

HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS

UN APOORTE AL MEJORAMIENTO DE CEBADA

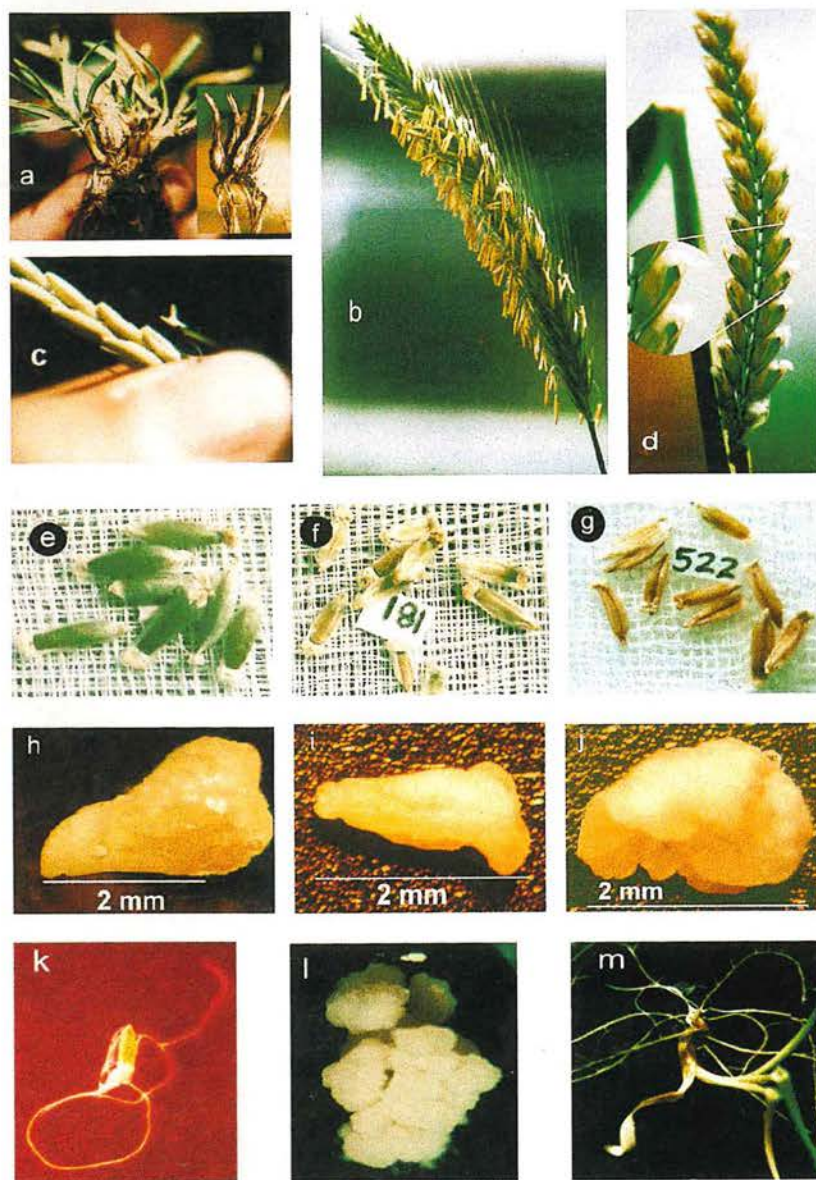


Foto 1. Cruza entre la especie silvestre (*Hordeum bulbosum*) y la cebada cultivada (*Hordeum vulgare*) y secuencia del trabajo a nivel de laboratorio.

a. Planta de la especie silvestre, destacan bulbos de reproducción vegetativa.

b. Espiga de la especie silvestre, previo al uso de su polen para polinizar la cebada.

c. Emasculación de la cebada o eliminación de los estambres para impedir la autopolinización y permitir la posterior polinización artificial con la especie silvestre.

d. Espiga de cebada que muestra semillas híbridas interespecíficas.

e, f, g. Diversos tipos de semillas producidas por los distintos genotipos empleados.

h, i, j. Diversos tipos de embriones interespecíficos.

k. Germinación del embrión y crecimiento *in vitro* de plántulas.

l. Callo obtenido a partir de un embrión interespecífico.

m. Planta de 3 a 4 hojas verdaderas, sólo con el genoma de la cebada cultivada.

Haroldo Salvo G.
Ingeniero Agrónomo

Ricardo Felmer D.
Bioquímico

INIA Carillanca

Iván Maureira B.
Tesisista
Universidad Austral de Chile

La aplicación de estas metodologías permitirá ayudar al fitomejoramiento mediante la rápida fijación génica, la caracterización molecular y la selección de progenitores, e identificar marcadores asociados con caracteres de importancia económica, agronómica, industrial y de resistencia a enfermedades. Desde marzo de 1995 hasta marzo de 1997, con financiamiento de Fondecyt (Proyecto 1950020), INIA Carillanca desarrolló y optimizó la cruce entre dos especies, *Hordeum vulgare* L., cebada cultivada y *Hordeum bulbosum* L., gramínea silvestre de reproducción vegetativa.

La cruce genera embriones sólo con los cromosomas de la cebada cultivada; embriones que, por esta razón, no son viables en forma natural, por lo que se requiere brindarles artificialmente, vía cultivo *in vitro*, las condiciones necesarias hasta que generen una planta de dos a tres hojas verdaderas (Foto 1). Luego, a nivel de laboratorio, a esta planta se le duplican sus cromosomas, logrando, así, una línea pura o ciento por ciento "homocigota". En otras palabras, una planta genéticamente estable, y cuya descendencia no presentará variaciones.

Esta técnica se convierte en una poderosa herramienta para reducir los ciclos de mejoramiento a través de una

rápida fijación de los caracteres genéticos. En términos prácticos ello significa lograr una mayor velocidad de producción de líneas puras, para su inmediata evaluación agronómica e industrial. El principal problema de esta biotecnología ha sido la baja eficiencia de generación de líneas puras, debido a incompatibilidades entre las dos especies y al manejo ambiental y cultivo *in vitro* de los embriones interespecíficos generados.

Al empezar la investigación, se analizaron genotipos de ambas especies y se determinó una alta interacción entre ellas, lo que originó diversos grados de compatibilidad. En tres grupos "elite" de cebada empleados en mejoramiento, caracterizados por sus altos rendimientos, calidad maltera y tolerancia o resistencia a enfermedades, fue posible detectar progenitores de alta compatibilidad, lográndose una eficiencia máxima de 31 por ciento.

Sin embargo, cuando a estos progenitores se les dio un correcto manejo ambiental y los embriones interespecíficos fueron llevados a cultivo *in vitro* en su estado óptimo de desarrollo, diez días después de la polinización, una mayor cantidad de embriones generó plantas y hubo una menor proporción de callos. Estos últimos son estructuras irregulares producto de un desordenado crecimiento de las células del embrión con baja capacidad de germinación. El conjunto de los factores mencionados condiciona la eficacia del método, que en el estudio descrito significó lograr una eficiencia final del 47 por ciento.

Durante la temporada 1996/97, con la técnica en óptimas condiciones, es decir con progenitores de alta compatibilidad y de aceptable comportamiento agronómico e industrial, se generaron poblaciones F_1 , o primera familia producida a través de la cruce de dos cebadas. A partir de ellas fue posible producir 400 líneas puras, con una eficiencia que superó las 20 plantas por cada cien flores polinizadas. Se trata de un gran logro porque dichos valores sitúan al INIA a nivel de los trabajos europeos, norteamericanos y japoneses —Japón es uno de los líderes en el uso

de esta biotecnología en sus proyectos de mejoramiento, tanto en cebada como en trigo y arroz—; y, segundo, porque se logró reducir el ciclo de mejoramiento de la cebada entre cinco o seis años, a través de la rápida fijación de caracteres genéticos.

Análisis de ADN

Los niveles de diversidad dentro de una población y de una especie son los que controlan la velocidad de evolución adaptativa y, también, los que limitan la tasa de avance en el mejoramiento convencional de cultivos. En consecuencia, es muy relevante caracterizar y cuantificar la variabilidad genética. En cebada primaveral, donde existe una alta presión de selección, la técnica de laboratorio conocida como RAPDs entrega una buena estimación de las relaciones de semejanza o diferencia genética dentro de la especie. La técnica se basa en la caracterización molecular vía análisis al azar de segmentos de ADN. Esto significa que el ADN, como información única en cada individuo, brinda la posibilidad de medir el grado de diferencia o semejanza entre las diversas líneas puras o variedades.

De esta forma, al leer la información del ADN, con el uso de la estadística, ha sido posible graficar la distribución de una población de líneas puras, con sus progenitores. En la Figura 1, los padres A y B se encuentran ubicados en los extremos de una figura multidimensional; es fácil observar que estos padres generaron una amplia variabilidad en su población descendiente, ya que todos sus hijos se encuentran distribuidos en diversos puntos de la figura. Esta información se puede aplicar, por ejemplo, si se quieren seleccionar individuos similares a A, pero que lleven información genética de B; sería simple tomar aquellos individuos cercanos a A, pero diferentes a A, como son las líneas puras identificadas con

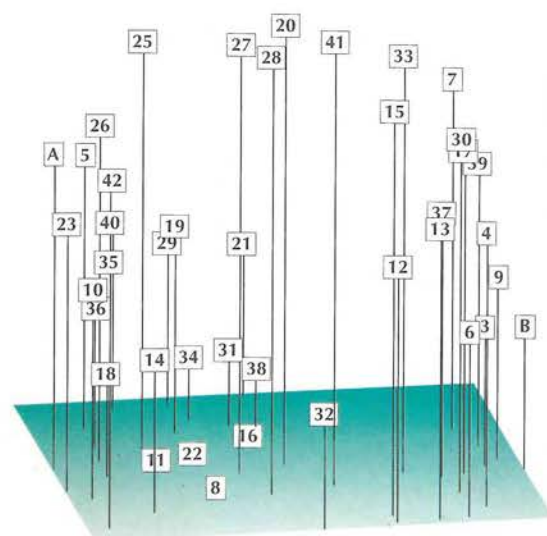


FIGURA 1. Gráfico multidimensional que muestra la distribución de una población de líneas puras sobre la base de su variabilidad genética.

los números 25; 26; 5; 42; 40; etc.

En este contexto, se ha extraído y purificado en forma exitosa ADN de las células de cebada. Luego, usando técnicas a nivel molecular, se cuantificó el grado de variabilidad genética en las poblaciones de líneas puras obtenidas a través del cruzamiento *H.vulgare* por *H. bulbosum*. La dispersión de genotipos a nivel de este gráfico multidimensional (Figura 1) sugiere que la cruce mencionada no restringe el grado de variabilidad genética y que, a pesar de que el germoplasma de cebada primaveral posee una alta presión de selección, es posible generar una aceptable variabilidad, lo que potencia las opciones de búsqueda de nuevas variedades comerciales.

Así, es posible apreciar otra gran ventaja de las líneas puras: en una temporada se pueden generar poblaciones bien estructuradas. Ello implica que frente a cualquier problema imprevisto, como una nueva enfermedad o un nuevo requerimiento por parte de los consumidores, sería posible reaccionar para enfrentarlo en un corto período, con las grandes ventajas que eso involucra.

La aplicación de estas metodologías permitirá asistir al mejoramiento de la cebada e identificar "marcadores" que posibiliten manejar características de importancia económica, agronómica, industrial y de resistencia a enfermedades. ▲