

EINES MOLECULARS EN AGRICULTURA

AMPARO MONFORT

*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària,
Centre de Recerca en Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB)*

Adreça per a la correspondència: Amparo Monfort Vives. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB). Ctra. de Cabriils, km 2. 08348 Cabriils. Tel.: 937 507 686. Adreça electrònica: *amparo.monfort@irta.es*.

RESUM

Els marcadors moleculars són les eines utilitzades per l'ésser humà com a suport per a l'agricultura, i han representat un gran avenç en la millora genètica vegetal. A mesura que s'han anat descobrint els diferents tipus de marcadors moleculars, i que s'han anat millorant les tècniques per utilitzar-los, s'ha obtingut la selecció de noves varietats vegetals amb un temps més curt que fent servir la millora clàssica. Els marcadors són usats en plantes per a l'estudi de la seva variabilitat genètica, la identificació de les diferents varietats que hi ha en el mercat o en la natura o la selecció de plantes heterozigotes. En projectes de millora genètica els marcadors han servit per seleccionar noves varietats escollides perquè tenen característiques d'interès en la planta o en el fruit. Són utilitzats també per elaborar els mapes genètics de les diferents espècies vegetals. En tots els casos es poden utilitzar diferents tipus de marcadors moleculars basats en el DNA, com els RFLP, els AFLP, els microsatèl·lits i els SNP.

Paraules clau: marcador molecular, mapa genètic, varietat vegetal, millora, germoplasma.

MOLECULAR TOOLS IN AGRONOMY

SUMMARY

Molecular markers are the tools used by breeders in support of agriculture and that meant a breakthrough in plant breeding. As we have been exploring different types of molecular markers, and improved techniques to apply them, we select new plant varieties in a shorter time than using the classical breeding. These markers are used in plants to study their genetic variability, the identification of different varieties on cultivated or wild

cultivars and the selection of heterozygous plants. In other projects of marker assisted selection they were used to select new varieties characterized to have some specific parameters of the plant or fruit. They are also used to produce the genetic maps of different plant species. In all cases you can use different types of DNA-based molecular markers such as RFLPs, AFLPs, SNPs and microsatellites.

Key words: molecular marker, genetic map, cultivar, breeding, germoplasme.

INTRODUCCIÓ

La millora genètica vegetal (MGV) és l'evolució de les espècies vegetals forçada per l'acció humana, i adaptada als ambients modificats pels éssers humans. Això és un procés lent i continu que ha fet que el millorador vegetal estigui obert a les noves tecnologies i a la incorporació de noves eines que puguin ajudar-lo en aquest procés. La genòmica i el desenvolupament de marcadors moleculars ha estat un pas decisiu en l'avenç de la MGV, ha incorporat un salt qualitatiu i ha escurçat el període de selecció de noves varietats en el procés que s'anomena *selecció assistida per marcadors* (MAS).

En les bases de l'agricultura la modificació dels cultius era inconscient. Per exemple, per selecció de les espigues més productives, l'agricultor sembrava la temporada següent una llavor de blat que no tenia fragilitat en la tija, ja que aquesta no es recollectava. En poques generacions l'agricultor havia modificat l'estructura genètica de la població silvestre original i havia millorat l'espècie. Com més va més aquesta selecció era menor, ja que havia desaparegut la variabilitat genètica a causa de la uniformitat del cultiu.

Per modificar l'estructura genètica de les poblacions i aconseguir els objectius de maximitzar el rendiment i el valor comercial del cultiu, el millorador ha d'establir un programa de MGV separat en tres etapes: generació de variabilitat, selecció i fixació dels genotips seleccionats. El mètode clàs-

sic per generar variabilitat són els encreuaments, però la selecció dels pares per encreuar, l'anàlisi de les descendències i els retroencreuaments per fixar els caràcters són un procés llarg i laboriós que comporta diversos anys, depenent del tipus de planta. Els marcadors moleculars han aportat a la MGV un salt qualitatiu de gran envergadura.

MARCADORS MOLECULARS

Un marcador genètic és un polimorfisme o diferència heretable d'herència mendeliana senzilla, i l'anàlisi de la seva variabilitat ens permet fer estudis genètics. Els primers marcadors descrits foren marcadors morfològics, basats en l'observació de les diferències fenotípiques degudes a gens amb efecte major que presenten una herència simple i són estables enfront de diferents ambients (Immer i Henderson, 1943; Allard, 1953). Un bon marcador ha de ser independent de l'ambient i d'altres regions del genoma, ha de ser estable i reproduïble en diferents experiments, altament polimòrfic, codominant, i per tenir una alta aplicabilitat ha de ser econòmic. Els marcadors moleculars han representat un gran avenç en la millora genètica vegetal, a mesura que s'han anat descobrint els diferents tipus i s'han anat millorant les tècniques per utilitzar-los. Són usats en plantes per a l'estudi de la variabilitat genètica, la identificació de les diferents varietats que hi ha en el mercat i en projectes de millora genè-

tica. Són utilitzats també per elaborar els mapes genètics de les diferents espècies vegetals.

Un bon marcador ha de reunir un conjunt de característiques, com són: *a*) l'alt grau de polimorfisme per distingir el nombre més gran de mostres possible, *b*) la codominància, que permet distingir individus homozigots i heterozigots, *c*) s'ha de distribuir de manera homogènia al llarg de tot el genoma, *d*) ha de tenir un comportament neutre i no estar sotmès a selecció natural, *e*) senzill, *f*) d'interpretació objectiva i *g*) de reproductibilitat fàcil. En tots els casos es poden utilitzar diferents tipus de marcadors moleculars com els isoenzims o els marcadors de DNA (RFLP, AFLP, microsatèl·lits i SNP). Depenent de les seves característiques es pot escollir un o altre tipus de marcador per a les diferents aplicacions (vegeu la taula 1). Els primers marcadors moleculars descrits, els isoenzims, eren marcadors bioquímics basats en dues varietats d'una proteïna (isoenzim) que poden presentar diferent càrrega i, per tant, diferent mobilitat electroforètica. Aquests marcadors, molt utilitzats en la dècada dels vuitanta (Bournival *et al.*, 1989), són codominants, i permeten distingir els individus heterozigots, però els trobem en un nombre reduït i no cobreixen tot el genoma. En cereals tenen una aplicació directa sobre la qualitat de la llavor, i detecten la propietat de blat dur o farinós.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Els primers marcadors de DNA que es van desenvolupar al final dels anys setanta foren els RFLP. Aquests marcadors es basen a detectar diferències de longitud d'uns fragments, que es generen en digerir el DNA genòmic amb enzims de restricció

(detecta polimorfismes a escala de dianes de restricció). El producte de la digestió se separa mitjançant una electroforesi en un gel d'agarosa, i es transfereix a una membrana pel mètode del transferència Southern (Sambrook i Russell, 2001). A continuació s'afegeix una sonda marcada (radioactiva o de fluorimetria), que hibridarà amb els fragments homòlegs immobilitzats a la membrana. Les sondes que s'utilitzen procedeixen de genoteques de cDNA (normalment són gens coneguts) o de DNA genòmic (fragments amplificats de manera inespecífica).

Els RFLP solen segregar com a marcadors codominants, i es poden trobar en qualsevol part del genoma, i en un nombre quasi il·limitat. Per aquest motiu són molt utilitzats per a la construcció de mapes genètics (Joobeur *et al.*, 1998). A més, és possible comparar mapes genètics entre espècies pròximes, ja que l'ordre dels marcadors RFLP en el mapa detectat amb la mateixa sonda es conserva entre les espècies properes.

Els principals inconvenients d'aquest tipus de marcador molecular és que es necessita molt de temps per desenvolupar-ne de nous, tenen un elevat cost econòmic (el cost de la infraestructura necessària és considerable), i a més és necessària la presència de personal qualificat (normalment s'utilitza radioactivitat). Però els avantatges són que els RFLP no necessiten conèixer la seqüència, i a més, és relativament fàcil passar-los a marcadors basats en la seqüència. Així es poden passar RFLP potencialment útils per a projectes de millora genètica a uns marcadors més senzills, partint de la seqüenciació de l'RFLP. Podríem dir que són uns marcadors de base.

TAULA 1. Característiques dels diferents marcadors moleculars

Marcador	Detecció polimorfisme	Codominància	Transferible	Reproducible	Seqüència	Cost	Temps
RFLP	Pol. mitjà	Codominant	Interespecífic	Molt rep.	No	Alt	Molt
AFLP	Molt alt pol.	Dominant	No	Poc rep.	No	Baix	Molt
RAPD	Baix	Dominant	No	Poc rep.	No	Baix	Poc
CAPS	Molt baix pol.	Codominant	Intraespecífic	Reproducible	Sí	Alt	Mitjà
SSR	Alt pol.	Codominant	Interespecífic	Reproducible	Sí	Alt	Poc
SNP	Alt pol.	Codominant	Interespecífic	Reproducible	Sí	Alt	Molt

Marcadors de tipus PCR

Amb el descobriment de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), que permet copiar i amplificar qualsevol fragment de DNA, es va obrir un nou camp per desenvolupar nous marcadors moleculars. Són marcadors basats en la seqüència del DNA més fàcils d'utilitzar, i que es poden obtenir a un ritme més elevat que els RFLP. Els principals marcadors moleculars d'aquest tipus que es van desenvolupar i que s'utilitzen actualment, són:

— AFLP: *amplified fragment length polymorphism*

— RAPD: *random amplified polymorphic DNA*

— SSR o microsatèl·lits: *simple sequence repeats*

— CAPS: *cleaved amplified polymorphic sequence*

— SNP: *single nucleotide polymorphism*

Tots aquests marcadors es basen en una reacció d'amplificació de fragments de DNA, i es beneficien dels avantatges d'aquesta tècnica: es necessita molt poca quantitat de DNA per mostra, és ràpida de fer, i produeix una amplificació específica dels fragments. Els encebadors (petits fragments de DNA de cadena senzilla) que intervenen en la reacció reconeixen dues zones concretes de la seqüència, i s'amplifica la regió compresa entre totes dues.

AFLP (*amplified fragment length polymorphism*)

Aquests marcadors es basen en una amplificació selectiva de fragments de DNA obtinguts mitjançant una digestió amb enzims de restricció (Vos *et al.*, 1995). A aquests fragments s'uneixen uns oligonucleòtids o adaptadors compatibles amb els extrems cohesius dels enzims, i s'amplifica per PCR. Jugant amb la complementarietat de l'oligonucleòtid i el lloc de restricció, es pot disminuir o augmentar el nombre de bandes amplificades. Aquesta tècnica és capaç de generar molts marcadors moleculars, que posteriorment es poden adaptar a un mètode d'aplicació fàcil en la millora i, per tant, són importants per generar molta informació.

RAPD (*random amplified polymorphic DNA*)

Aquesta és una de les tècniques més versàtils des que es van desenvolupar al principi dels anys noranta (Welsh i McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Es basa a utilitzar una col·lecció de decanucleòtids (deu parells de bases de seqüència aleatòria), que amplifiquen àrees a l'atzar del genoma (s'utilitza un únic encebador en la reacció de PCR). Com que l'encebador és

molt curt i la temperatura que s'utilitza en la PCR és poc restrictiva (36 °C), s'assegura que l'encebador s'unirà a moltes regions del genoma. Si aquesta unió es produeix entre dues regions amb orientació oposada, i dins del rang de mides amplificades per la polimerasa (200-2.000 pb), es produirà l'amplificació del fragment. Com els marcadors AFLP, solen ser marcadors dominants que s'analitzen com a presència/absència del producte amplificat. És una tècnica molt còmoda, ràpida i econòmica que requereix poc DNA per amplificar i poca infraestructura. No cal tenir coneixements previs de la seqüència, i permet distingir de manera molt ràpida els diferents individus.

Microsatèl·lits o simple sequence repeats (SSR)

Els microsatèl·lits es van descriure per primer cop cap als anys vuitanta (Hamada *et al.*, 1982), i consisteixen en seqüències formades per repeticions en tàndem d'un a sis nucleòtids. Aquest tipus de seqüències es troben àmpliament distribuïdes per tot el genoma, i les repeticions més freqüents són les de dinucleòtids. El nombre de repeticions de cada microsatèl·lit és variable, i el grau de polimorfisme d'aquest tipus de marcador és molt elevat. L'elevat polimorfisme i l'àmplia distribució en el genoma serien els dos avantatges més importants d'aquest tipus de marcador.

L'amplificació del microsatèl·lit es fa mitjançant una parella d'encebadors específics que el flanquegen. Aquest és un dels principals desavantatges del marcador, ja que necessitem conèixer prèviament la seqüència per dissenyar els encebadors, i es tracta d'un procés molt costós i laboriós. Però una vegada ja disposem dels encebadors dissenyats, són molt fàcils d'utilitzar, ja

que llavors només necessitem una reacció de PCR.

Són marcadors codominants i altament reproduïbles, i s'han utilitzat satisfactòriament en la construcció de mapes genètics de diferents espècies vegetals. També es poden utilitzar per a la identificació varietal, i són molt útils en espècies amb baixos nivells de polimorfisme. Per tant, són molt útils en la millora, ja que permeten separar diferents individus de la mateixa espècie i d'alta consanguinitat.

Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)

Els marcadors CAPS els van descriure per primer cop Konieczny i Ausubel, l'any 1993. Consisteixen en una PCR d'amplificació de DNA genòmic, seguida d'una digestió enzimàtica amb un enzim de restricció. Els encebadors que s'utilitzen per a la PCR són d'uns 20-25 pb, i permeten amplificar una regió específica del genoma. A continuació, les mostres es carreguen en un gel d'electroforesi per observar els polimorfismes de les bandes digerides.

Els polimorfismes que es produeixen entre les seqüències es deuen a diferències en la seqüència de DNA amplificada (mutacions puntuals, insercions, delecions, etc.), que produeixen la presència/absència d'una diana de restricció. Aquests canvis provoquen que l'enzim digereixi de manera diferencial les seqüències, i el patró de bandes resultant és diferent.

Per a aquest tipus de marcador es necessita molt poca quantitat de DNA i la infraestructura necessària al laboratori no és gaire elevada. Un altre avantatge és que són uns marcadors altament reproduïbles. Són, a més, marcadors codominants, i els patrons de bandes dels gels es poden interpretar en termes de locus i allels. La princi-

pal limitació d'aquest marcador però, és que es necessita conèixer la seqüència prèviament per tal de dissenyar els encebadors de la PCR (com el cas dels SSR), i aquest és un procés costós i laboriós. Un cop obtinguts aquests marcadors són molt utilitzats en selecció assistida per marcadors, per exemple per identificar en espècies hortícoles les línies resistents a un virus a partir d'un encreuament entre un pare susceptible i l'altre resistent (vegeu la figura 1).

Single nucleotide polymorphism (SNP)

Els SNP són una nova generació de marcadors derivats de la tecnologia de seqüenciació del DNA. Els SNP són diferències d'un sol nucleòtid, i representen el tipus de variació més freqüent del DNA (Brookes, 1999). Perquè un canvi de base sigui considerat com a SNP i, per tant, un possible marcador molecular, la seva freqüència al·lèlica ha de ser superior a l'1 % en una població. Les insercions o delecions (INDEL) d'una sola base poden ser considerades com a SNP, encara que el seu origen sigui diferent. A vegades els SNP tenen associats un fenotip, i aleshores parlem d'una muta-

ció, però en general la pressió evolutiva acostuma a eliminar els canvis en les regions codificants. El mètode més senzill per descobrir un SNP és obtenir la seqüència directament dels productes de PCR obtinguts dels pares de la població d'estudi (vegeu la figura 2). La comparació de seqüències obtingudes de grans projectes de seqüenciació amb eines informàtiques (bases de dades d'EST, reseqüenciació en diferents individus) són una font important de descobriment de SNP *in silico*.

Per detectar i mapar un SNP en una població o en un gran nombre d'individus, a part de la reseqüenciació, hi ha altres mètodes de detecció de SNP, com la PCR específica d'allel (Newton *et al.*, 1989), la dHPLC (separació per cromatografia d'alta resolució en condició desnaturalitzant), els SSCP (*single strand confirmation polymorphism*) i la piroseqüenciació, i també les sondes Taqman i diferents formes de la *single-base extension* (SNaPshot i *mass array*) (Landegren *et al.*, 1998). Aquesta tècnica, molt utilitzada en millora vegetal per l'aplicació fàcil que presenta, consisteix a amplificar un fragment que contingui l'SNP amb encebadors específics, i a continuació dissenyar un nou encebador per a la seqüència amplificada, que tingui la posició 3' just

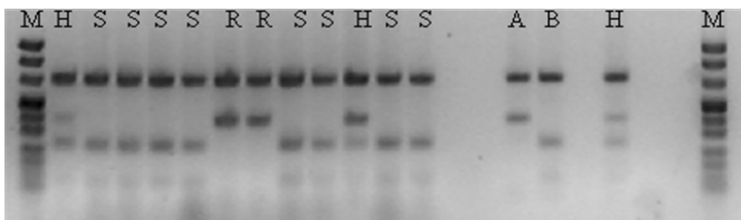


FIGURA 1. Marcador CAPS M132 de meló lligat al gen *nsv* que dona resistència al virus del mosaic del meló (Morales *et al.*, 2005). La presència del locus resistent es correspon amb la detecció de la banda de 400 pb. La planta A és el genotip resistent i la planta B el genotip sensible. H correspon al genotip heterozigot. En les dotze plantes analitzades de la descendència trobem el genotip sensible (S) i el genotip resistent (R), i també els heterozigots (H). M correspon al marcador de pes molecular de les bandes de DNA.

abans de l'SNP. Amb aquest nou encebador es fa una nova reacció de PCR amb els quatre didesoxinucleòtids (que estan marcats amb quatre fluorocroms diferents). D'aquesta manera només s'incorpora un nucleòtid, i amb un aparell de seqüenciació automàtic es pot determinar de quin es tracta. Un cop es té a punt la tècnica, es poden manipular moltes mostres de manera ràpida i eficient, encara que és una tecnologia cara i el cost per mostra continua sent elevat.

Les substitucions nucleotídiques tenen lloc amb una freqüència relativament alta al llarg del genoma, i són molt útils per construir mapes físics. Molts dels polimorfismes detectats per altres tipus de marcadors (RFLP, AFLP, CAPS), el que detecten realment és un SNP (una mutació puntual o un polimorfisme en el genoma). El desenvolupament de nous marcadors SNP està evolucionant d'una manera molt ràpida en introduir-se en el mercat les noves tecnologies de seqüenciació massiva de genomes, que permeten obtenir la seqüència

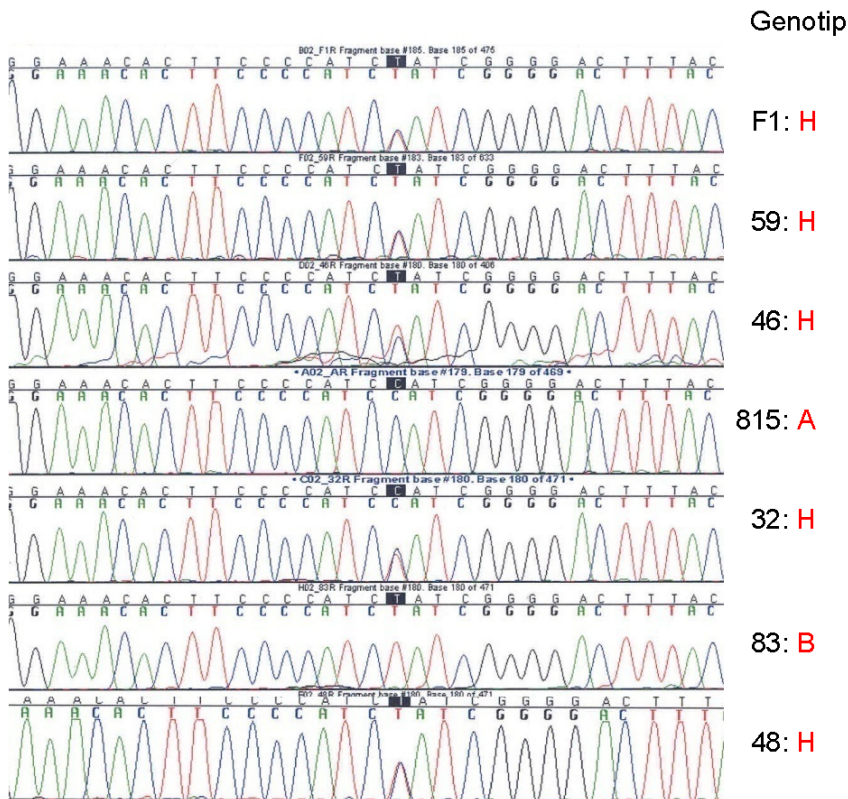


FIGURA 2. SNP, cromatograma de la seqüència obtinguda amb l'encebador PP705 en set individus seleccionats, F1, 59, 46, 815, 32, 83 i 48, que inclou un de parental (815) homozigot i un d'híbrid (F1) heterozigot. Els individus amb l'al·lel A presenten un pic corresponent a la base citosina a la posició central del cromatograma, i els individus amb l'al·lel B presenten un pic corresponent a la timina. Els individus heterozigots mostren els dos pics superposats, encara que el detector n'identifiqui un (timina) de manera preferent.

d'un genoma d'una manera econòmica i en un sol experiment. Comparant la seqüència d'un conjunt d'individus seleccionats per la seva distància genètica podem descobrir una col·lecció de SNP repartits al llarg de tot el genoma i que es poden transformar en xips de DNA, per detecció de SNP de manera massiva, i llavors caracteritzar el genotip dels individus.

APLICACIÓ DELS MARCADORS MOLECULARS A LA MILLORA GENÈTICA VEGETAL

Identificació de varietats

La identificació varietal ha estat un dels objectius constants de l'estudi del material vegetal. L'observació de les característiques morfològiques és el primer pas de la identificació, però quan volem observar diferències a escala intraespecífica, per identificar varietats de la mateixa espècie, els marcadors genètics adquireixen una importància rellevant per poder diferenciar varietats cultivades, i defensar els drets de l'obtentor de la varietat.

Per a la identificació de varietats hem de tenir en compte la definició de *varietat*. Una varietat vegetal és aquella que reuneix tres característiques essencials: *a)* ser distinta de les altres en determinades observacions, *b)* ser uniforme, de manera que diferents individus de la mateixa varietat es puguin considerar iguals i *c)* ser estable, és a dir, que transmeti les seves característiques als descendents. Actualment els avenços en biotecnologia permeten obtenir noves plantes amb la incorporació d'un sol gen que li confereix una característica diferent. Aquestes noves línies obtingudes per metodologia es consideren com a *varietats essencialment derivades*, ja que mantenen l'es-

tractura genètica de la varietat de la qual deriven.

Les eines moleculars per protegir la propietat d'una varietat i els drets de l'obtentor han de ser capaces de distingir una varietat de les més properes i fins i tot distingir si és una varietat essencialment derivada. Els marcadors moleculars són actualment molt fiables i tenen capacitat de discernir canvis en un sol nucleòtid per diferenciar les noves varietats. L'aplicació d'aquests marcadors als estudis filogenètics i de distància genètica entre les línies permet al millorador dissenyar els futurs encreuaments per a l'obtenció de noves línies que incorporaran potencialment les característiques de tots dos pares o les milloraran.

Caracterització de bancs de germoplasma

La uniformitat en els cultius de l'agricultura moderna ha portat a una reducció de la base genètica dels cultius, i a la pèrdua de capacitat de resposta enfront de l'atac d'un patògen o un fenomen meteorològic imprevist. Per això s'ha desenvolupat un moviment de salvaguarda dels recursos filogenètics. Aquest moviment es plasma en la creació dels bancs de germoplasma, en què l'objectiu és la recollecció, conservació, propagació i ús dels recursos genètics vegetals. El millorador reconeix que l'ús dels recursos genètics és un dels principals components dels programes de millora vegetal. L'estratègia clàssica de la conservació i utilització del germoplasma es basa en el fenotip i la disposició ecogeogràfica de les varietats vegetals conservades. El resultat directe de l'aplicació dels marcadors moleculars a l'avaluació del germoplasma ha estat, en primer lloc, l'ordenació de les entrades al banc i la identificació de duplicacions. En segon lloc, la classificació

de les varietats ha permès calcular la distància genètica entre les entrades i identificar les zones geogràfiques d'origen de la variabilitat de l'espècie. Variabilitat i distància genètica són dades objectives per al millorador, que les pot utilitzar per escollir els nous pares dels seus encreuaments per introduir nous al·lels que suposadament aportaran nous caràcters. L'anàlisi amb marcadors de la descendència d'aquests encreuaments permetrà detectar el grau d'herència d'aquests al·lels, i l'anàlisi fenotípica aportarà la informació de la millora en caràcters d'interès agronòmic.

Estudi de la variabilitat genètica intraespecífica i interespecífica

Els estudis comparatius existents demostren que l'ús de marcadors genètics proporciona els paràmetres més ajustats per identificar al·lels diferents en els encreuaments intraespecífics (Lee, 1995), que poden aportar variabilitat genètica en aspectes molt concrets. Com més properes siguin les línies parentals de l'encreuament, més difícil resulta identificar nous genotips entre la descendència i, per tant, individus amb noves combinacions al·lèliques. Quan el millorador no troba la variabilitat necessària dintre de l'espècie recorre als encreuaments interespecífics. Aquest tipus d'encreuaments s'utilitzen per introgressar en una planta caràcters d'herència senzilla d'espècies molt properes. Ens referim, per exemple, a la resistència a malalties, amb la recuperació de l'estructura genètica de l'espècie original després de diverses etapes de retroencreuament amb l'espècie recurrent. Els marcadors faciliten la selecció de l'individu heterozigot sempre que tinguem un marcador lligat o molt proper a l'herència del caràcter. Seleccionant amb marcadors no cal tenir la intro-

gressió en homozigosi per tornar a fer el retroencreuament, és a dir, no cal que seleccionem pel caràcter, sinó que podem detectar l'al·lel lligat al caràcter i retroencreuar l'individu, rastrejant en la descendència la presència de l'al·lel considerat. D'aquesta manera es redueix a la meitat el nombre d'encreuaments per fer. En el cas de tenir marcadors flanquejant el caràcter es pot reduir la regió introgressada.

Aquests últims anys la generació de mapes genètics d'alta densitat de poblacions d'encreuament entre espècies de tomàquet conreat i espècies de tomàquet silvestre ha permès la localització de regions cromosòmiques introgressades que milloren el color i el rendiment del tomàquet. El procediment consisteix en la generació per retroencreuaments de línies del cultivar amb segments cromosòmics de la línia silvestre (Tanksley i McCouch, 1997). El rendiment ha estat avaluat en diverses regions del món. Aquesta tècnica ha estat aplicada a diferents espècies vegetals com la civada o el meló.

Estudi d'heterosis

Un dels mètodes de millora genètica vegetal que ha revolucionat la indústria de llavors ha estat la producció de varietats híbrides. El principal avantatge dels híbrids és, per sobre del rendiment, l'homoogeneïtat de la producció i el valor comercial de la llavor. L'híbrid comercial és el producte de l'encreuament de dues línies pures seleccionades per produir heterosi. L'heterosi o «vigor de l'híbrid» és el fenomen segons el qual els individus descendents (F1) d'un encreuament de dues línies endogàmiques mostren unes característiques fenotípiques superiors a la mitjana de les línies parentals, o el valor del pare més gran.

L'heterosi, descrita ja al principi del segle xx (East, 1936), és un mecanisme àmpliament documentat en plantes per determinar un increment de la biomassa, el rendiment, la mida de la planta i del fruit, la fertilitat, la resistència a malalties o plagues d'insectes, etc. La base genètica del vigor de l'híbrid encara és objecte de discussió entre els genetistes. El fenomen ha estat aplicat amb gran èxit a la millora de plantes, inicialment en l'obtenció de línies híbrides de blat de moro d'alt rendiment procedents de l'encreuament de línies endogàmiques. Aquest fenomen és un dels principals responsables de la revolució verda dels anys setanta. Actualment el 95 % del blat de moro plantat als Estats Units i el 65 % del plantat arreu del món (Swanson Wagner *et al.*, 2006) és híbrid (vegeu la figura 3). El coneixement genètic de dues línies pot permetre al millorador predir l'heterosi. L'aportació de l'ús de marcadors moleculars per conèixer la distància

genètica entre les línies ha demostrat que els encreuaments entre línies que pertanyen a diferents grups heteroics presenten més heterosis que els encreuaments entre línies del mateix grup (Hallauer *et al.*, 1988). Però no ens permet predir l'heterosi en híbrids produïts entre grups molt distants i tampoc si apareix el fenomen de l'epístasi o regulació per altres gens.

Detecció d'híbrids

Així mateix, el control de la qualitat de la llavor híbrida mitjançant l'ús de marcadors moleculars ha permès comercialitzar un gran nombre d'espècies híbrides que actualment asseguren els nivells de producció agrícola i d'uniformitat de característiques de qualitat de la planta i del fruit (Meyer *et al.*, 2007). Cal pensar que la majoria d'espècies hortícoles com el tomàquet, el meló, el cogombre, el pebrot, etc., són



TRENDS in Plant Science

FIGURA 3. Manifestació fenotípica de l'heterosi. *a)* L'heterosi es manifesta típicament en els caràcters de la planta adulta com el rendiment o la llargària de la panotxa de blat de moro. *b)* L'heterosi també es manifesta normalment en el desenvolupament de les llavors (Hochholdinger i Hoecker, 2007).

conreades a partir de la llavor híbrida que assegura al productor un rendiment homogeni. El control de la pol·linització creuada entre les línies escollides mitjançant marcadors codominants assegura la producció de llavor híbrida.

Construcció de mapes genètics

Els marcadors moleculars es poden fer servir tant per a la identificació varietal o l'estudi de la variabilitat genètica com per elaborar mapes genètics. Els mapes genètics són representacions gràfiques de l'ordre dels marcadors genètics en un cromosoma o grup de lligament. El concepte de lligament entre marcadors genètics en l'herència va ser proposat fa quasi un segle per Morgan (1911), i el primer mapa genètic lineal, del cromosoma X de *Drosophila melanogaster*, el va publicar Sturtevant el 1913. La descoberta dels marcadors moleculars en nombre il·limitat per tot el genoma ha fet possible la construcció de mapes de lligament detallats en tots els organismes de reproducció sexual (vegeu la figura 4).

El mapatge de marcadors moleculars es basa en el principi que els gens i els marcadors segreguen per la via de la recombinació cromosòmica durant la meiosi, fet que en permet l'anàlisi en la descendència (Paterson, 1996). Els gens o marcadors que estan pròxims en el cromosoma es transmeten junts a la descendència amb una freqüència molt més elevada que els gens o marcadors que estan a una distància més gran. En una població segregant hi ha una barreja de genotips en què podem observar cada un dels parentals o recombinants. El nombre de genotips recombinants entre dos locus es pot fer servir per calcular la freqüència de recombinació i convertir-la en una mesura de distància genètica entre els locus. Com més genotips recombinants

apareixen entre dos locus, major és la distància genètica mesurada en centimorgans (cM). És a dir, la freqüència de recombinació és directament proporcional a la distància genètica entre els marcadors.

Anàlisi de caràcters quantitius

La diversitat present a les poblacions segregants, tant a escala morfològica com molecular, és una valuosa eina per estudiar les bases genètiques de l'herència de caràcters qualitius i quantitius. L'anàlisi dels caràcters quantitius (*quantitative trait loci*, QTL) és una manera de descriure la variació de les distribucions fenotípiques contínues i determinar el nombre de locus que controlen un caràcter fenotípic i, per tant, la seva segregació en la població (Tanksley, 1993). Una de les estratègies per identificar els gens implicats en un fenotip és l'aproximació per gens candidats o GC (Pflieger *et al.*, 2001). Es consideren GC els gens amb funció coneguda o suposada, relacionats amb caràcters d'interès i que poden correspondre a locus majors o QTL. Els gens aïllats en espècies model poden ser considerats com a GC per a altres espècies. Quan es coneixen a fons les vies metabòliques o fisiològiques d'un caràcter d'interès els GC s'escullen entre els gens implicats en la via. Quan no es coneix la seqüència del gen en l'organisme, podem recórrer a la informació d'altres espècies properes que ens permet dissenyar encebadors degenerats de regions conservades per tractar d'amplificar el gen. Per trobar seqüències en espècies properes hem de cercar en les col·leccions d'EST provinents de genoteques de cDNA. Per localitzar els gens candidats en genètica de plantes s'utilitzen dues estratègies: comparar la posició en el mapa genètic del gen candidat amb els locus associats al caràcter d'interès, i analitzar i comparar

la segregació d'un caràcter fenotípic en una població i el polimorfisme del gen candidat. La posició dels QTL pot ser bastant aproximada; un QTL pot cobrir regions amb centenars de gens, i són necessaris experiments de mapatge de precisió mitjançant encreuaments que confirmen la segregació del gen candidat o el marcador amb un QTL, amb càlculs estadístics d'associació. Aquesta anàlisi serà més complexa si el caràcter està controlat per més d'un gen (poligènic). Caldrien experiments de transformació gènica o silenciament per demostrar l'associació del QTL amb el gen candidat. Aquest mètode ha estat validat amb espècies com el tomàquet o l'arròs per a caràcters d'interès agronòmic, com la forma,

o aspectes relatius a la resposta a l'estrès hídric en arrels (Causse *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2006).

Els caràcters d'interès agronòmic tenen en general una herència quantitativa. Molts estan relacionats amb la maduració del fruit, definida com un conjunt de canvis que tenen lloc en el fruit en les darreres etapes de creixement. Aquest període està controlat genèticament i implica un ampli ventall de canvis bioquímics i fisiològics que comporten l'adquisició de qualitats organolèptiques i nutricionals que fan el fruit apte per al consum humà. Entre les modificacions més significatives destaquen canvis en el color, la textura, la mida, la forma, el contingut en sucres i àcids orgànics (res-

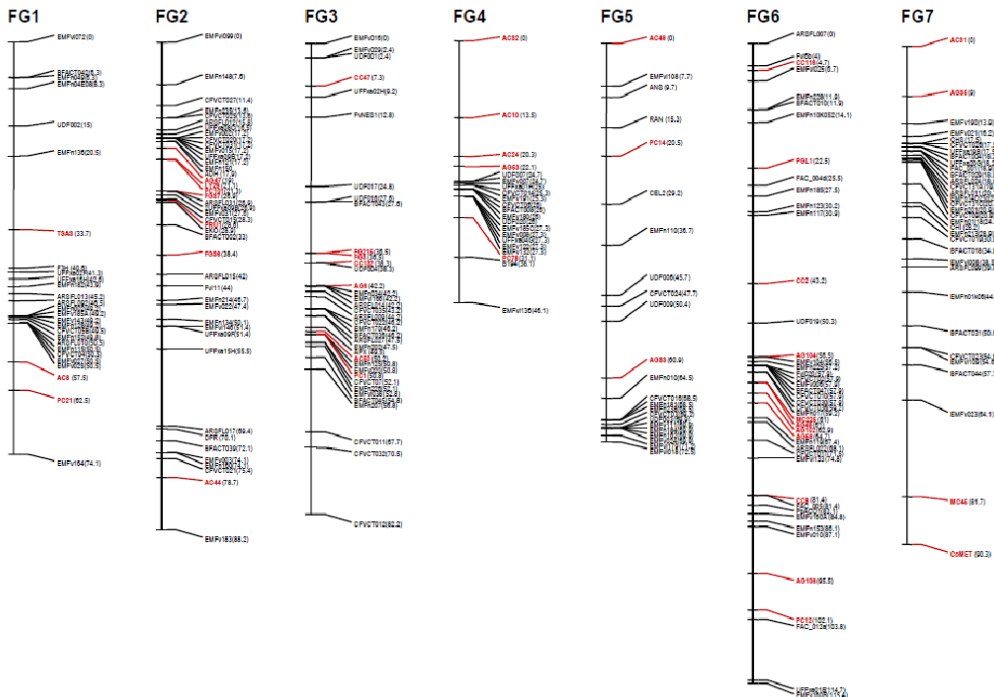


FIGURA 4. Mapa genètic de *Fragaria* construït amb el genotipatge dels 76 individus F2 de l'encreuament interespecífic entre *Fragaria vesca* × *Fragaria nubicola*. Distribució en set grups de lligament de 228 locus que cobreixen una distància de 569 cM. En negre els SSR i els gens, i en vermell els RFLP (Vilanova *et al.*, 2008).

ponsables del gust) i el contingut en substàncies volàtils (responsables de l'aroma).

precoç de la forma del fruit o el color de la polpa.

Selecció assistida per marcadors

El procés d'aplicar els marcadors moleculars per identificar QTL i utilitzar-los per seleccionar les plantes que presenten l'allel específic del marcador associat al caràcter és el que es denomina *selecció assistida per marcadors* (MAS, *marker assisted selection*). Aquest procés és diferent dels processos de modificació genètica perquè en aquest cas se selecciona l'individu que conté el gen, però no es modifica el seu material genètic. El marcador molecular utilitzat en selecció no sempre és el gen responsable de la variació del caràcter, sinó que pot ser un marcador o fragment de DNA proper al QTL i localitzat en el mapa perquè segrega igual que la variació del caràcter. Aquests marcadors són senzills i de baix cost, per utilitzar en grans poblacions. Una recombinació ens pot separar el marcador del QTL, però com més petita és la distància entre el marcador i el QTL més baixa és la possibilitat que se separin per recombinació. Com més polimòrfic és un marcador més efectiu serà en la selecció assistida.

La MAS ha estat utilitzada de manera àmplia en el cultiu de cereals, per exemple en el blat de moro, en què grans empreses com Monsanto o Syngenta han invertit grans capitals per utilitzar-lo de manera rutinària en la seva producció de llavors. La principal aplicació de la MAS es desenvolupa en el camp de la resistència a malalties en cereals, o en QTL associats a la fixació de nitrogen en plantes farratgeres. Els arbres fruiters, com la pomera, el préssec o la perera (Dirlewanger *et al.*, 2004) tenen grans programes de selecció assistida basats en SSR i SNP per augmentar la resistència a malalties o la selecció

CONCLUSIONS

L'ús de marcadors moleculars en la millora d'espècies vegetals es va generalitzar en la dècada dels noranta, en què apareixen una gran nombre de referències en espècies llenyoses, hortícoles i cereals. Els marcadors són usats en plantes per a l'estudi de la variabilitat genètica, la identificació de les diferents varietats o la selecció de plantes heterozigotes. En projectes de millora genètica els marcadors han servit per seleccionar noves varietats escollides perquè tenen unes determinades característiques d'interès en la planta o en el fruit.

L'efectivitat de la selecció assistida per marcadors en la millora genètica vegetal dependrà en primer lloc de l'existència d'un mapa d'alta densitat fet amb marcadors transferibles entre encreuaments. Molts dels caràcters agronòmics es comporten com a gens majors, incloent-hi resistència a patògens o característiques de fruit, fet que permet una aplicació millor de la MAS. Els QTL han d'estar flanquejats per gens estretament lligats a la variació del caràcter, ja que en cas contrari això implica recombinació entre el marcador i el QTL, i es reduirà la resposta a la selecció. Des del punt de vista genètic el coneixement dels genomes d'espècies properes permet l'ús de marcadors lligats a QTL en diferents espècies a causa de la conservació del DNA i la transferibilitat dels marcadors entre genomes de la mateixa família.

BIBLIOGRAFIA

- ALLARD, R. W. (1953). «Inheritance of some seed coat colours and patterns in lima beans». *Hilgardia*, 22: 167-177.
- BOURNIVAL, B. L.; SCOTT, S. W.; VALLEJOS, C. E. (1989). «An isozyme marker for resistance to race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in tomato». *Theor. Appl. Genet.*, 78: 489-494.
- CAUSSE, M.; DUFFE, P.; GOMEZ, M. C.; BURET, M.; ZAMIR, D.; GUR, A.; LEMAIRE-CHAMLEY, M. C.; ROTHAN, C. (2004). «A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition». *J. Exp. Bot.*, 55 (403): 1671-1685.
- DIRLEWANGER, E.; GRAZIANO, E.; JOOBEUR, T.; GARRIGA-CALDERÉ, F.; COSSON, P.; HOWAD, W.; ARÚS, P. (2004). «Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 101: 9891-9896.
- EAST, E. M. (1936). «Heterosis». *Genetics*, 21: 375-397.
- HALLAUER, A. R.; RUSSELL, W. A.; LAMKEY, K. R. (1988). «Corn breeding» A: SPRAGUE, G. F.; DUBLEY, J. W. [ed.]. *Corn and Corn Improvement*. Vol. 18. 3a ed. Madison: ASA, CSSA i SSSA, p. 463-564.
- HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. (1982). «A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6465-6469.
- HOCHHOLDINGER, F.; HOECKER, N. (2007) «Towards the molecular basis of heterosis». *Trends in Plant Science*, 12: 427-432.
- IMMER, F. R.; HENDERSON, M. T. (1943) «Linkage studies in Barley». *Genetics*, 28: 419-440.
- JOOBEUR, T.; VIRUEL, M. A.; VICENTE, M. C. de; JÀUREGUI, B.; BALLESTER, J.; DETTORI, M. T.; VERDE, I.; TRUCO, M. J.; MESSEGUER, R.; BATLLE, I.; QUARTA, R.; DIRLEWANGER, E.; ARÚS, P. (1998). «Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using an almond × peach F2 progeny». *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1034-1041.
- KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F. M. (1993). «A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers». *The Plant Journal*, 4: 403-410.
- LANDEGREN, U.; NILSSON, M.; KWOK, P. Y. (1998). «Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis». *Genome Res.*, 8: 769-776.
- LEE, M. (1995) «DNA markers and plant breeding programs». *Advan. in Agron.*, 55: 265-344.
- MEYER, S.; POSPISIL, H.; SCHOLTEN, S. (2007). «Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern». *Plant Mol. Biol.*, 63: 381-391.
- MORALES, M.; ORJEDA, G.; NIETO, C.; LEEUWEN, H. van; MONFORT, A.; CHARPENTIER, M.; CABOCHE, M.; ARÚS, P.; PUIGDOMÈNECH, P.; ARANDA, M. A.; DOGIMONT, C.; BENDAHMANE, A.; GARCIA-MAS, J. (2005). «A physical map covering the *nsv* locus that confers resistance to Melon necrotic spot virus in melon (*Cucumis melo* L.)». *Theor. Appl. Genet.*, 111: 914-922.
- MORGAN, T. H. (1911). «Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance». *Science*, 36: 718-719.
- NEWTON, C. R.; GRAHAM, A.; HEPTINSTALL, L. E.; POWELL, S. J.; SUMMERS, C.; KALSHEKER, N.; SMITH, J. C.; MARKHAM, A. F. (1989). «Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)». *Nucleic Acids Res.*, 17: 2503-2516.
- PATERSON, A. H.; LAN, T. H.; REISCHMANN, K. P.; CHANG, C.; LIN, Y. R.; LIU, S. C.; BUROW, M. D.; KOWALSKI, S. P.; KATSAR, C. S.; DELMONTE, T. A.; FELDMANN, K. A.; SCHERTZ, K. F.; WENDEL, J. F. (1996). «Toward a unified genetic map of higher plants, transcending the monocot-dicot divergence». *Nat. Genet.*, 14 (4): 380-382.
- PFLIEGER, S.; LEFEBVRE, V.; CAUSSE, M. (2001). «The candidate gene approach in plant genetics: a review» *Mol. Breed.* 7: 275-291.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring: Harbour Laboratory Press.
- STURTEVANT, A. H. (1913). «The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association». *Journal of Experimental Zoology*, 14: 43-59.
- SWANSON WAGNER, R. A. Y.; JIA, R.; DECOOK, L. A.; BORSUK, D. (2006). «All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F1 hybrid and its inbred parents». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 6805-6810.
- TANKSLEY, S. D.; MCCOUCH, S. R. (1997). «Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild». *Science*, 277: 1063-1066.
- TANKSLEY, S. D. (1993). «Mapping polygenes». *Annu. Rev. Genet.*, 27: 205-233.
- VILANOVA, S.; SARGENT, D. J.; ARÚS, P.; MONFORT, A. (2008). «Synteny conservation between two distantly-related rosaceae genomes: *Prunus* (the

- stone fruits) and *Fragaria* (the strawberry)». *BMC Plant Biology*, 8 (67): 1-12.
- VOS, P.; HOGERS, R.; SLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HOMES, M.; FREITERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. (1995). «AFLP: a new concept for DNA fingerprinting». *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407-4414.
- WELSH, J.; MCCLELLAN, M. (1990). «Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers». *Nucleic Acids Res.*, 18: 7213-7218.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIC, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. (1990). «DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers». *Nucleic Acid. Res.*, 18: 6531-6535.
- ZHENG, B. S.; YANG, L.; MAO, C. Z.; ZHANG, W. P.; WU, P. (2006). «Mapping QTLs and candidate genes for rice root traits under different water-supply conditions and comparative analysis across three populations». *Theor. Appl. Genet.*, 107 (8): 1505-1515.