

# ADN-FINGERPRINT (HUELLA DIGITAL DE ADN): NUEVA HERRAMIENTA DE APOYO AL COMERCIO LEGAL DE SEMILLA DE PAPA



Chile avanza en los sistemas de protección de la Propiedad Intelectual de las variedades vegetales.

**Boris Sagredo D.**

Bioquímico, Ph.D.

bsagredo@inia.cl

INIA Remehue

**Alejandro Peña Z.**

Ingeniero Agrónomo

Servicio Agrícola y Ganadero

**Belfor Portilla R.**

Ingeniero Agrónomo, M.Sc.

Jefe Nacional de Insumos

Tecnológicos

INIA

**Annette Fahrenkrog H.**

Bioquímica

INIA Remehue

En un escenario donde el conocimiento fluye cada vez más por circuitos comerciales privados, la necesidad de desarrollar y disponer de nuevas tecnologías ha obligado a la gran mayoría de los países a ajustar sus marcos normativos en materia de Propiedad Intelectual (PI).

Chile no ha escapado a tal tendencia y es así como en 1994 se promulgó la Ley 19.342 que "Regula Derechos de Obtentores de Nuevas Variedades Vegetales", con el propósito de alinear la legislación para adherir a la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) en su Acta 1978.

Aunque su contenido final no dejó satisfechos a los obtentores vegetales, sin duda fue un paso importante para incentivar la generación de nuevas variedades

en el país así como para dinamizar la inscripción de variedades creadas en el extranjero, especialmente frutícolas y ornamentales, en el Registro de Variedades Protegidas.

En el mismo sentido y con el propósito de firmar el Acuerdo de Libre Comercio con Estados Unidos, Chile se comprometió a adherir antes del 1 de enero del 2009 al Acta UPOV 1991, lo cual implica modificar la actual Ley 19.342 en un trámite legislativo en el Congreso. Sin duda el objetivo de convertir a Chile en "potencia agroalimentaria" requiere de un alto nivel competitivo con tecnología de excelencia, a la cual se accede en forma más expedita en escenarios de respeto eficaz de la Propiedad Intelectual.

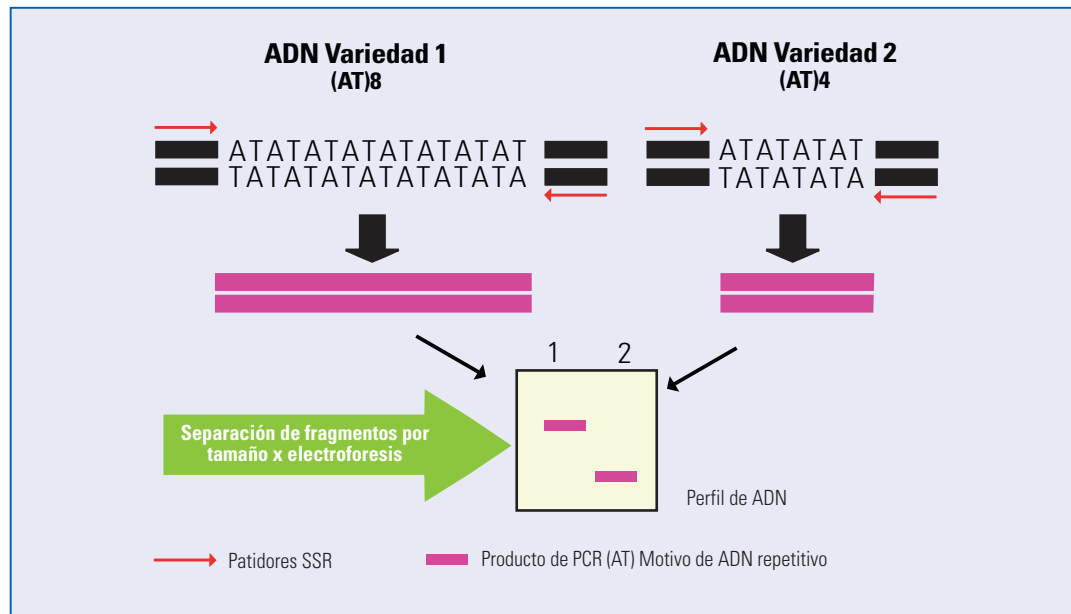
Entre las modificaciones esenciales que debe contener la

nueva Ley cabe mencionar: a) la protección de la PI se extiende no sólo a los materiales de multiplicación sino que también a los productos de la cosecha y a aquellos elaborados a partir de éstos, obtenidos por utilización no autorizada del material de reproducción que les dio origen; norma que representa un gran avance, porque todos los eslabones de la cadena agroindustrial deberán velar porque los derechos del obtentor se hayan respetado en relación a los productos que están comercializando o elaborando; b) se debe considerar una excepción al derecho de obtentor y acotar la reutilización del material de reproducción propio "farm save seed"; c) se introduce el concepto de derivación esencial para evitar la copia con modificaciones cosméticas de los caracteres esenciales de una variedad protegida; y d) se extiende la protección a 25 años para árboles y vides y a 20 años para los demás cultivos.

En definitiva, y tan importante como la legislación, es ir cambiando la cultura tecnológica del país de tal modo de alcanzar gradualmente los niveles de los países desarrollados. En éstos se tiene siempre presente que el uso de semillas certificadas y plantas de origen legal significa fomentar el desarrollo de nuevas innovaciones tecnológicas en beneficio de la competitividad del propio sector.

Aquí presentamos una nueva herramienta de identificación de variedades de papa, la cual se basa en la identificación de variedades mediante polimorfismo de ADN. Estas pruebas, conocidas como ADN-fingerprint o huella digital de ADN, que gozan de gran robustez gracias a su gran sensibilidad y rapidez, vienen a fortale-

**Figura 1.** Representación esquemática de las secuencias de ADN SSRs para dos variedades diferentes y su síntesis a través de PCR, utilizando partidores específicos. Las diferencias en el tamaño de las secuencias permiten diferenciar a las dos variedades entre sí.



cer el comercio legal de semilla y la protección de la propiedad intelectual.

Del contenido de la nueva Ley y reglamento y de la aplicación práctica y eficacia con que opere el sistema dependerá su incidencia en el fortalecimiento de la capacidad de innovación tecnológica del país.

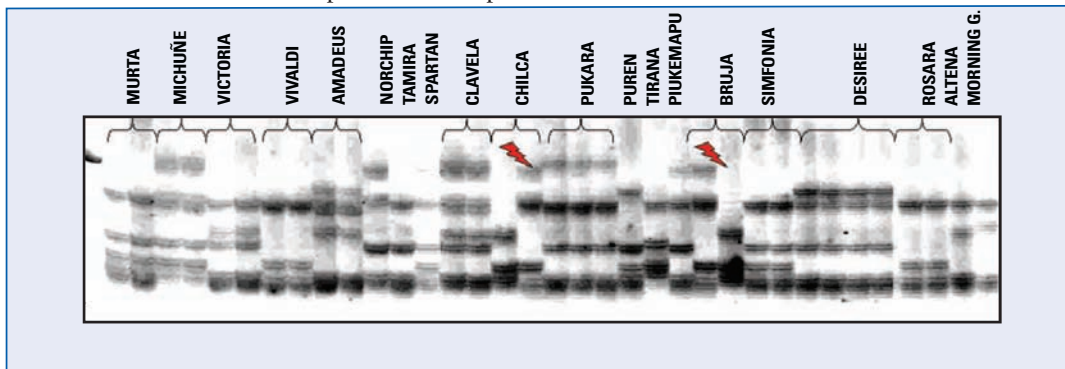
### Importancia de la variedad de papa

Una variedad de papa se distingue de otras variedades según sus características de productividad, adaptación y precocidad, forma del tubérculo, color de piel y pulpa, resistencia y susceptibilidad a enfermedades, contenido de materia seca, calidad para fritura, entre otras. La expresión de estas y otras cualidades de la papa, están determinadas por factores genéticos en interacción con el medio ambiente. Estas características, asociadas a otras va-

riables como calidad de semilla y un manejo agronómico adecuado, definen en última instancia su uso y destino como variedad (Ej. mercado del consumo fresco o productos procesados). La utilización de una variedad inadecuada generará un producto de calidad no deseada y por lo tanto puede producir pérdidas significativas al productor, empresa y disconformidad en los consumidores.

Actualmente en Chile existen 156 variedades de papa registradas en la Lista de Variedades Descritas Oficialmente por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), y 31 de ellas se encuentran inscritas en el Registro de Variedades Protegidas con derecho de propiedad intelectual. La actual legislación reconoce el derecho que el obtentor tiene sobre su variedad, otorgándole la exclusividad para multiplicar y comercializar la semilla de la variedad protegida por un período de 15 años. Además, este derecho faculta al obtentor

**Figura 2.** Perfiles de ADN elaborados para un grupo de variedades de papa utilizando el SSR STM1020. En rojo se muestra un caso de confusión de material de plantación en campo.



de la variedad protegida a otorgar una licencia o autorización para que otro la multiplique o reproduzca. Para obtener la licencia ha de pagarse al dueño de la variedad el precio convenido (Royalty), cuyo monto es regulado por el mercado. Un porcentaje de este royalty retorna directamente a los programas de mejoramiento genético, para que estos continúen su importante labor de desarrollar nuevas variedades de papa.

La violación de la propiedad intelectual desalienta la creación de nuevas variedades en el país y la entrada de nuevos materiales de alto valor agronómico o comercial desde el exterior, lo que va en desmedro de la productividad agrícola nacional. Por lo tanto, el garantizar la identidad de una variedad de papa, comercializada como semilla y sus productos, se constituye en un requisito esencial tanto para la protección de los derechos de los creadores de nuevas variedades como de las empresas semilleras, de los productores y de las industrias procesadoras. A la vez, esto también va en directo favor de los consumidores quienes se beneficiarán de productos de mejor calidad.

Para la identificación de va-

riedades de papa, según la UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales), se utilizan alrededor de 50 parámetros descriptores de tipo morfoagronómico, por ejemplo la morfología de flores y hojas, forma de tubérculo, color de pulpa, profundidad de ojos, entre otros. En Chile el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) es la institución encargada de realizar las pruebas y ensayos para verificar que las características botánicas y morfológicas descritas por los obtentores correspondan a la variedad que se pretende registrar. Las evaluaciones deben realizarse a lo largo de todo el período de desarrollo del cultivo, incluyendo etapas de postcosecha; en general, es un sistema confiable cuando es realizado por un profesional calificado.

### Detección de polimorfismo de ADN para identificación varietal

Recientemente, gracias a técnicas de la biología molecular que permiten detectar polimorfismos (diferencias) de ADN entre individuos, han surgido nuevas herramientas de identificación de variedades de papa. Estas pruebas

se conocen como ADN-fingerprint o huella digital de ADN.

Los marcadores más populares para estas pruebas de ADN son los microsatélites o SSRs. Estos corresponden a secuencias repetitivas de ADN, presentes en el genoma de la papa, en donde la variación en el número de estas repeticiones permite diferenciar a distintos individuos entre sí. Estas secuencias de ADN, de distintos tamaños, son observadas como bandas al ser separadas en matrices porosas de agarosa o poliacrilamida mediante electroforesis, representando una imagen similar a los códigos de barra de los productos en un supermercado (figura 1). Los SSRs pueden ser sintetizados in vitro utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La papa (*Solanum tuberosum*) es una especie autotetraploide y altamente heterocigota, por lo tanto entre distintas variedades, incluyendo los genotipos que provengan de una misma cruce (hermanos), es relativamente fácil encontrar polimorfismos de ADN que las diferencien a través de SSRs.

La alta variabilidad que presentan los SSRs ha permitido, hasta el momento, elaborar huellas o perfiles de ADN únicas para cada una de las variedades de papa cultivadas en Chile. Su utilización ha permitido detectar en forma rápida y oportuna problemas de manejo de materiales en campo y variedades mal clasificadas (figura 2).

### Ventajas

El uso de marcadores SSRs en identificación varietal permite:

- La identificación precisa de un individuo en cualquier es-

tado de desarrollo.

- Se requieren cantidades ínfimas de tejido vegetal de cualquier tipo, incluyendo: hoja, raíz, tallo, tubérculos o brotes.
- Alta reproducibilidad de los resultados entre diferentes laboratorios.
- A diferencia de los caracteres morfológicos, los resultados no son afectados por el medio ambiente.
- Los resultados se obtienen en forma rápida, en menos de una semana (tres días).
- Los costos de análisis son moderados.

### Limitaciones

- En el caso de variedades obtenidas por mutaciones espontáneas (variantes clonales) o mediante transgenia (OGM), los SSR no son los más adecuados para la identificación y diferenciación de éstas con la variedad original. Para ello debe utilizarse otro tipo de marcadores moleculares.
- El uso de marcadores SSRs no es todavía una técnica oficialmente reconocida por la UPOV, está en etapa de evaluación.

### Aplicaciones prácticas

Las técnicas de ADN están especialmente recomendadas para solucionar problemas que requieran respuesta inmediata, tales como:

- Detección rápida y denuncia de fraudes durante la producción y comercialización de semilla de papa.
- Identificación rápida de plántulas in vitro.
- Determinación de identidad y mezcla varietal en cualquier

estado de desarrollo del cultivo, incluso una vez cosechados los tubérculos.

- Verificación de identidad frente a un comportamiento inusual de la variedad.
- Detección y denuncia del uso ilegal de semillas de variedades protegidas.

### Algunas consideraciones técnicas

**Cómo coleccionar una muestra:** la muestra debe ser representativa para cada situación particular, evitando recolectar plantas de papa que crecen como malezas, plantas al borde de caminos y plantas marchitas o enfermas. Para evitar contaminaciones, la muestra debe ser recolectada directamente desde la planta a través de una bolsa. En el caso de hojas y brotes, la bolsa debe ser plástica y deben ser mantenidas en refrigerador a 4°C hasta su envío, para evitar la oxidación de los tejidos. Los tubérculos limpios

y secos deben ser almacenados en bolsas de papel para evitar pudriciones.

La identificación de la muestra debe ser realizada al momento de ser recolectada para no confundirla. La etiqueta debe contener información básica como: 1. Nombre del recolector; 2. Procedencia; 3. Región; 4. Tipo de tejido (hoja, brote, tubérculo); 5. Identificación de la muestra y 6. Fecha de recolección.

**Envío y recepción de muestras:** las muestras provenientes del área libre de plagas cuarentenarias de la papa pueden ser enviadas a INIA Remehue (X Región). Las muestras provenientes de otras zonas deben ser enviadas a INIA La Platina (RM).

**Almacenamiento:** una vez recepcionada la muestra en el laboratorio, se procede a su preparación. Esto consiste en tomar una pequeña cantidad de tejido de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, el cual es depositado en un tubo plástico estéril de 1,5 ml. Para asegurar la

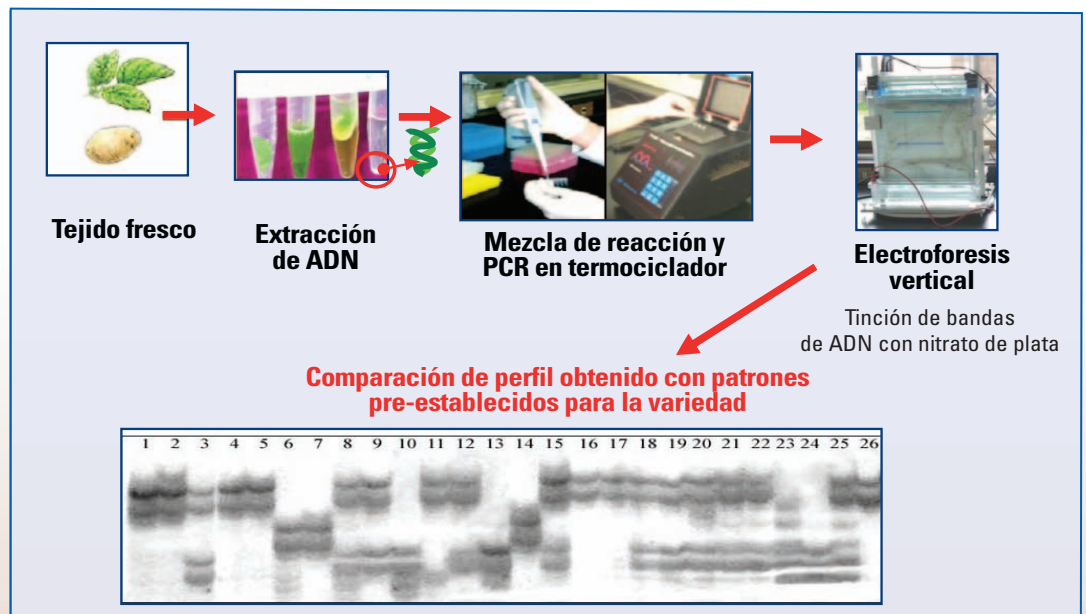
## GLOSARIO

**ADN:** macromolécula responsable de la herencia genética de cualquier organismo vivo.

**Partidores:** secuencias cortas de ADN que son complementarias a las zonas que bordean las secuencias SSRs, permiten dar inicio a la síntesis de nuevas hebras de ADN.

**Marcador:** Secuencia de ADN cuya presencia puede ser asociada a algún carácter determinado, como por ejemplo la resistencia a enfermedades, color o identidad varietal.

Figura 3. Representación esquemática del sistema de identificación varietal utilizando SSRs.



integridad del ADN, las hojas frescas, la piel del tubérculo y/o brotes son conservados a 4°C por un plazo máximo de una semana. Para una mantención a largo plazo las muestras son congeladas a -20°C. En el caso de pulpa de tubérculo, debe ser congelada inmediatamente para evitar su oxidación.

**Análisis de laboratorio:** el análisis de laboratorio comienza con la extracción del ADN de cada muestra, para lo cual es necesario romper los tejidos y células a través de trituración mecánica y química con detergentes; el ADN es separado de los otros componentes celulares utilizando solventes orgánicos. Para el análisis, se requiere extraer una cantidad aproximada de 20 ng de ADN. Una vez extraído, se realiza la síntesis artificial de las secuencias de ADN de interés para lo cual se utiliza la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR utiliza la enzima Taq polimerasa y ciclos térmicos para sintetizar millones de secuencias idénticas a partir del ADN molde, la zona de inicio de síntesis es marcada por un partidador específico para cada SSR. Luego, los fragmentos son separados por electroforesis en matrices porosas de agarosa o poliacrilamida. Finalmente, las bandas o secuencias de ADN son visualizadas a través de tinción con nitrato de plata y analizadas según su tamaño. Los perfiles de ADN obtenidos son comparados con los perfiles pre-establecidos en el laboratorio (figura 3).

**Eficiencia de análisis:** hasta el momento han sido estandarizadas las condiciones de laboratorio para 22 marcadores SSRs, los cuales al ser utilizados individual-

mente han podido diferenciar hasta un 53% de un amplio grupo de variedades de diverso origen. Sin embargo, la utilización de combinaciones de 3 SSRs permite aumentar enormemente la eficiencia de análisis hasta llegar a un 100%. Desde el punto de vista del tiempo de análisis, es posible obtener un resultado certero en dos días; la extracción de ADN y PCR se realiza durante el primer día, mientras que la electroforesis y análisis de datos, el segundo día. Esto ha sido posible debido al desarrollo de reacciones de PCR en condición de múltiplex, que consiste en realizar PCR simultáneamente con más de un SSRs, además de la utilización de protocolos rápidos de extracción de ADN.

**Entrega de resultados:** los resultados del análisis pueden ser enviados de forma inmediata vía correo electrónico o por correo certificado, siendo este costo asumido por el demandante del análisis. La información obtenida es de carácter confidencial.

La tecnología de identificación utilizando perfiles de ADN está al alcance de cualquier persona o empresa que lo requiera, sin embargo oficialmente el INIA aún no presta el servicio a nivel comercial. Por esta razón, el costo de este tipo de análisis dependerá de cada situación particular. **Ta**

La información puede ser solicitada a:

**Dr. Boris Sagredo Díaz**

Email: [bsagredo@inia.cl](mailto:bsagredo@inia.cl)

Fono/Fax: (64)450420/(64)237746

Km 8 Ruta 5 Sur, INIA Remehue, Osorno.

## IMPACTO DE LA BIOTECNOLOGÍA EN EL CULTIVO DE LA PAPA



*La variedad Karu INIA ha dado muy buenos resultados en el mercado nacional y, al igual que otras variedades del INIA, tiene amplias proyecciones en mercados externos, que incluyen Estados Unidos, varios países de Latinoamérica y Europa.*

El INIA, a través de su Centro Regional de Investigación Remehue, declarado Centro Nacional de la Papa por el Ministerio de Agricultura, y la FAO realizaron un seminario internacional denominado "Impacto de la biotecnología en la conservación y mejoramiento del cultivo de la papa", el cual tuvo lugar el 22 de octubre en la sede de la FAO, en Santiago.

"El objetivo de este evento, que se enmarca en la conmemoración del Año Internacional de la Papa, es difundir los alcances e impactos de la biotecnología moderna en la conservación y mejoramiento de este cultivo, el cuarto en importancia en todo el mundo", afirmó el director nacional del INIA, Leopoldo Sánchez, quien inauguró el simposio junto a la representante de FAO en Chile, Margarita Flores.

En el evento expusieron el experto del Centro Internacional de la Papa, Dr. William Roca, el especialista boliviano Dr. Jorge Rojas, el académico de la Universidad Austral de Chile, Ricardo Riegel;

además de Julio Kalazich, director regional de INIA Remehue y jefe nacional del Programa de Mejoramiento Genético de Papa de INIA, el Dr. Boris Sagredo del mismo CRI, y la investigadora de INIA La Platina, Dra. María Teresa Pino.

Durante más de 40 años el INIA ha tenido un rol preponderante como líder nacional en investigación y transferencia tecnológica en el rubro papa. A través de su CRI Remehue, donde se concentra el Programa de Mejoramiento Genético de Papa, la institución ha introducido y creado las principales variedades de este tubérculo existentes en el país, entre ellas: Desirée, que fue traída a Chile en 1968 y ocupa hasta hoy la mayor superficie plantada en Chile; Yagana INIA, la principal variedad utilizada por la agroindustria para producción de papas pre-fritas y puré; Pukará INIA, variedad especial para el cultivo de papa temprana, y Karu INIA, utilizada principalmente para el consumo fresco. **Ta**