

TRAZABILIDAD GENÉTICA DE VARIETADES FRUTALES MEDIANTE HERRAMIENTAS MOLECULARES

La necesidad de contar con sistemas eficaces y rápidos para asegurar la calidad genética o autenticidad varietal de plantas frutales y de sus productos, las frutas, ha llevado a implementar sistemas de trazabilidad genética basados en marcadores moleculares de tipo microsatélites especie-específicos, con el fin de proteger los derechos de los obtentores y de contar con sistemas de trazabilidad para la propagación de plantas.

La constante necesidad de mejorar calidad y rendimiento ha producido en el último siglo una enorme cantidad de variedades en casi todas las especies cultivadas. En el ámbito frutícola, que es uno de los ejes principales de la agroindustria exportadora chilena, cerca de la totalidad de las variedades cultivadas son resultado del mejoramiento y selección de programas de *breeding* de empresas o instituciones de países del hemisferio norte, principalmente Estados Unidos y Europa.

Un aspecto determinante para la comercialización de estos productos agrícolas es su correcta identidad genética (ID), considerado un factor clave de calidad. Si bien en muchos casos esta ID es factible se realizar mediante un análisis morfo-agronómico de plantas y frutas (que en el caso de las vides recibe el nombre particular de ampelografía), hay otros en que estos criterios son de difícil aplicación (por ejemplo, alta similitud morfológica de variedades de arándano –ver fotos–; estrecha relación genética entre variedades y sus progenitores; inexperiencia del evaluador, etc.), con obvias posibilidades de confusión debido a la interacción del genotipo con el medio ambiente (efecto GxE), al estado fitosanitario o a la etapa del desarrollo de las plantas.

Una de las etapas esenciales en la cadena productiva es la propagación de plantas en viveros. Allí, la correcta identificación de las variedades desde etapas tempranas, a partir de las plantas madres y bloques de incremento, es el momento clave para establecer un sistema de trazabilidad que



Similitud morfológica dificulta identificación de variedad.

garantice la ID de las plantas propagadas y distribuidas a los productores.

Con el fin de implementar una metodología eficaz y eficiente para lograr estos propósitos en diversas especies frutales, INIA en conjunto con el SAG y con el respaldo de la Asociación Nacional de Productores de Semillas (ANPROS), ocho viveros frutícolas nacionales y la Corporación para el Desarrollo Viverístico, además de dos laboratorios de análisis genético (Bioscan y Genytec), desarrollaron un proyecto financiado principalmente por FONDEF, apoyado FingerFruta, cuyos principa-

les resultados enfocados a resolver esta problemática en siete de los frutales más importantes para Chile –vides, manzanos, carozos (nectarines y duraznos, cerezos y ciruelos), frutillas y arándanos–, se presentan a continuación.

Cómo se identifican genéticamente variedades de plantas

Desde un punto de vista metodológico, actualmente la mejor forma para la ID genética de plantas y diferenciación de variedades es el análisis de regiones específicas del genoma (ADN cromoso-

Patricio Hinrichsen R.

Bioquímico, Dr.

phinrichsen@inia.cl

INIA La Platina



mal) de las plantas, conocidos como marcadores moleculares (MM). Los MM más eficientes que se usan hoy para trazabilidad genética son los denominados microsatélites, abreviados también como SSR o Secuencias Simples Repetidas, es decir, secuencias cortas de entre 1 y 5 nucleótidos que se repiten usualmente entre 5 y 20 veces, y que se encuentran repartidas profusamente a lo largo de todos los cromosomas. Su principal ventaja respecto de otros MMs es que combinan una alta variabilidad con un excelente comportamiento en electroforesis, por lo cual se obtienen resultados de fácil interpretación aplicables tanto en identificación de variedades como en diversos estudios genéticos. Un ejemplo que muestra la diferenciación de variedades de arándano se presenta en la figura 1.

Existen numerosos marcadores de SSR descritos para la mayoría de las especies de plantas cultivadas, incluyendo a gran parte de los frutales. La mayor parte de esta información se encuentra disponible en revistas especializadas. En este sentido, destaca la importancia que se le atribuye en algunos países al mantenimiento de colecciones que preservan la

Cuadro 1. Especies, número de variedades, de marcadores ensayados y número mínimo de marcadores requeridos para diferenciar las variedades

Especie	N° variedades	N° SSR ensayados	N° SSR ID*
Vid	90	100	6
Manzano	75	19	4
Nectarines + durazneros	125	24	16
Ciruelos	64	12	10
Cerezos	58	10	6
Frutillas	22	8	4
Arándanos	94	12	3
Total	528	185	49

*Número mínimo requerido para diferenciar las variedades estudiadas de cada especie, o N° recomendado por expertos (publicaciones especializadas).

diversidad propia de cada especie, género o familia de plantas (germoplasma), incluyendo las variedades tradicionales. Para este trabajo, el acceso a estas colecciones, principalmente de EE.UU. y países europeos, ha sido clave para completar las bases de datos preparadas en INIA.

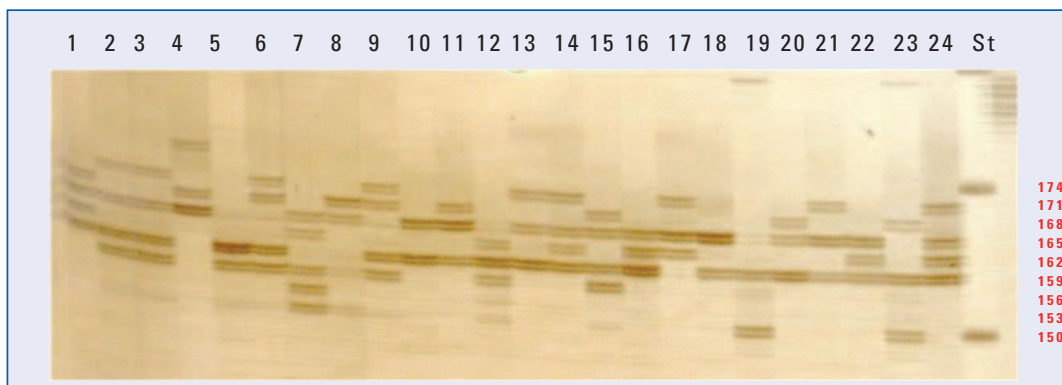
Alcances técnicos del proyecto

La principal contribución de este trabajo fue evaluar y validar un conjunto mínimo de SSRs en las especies de interés del proyecto. Cada una de ellas presenta diferentes niveles de diversidad

genética y de ploidía, lo que hizo necesario identificar los marcadores más informativos y ajustar los protocolos analíticos en cada caso. En todas las especies se consideraron las variedades incluidas en el Registro de Variedades Protegidas del Servicio Agrícola y Ganadero (RVP-SAG), y también el mayor número posible de variedades de uso libre, de modo que se pudieran construir bases de datos lo más completas y representativas de la "casuística varietal" y diversidad genética presente en el país. En total, considerando las siete especies de este estudio, se obtuvieron los patrones genéticos de más de 500 variedades de frutales, con entre cinco y 12 marcadores cada uno (cuadro 1).

Los datos registrados en estas bases de datos corresponden a los patrones alélicos de cada variedad y cada marcador SSR que permite identificar y diferenciar a cada una de ellas. Para cada especie se determinó el número mínimo de marcadores SSR que permitiera identificar todas las variedades consideradas, priorizándose los marcadores, desde los más informativos hasta los menos útiles. Así, cuando se quiera

Figura 1. Patrones genéticos de 24 variedades de arándano. La identificación de cada una de las variedades de esta especie tetraploide (4n) se simplifica al tener una colección de referencia, en este caso obtenida del USDA, EE.UU. A la derecha se indican los tamaños de los alelos identificados.



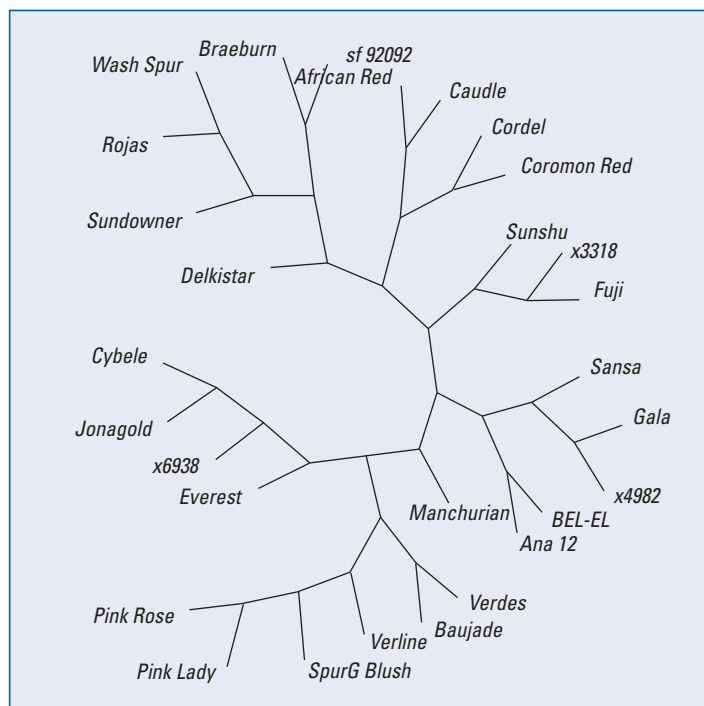
La identidad genética de frutales es un problema para resolver en Chile.

obtener el *fingerprinting* de nuevas variedades para incorporar en la respectiva base de datos, se usarán en primer lugar aquellos marcadores SSR más informativos.

En el cuadro 1 se indica las especies consideradas, el número de variedades en cada caso, el número de marcadores SSR ensayados y el número mínimo de ellos que fueron capaces de diferenciar todas las variedades analizadas. Como se observa, hay especies de alta diversidad genética, como los arándanos, las vides y los manzanos, en cuyo caso una pequeña cantidad de marcadores permitió diferenciar todas las variedades. En otros casos, como la frutilla, su elevada ploidía (octoploide) permite identificar numerosos alelos para cada marcador analizado, y así los haplotipos son muy informativos, aun con pocos marcadores ensayados. En el otro extremo se puede incluir a los carozos en general y a los durazneros y nectarinos en particular, los cuales presentan un estrecho fondo genético, pues su mejoramiento —iniciado a fines del siglo XIX— derivó de muy pocas variedades. Esto hizo que el número de alelos que presenta cada marcador (cada locus) sea muy reducido, usualmente no más de tres o cuatro, y por eso se debe recurrir a un número mucho mayor de marcadores, de entre seis y diez, para diferenciar las más de 120 variedades consideradas en este estudio. Otra dificultad inherente a esta especie de frutales de carozo es que los programas de fitomejoramiento han sido históricamente muy activos, por lo cual el número de variedades conocidas, en Chile y el resto del mundo, es muy elevada.

Como se indica anteriormente,

Figura 2. Árbol de relaciones de similitud genética de cultivares de manzano construido en base a marcadores SSR.



una de las etapas clave de este trabajo consistió en establecer la diversidad genética (DG) propia de cada especie, la que en parte está determinada por el subconjunto de variedades elegidas para el estudio; aunque en cantidades más grandes de variedades como en el caso de este proyecto, la DG pasa a ser una característica propia de la especie. Esta diversidad se ve reflejada en las relaciones de similitud genéticas, que son una representación gráfica de la DG para un determinado conjunto de variedades.

La figura 2 ilustra como ejemplo las relaciones de similitud genética en un grupo de variedades de manzano.

Otra situación particular que se presenta en algunas especies son las variedades derivadas de mutaciones somaclonales (en fruticultura llamados *sports*; aquí las llamaremos “variedades clonales”

o “clones”), en cuyo caso la diferenciación molecular resulta mucho más difícil de lograr y se requiere estudiar el problema caso a caso. Por ejemplo, en contraste con la facilidad para diferenciar variedades de vides y manzanos que provienen de cruzamientos genéticos o hibridaciones, las variedades clonales son muchas veces indiferenciables. Por ejemplo, los clones de cepas de vid de vinificación o variedades de mesa, o los grupos de variedades de manzano derivadas de ‘Gala’ o ‘Fuji’, usualmente descritas como variantes de pigmentación, presentaron en ambos casos los mismos patrones genéticos o perfiles alélicos de SSR.

Aunque hay reportes recientes del uso de otros tipos de marcadores genéticos, especialmente de algunos cuyo blanco molecular son elementos genéticos móviles conocidos como transposones,

GLOSARIO

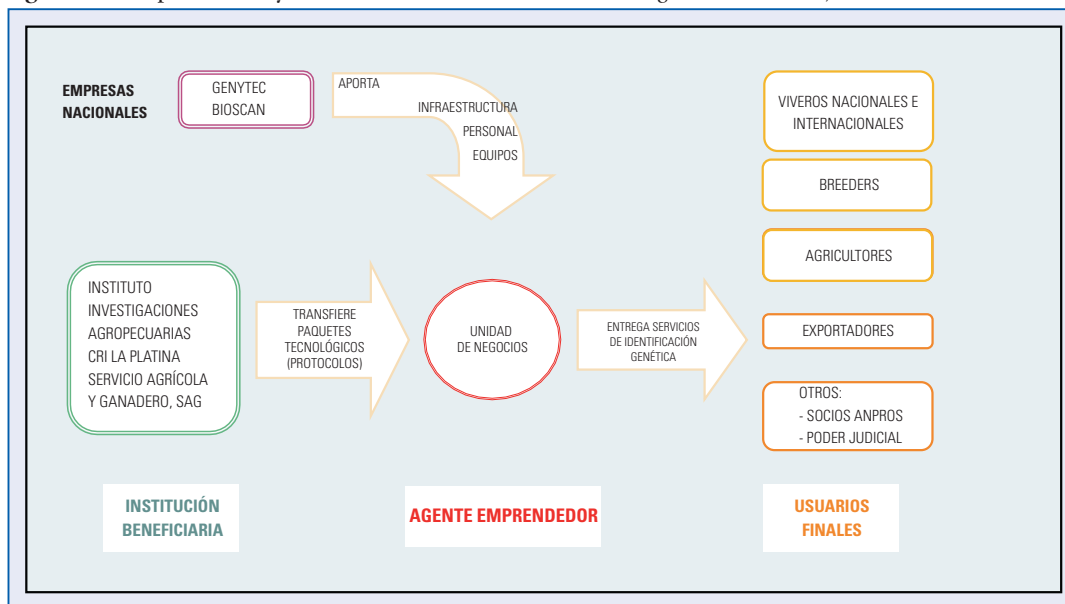
Alelos: Distintas variantes que presenta un *locus* determinado. Un patrón alélico es la combinación de alelos de una determinada variedad para un *locus* dado.

Haplotipo: Combinación de alelos para un conjunto determinado de *loci* genéticos o puntos particulares del genoma de una especie.

Nucleótido: Unidad básica de las cadenas de ADN y ARN (portadores de la información genética) compuesta por una base nitrogenada, un azúcar y ácido fosfórico.

Ploidía: Veces que el número básico de cromosomas (n) se repite en una especie. Muchas especies son diploides ($2n$), aunque otras pueden llegar a tener ocho o más copias, como la frutilla que es octoploide ($8n$).

Figura 3. Principales actores y beneficiarios del sistema de identificación genética de frutales, "FINGERFRUTA".



PROFESIONALES PARTICIPANTES EN EL PROYECTO

El autor agradece la participación de todos quienes colaboraron en este trabajo, en particular a Carlos Muñoz S. y Gamalier Lemus S. de INIA La Platina, y a Manuel Toro, encargado del Registro de Variedades Frutales Protegidas del Servicio Agrícola y Ganadero (RVP-SAG), así como a numerosos profesionales y técnicos de los viveros y otras empresas asociadas. Asimismo, participaron en este proyecto los siguientes profesionales: Gabriela Rojas R., Rodrigo Ramos V., Gonzalo Ravest C., M. Herminia Castro, de INIA La Platina; y Marco Méndez T., del INTA- Universidad de Chile.

sus resultados en nuestro laboratorio han sido poco eficientes. En consecuencia, es probable que para su identificación se deba recurrir al estudio de los factores genéticos relacionados a las características que diferencian a los clones, como los genes que determinan la pigmentación, el tamaño o forma de frutos, etc.

Transferencia de la tecnología a laboratorios de análisis genético

Este proyecto permitirá instrumentalizar las herramientas que den respaldo a la nueva ley de propiedad intelectual (actualmente en trámite en el Congreso), la que permitirá al país incorporarse a UPOV 91, con todos los beneficios y compromisos que eso significa. Para ello, la tecnología está en proceso de ser transferida a las empresas de análisis genético Bioscan y Genytec. Previo a su transferencia, se procedió a registrar en el Departamento de Propiedad Intelectual del Ministerio

de Economía seis marcas que corresponden a los protocolos analíticos para cada especie o grupo de ellas (por ejemplo, "Fingervitis-INIA" para el análisis de vides; "Fingerprunus-INIA" para frutales de carozo; "Fingerfresa-INIA" para frutillas, etc.).

Actualmente, las empresas de análisis genético están en proceso de establecer un servicio eficiente de identificación genética de frutales a nivel nacional y regional, con el soporte técnico de INIA. El servicio de *fingerprinting* quedará disponible para cualquier usuario de la cadena productiva y de comercialización de plantas y frutas, desde los fitomejoradores o licenciarios de variedades hasta los exportadores y otros agentes de comercialización, incluyendo también a los que serán probablemente sus principales usuarios, los viveristas y los productores frutícolas (figura 3).

Finalmente, existe interés por aplicar esta tecnología en otras especies, no sólo del ámbito frutícola sino también ornamental,

forestal, ganadero, microbiológico, etc., combinado con la posibilidad de establecer puntos de captura y procesamiento de muestras a nivel internacional, puesto que los precios de este tipo de servicio en distintos centros del hemisferio norte son de costos muy elevados (además de existir una escasa oferta del servicio), y podría incursionarse en estos mercados en forma bastante competitiva. **Ta**