

Nº. 6 Febrero 1996

# INIAP

REVISTA INFORMATIVA DEL INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO  
DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

- **Híbridos de arroz**
- **Biotecnología**
- **Leguminosas forrajeras**
- **Monitoreo de mosca en soya**
- **Nuevas variedades de papa**

ECUADOR

# LA BIOTECNOLOGIA EN LA CONSERVACION Y USOS DE LA AGRO-BIODIVERSIDAD

Raúl O. Castillo Torres, Ph. D.  
Departamento Nacional de Recursos  
Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF)-INIAP

## RESUMEN:

*La agro-biodiversidad denominada también Recursos Fitogenéticos, está constituida por genotipos o poblaciones de cultivares o variedades locales, líneas de mejoramiento, variedades mejoradas, grupos genéticos, especies silvestres y malezas emparentadas a los cultivos. Toda esta variabilidad se puede conservar mediante variados sistemas tales como: semillas, tejidos en medios de cultivo, plantas enteras en forma de huertos o arboretums, y en sus ambientes naturales o la conservación in situ. La importancia de la conservación de los recursos fitogenéticos está claramente definida, especialmente porque permitirá disponer de germoplasma para las presentes y futuras generaciones. Para mantener, evaluar y usar esta mega-biodiversidad, se puede hacer uso de las técnicas biotecnológicas, es decir a través de una serie de manipulaciones biológicas a nivel celular, tejidos y órganos, rescate de embriones, ingeniería genética, vacunas, marcadores moleculares, etc. En el contexto mismo de los recursos genéticos la biotecnología puede ayudar a mejorar la adquisición o intercambio de germoplasma, conservación, evaluación y usos a través de la transferencia y estudios del ADN.*

## INTRODUCCION



cuador y la Región Andina en general constituyen uno de los más grandes centros de dispersión de plantas cultivadas. Desde hace varios años se han iniciado una serie de actividades encaminadas a conservar

la agro-biodiversidad de plantas que están en proceso de erosión genética (Castillo, 1995a). Se han colectado varias muestras de germoplasma, que constituyen las accesiones o entradas del banco de germoplasma. Cada colección de germoplasma está formada por genotipos o poblaciones representativas de cultivares nativos o variedades locales, mate-

## *Passiflora* spp.



*Variabilidad de Passifloras.*

riales en proceso de mejoramiento, especies silvestres relacionadas a las plantas cultivadas y malezas útiles para el mejoramiento genético que está en proceso de domesticación. Las variedades locales o nativas son poblaciones que interactúan entre un medioambiente natural y cultural, al que han sido expuestas por períodos largos de tiempo y pueden ser las más importantes en términos de recursos genéticos (Harlan, 1993). Cultivares avanzados, especialmente los de origen reciente o provenientes del programa de fitomejoramiento, pueden ser incorporados con otros materiales durante el proceso de selección. Estas categorías de germoplasma, con los grupos genéticos obtenidos mediante mutaciones, líneas en proceso de mejoramiento con características específicas, o líneas con tolerancia o resistencia a enfermedades, plagas o condiciones medioambientales, juegan un papel muy importante en el proceso de mejoramiento genético de las plantas económicas, las que necesitan ser conservadas y evaluadas para una correcta identificación de su utilidad específica (Nieto, *et al*, 1982; Frankel, 1990).

El trabajo pionero del Botánico Ruso Nikolai Vavilov durante los años 1920 a 1940 constituye la base del proceso de conservación de recursos genéticos. Varias modificaciones al concepto de Vavilov (1951) sobre los “centros de origen de las plantas domesticadas”, dio origen al concepto de “centros de diversidad de plantas”. La ampliación de estos conceptos dio origen a la idea de los grupos genéticos de plantas (“gene pools”), que se basa en la relación entre grupos taxonómicos o lo que se conocen como “el concepto de especie biológica”. Estos conceptos han sido usados por los mejoradores de plantas debido a que se basa en la facilidad para transferir genes de un grupo taxonómico a otro, con mayor o menor facilidad.

Desde hace varios años se creía que la variación genética en plantas es abundante o ilimitada. Pero, es claro que la mayor parte de la variación existente en los centros de diversidad de plantas se extinguiría si no se toman medidas urgentes para conservarla. Los problemas de erosión genética se agudizaron con la introducción de nuevas técnicas y desarrollo

agrícola para alimentar a una creciente población, lo cual causó un profundo impacto en la agricultura tradicional, volviéndose un sistema "obsoleto" en términos de modernización, sin un análisis profundo sobre su estructura y contexto social. La riqueza en variabilidad genética existente dentro de un grupo genético tiene un enorme potencial de uso en el presente y en el futuro. La agro-biodiversidad no es reemplazable, una vez perdida, no habrá posibilidades de recuperarla, por ello es necesario que se tomen acciones para su conservación. Su uso potencial no solo está a través de la transferencia de genes vía cruzamientos convencionales, sino también a través del uso de modernos métodos biotecnológicos. La biotecnología no solo permite la transferencia de segmentos específicos del ADN entre especies, sin que pertenezca al mismo grupo de especies biológicas o grupos genéticos afines, también permite la transferencia del ADN de un organismo totalmente diferente (animal o bacteria) a una planta, a través de los procesos denominados como ingeniería genética. La biotecnología puede ser útil para un mejor manejo en todas las etapas de la agro-biodiversidad, es decir en los procesos de colección, conservación *ex situ* e *in situ*, evaluación morfológica y agronómica; y usos de la diversidad genética.

El presente artículo expone posibilidades del uso de la biotecnología en los procesos de manejo de los recursos fitogenéticos, llamada también agro-biodiversidad.

## EXPLORACION Y COLECCION

Debido a que la agro-biodiversidad está rápidamente desapareciendo por la introducción de cultivares uniformes, deforestación, actividades de desarrollo como: proyectos de irrigación, termoeléctricos, construcción de vías, urbanizaciones y los cambios de las prácticas agropecuarias así como hábitos de consumo de alimentos; hace que sean urgentes las actividades de exploración y colección de germoplasma. La biotecnología puede ayudar a reducir algunos impedimentos para un eficiente proceso de

colección a través de:

1. Proveer información sobre la disponibilidad de la diversidad genética en una área determinada; y
2. Desarrollando métodos apropiados de colección *in vitro*, especialmente en especies de reproducción vegetativa y aquellas que producen semillas recalcitrantes o difíciles de secarse (Withers, 1994).

Para iniciar trabajos de colección de germoplasma, es muy importante, en condiciones ideales, conocer la extensión y la distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones para poder realizar un adecuado muestreo. Aquí, el uso de marcadores moleculares para estudiar la diversidad genética de las poblaciones puede ayudar a entender mejor la distribución ecogeográfica de una especie. Los marcadores bioquímicos y moleculares son útiles ya que permiten realizar una adecuada colección, poniendo atención a regiones y tipos específicos. Por ejemplo, Miller y Tanksley (1990) demostraron que con el uso de Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLPs) se puede determinar la probabilidad de adicionar nuevos genes a la colección de tomate en un 20% más, si se colecta una nueva accesión de tomate silvestre *Lycopersicum peruvianum* de los Andes de Ecuador y Perú. Los estudios realizados en papas silvestres por Castillo (1995b) en la serie *Conicibaccata* muestra que hay básicamente tres grupos de especies dentro de esta serie: grupo diploides, tetraploides y hexaploides de México y Centro América y tetraploides y hexaploides de América del Sur después de usar la técnica de ampliación al azar del ADN (RAPDs) y los RFLPs del ADN del cloroplasto. Ello permitirá dirigir colecciones específicas de acuerdo a la distribución de estas especies y su relación filogenética o evolutiva.

Así mismo, el desarrollo de técnicas modernas de extracción del ADN ha permitido que se puedan realizar estudios de especímenes de herbario o fósiles. Estas mismas técnicas en pleno proceso de desarrollo permitirían coleccionar ADN directamente en

el campo. Todo esto ayudará a entender los patrones de diversidad genética y las relaciones filogenéticas entre las especies y de familias (Adams *et al.*, 1992).

En muchas expediciones de colección ha sido difícil encontrar semillas viables para formar una muestra adecuada, o simplemente las especies son de reproducción vegetativa o producen semillas recalcitrantes. Para estas especies se han desarrollado protocolos específicos y adecuados para coleccionar usando sistemas *in vitro*, o sea se toma un pedazo de planta y se deposita en un tubo de ensayo que contiene un medio de cultivo adecuado (Withers, 1994). Existen varios ejemplos prácticos sobre este método; uno de ellos en la colección de cacao (Yidana *et al.*, 1987) a través de coleccionar ramas jóvenes con meristemas en pleno proceso de crecimiento y depositarlos en el medio de cultivo elaborado previamente en el laboratorio. En INIAP-DENAREF durante los viajes de colección de *Passifloras silvestres*, que no producen semillas en cantidades adecuadas, se coleccionaron ramas jóvenes en tubos de ensayo y medio apropiado de cultivo, las que están en pleno proceso de crecimiento (Tapia C. y Muñoz L., comunicación personal).

### INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA

Dentro de la utilización del germoplasma de un banco, el intercambio de germoplasma es uno de los procesos más importantes del manejo de colecciones. Sin embargo, para realizar un acertado intercambio, tanto semillas como partes vegetativas deben ser estudiadas y analizadas tanto al momento del envío, cuanto a la recepción de la muestra. Rescate de embriones y germinación de semillas en medios apropiados de cultivo pueden ayudar a determinar si una muestra tiene problemas con enfermedades o parásitos.

La biotecnología es una herramienta muy eficaz para apoyar un intercambio seguro de germoplasma. Se han establecido guías técnicas generales para indexar enfermedades, identificar y erradicar virus a

través de técnicas de cultivos de tejidos y métodos bioquímicos tales como ELISA y otros. El Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos conjuntamente con la FAO han publicado una serie de guías técnicas para un intercambio seguro de germoplasma de especies de reproducción vegetativa tales como: cacao, cítricos, leguminosas, yuca, bananos, papa, vainilla, coco, caña de azúcar y camote, entre otros (FAO / IPGRI, 1989 a 1994).

El Centro Internacional de la Papa (CIP) en colaboración con algunos programas nacionales ha desarrollado tecnologías de producción de microtubérculos *in vitro* de papa (Estrella, 1990). Actualmente, se están desarrollando protocolos de producción de microtubérculos en tubérculos andinos como oca, melloco y mashua (véase el Plan Operativo Anual 1996, Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología del INIAP), complementando algunas experiencias obtenidas en la Universidad de San Marcos de Lima-Perú (R. Estrada, comunicación personal). Estos microtubérculos, son usados tanto para conservación a mediano plazo, así como para el intercambio de germoplasma.

### CONSERVACION DEL GERMOPLASMA

Al existir una extensa biodiversidad en Ecuador, la conservación a través de varios métodos es necesaria. De esta forma se protegerán los recursos que actualmente son declarados en la Constitución Política como "patrimonio nacional". Así se evitará la salida permanente de recursos genéticos a otros centros de conservación o instituciones de investigación internacional, trayendo como consecuencia la discusión de pertenencia y propiedad intelectual de los mismos (Castillo, 1991). Hay dos procesos de conservación de la agro-biodiversidad; *ex situ* e *in situ*, las dos alternativas no son excluyentes sino más bien se complementan mutuamente. Dentro de la conservación *ex situ* hay variados métodos de conservación en los que la biotecnología podría jugar un papel muy importante, al igual que en los planes de conservación *in situ*.

## a. Conservación *ex situ*

### 1. Semillas ortodoxas.-

El método de conservación de semillas es a través de reducir la temperatura de almacenamiento y la humedad de la semilla, estos dos factores controlados adecuadamente permitirán mantener la germinación de la semilla por períodos de tiempo considerablemente largos (20 - 50 ó más años), o sea intervalos de regeneraciones de germoplasma más largos comparados con semillas almacenadas a temperaturas ambientales y con humedad interna arriba del 10% (Ellis y Jackson, 1995). A pesar de que el almacenamiento de semillas en almacenes con bajas temperaturas (ej.: 18°C bajo cero), ayudan a prolongar la vida de la semilla, los métodos de almacenamiento a ultrabajas temperaturas (196°C bajo cero) o la criopreservación, ayudará a mantener las semillas por períodos más largos de tiempo. Sin embargo, la criopreservación ha sido mayormente usada para las especies de reproducción vegetativa o que producen semillas que no se pueden secar. Durante el proceso de conservación de semillas es necesario realizar monitoreos de la estabilidad genética de las accesiones, en este aspecto los marcadores moleculares son útiles. El uso de RFLPs o RAPDs puede ayudar a determinar la integridad genética de las accesiones mantenida durante la conservación o regeneración del germoplasma.

### 2. Especies de reproducción vegetativa, de semillas recalcitrantes y cruzamientos interespecíficos.-

Varios cultivos y frutales ampliamente usados en el mundo no producen semillas o sea, son de reproducción vegetativa, o producen semillas no aptas a secamientos internos, ya que al hacerlo produce la muerte inmediata del embrión, a estas semillas se las denomina "recalcitrantes". La conservación de este grupo de materiales en un banco de germoplasma es a través de las "colecciones en campo", o manteniendo plantas vivas, con el consiguiente riesgo de plagas y enfer-



*Conservación in vitro de tubérculo andino.*

medades, desastres naturales, y costos altos de mantenimiento. La alternativa ha sido usar otros métodos biotecnológicos que garantizan la conservación de estas especies:

### Cultivo de Tejidos.-

Este método requiere del desarrollo de un medio de cultivo adecuado para cada especie, e incluso dentro de especies para variedades. Una vez encontrado el medio apropiado para el establecimiento y micropropagación, se requiere mantener al mínimo el crecimiento de las plántulas, o en muchos casos detenerla. Para conseguir un crecimiento lento de plántulas, se pueden usar entre otros los siguientes procesos:

1. Usar cigotes - embriones inmaduros,
2. Modificación del medio de cultivo mediante el uso de inhibidores hormonales u osmóticos o retardadores de crecimiento,
3. Reducción de la temperatura de almacenamiento (4 - 10°C para especies de clima frío y 15 - 25°C para especies tropicales),
4. Colocar aceite mineral sobre el medio de cultivo,
5. Reducir la tensión de oxígeno; y,
6. Defoliación de los tallos (Withers, 1991).

Sin embargo, una regeneración y propagación exitosa de plántulas genéticamente estable es el prerequisite de cualquier sistema de conservación *in vitro*.

Para muchas especies los protocolos ya establecidos son fácilmente adaptables, pero para otras especies, se requiere más investigación y desarrollo. Es importante tomar en cuenta que los métodos a usarse mantengan la integridad genética. Generalmente, tejidos bien establecidos y organizados son los más apropiados, entre ellos están las puntas de tallos jóvenes y microtubérculos en el caso de especies tuberosas. En los procesos de micropropagación, si hay presencia de callos, estos pueden ayudar a producir variación somaclonal.

Hay dos problemas claves con el uso del sistema de conservación *in vitro*:

1. La estabilidad genética de los materiales conservados, debido a la variación somaclonal durante el proceso de regeneración del tejido a plántulas, y
2. El tiempo de almacenamiento como tejidos es muy limitado (Rao y Riley, 1994). El uso de marcadores moleculares puede ayudar a determinar la estabilidad genética de las accesiones conservadas mediante cultivo de tejidos, RFLPs, RAPDs o ALFPs pueden ser muy útiles en este análisis. Los resultados podrían direccionar hacia una modificación de méto-

dos o medios de cultivo.

### **Crioconservación.-**

El uso de nitrógeno líquido que mantiene temperaturas de 196°C bajo cero, teóricamente es el mejor sistema de conservación a largo plazo. Las semillas son sumergidas en el líquido o colocadas en el área de influencia del vapor del líquido y se detiene todo proceso o actividad metabólica de cualquier tejido viviente, sean estas semillas, suspensión de células, callos, tejidos en medio de cultivo, polen, cigotes - embriones, meristemos, etc. Los pasos principales que se siguen en este proceso de criopreservación de materiales en cultivo de tejidos son: selección, corte del tejido u órgano y cultivo del material original, selección de materiales sanos, pre-crecimiento de los explantes, aplicación de crioprotectantes, enfriamiento / congelamiento, almacenaje, luego calentamiento / humedecimiento, tratamiento luego de humedecer, pruebas de viabilidad y crecimiento o recuperación (Escobar *et al.*, 1993). Ejemplos exitosos de este método de conservación se reportan en más de 12 especies (Charrier *et al.*, 1991). Los estudios de estabilidad genética realizados en los cultivos mantenidos mediante este método han demostrado que no hay cambios genéticos.

Algunas ventajas de este método son:

1. Mantenimiento de la integridad física y estabilidad genética de los tejidos por períodos largos,
2. Es relativamente económico, y
3. Los materiales conservados son fácilmente accesibles.

### **Semillas sintéticas o artificiales.-**

Es una alternativa de conservación de especies de reproducción vegetativa o con semillas recalcitrantes. Se encapsulan los meristemos o em-

## cpADN, TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS de RESTRICCIÓN POLIMORFICOS



briones en un material semisólido que sirve como cubierta y endospermo de una semilla. Esta cubierta contiene nutrientes y pesticidas. Los embriones somáticos y las puntas meristemáticas no tienen tolerancia a desecación y son muy activos, estas cubiertas ayudan a mantener estos tejidos vivos a través de proveer nutrientes y hormonas necesarias para un normal desarrollo. Una serie de proyectos de investigación están en marcha para perfeccionar esta técnica que se presenta prometedora para los procesos de conservación.

### Conservación del ADN o bancos de genes.-

Con el desarrollo de la ingeniería genética, hoy en día no existen barreras para transferir genes de un organismo a otro, incluso de animales a plantas. Este importante evento ha permitido el establecimiento de las bibliotecas del ADN ("DNA libraries") que contienen genes únicos útiles para los programas de mejoramiento o incluso se ha sugerido que la información genética de un organismo sea almacenado en forma de biblioteca de ADN (Benford, 1992). Actualmente existen varios centros mundiales donde se depositan estas librerías del ADN, a las que biólogos moleculares

tienen acceso para continuar con sus investigaciones. El ADN puede ser obtenido de muestras de herbario o fósiles. Este tipo de almacenamiento podría reemplazar a otros procesos de conservación de germoplasma, los que podrían ser obtenidos de muestreos de herbarios o fósiles.

### **b. Conservación *in situ*.-**

La conservación *in situ* ayuda a mantener la diversidad genética en su habitat natural donde la planta ha evolucionado a través de los siglos. La conservación del germoplasma puede hacerse en áreas de reserva natural o a nivel de finca de agricultor, dependiendo del material que se desea conservar. Este tipo de conservación es dinámico, opuesto al sistema estático de conservación *ex situ* y provee a la especie o población de una oportunidad para evolucionar y desarrollarse bajo condiciones naturales. Actualmente, la perspectiva de conservación *in situ* no es solo desde el mejorador de plantas, sino también desde el conservacionista preocupado por el mantenimiento de la variabilidad en pequeñas poblaciones o especies en peligro de extinción.

Las siguientes podrían ser las áreas principales



de investigación biotecnológica necesaria para un proceso de conservación *in situ*:

1) Determinar la variación genética representada en áreas específicas para documentar los patrones generales de esa variación geográfica; este análisis puede realizarse usando isoenzimas o variación del ADN mediante RFLPs, 2) estudios de erosión genética debido a la introducción de variedades mejoradas, 3) identificación de regiones con alta variabilidad genética, 4) cambios temporales y espaciales de la estructura genética de las poblaciones, 5) estudios bio-geográficos, especialmente si hay procesos de introgresión, 6) áreas y tamaños de poblaciones mínimas viables, y 7) efectos de autopolinización. Las técnicas moleculares pueden ser útiles para rápidamente determinar los patrones de distribución o composición de la diversidad genética.

## CARACTERIZACION y EVALUACION

Las colecciones de diferentes especies conservadas deben ser adecuadamente evaluadas para que puedan ser usadas en los diferentes programas de mejoramiento genético, agroindustria, estudio de evolución, etc. Para usar exitosamente la variabilidad genética de un amplio grupo genético, se necesita conocer los atributos genéticos, así como los caracteres agronómicos beneficiosos disponibles en el germoplasma conservado, esto se consigue únicamente luego de realizar una evaluación sistemática de las colecciones.

La caracterización y evaluación podría tener dos funciones principales: a) Los datos registrados de cada accesión o entrada de una colección sirve de diagnóstico que le permite al responsable de la colección observar si la accesión mantiene su integridad genética a través del tiempo y b) se relaciona con el uso mismo de la accesión. El registro de los datos mencionados anteriormente ayudará al usuario a identificar accesiones con caracteres deseables para el proceso de mejoramiento, industria, medicina, fitoquímica, etc. En términos de mejoramiento de plan-

tas, las evaluaciones agronómicas y de caracteres de interés económico se realizan por grupos de especialistas.

Estos caracteres generalmente son gobernados por varios genes (poligenes) y son altamente influenciados por el medio ambiente.

Generalmente, y hasta hace poco tiempo, la caracterización y evaluación de la agro-biodiversidad se basaba en el registro de datos morfológicos cualitativos o cuantitativos. Desde hace poco más de una década, el uso de marcadores bioquímicos (isoenzimas) y recientemente marcadores moleculares (RFLPs, RAPDs, Fragmentos de Restricción Amplificados (ALFPs), Microsatélites, Secuenciación del ADN, etc.) han tenido mucho énfasis en la evaluación de las colecciones. El uso de isoenzimas que tienen herencia Mendeliana es fácil para la mayoría de especies, sin embargo, el número de marcadores que se pueden localizar son muy pocos. Los marcadores moleculares, tienen muchas ventajas sobre los caracteres morfológicos, proteínas y flavonoides en:

1. No están influenciados por el medioambiente,
2. Puede usarse cualquier parte de la planta,
3. No hay límite de muestras a usarse,
4. Requiere pequeñas cantidades de tejido vegetal,
5. El ADN es muy estable en condiciones de un refrigerador común,
6. Puede obtenerse y registrar un ilimitado número de datos.

Sin embargo, algunas desventajas de sus usos son:

1. Generalmente caracteriza una pequeña parte del genoma y no necesariamente están relacionados a caracteres morfológicos,
2. Muchos de ellos son costosos y requieren de equipos especiales.

Las principales áreas en las que la biotecnología a

través de los marcadores moleculares puede apoyar en la caracterización de germoplasma son:

1. Identificación de genotipo y duplicados dentro de una colección,
2. Determinación del patrón genético o genotipos ("finger printing"),
3. Análisis de la variabilidad genética de una colección; y,
4. Establecimiento de colecciones núcleo (core collection).

La determinación de la variabilidad genética en bancos de germoplasma ha sido estudiada ampliamente con el uso de isoenzimas y marcadores moleculares (Clegg, 1990, Tanksley *et al*, 1989). Estudios de variación en la secuencia o código genético del ADN en base a genes de copias simples y genomas de organelos han sido usados en muy pocos casos. El énfasis más bien ha sido en la construcción de mapas genéticos, usando una combinación de RFLPs, RAPDs e isoenzimas en cultivos como arroz, maíz, tomate, papa, fréjol común y otros.

Las principales técnicas para el estudio de la diversidad genética y mapeo de genes en los cromosomas han sido desarrolladas rápidamente o continúan en proceso de desarrollo. Muchas de ellas se tornan obsoletas en pocos años al aparecer diariamente nuevas alternativas. Una descripción resumida de las técnicas más importantes es:

1. Fragmentos de restricción polimórficos (RFLPs), es una técnica de marcaje de una porción del ADN, para establecer la localización de una fracción del ADN en el cromosoma, que pueda ayudar en los procesos de selección de un programa de mejoramiento, denominado selección con ayuda del marcador molecular. Los RFLPs se usan en estudios taxonómicos y filogenéticos, especialmente usando el ADN de los organelos como cloroplasto o mitocondria. Generalmente es una técnica que usa radioisótopos con  $^{32}\text{P}$ , aunque existen técnicas no-radioactivas que se están desarrollando;

2. Fragmentos polimórficos del ADN amplificados al azar (RAPDs), se basan en las técnicas de PCR (reacción en cadena de una polimerasa). Esta técnica es simple y rápida requiere cantidades muy pequeñas de ADN, cuyo producto final es una adecuada cantidad de ADN amplificado apto para cualquier estudio. El problema de los RAPDs, a diferencia de los RFLPs es que generalmente tiene una segregación dominante, es decir la ausencia de la banda no necesariamente indica ausencia del marcador, sino que puede tratarse de un carácter recesivo. Algunas bandas o marcadores de RAPDs pueden segregarse en forma codominante por lo que pueden ser usados en estudios genéticos o establecer relaciones o ligamientos con ciertos caracteres agronómicos. Los RAPDs pueden ser útiles en estudios de diversidad genética dentro y entre poblaciones, ayudar a mapear genes complementando a los RFLPs, y establecer el patrón genético de una población;

3. Otro tipo de marcador molecular es el número variable de repeticiones en tandem (VNTRs), que son básicamente un núcleo de secuencias de ADN que se repite en series, los que dependiendo del tamaño pueden ser micro o minisatélites. Este marcador es muy útil en situaciones de locus simple, que ayuda a identificar individuos o sus padres. En casos de encontrar polimorfismos en múltiples locus, se puede usar en procesos de selección durante el mejoramiento de una variedad o la selección basada en el marcador molecular, también puede ser muy útil para determinar la relación entre accesiones y la variación genética;

4. La secuenciación del ADN usando el método de reacción en cadena de una polimerasa (PCR) para secuenciar regiones específicas del ADN o genes específicos. Luego de amplificar la región específica se procede a secuenciar el ADN o descifrar su código genético. Este proceso puede hacerse manualmente o usando máquinas secuenciadoras automáticas que secuencian

numerosas muestras de germoplasma. Esta técnica es muy útil en el estudio de poblaciones, taxonomía y/o filogenia.

Varias técnicas pueden ser usadas para caracterizar la variabilidad genética, al momento mismo de escribir este artículo, nuevas técnicas están desarrollándose. Hay miles de ejemplos en la literatura sobre la utilidad de los mismos. Las aplicaciones más comunes en forma resumida son:

1. Se puede establecer los límites de la variación genética de los cultivos,
2. Análisis de la pureza de líneas homocigotas,
3. Selección de los padres que serán recurrentes en los métodos de mejoramiento por cruzamientos recíprocos,
4. Identificación de cultivares,
5. Determinación de la fusión de híbridos simples, dobles o triples,
6. Estudios de la variación somaclonal a nivel molecular,
7. Distribución de la variabilidad genética por regiones,
8. Movimiento de genes de poblaciones silvestres a cultivadas, método que ayudaría a determinar si existe flujo de genes de variedades transgénicas a especies afines, sean estas silvestres o malezas. Esto ayudará a observar el comportamiento de materiales transgénicos para fines de regular el uso de los mismos, dentro de los procesos de bioseguridad; y,
9. Estudios taxonómicos y filogenia de especies y poblaciones conservadas en un banco de germoplasma.

## BIOSISTEMATICA Y EVOLUCION DE CULTIVOS

Si existe claridad y entendimiento sobre la evolución de una especie determinada, su relación con otras especies que pertenecen al mismo o diferente grupo genético, se podrá establecer con claridad los proce-

sos de conservación de la agro-biodiversidad. Hace poco tiempo, la mayor parte de taxónomos usaban los caracteres morfológicos para estudiar y entender la botánica sistemática, las relaciones entre especies y la evolución del grupo taxonómico en estudio. Recientemente se usaron marcadores bioquímicos como las isoenzimas para analizar las relaciones interespecíficas (Gepts, 1990 en fréjoles, Doebley, 1989 en maíz, Rick y Holle, 1990 en tomate). Actualmente, y desde hace una década aproximadamente, se ha incrementado el uso de técnicas moleculares en gran escala.

Los marcadores moleculares pueden ayudar a tener un buen conocimiento de las relaciones entre especies y las homologías entre genomas lo que facilitará la transferencia de genes e incluso la sustitución de cromosomas de una especie a otra. Este proceso puede apoyar en dos áreas principales:

1. Dirigir las incogénicas sobre las relaciones filogenéticas entre especies, y
2. Como dirigir las preguntas acerca de la evolución del carácter (dónde, cuándo y cómo provino el estado del carácter). Es el segundo punto más importante de aplicación donde la filogenia basada en los sistemas moleculares ha tenido su mayor impacto en sistemática, evolución, genética y ecología (Sytsma, *et. al.*, 1991).

Varios ejemplos han sido publicados en la literatura sobre el uso de marcadores moleculares en estudios taxonómicos y filogenéticos. Desde hace muchos años (Stebbins, 1957 y otros investigadores) propusieron la hipótesis sobre el origen de varias especies vía hibridación. Sin embargo, no se ha podido comprobar esta hipótesis a través de la obtención de híbridos sintéticos, estudios morfológicos, compuestos secundarios, datos ecológicos y geográficos. Esto es debido a que, en el caso de los híbridos obtenidos, no se puede analizar con claridad los caracteres que muestran herencia cuantitativa. La solución ha sido el uso de marcadores moleculares transmitidos de una generación a otra desde ambos padres o sea el genoma nuclear. En otros casos

usando el genoma de uno de los padres o heredado desde el citoplasma, el cloroplasto o la mitocondria. Si por ejemplo una especie se derivó a través de una hibridación reciente, el taxón debe combinar los alelos de los posibles padres y tener el ADN del cloroplasto similar a uno de ellos. Uno de los ejemplos más claros que demuestran la teoría de origen por hibridación es el realizado por Riesberg *et al.*, (1990) quienes combinaron datos de isoenzimas, RFLPs del cloroplasto y el ADN ribosomal para estudiar el origen de dos especies de girasol *Helianthus neglectus* y *H. paradoxus* que tuvieron su origen a través de hibridaciones entre *H. annuus* y *H. petiolaris*. Estos marcadores moleculares mostraron con claridad el origen por hibridación de estas dos especies, que fue muy difícil demostrarlo a través de cruzamiento o estudios morfológicos.

Otros estudios como los de Spooner, *et al.*, (1993) demostraron que dos géneros *Lycopersicon* y *Solanum* de la familia Solanaceae, constituyen un solo género y los dos pertenecen al subgénero *Potatoe*, de esta manera el estudio sugirió cambiar de nombre de *Lycopersicon esculentum* a *Solanum lycopersicon*. Así mismo estudios realizados combinando datos del ADN del cloroplasto y morfológicos de un grupo de papas silvestres, la serie *Conicibaccata*, muestran que las especies mexicanas *S. agrimonifolium* y *S. oxycarpum* son especies ancestrales de las especies tetraploides de América del Sur, y la forma diploides de este grupo forman un grupo independiente, (Castillo, 1995b), sugiriendo por tanto que las especies diploides de esta serie taxonómica no fueron los ancestros directos de las especies poliploides como se había sugerido anteriormente en base a análisis morfológicos (Hawkes, 1990).

## USOS DE LA AGRO-BIODIVERSIDAD

Siendo el principal objetivo de un banco de germoplasma dar un uso adecuado y oportuno al germoplasma conservado, así como un uso adecuado de la agrobiodiversidad disponible, los métodos biotecnológicos como son los marcadores moleculares

pueden ser de gran ayuda para un mejor uso de esta biodiversidad.

Los marcadores moleculares podrían ayudar enormemente en los procesos de fitomejoramiento. El uso de RFLPs puede acelerar la obtención de una variedad mejorada dentro de un programa de cruza amplias. Por ejemplo al usar la técnica del cultivo *in vitro* de embriones en un programa de cruzamientos, los RFLPs permitirían una caracterización segura y rápida en desarrollos tempranos de las plántulas, sin esperar que maduren para proceder al análisis genético.

El mapeo de cromosomas usando RFLPs, RAPDs, u otros marcadores proveerá un uso más adecuado de la diversidad genética con amplio polimorfismo. En pocos años tendremos mapas completos o saturados de todas las especies cultivadas. Esto ayudará a determinar la localización del gen en el cromosoma, así como determinar si se transmite o no a la progenie en un programa de fitomejoramiento tradicional o vía ingeniería genética.

Otro uso importante de los marcadores moleculares con programas de mejoramiento es a través del uso del marcador (s) para un programa de selección, lo que se denomina "mejoramiento con la ayuda de marcadores moleculares". Esta técnica permite seleccionar materiales sin esperar que produzcan semillas, simplemente se determina si una progenie heredó el marcador o no a través del uso del ADN extraído de hojas jóvenes. Al determinar con exactitud en cual (es) planta (s) se encuentra el marcador, se seleccionan solamente las plantas con marcadores para las siguientes fases de selección.

Las técnicas de cultivo de tejidos, que son parte de los procesos biotecnológicos, ayudan grandemente para regenerar plantas provenientes de embriones de cruza interespecíficas, que permite transmitir genes que de otra forma sería imposible. La técnica de fusión de protoplastos ha permitido igualmente transferir genes de dos especies diferentes o incluso géneros dentro de un pool de genes determinado.

Otras técnicas de cultivo de tejido han ayudado en programas de mejoramiento por selección bajo condiciones de estrés, o tolerancia a herbicidas, salinidad, pH del suelo, etc.

El éxito de un programa de ingeniería genética mayormente está basado en la facilidad de reproducir plantas en medios de cultivo y luego transportarlos a macetas y suelo. Muchos trabajos en esta área se han visto truncados por la falta de protocolos de cultivo de tejidos adecuados para la regeneración de plantas genéticamente transformadas.

Los usos oportunos y adecuados de la agro-biodiversidad, en países en desarrollo como Ecuador, estará basada en cuanto se puede avanzar en el perfeccionamiento y aplicación de las técnicas biotecnológicas. Los países desarrollados son los principales usuarios de la diversidad genética a través de la biotecnología. Por tanto Ecuador debe participar de estos avances tecnológicos para aprovechar la diversidad biológica y no esperar que la tecnología sea más cara y difícil de acceder.

## REFERENCIAS

- ADAMS, R. P. N. Do and C. Ge-Lin 1992.** Preservation of DNA in plant specimens from tropical species by desiccation. *In* Adams, R.P. and J. E. Adams (Eds.). Conservation of Plant Genes. DNA Banking and *in vitro* Biotechnology. San Diego, USA. Academic Press Inc. pp. 153 - 181.
- BENFORD, F. 1992.** Saving the "library of life". *Proc. Natl. Acad. Science. USA* 89: 11098 - 11101.
- CASTILLO, R. 1991.** Recursos fitogenéticos: distribución y pertenencia. *In* Castillo, R. C. Tapia y J. Estrella (Eds.). Memorias de la Segunda Reunión Nacional sobre Recursos Fitogenéticos. Editora Porvenir. Quito - Ecuador.
- CASTILLO, R. 1995 (a).** Plant. Genetics Resources in the Andes: Impact Conservation and management. *Crop Science* 35 (2): 355-360.
- CASTILLO, R. 1995 (b).** Phylogenetic relationships in wild potatoes (*Solanum* sect. *petota*) ser. *Conicibaccata*. Ph. D. Thesis. University of Wisconsin, Madison, USA.
- CLEGG, M. T. 1990.** Molecular diversity in plant populations. *In* Brow, A. H. D., M. T. Clegg, Al. Kahler, y B. S. Weber (eds.). Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland, Sinawer Associates Press., pp. 99-116.
- CHARRIER, A. J. DEREUDRE and F. ENGLEMAN. 1991.** The implications of biotechnology in germplasm conservation and utilization. *In* Ng, N. Q. O., Perrino, F. Attese and H. Zedan (eds.). Crop Genetic Resources of Africa. Vol. II. Ibadan, Nigeria. IITA/IBPGR/UNEP/CNR. pp. 279-286.
- DOEBLEY, J. 1989.** Isozymic evidence and the evolution of crop plants. *In* Soltis, D. E. and D. S. Soltis (eds.). Isozymes in Plant Biology. Portland, USA. Diocoridis Press. pp. 165-199.
- ESCOBAR, R.H. W. M. ROCA y G. MAFLA, 1993.** Cryopreservation of cassaba root tips. *In* Roca, W. M. and Thro, A. M. (eds.). Proceedings of the first International Scientific Meeting of the Cassaba Biotechnology Network. Cartagena-Colombia. CIAT, Cali-Colombia, pp. 116-121.
- ELLIS, R. H. y M. J. JACKSON. 1995.** Accession regenerations in genebanks: Seed production environment and the potential longevity of seed accessions. *Plant Genetic Resources Newsletter* 102: 26-28.
- ESTRELLA, J. 1990.** Producción de microtubérculos *in vitro* de tres variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Santa Catalina-INIAP. Tesis Ing. Agrónomo Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador.
- FAO/IPGRI, 1989-1994.** FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. IPGRI, Roma, Italia.

- FRANKEL, O. H. 1990.** The future of the global genetic resources: Activation or dissolution? *Diversity 6*: 59-60.
- GEPTS, P. 1990.** Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) beans. *Economic Botany 44*: 28-38.
- HARLAN, J. 1993.** *Crops and Man. 2nd edition.* American Society of Agronomy. Madison, WI, USA.
- HAWKES, J. 1990.** *The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources.* Smithsonian Institution Press. Washington. D.C.
- MILLER, J. C. and TANKSLEY, S. D. 1990.** RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics 80*: 437-448.
- NIETO, C.J. REA, R. CASTILLO y E. PERALTA 1983.** Guía para el manejo y preservación de los recursos fitogenéticos. *Boletín Misceláneo n° 47.* INIAP. E. E. Sta. Catalina. Quito - Ecuador.
- RAO, V. R. y K. W. RILEY. 1995.** The use of biotechnology for conservation and utilization of Plant Genetic Resources. *P. G. R. Newsletter 97*: 4-19.
- RICK, C. M. and M. HOLLE. 1990.** *Andean Lycopersicon esculentum var. cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance. *Econ. Botany 44*: 69-78.
- RIESBERG, L. H. R. CARTER y S. ZONA. 1990.** Molecular tests of the hypothesized hybrid origin of two diploid *Helianthus* species (Asteraceae). *Evolution 44*: 1498-1511.
- SPOONER, D. M. G. J. ANDERSON y R. K. JANSEN. 1993.** Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes and pepinos (Solanaceae). *Am. J. Botany 80*: 676-688.
- STEBBINS, G. L. 1957.** The hybrid origin of microspecies in the *Elymus glaucus* complex. *Cytologia. Supl. Vol.*: 336-340.
- SYTSMA, K. J., J. F. SMITH y P. E. BERRY 1991.** The use of chloroplast DNA to assess biogeography and evolution of morphology, breeding systems, and flavonoids in *Fuchsia* sect. *Skinnera* (Onograceae). *Systematic Botany 16*: 257-269.
- TANKSLEY, S. D., N. D. YOUNG A. H. PATERSON y N. W. BONIERBACE. 1989.** RFLP Mapping in Plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology 7*: 257-264.
- VAVILOV, N. I. 1951.** *the origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants* (translated by K. Starrechester). Ronald Press Co. New York, USA.
- WITHERS, L. 1994.** New technologies for the conservation of Plant Genetic resources. *In. Proceedings of the International Crop Science Congress of America.* Iowa, Crop Science Society of America. pp. 429-435.
- YIDANA, J. A., L. A. WITHERS y J. D. IVINS. 1987.** Development of a simple method for collecting and propagating cocoa germplasm *in vitro*. *Acta Horticultural 212*: 95-98.