodos convencionales de mejora; por ejemplo en la selección genealógica, en la selección con base en "test-crosses", o en la selección en retrocruzamientos, etc. El método es sencillo, seguir la pista del gen marcador asociado al QTL favorable a través de las sucesivas generaciones de selección.

Este tipo de selección asistida se esta usando ya hoy día en varios laboratorios de Universidades, Centros Públicos y Empresas privadas grandes, pero es presumible que en el futuro pueda convertirse en un proceso rutinario en la mayoría de los programas de mejora de plantas, especialmente para el desarrollo de líneas puras y de híbridos.

## LITERATURA CITADA

1 Arus, P. and J. Moreno-González. 1993. In Plant Breeding: Principles and Prospects, Hayward, M.D., Bosemark, N.O and Romagosa, I. (eds.), Chapman and Hall, London.

2 Carbonell, E.A., T.M. Gerig, E. Balansard and M.J. Asins. 1992. Biometrics 48:305-315

- 3 Dudley, J.W. 1994. Analysis of molecular marker data. Proceed. of the joint plant breeding symposia series, American Society for Horticultural Science/Crop Science Society of America. pp. 3-7.
- 4 Lander, E.S. and D. Botstein. 1989. Genetics 121:185-199.
- 5 Moreno-González, J. 1993. Genetics 135:223-231.
- 6 Moreno-González, J. 1993. J. Genet Breed. 47:9-14.
- 7 Nei, M. and W. Li. 1979. Proc Natl. Acad. Sci. USA 76:5269-5273.
- 8 Paterson, A.H., E.S. Lander, J.D. Hewitt, S. Paterson, S.E. Lincoln and S.D. Tanksley. 1988. Nature 335:721-726.
- 9 Rogers, J.S. 1972. Studies in genetics VII. Univ. of Texas Publ. 7213:145-153.
- 10 Sax, K. 1923. Genetics 8:552-560.
- 11 Stuber, C.W. 1994. Analysis of molecular marker data. Proceed. of the joint plant breeding symposia series, American Society for Horticultural Science/Crop Science Society of America. pp. 44-46.
- 12 Tanksley, S.D. and J. Hewitt. 1988. Theor. Appl. Genet. 60:291-296.