

Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas

Ricardo W. Masuelli

Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, C.C. 7 (5505) Chacras de Coria, Mendoza, Argentina

Resumen

En los últimos veinte años se produjeron grandes avances en Biología Molecular; se desarrollaron técnicas moleculares que permiten analizar en forma rápida y precisa el genoma de los seres vivos. A través de estas técnicas se obtuvieron gran cantidad de marcadores moleculares dispersos a lo largo de todo el genoma, se construyeron mapas genéticos de diversas especies hortícolas, y se ubicaron genes de resistencia a enfermedades, plagas, etc. Los marcadores ligados a genes de interés agronómico se pueden utilizar para realizar selección genotípica temprana, en plántulas, y de esta manera se evita manejar cientos o miles de plantas

en la selección fenotípica en invernáculo o a campo. La selección asistida por marcadores moleculares es una herramienta muy interesante para los planes de mejoramiento, ya que permite acelerar la selección y disminuir los costos en el manejo de grandes poblaciones de plantas. El objetivo de esta revisión es resumir los marcadores utilizados en el análisis genético y discutir el alcance de los mismos en el mejoramiento de hortalizas.

Palabras clave: Marcadores moleculares - Mejoramiento vegetal - Cultivos Hortícolas

Use of molecular markers in breeding of vegetable crops

Summary

The development of the Molecular Biology in the last two decade allowed to characterize and manipulate genes of agronomic interest. Currently, several techniques to obtain molecular markers (or DNA markers) are available, high density genetic maps were obtained and several genes were tagged with markers. The use of these markers in the genetic analysis increases the efficiency of conventional plant breeding methods and a non-

conventional breeding strategies were developed. The goals of this review is to resume the most important techniques to obtain molecular markers and their potential and limitations in breeding of vegetable crops.

Key words: Molecular markers - Plant breeding - Vegetable crops

Introducción

A través de la utilización de los principios genéticos en los últimos años se lograron importantes avances en el mejoramiento genético de especies hortícolas. Estos avances se basaron principalmente en la selección fenotípica de los mejores genotipos. La eficiencia de un esquema de selección basado en el fenotipo es función directa de la heredabilidad del carácter, de la influencia del ambiente, del tipo de herencia, monogénica o multigénica, y de la dominancia parcial o total del carácter en estudio (34). Muchas de las

complicaciones que se tienen en la selección de los caracteres fenotípicos se pueden solucionar a través de la identificación directa de los genotipos mediante el uso de marcadores genéticos.

Según Griffiths *et al.* (12), un marcador genético es una variante alélica que se utiliza para marcar una estructura biológica o proceso a lo largo de un experimento genético. Estos marcadores genéticos pueden ser utilizados por mejoradores de plantas como herramientas de selección (2). Aquellos caracteres de herencia poligénica, difíciles de analizar a través de métodos tradicionales de mejora

genética, ahora pueden ser fácilmente etiquetados con marcadores moleculares, y la selección de los mismos se puede realizar a través de ellos.

Los marcadores moleculares han tenido un fuerte impacto en el mejoramiento genético de hortalizas. A través de su uso es posible analizar en profundidad la estructura del genoma de las plantas y de esta manera hacer más eficiente la utilización de los recursos genéticos en el mejoramiento vegetal. En los últimos años se ha avanzado mucho en el desarrollo de mapas genéticos y en el marcado de genes de interés agronómico. La utilización de estos marcadores en el mejoramiento constituye lo que se ha dado en llamar Selección Asistida por Marcadores o “Marker Assisted Selection” (MAS). La selección asistida permite incrementar la eficiencia de selección, ya que se puede realizar una selección temprana de los genotipos y de esta manera reducir el tamaño de la población de selección. La ventaja de MAS sobre la selección fenotípica radica en que no se selecciona el carácter en particular sino un marcador molecular ligado a éste. Por supuesto, que es necesario disponer de marcadores fuertemente ligados al carácter de interés (menos de 10 cM, centimorgan) y que sean repetibles (39).

El objetivo de esta revisión es resumir los marcadores utilizados en el análisis genético y discutir el alcance de los mismos en el mejoramiento de hortalizas. Al final del artículo hay un glosario de los términos técnicos utilizados.

Tipos de marcadores genéticos

A los marcadores utilizados en el análisis genético se los puede dividir en tres tipos.

1. Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos fueron los primeros utilizados y tienen que ver con el

origen de la genética. Mendel utilizó entre otros, el carácter rugoso o liso de las semillas para analizar la segregación de los cruzamientos de arvejas. En 1952, Rick desarrolló uno de los mapas genéticos más completos en tomate utilizando caracteres morfológicos (30). En el mejoramiento genético estos marcadores son de uso limitado, principalmente porque su expresión puede estar influenciada por el ambiente, por factores genéticos (por ejemplo, epistasia o genes modificadores), lo que altera el fenotipo de la planta e interfiere en el mejoramiento (32).

2. Marcadores bioquímicos.

Las proteínas de reserva de la semilla y las isoenzimas son los marcadores bioquímicos más utilizados.

Las proteínas de reserva, por tener distinto peso molecular y carga, se pueden separar por electroforesis en geles de poliacrilamida y teñirlas con un colorante para proteínas. Las bandas que se obtienen son producto de la expresión de genes y se las analiza como marcadores genéticos.

Las isoenzimas consisten en moléculas de proteína diferencialmente cargadas, que también se pueden separar usando métodos de electroforesis (19). Estas enzimas catalizan reacciones bioquímicas específicas; por lo tanto, al separarlas en geles de almidón y poliacrilamida, agregarles el sustrato y los cofactores apropiados, se produce una reacción bioquímica que reduce una sustancia coloreable, la que se deposita como una banda en el gel. Estas bandas se pueden analizar como marcadores genéticos y se heredan en forma codominante.

Los marcadores bioquímicos han sido reemplazados en gran medida por otro tipo de marcadores genéticos; sus principales desventajas son: 1) que detectan niveles menores de variación y 2) que al ser productos de la expresión génica se ven afectados por

modificaciones postranscripcionales o postransduccionales. Sin embargo, las proteínas de reserva se siguen utilizando en la identificación de variedades, y las isoenzimas en la estimación de parámetros de fecundación y de selección (28).

3. Marcadores moleculares

Dentro del tercer grupo de marcadores se encuentran aquellos que detectan polimorfismo a nivel del ADN. Diversas son las técnicas que se utilizan para obtener estos marcadores moleculares.

3.1. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Los primeros marcadores desarrollados fueron los RFLP (2). Detectan polimorfismo

en el lugar de corte de enzimas de restricción y generan fragmentos de ADN de diferente longitud, los cuales se separan por electroforesis y se inmovilizan en membranas de nylon o nitrocelulosa. La detección de los fragmentos cortados se realiza a través de una sonda (segmento de ADN de 500 a 3000 pares de bases) de ADN genómico o cADN, marcada radioactivamente (también pueden ser marcadas con reactivos quimioluminiscentes).

La sonda marcada se hibrida por complementariedad de bases con el segmento inmovilizado en la membrana y al colocar sobre ella una placa radiográfica se revelan bandas (Figura 1). Estas bandas se pueden analizar como marcadores genéticos codominantes. El uso de radioactividad y la complejidad de la técnica son algunas de las complicaciones de los RFLP.

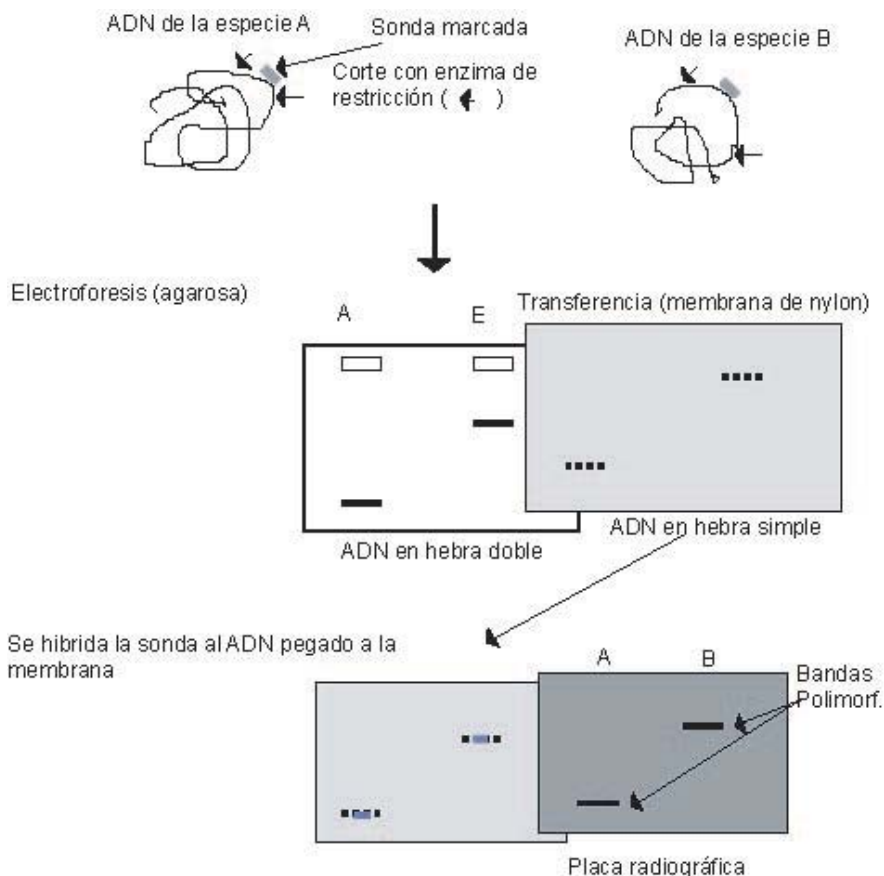


Figura 1. Análisis a través de marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

3.2. Marcadores basados en la técnica de PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) revolucionó el campo de la biología molecular y a partir de ella se desarrollaron una serie de técnicas.

3.2.1. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

La técnica RAPD consiste en la amplificación de segmentos de ADN a través del uso de un cebador o iniciador (fragmentos cortos de ADN monohebra de 10 a 20 bases), de secuencia aleatoria o arbitraria. Los cebadores se hibridan en aquellos sitios donde

encuentran secuencias complementarias en el ADN usado como molde. Cuando el cebador hibrida a las hebras complementarias en forma opuesta y lo suficientemente cerca, da lugar a productos de amplificación. Los productos de amplificación se separan por electroforesis en geles de agarosa y se visualizan al colorearlos con bromuro de etidio en un trasiluminador de luz UV (Figura 2). El polimorfismo entre los individuos resulta de las diferencias en las secuencias de hibridación de los iniciadores o primers y se comportan como marcadores genéticos del tipo dominante.

Esta técnica es apropiada para realizarla en laboratorios de baja complejidad, ya que no se necesita conocer previamente la secuencia de los primers (son de secuencia arbitraria),

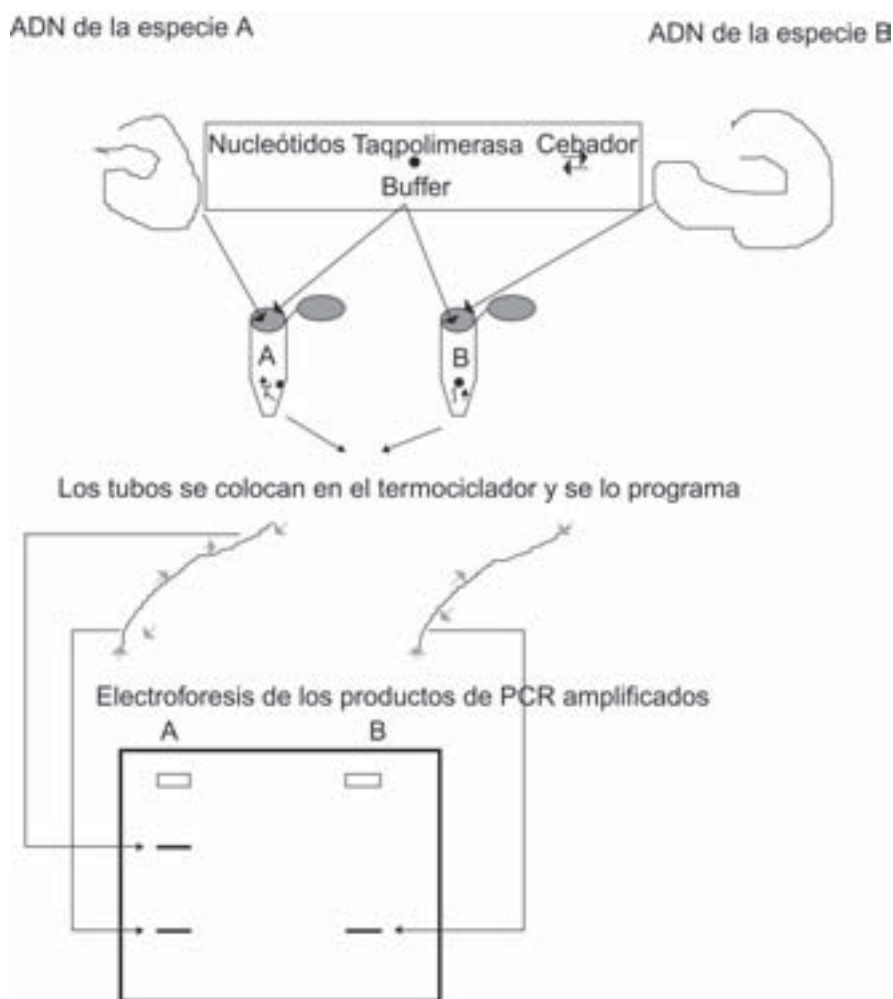


Figura 2. Obtención de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

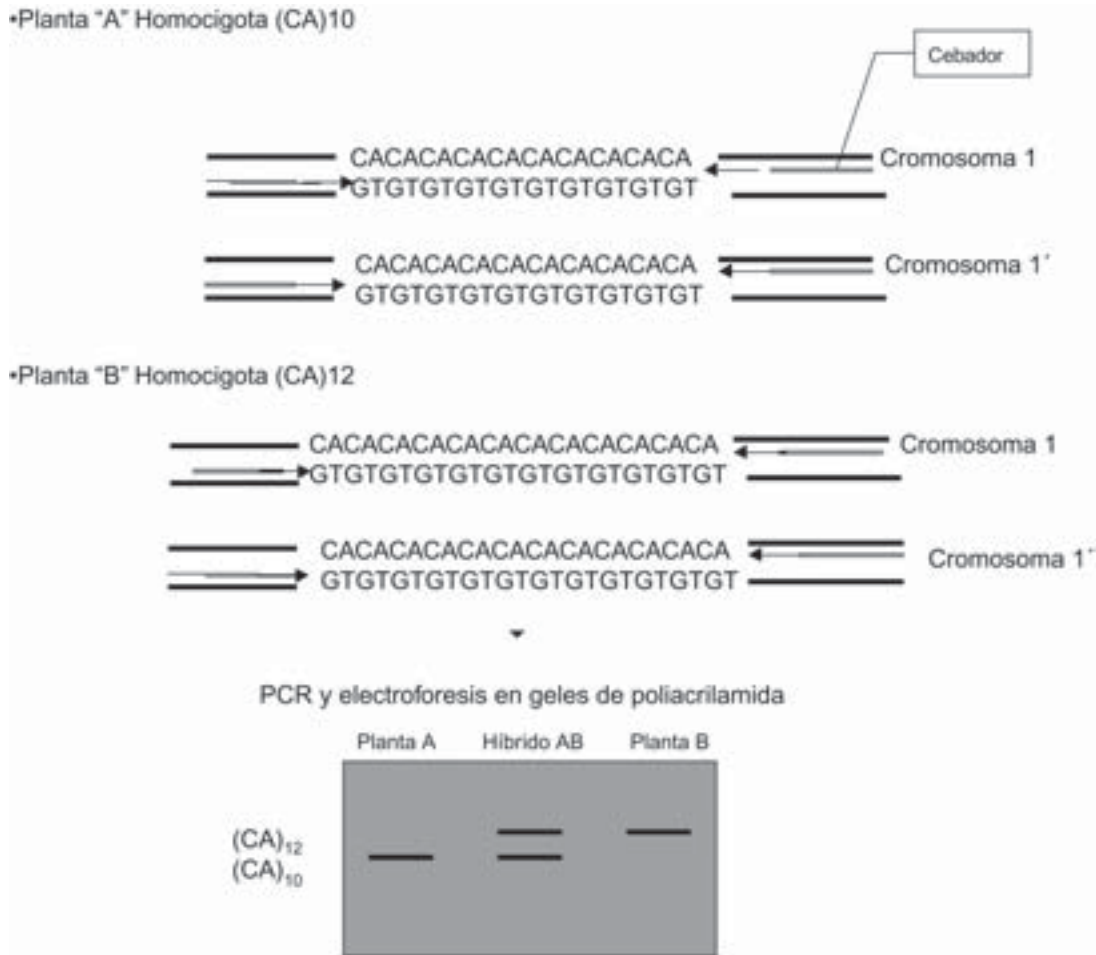


Figura 3. Análisis a través de Microsatélites

no se usa radioactividad y con bajos costos se puede analizar un alto número de *loci*. Uno de los inconvenientes de RAPD es la baja repetibilidad de los resultados. Este problema se puede solucionar clonando y secuenciando las bandas RAPD, para luego sintetizar primers específicos para cada marcador RAPD; a estos marcadores que son más repetibles se les llama SCAR (Sequence Characterize Amplified Regions) (27).

3.2.2. Microsatélites

El ADN genómico de eucariotas y en especial el de las plantas, tiene una serie de secuencias repetidas que pueden llegar a representar el 80% del genoma. Los

microsatélites (también llamados secuencias simples repetidas) son secuencias de di o trinucleótidos repetidas un cierto número de veces. En plantas, Akkaya *et al.* (1) y Morgante y Olivieri (25) encontraron que los microsatélites son altamente polimórficos, y que las repeticiones de (AT)_n son las más numerosas.

Los microsatélites se amplifican a través de PCR, utilizando primers específicos que se hibridan en regiones conservadas que flanquean la región del ADN que contiene las secuencias repetidas. Los productos de amplificación, en este caso regiones de ADN con, por ejemplo, dos o tres repeticiones de (AT)_n, se separan en geles de poliacrilamida y se colorean con plata (Figura 3). El

polimorfismo está dado por el número de repeticiones y son marcadores del tipo codominante. Por su alto grado de polimorfismo pueden ser utilizados para diferenciar genotipos con alto grado de parentesco (clones). La dificultad de esta técnica radica en que es necesario invertir en el desarrollo de las secuencia de los cebadores específicos para el microsatélite, y esto no lo pueden realizar laboratorios de baja complejidad. Sin embargo, una vez conocida las secuencias su utilización en el análisis genético no es compleja.

3.2.3. CAPs (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*)

La técnica consiste en sintetizar primers específicos para un locus de interés del genoma de plantas. Estos cebadores se utilizan en reacciones de PCR para amplificar segmentos de ADN de muestras de diversos individuos. Los productos de amplificación se cortan con enzimas de restricción y se analiza el perfil de bandas que se obtiene, luego de separarlas por electroforesis y teñirlas con bromuro de etilio. Esta técnica tiene algunas de las ventajas de los RFLP pero no las complicaciones del análisis a través de *Southern blots* (ensayos de Southern). Sin embargo, es necesario conocer las secuencias de ADN del fragmento que se quiere amplificar y esto dificulta su amplia utilización.

3.2.4. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

AFLP consiste en amplificar en forma selectiva fragmentos de ADN cortados con enzimas de restricción (42). El ADN de las plantas a analizar se corta con dos enzimas de restricción, usualmente *Mse* I y *Eco*R I, luego se le ligan adaptadores con una, dos o tres bases de más, que permite que se amplifiquen en forma selectiva sólo aquellos fragmentos

que tienen estas bases suplementadas a los primers (Figura 4). La separación de estos fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida genera entre 50 y 100 fragmentos. La ventaja de este método radica en que se puede analizar un gran número de locus en un solo gel; el principal inconveniente de estos marcadores que se comportan como dominantes, es el uso de radioactividad o la dificultad en la manipulación de los geles tan delgados, al teñirlos con plata.

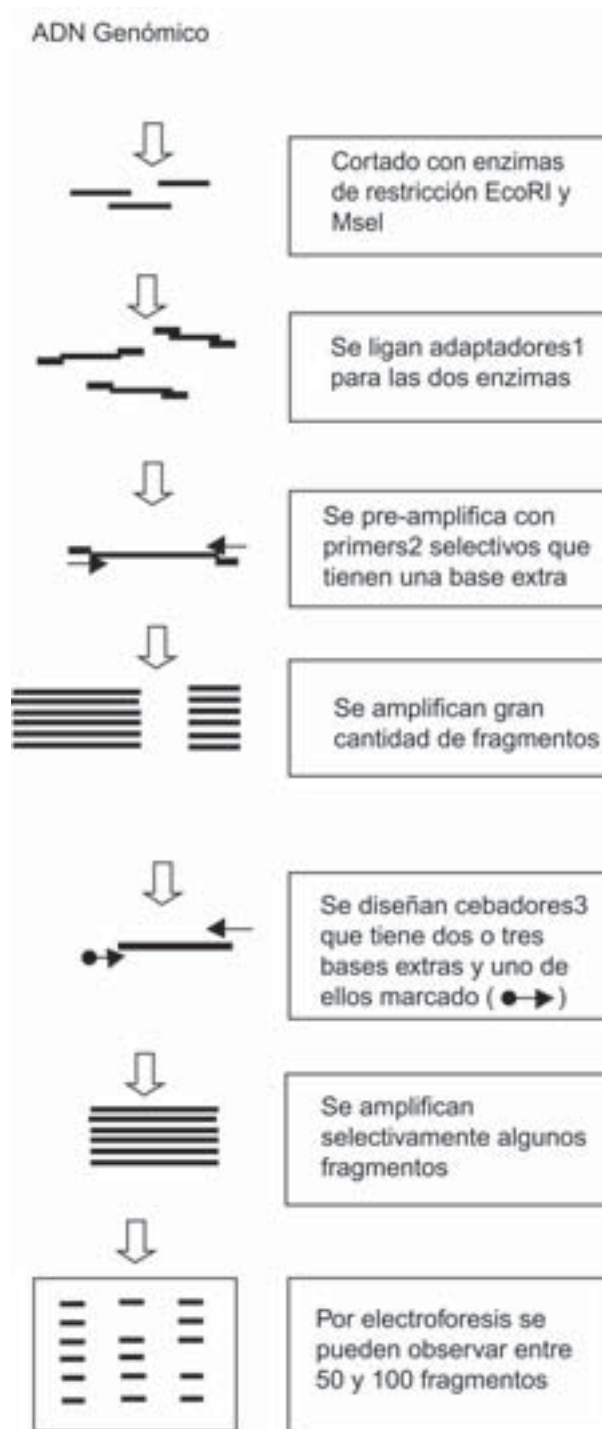
La elección correcta de la técnica a utilizar en el análisis genético es un aspecto muy importante, ya que en el mejoramiento vegetal se trabaja con muestras muy grandes, lo que supone altos costos y una cantidad considerable de trabajo. En la Tabla 1 se resumen las ventajas y desventajas del uso de cada uno de los marcadores moleculares previamente descritos, en el análisis genético.

Aplicaciones de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de cultivos hortícolas

1. Análisis de la diversidad genética

Uno de los aspectos más importantes en los planes de mejoramiento es el manejo eficiente de los recursos genéticos y del germoplasma disponible. Tradicionalmente, los recursos genéticos se caracterizaban por una combinación de caracteres morfológicos y agronómicos. Los marcadores moleculares, al analizar varios loci por reacción, permiten estimar en forma rápida y eficiente la diversidad genética existente en el plan de mejoramiento y el grado de similitud genética entre los cultivares. Los mejoradores pueden usar los datos sobre similitud genética para seleccionar genotipos parentales, con el fin de desarrollar poblaciones de mejoramiento, o para identificar padres genéticamente divergentes y utilizarlos en cruzamientos (26).

Diversos son los trabajos donde se han utilizado marcadores moleculares para la



¹ Los adaptadores son secuencias de ADN que se ligan a los extremos cortados con *Eco* RI y *Mse* I y que sirven para que los *primers* se hibriden.

² Los *primers* tiene una base de más para seleccionar fragmentos y disminuirlos 16 veces con respecto a los fragmentos originales.

³ Al agregarle dos bases más a los *primers* se reduce 256 veces el número de fragmentos que se pre-amplificaron.

Figura 4. Marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Tabla 1. Propiedades de los marcadores moleculares

| Propiedades | Marcadores | | | | |
|-----------------------------|--|--|--|---|---|
| | RFLP | RAPD | Microsatélites | CAPs | AFLP |
| Principio | Enzimas de restricción, Southernblot | PCR con primers aleatorios | PCR de secuencias simples repetidas | Digestión con enzimas de los productos de PCR | Digestión con enzimas y PCR de los fragmentos |
| Tipo de polimorfismo | Cambio de bases, inserciones, deleciones | Cambio de bases, inserciones, deleciones | Cambios en la longitud de las unidades de repetición | Cambio de bases, inserciones, deleciones | Cambio de bases, inserciones, deleciones |
| Abundancia en el genoma | Alta | Muy alta | Media | Alta | Muy alta |
| Nivel de polimorfismo | Medio | Medio | Alto | Medio | Muy alto |
| Dominancia | Codominante | Dominante | Codominante | Codominante | Dominante |
| Cantidad de DNA requerido | 2 - 10 ug | 10 -25 ng | 50 - 100 ng | 50 - 100 ng | 10 -25 ng |
| Información sobre secuencia | No | No | Si | No | No |
| Radioactividad | Si/No | No | No | No | Si/No |
| Costos | Medio/Alto | Bajo | Alto | Medio | Alto |

estimación de la diversidad genética. Dos Santos *et al.* (9), encuentran que el cálculo de la similitud genética, entre 45 genotipos de *Brassica oleracea* L. con marcadores RAPD y RFLP dan un nivel de resolución equivalente y consideran que los RAPDs son más prácticos por sus menores costos y mayor simplicidad. Por esta razón, los marcadores RAPD están convirtiéndose en los preferidos en estudios de organización y caracterización de germoplasma de distintas especies hortícolas (Tabla 2). Sin embargo, los marcadores AFLP están lentamente reemplazando a los RAPD en estudios de diversidad genética; esto se debe a que el número de *locus* que se analiza por

reacción es mayor, aunque la complejidad y los costos de la técnica sean superiores.

2. Elaboración de mapas genéticos y búsqueda de marcadores moleculares ligados a genes de interés agronómico

Los mapas genéticos serán un componente clave de la infraestructura y el desarrollo de los planes de mejoramiento futuros. Como afirma Lee (18), serán importantes entre otros aspectos en: 1) conectar las necesidades del mejoramiento con los datos aportados por la Biología Molecular; 2) acelerar la identificación e incorporación de genes útiles

en los cultivares; 3) aportar datos para entender las bases biológicas de caracteres complejos, como los de herencia cuantitativa; y 4) aportar información para la clonación posicional de genes.

Con el desarrollo de los marcadores moleculares se aceleró el proceso de obtención de mapas genéticos y en este momento se dispone de mapas con alta densidad de marcadores, por ejemplo en cultivos como: poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) con 244 marcadores y 1200 cM de longitud (38); papa (*Solanum tuberosum* L.) con 977 marcadores que cubren 684 cM de longitud y en tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) con 1.030 marcadores con una longitud de 1.276 cM (35).

Uno de los aspectos críticos en la construcción de mapas genéticos y en la obtención de marcadores ligados a caracteres de interés agronómico es la selección de una población de mapeo apropiada (32). Con el fin de buscar marcadores ligados a genes de resistencia a enfermedades, se utilizan progenies (F₂, retrocruzas, líneas isogénicas) de cruzamientos de progenitores resistentes y susceptibles a la enfermedad. Los datos de segregación para la resistencia, obtenidos en pruebas de progenie, son combinados con los datos de segregación de los marcadores

moleculares. Debido a que se evalúan un gran número de plantas y marcadores, los datos se pueden analizar a través de programas de computación como MAPMAKER (17). Estos programas analizan los datos obtenidos de las poblaciones segregantes y estiman la frecuencias de recombinación, que luego se utilizan para ubicar los marcadores genéticos en un mapa de ligamiento lineal.

Michelmore *et al.* (21), desarrollaron un método que permite la identificación rápida de marcadores ligados a genes de interés. El método denominado *bulk segregant analysis* (BSA) consiste en agrupar el ADN de las plantas individuales de una población segregante. Los grupos contienen ADN de individuos que son idénticos para un carácter, por ejemplo resistencia o susceptibilidad para una enfermedad en particular. Los agrupamientos se analizan por alguna de las técnicas de marcadores moleculares antes descritas. Así, las diferencias detectadas entre los agrupamientos indicarían que existe ligamiento entre los marcadores y el carácter por el que se hicieron los grupos. A través de este método, Maisonneuve *et al.* (20) encontraron marcadores fuertemente ligados a genes de resistencia a *Bremia lactucae* en lechuga.

Tabla 2. Algunas citas sobre el uso de marcadores moleculares para la caracterización de germoplasma en especies hortícolas

| Especies | Marcador utilizado | Referencia |
|---|--------------------|------------|
| Apio (<i>Apium graveolens</i>) | RAPD | 41 |
| Brócoli (<i>Brassica oleracea</i>) | RAPD y RFLP | 9 |
| Nabo (<i>Brassica napus</i>) | RAPD | 10 |
| Poroto (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | RAPD | 31 |
| Frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i>) | RAPD | 7 |
| Cebolla (<i>Allium cepa</i>) | RAPD y RFLP | 3,4,15 |
| Ajo (<i>Allium sativum</i>) | RAPD | 5 |

3. Marcadores ligados a genes de resistencia a enfermedades en cultivos hortícolas

El mejoramiento por resistencia a enfermedades es uno de los componentes principales de los planes de mejoramiento. Los marcadores moleculares permitieron investigar gran parte del genoma por ligamiento a resistencias y resultó en la identificación de un gran número de marcadores (22). En la Tabla 3 se listan algunos ejemplos sobre marcadores ligados a plagas y enfermedades en distintos cultivos hortícolas; estos marcadores pueden ser utilizados en la selección asistida.

Los requerimientos fundamentales de MAS para ser aplicado eficientemente en los programas de mejoramiento son: 1) el marcador debe estar fuertemente ligado (1cM o menos) al carácter de interés; 2) se deben desarrollar tecnologías que permitan la selección rápida y eficiente de grandes poblaciones (en este sentido las técnicas más apropiadas son las derivadas de PCR), y 3) el

método desarrollado debe ser altamente reproducible, de baja complejidad, rápido y de bajo costo.

Uno de los principales problemas del uso de marcadores RFLP en los planes de mejoramiento son los costos, no sólo de materiales sino de laboratorio, personal especializado y radioisótopos. El otro problema relacionado especialmente a los marcadores RAPD es la baja reproducibilidad de los patrones (5-10 % de error). Para solucionar estos problemas se han desarrollado marcadores más confiables como los SCARs, o *primers* asociados a alelos específicos (ASAP). Timmerman *et al.* (37) desarrollaron ASAP para el gen *er-1*, que confiere resistencia a tizón pulverulento en arveja. Estos marcadores son confiables, rápidos y se puede eliminar la necesidad de realizar electroforesis, ya que los productos de PCR se pueden colorear, teñir y visualizar directamente. A su vez, dos marcadores se pueden analizar en una sola reacción de PCR, llamada “reacción multiplex”.

Tabla 3. Lista de algunos de los marcadores moleculares ligados a resistencia a enfermedades en cultivos hortícolas.

| Cultivo | Patógeno/Peste | Gen de resistencia | Marcador ligado | Cita |
|---|--------------------------------------|--------------------|-----------------|-------|
| Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) | Meloidogyne incognita | Mi | RFLP, RAPD | 16,40 |
| | Virus de la peste negra del tomate | Sw-5 | RAPD | 33 |
| | Verticillium dahliae | Ve | RAPD, SCAR | 13 |
| Lechuga (<i>Lactuca serriola</i>) | Bremia lactucae | Dm17 y 18 | RAPD, RFLP | 20 |
| | Plasmopara lactucae-radicis | plr | | 14 |
| Papa (<i>Solanum tuberosum</i>) | Globodera rostochiensis | H1 | RFLP | 11 |
| Poroto (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | Uromyces appendiculatus | Up-2 | RAPD | 23 |
| Arveja (<i>Pisum sativum</i>) | Virus del mosaico común de la arveja | mo | RFLP | 8 |
| | Tizón pulverulento de la arveja | er-1 | RFLP, ASAP | 37 |

4. Marcadores moleculares ligados a caracteres de herencia cuantitativa (QTL)

Muchos de los caracteres de importancia agronómica como el rendimiento, componentes del rendimiento (tamaño de fruto, número de frutos) y altura de planta, están controlados por varios genes. La construcción de mapas genéticos saturados permitió analizar los factores Mendelianos que determinan caracteres cuantitativos (QTL).

La identificación de QTLs no difiere de la identificación de marcadores ligados a caracteres de herencia monogénica. Sin embargo, es dificultoso determinar la localización precisa de un determinado QTL. Para solucionar este problema se trabaja con cruzamientos bien caracterizados, tales como líneas isogénicas, que llevan un segmento de una línea parental en un fondo genético de otra línea (24). Uno de los aspectos más importantes en el análisis de QTL es determinar el número y el efecto de los factores genéticos que controlan el carácter de herencia cuantitativa. Michelmore (22), cita que el número de *loci* para resistencia cuantitativa a enfermedades puede ir entre 2 y 13. En algunos casos, pocos *loci* controlan gran parte de la variación genética y estos son considerados oligogenes más que poligenes.

En tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), un *locus* explica el 77 % de la variancia genética para resistencia a *Pseudomona solanacearum* (6). Según Tanskley y McCouch (36), en tomate se han obtenido líneas que contienen QTLs de la especie silvestre *Lycopersicon hirsutum* que superan a la línea original élite en 48, 22 y 33 % en rendimiento, sólidos solubles y color del fruto, respectivamente. Estas líneas superiores se obtuvieron en dos etapas: primero se ubicaron QTLs en plantas de retrocruzas (BC2) y, en base a esta información, se seleccionaron nuevas líneas que contenían alelos de QTL de la especie silvestre. Esto demuestra que es

posible crear variedades con una mezcla de genes beneficiosos que provengan de especies silvestres relacionadas, y que estos genotipos se pueden obtener en forma eficiente a través del llamado “mejoramiento molecular” (36).

Conclusiones

Los avances logrados en las últimas dos décadas en las técnicas de Biología Molecular han permitido analizar en profundidad el genoma de las plantas y se desarrollaron mapas genéticos con una gran cantidad de marcadores. Muchos de estos marcadores están fuertemente ligados a características de interés agronómico y por lo tanto son sumamente útiles en la selección asistida. Por otro lado, están a disposición de los mejoradores técnicas muy confiables y de bajo costo, como las basadas en PCR, que están al alcance de laboratorios de baja complejidad. Como afirman Rafalski y Tingey (29), es necesario que se produzca un cambio cultural en la comunidad de mejoradores de plantas, para que acepten la necesidad de diseñar esquemas de mejoramiento que incluyan la eficiencia de la selección genética por marcadores.

Bibliografía

1. AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A. & P.B. CREGAN. 1992. Genetics 132:1131-1139.
2. BECKMAN, J.S. & M. SOLLER. 1983. Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet. 67:35-43.
3. BRADENN, J.M. & M.J. HAVEY. 1995a. Restriction fragment length polymorphisms reveal considerable nuclear divergence within a well supported maternal clade in *Allium* section *cepa* (Alliaceae). Am. J. Bot. 82:1455-1462.
4. BRADENN, J.M. & M.J. HAVEY. 1995b. Randomly amplified polymorphic DNA in bulb onion and its use to assess inbred integrity. J. Am. Soc. Hort. Sci. 120: 752-758.
5. BRADLEY, K.F., RIEGER, M.A. & G.G. COLLINS. 1996. Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. Aust. J. Exp. Agric. 36:613-618.

6. DANESH, D.; AARONS, S.; MCGILL, G.E. & N.D. YOUNG, N.D. 1994. Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:464-471.
7. DEGANI, CH., ROWLAND, L.J., LEVI, A., HORTYNSKI, J.A. y G.J. GALLETTA. 1998. DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica* 102:247-253.
8. DIRLEWANGER, E.; ISAAC, P.G.; RANADE, S.; BELAJOUZA, M.; COUSIN, R. & D. DE VIENNE. 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. *Crop Sci.* 33:838-847.
9. DOS SANTOS, J.B., NIENHUIS, J., SKROCH, P., TIVANG, J. & M.K. SLOCUM. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* l. genotypes. *Theor Appl Genet* 87:909-915.
10. DULSON, J., LAIMA, S.K. & V.L. RIPLEY. 1998. Efficacy of bulked DNA samples for RAPD DNA fingerprinting of genetically complex *Brassica napus* cultivars. *Euphytica* 102:65-70.
11. GEBHARDT, C.; MUGNIERY, D.; RITTER, E.; SALAMINI, F. & E. BONNEL. 1993. Identification of RFLP markers closely linked to the *Hl* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 85:541-544.
12. GRIFFITHS, A.F., MILLER, J.H., SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R.C. & W.M. GELBART. 1993. An introduction to genetic analysis. Fifth edition, Freeman, W.H. and Company / New York.
13. KAWCHUK, L.M., LYNCH, D.R., HACHEY, J. & P.S. BIANI. 1994. Identification of a co-dominant amplified polymorphic DNA marker linked to the verticillium resistance gene in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 89:661-664.
14. KESSELI, R.V.; PARAN, I. & R.W. MICHELMORE. 1994. Analysis of detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (Lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics.* 136: 1435-1446.
15. KLAAS, M. 1998. Applications and impact of molecular markers on evolutionary and diversity studies in the genus *Allium*. *Plant Breeding* 117:297-308.
16. KLEIN-LANKHORST, R.; REITVELD, P.; MACHIELIS, B.; VERKERK, R.; WEIDE, R.; GEBHARDT, C.; KORNEEF, M. & P. ZABEL. 1991. RFLP markers linked to the root knot nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 81:661-667.
17. LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, A.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E. & L. NEWBERG. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
18. LEE, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Adv. Agron.* 55:265-344.
19. MARKERT, C.L. & F. MOLLER. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissues, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45:753-763.
20. MAISONNEUVE, B.; BELLEC, Y.; ANDERSON, P. & R.W. MICHELMORE. 1994. Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing cluster of resistance genes. *Theor Appl. Genet.* 89:96-104.
21. MICHELMORE, R.W., PARAN, I. & R.V. KESSELI. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9828-9832.
22. MICHELMORE, R.W. 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15:393-427.
23. MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R. & J.D. KELLY. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 85:745-749.
24. MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R. & T. SASAKI. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3:87-103.
25. MORGANTE, M. & A.M. OLIVIERI. 1993. *Plant J.* 3:175-182.
26. NIENHUIS, J. & G. SILLS. 1992. The potential of hybrid varieties in self-pollinated vegetables. In: Datte Y, Dumas C, Gallais A (eds) *Reproductive biology and plant breeding*. Springer-Verlag, pp, 378-396.
27. PARAN, I. & R.W. MICHELMORE. 1994. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
28. PEREZ DE LA VEGA, M. 1997. El uso de marcadores moleculares en genética vegetal y mejora. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* Vol. 12 (1, 2 y 3) 31-60.
29. RAFALSKI, J.A. & S.V. TINGEY. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *TIG*, vol 9, 8:275-280.

30. RICK, C.M. 1978. The tomato, Scientific American, agosto.
31. SKROCH, P.W. & J. NIENHUIS. 1995. Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. Theor Appl Genet 91:1078-1085.
32. STAUB, J.E., SERQUEN, F. C. & M. GUPTA. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience 31:729-741.
33. STEVENS, M.R.; HEINY, D.K.; RHOADS, P.D.; GRIFFITHS, P.D. & J.W. SCOTT. 1996. A linkage map of the tomato spotted wilt virus resistance gene *Sw-5* using near isogenic lines and an interspecific cross. Acta Horticulturae 431: 885-392.
34. TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H. & M.W. BONIERBALE. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for and old science. Bio/Technology 7:257-264.
35. TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; DE VICENTE; M.C., BONIERBALE; M.W., BROUN; P., FULTON; T.M., GIOVANNONI; J.J., GRANDILLO; S., MARTIN; G.B., MESSGUER, R; MILLER, J.C.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RODER, M.S.; WING, R.A.; WU, W. & N.D. YOUNG. 1992. High density molecular maps of the tomato and potato genomes. Genetics 132:1141-1160.
36. TANKSLEY, S.D. & S. MCCOUCH. 1997. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. Science 227: 1063-1066.
37. TIMMERMAN, G.M.; FREW, T.J.; WEEDEN, N.F.; MILLER, A.L. & D.S. GOULDEN. 1994. Linkage mapping of *ofer*, a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi*). Theor Appl Genet 88:1050-1055.
38. VALLEJOS, C.E., SAKIYAMA, C.D. & C.D. CHASE. 1992. Molecular marker-based linkage map in *Phaseolus vulgaris* L. Genetics 131:733-740.
39. WEEDEN, N.F., M. TIMMERMAN, M. HERMMAT, B.E., KNEEN, & M.A. LOHI. 1992. Inheritance and reability of RAPD markers. In: J. Nienhuis (ed.) Proc. Symp. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, p. 12-17 Nov. 1992, Minneapolis, Minn.
40. WILLIAMSON, V.M.; HO, J.Y.; WU, F. F.; MILLER, N. & I. KALOSHIAN. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi*, in tomato. Theor Appl Genet 87:757-763.
41. YANG, X. & C. QUIROS. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theor Appl Genet 86:205-212.
42. ZABEAU, M & P. VOS. 1993. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprints. European Patent Application. Publ. 0534858A1.

Glosario

Bromuro de etidio. El bromuro de etidio es un análogo de bases que se intercala en forma irreversible entre las bases de la molécula de ADN. Cuando se lo excita con luz ultravioleta emite fluorescencia de color naranja.

Centimorgan. Es una medida de la distancia genética entre un par de genes, donde una unidad del mapa representa 1% de recombinación entre los dos genes.

cADN. Síntesis de ADN a partir de un ARN específico a través de la acción de la enzima transcriptasa reversa.

Clonado del ADN. Sección de ADN que se insertó en un vector, tales como plásmidos o cromosoma de un fago, y que puede replicarse dando lugar a muchas copias.

Codominante. Son aquellos marcadores en los que se pueden observar los dos alelos en el heterocigota.

Electroforesis. Técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla de moléculas (proteínas, ADN, ARN), dentro de una matriz porosa (gel), en un campo eléctrico.

Enzimas de restricción. Son endonucleasas que reconocen una secuencia de nucleótidos específica en el ADN y cortan la cadena en ese punto.

Frecuencia de recombinación. La proporción (o porcentaje) de células o individuos recombinantes.

Ligamiento. Asociación de genes en un cromosoma.

Ligasa. Enzima que permite unir dos fragmentos de ADN. Esta enzima restablece los enlaces fosfodiéster de los ácidos nucleicos.

PCR. Método que sirve para amplificar segmentos de ADN específicos y que explota ciertas características de la replicación del ADN.

Polimorfismo. Ocurrencia de varios fenotipos asociados con alelos de un gen.

Primer. Secuencia corta de ADN utilizada como iniciador de la reacción de PCR

Southern blots. Transferencia de fragmentos de ADN, separados por electroforesis, del gel a una membrana de nylon o nitrocelulosa. Esta membrana se sumerge en una solución que contiene la sonda que se pega al fragmento de interés.