



# La adaptación al ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal

Editores Científicos:

Carmen María Ávila Gómez

Sergio Gustavo Atienza Peñas

María Teresa Moreno Yangüela

José Ignacio Cubero Salmerón



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  
**CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA**





# LA ADAPTACIÓN AL AMBIENTE Y LOS ESTRESSES ABIÓTICOS EN LA MEJORA VEGETAL

## **Editores Científicos:**

Carmen María Ávila Gómez

Sergio Gustavo Atienza Peñas

María Teresa Moreno Yangüela

José Ignacio Cubero Salmerón



**La adaptación al ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal**

© JUNTA DE ANDALUCÍA. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  
Consejería de Agricultura y Pesca

**Publica:** Dirección General de Planificación y Análisis de Mercados. Servicio de Publicaciones y Divulgación

**Editores Científicos:** Carmen María Ávila Gómez  
Sergio Gustavo Atienza Peñas  
María Teresa Moreno Yangüela  
José Ignacio Cubero Salmerón

© **Textos: Autores**

**Ilustraciones:** Autores

**ISBN:** 978-84-8474-248-2

**Depósito Legal:** SE-4491-2008

**Maquetación e Impresión:** LUMEN GRÁFICA, S.L. (Sevilla)



*A todos los mejoradores que trabajan  
para quienes viven en ambientes extremos  
y  
a todos los que siguen creyendo  
que sin Agricultura, nada*





## ÍNDICE

---

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN. Carmen M <sup>a</sup> Ávila, Sergio G. Atienza, María T. Moreno y José I. Cubero . . . . .	7
CAPÍTULO 2. EL ANÁLISIS GENÉTICO DE CARACTERES QUE PRESENTAN ALTA INFLUENCIA AMBIENTAL. Ana M. Pérez de Castro y Fernando Nuez Viñals . . . . .	13
CAPÍTULO 3. EL BLUP Y LOS MÉTODOS BAYESIANOS. APLICACIÓN A LA MEJORA GENÉTICA VEGETAL. Manuel Baselga y Agustín Blasco . . . . .	55
CAPÍTULO 4. MÉTODOS CUANTITATIVOS CONVENCIONALES Y TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA SELECCIÓN DE CARACTERES COMPLEJOS. Jesús Moreno-González . . . . .	83
CAPÍTULO 5. INTERACCIÓN GENOTIPO POR AMBIENTE. Ignacio Romagosa, Jordi Voltas, Marcos Malosetti, Fred A. van Eeuwijk . . . . .	107
CAPÍTULO 6. LA RAÍZ Y EL DOSEL. José Ignacio Cubero y Salvador Nadal . . . . .	137
CAPÍTULO 7. FENOLOGÍA Y ADAPTACIÓN DE LA CEBADA. Ernesto Igartua, Alfonso Cuesta, José Manuel Lasa, María Pilar Gracia, Samia Yahiaoui, Marian Moralejo, José Luis Molina-Cano, Francisco J. Ciudad, Ana María Casas . . . . .	157
CAPÍTULO 8. RESISTENCIA AL ENCAMADO. José María Carrillo Becerril . . . . .	183
CAPÍTULO 9. BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS. Eduardo O. Leidi y José M. Pardo . . . . .	197
CAPÍTULO 10. TOLERANCIA A LA SALINIDAD. Jesús Cuartero, M <sup>a</sup> Carmen Bolarín, Vicente Moreno y Benito Pineda . . . . .	231
CAPÍTULO 11. RENDIMIENTO Y RESISTENCIA A SEQUÍA EN MAÍZ. José L. Araus, Greg O. Edmeades, Ciro Sánchez y María D. Serret . . . . .	263
CAPÍTULO 12. MEJORAMIENTO VEGETAL PARA CONDICIONES DE ALTAS TEMPERATURAS. Carolina Saint Pierre, Julián Pietragalla, Matthew Reynolds . . . . .	285
CAPÍTULO 13. ESTRÉS POR METALES. José Luis Couselo y Antonio Ballester . . . . .	301
CAPÍTULO 14. RESISTENCIA A IONES TÓXICOS. César Benito y Francisco Javier Gallego . . . . .	315
CAPÍTULO 15. RESPUESTA MOLECULAR AL ESTRÉS TÉRMICO Y A LOS ESTRESSES MÚLTIPLES EN PLANTAS. Sergio G. Atienza, Antonio-Michelle Stanca y Luigi Cattivelli . . . . .	361

CAPÍTULO 16. RESISTENCIA A HERBICIDAS José Ignacio Cubero y Elena Prats . . . . .	391
CAPÍTULO 17. SELECCIÓN IN VITRO PARA ESTRESSES ABIÓTICOS. José Luis Couselo, Ana M. Vieitez y Antonio Ballester . . . . .	409
CAPÍTULO 18. LA INCORPORACIÓN DE GERMOPLASMA EXÓTICO. Amando Ordás y Pedro Revilla . . . . .	425
CAPÍTULO 19. MEJORA Y SELECCIÓN DE PATRONES <i>PRUNUS</i> TOLERANTES A ESTRESSES ABIÓTICOS. María Ángeles Moreno, Yolanda Gogorcena, Jorge Pinochet . . . . .	449
CAPÍTULO 20. MEJORA DE LA ADAPTACIÓN EN SISTEMAS DE CULTIVO ASOCIADO. Ana Paula Rodiño, Marta Santalla y Antonio M. De Ron . . . . .	477



# CAPÍTULO 1

---

## INTRODUCCIÓN

*Carmen María Ávila*  
*Sergio G. Atienza*  
*María Teresa Moreno*  
*José Ignacio Cubero*





## INTRODUCCIÓN

---

Carmen María Ávila<sup>1</sup>, Sergio G. Atienza<sup>2</sup>, María Teresa Moreno<sup>1</sup> y José Ignacio Cubero<sup>3</sup>

<sup>1</sup> **Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA).**

<sup>2</sup> **Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC**

<sup>3</sup> **Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC / Departamento de Genética, UCO.**

**Finca Alameda del Obispo, Av. Menéndez Pidal s/n Apdo. 4084, 14080.**

**E-mail: carmenm.avila@juntadeandalucia.es**

---

La Historia de la Agricultura y, por tanto, la de la Mejora de Plantas, es la historia de una continua adaptación al ambiente. De por sí, la domesticación propiamente dicha es una adaptación de una planta silvestre a un ambiente insólito cual es el de un lugar donde se la siembra en densidades nunca vistas en ambientes naturales, se la protege de sus enemigos todo lo que se puede, hasta se la alimenta y riega. La domesticación, pues, es el resultado de colocar una planta silvestre en condiciones, para lo que ha sido hasta entonces su vida, de estrés abiótico.

Y desde entonces, desde hace unos diez mil años en unos lugares y otros miles de años en otros, la Agricultura, con su inseparable y necesaria Mejora de plantas, aún no genética pero ya Mejora, ha consistido en ir adaptando consciente o inconscientemente, por necesidad o por placer, los vegetales y animales ya domesticados a los ambientes más diversos. Unos materiales respondieron mejor que otros, pero todos ellos o, al menos, la gran mayoría, se han extendido por la faz de la Tierra conquistando lugares lejanos a sus países de origen, adaptándose a climas tan diversos como los suelos en que crecían.

Por ello, hablar de “resistencia” a condiciones ambientales desfavorables, que es lo mismo que decir “estreses abióticos” es algo petulante o, quizá, algo fruto de la ignorancia de la Historia. Pero si tiene sentido hablar así es porque aún necesitamos adaptar nuestros cultivos a condiciones todavía más extremas, labor algo ardua, pues nuestras plantas pueden crecer en la meseta de Pamir o en el altiplano andino, en los bordes del desierto con menos de 200 mm de precipitación y también en las orillas del Mar Muerto a 400 m bajo el nivel del mar. No todas ellas, claro está, pero en todas las regiones salvo en las tundras heladas y en medio de los grandes desiertos hay vida, vida agrícola, por el hecho de que las plantas que el hombre necesita para su alimentación pudieron adaptarse y fructificar.

Pudieron adaptarse o el Hombre las hizo adaptarse a base de tesón, léase “selección”. Hoy nos resulta normal ver crecer el trigo, una planta del Oriente Medio, en la India monzónica, en el Brasil tropical y aluminico y en la helada Escandinavia. El trigo no estaba naturalmente predispuesto ni a esas latitudes ni a esos suelos. Lo mismo puede decirse del maíz y del arroz, de la papa y de la soja, que hoy dan de comer en lugares que sus ancestros nunca hubieran podido imaginar. Hablamos de “resistencia” o “tolerancia”, pero en realidad deberíamos hablar simplemente de “adaptación” o, simplemente, de “agricultura”. Cuando hoy registramos nuevas variedades para invernadero o en cualquier otro ambiente artificial, o cuando cultivamos en sustratos especiales, en realidad seguimos actuando como lo hicieron nuestros ancestros, los que crearon un nuevo régimen económico sin pretenderlo, es decir, continuamos adaptando especies y variedades a nuevas condiciones ambientales haciéndolas “resistentes” o “tolerantes” a ellas, a nuevos “estreses abióticos”.



También se habla de “resistencia” o “tolerancia” a plagas y enfermedades, es decir, a “estreses bióticos”, pero el sentido es distinto. La resistencia a factores abióticos (sequía, calor, salinidad o iones tóxicos en general, bajas temperaturas, etc.) es, como ya se ha dicho, una respuesta a las condiciones ambientales, pero aquí no hay un ser vivo frente a otro ser vivo, no hay razas de patógenos porque el ambiente no crea una forma agresiva en respuesta a una modificación de la planta. El ambiente es algo independiente del ser vivo, algo al cual éste o se adapta y sobrevive o no se adapta y desaparece. Si es lo primero, que es el caso de todas las variedades locales, el agricultor consigue un material con el que cultivar las tierras en las que vive o quiere vivir. Aunque nos sorprenda, el beduino que cultiva estacionalmente cebada y lenteja en el límite de los 200 mm no considera que esté actuando en condiciones de estrés: esas son, simplemente, sus condiciones de cultivo; igual piensa el que cultiva albaricoques a más de 3000 m de altura en el Pamir. Somos nosotros, los que habitamos las zonas fértiles de las latitudes templadas los que hablamos de condiciones extremas, pero lo son para nuestra agricultura. No ha habido, es cierto, grandes núcleos urbanos, ni reinos ni imperios por tanto, en zonas desérticas por calor o por frío o por sal o por exceso de agua. El problema de buscar adaptaciones a condiciones extremas, en los momentos actuales es consecuencia de haberse colonizado todas las buenas tierras del Planeta por exceso de población.

Pero cabe la pregunta, en estas nuestras buenas condiciones, de si es necesario buscar variedades adaptadas a límites biológicos, puesto que no sólo nos son casi desconocidos sino que la política agraria de los países desarrollados, en especial los de la Unión Europea, es precisamente dejar de cultivar tierras con el argumento de que en otros lugares se produce más barato. Si se retiran buenas tierras para el cultivo, ¿quién cultivará en suelos salinos, en pura caliza, en lugares encharcados o envenados por metales pesados? La respuesta es que, entre nosotros, nadie. Pero es una respuesta incompleta por varios motivos.

Uno de esos motivos es la solidaridad que debe reinar entre humanos. En otros parajes sí que reinan esas condiciones y no tienen otras, ni medios de defensa ante parásitos milenarios. Obtener materiales que puedan ser cultivados y garanticen un mínimo vital es un débito que hemos de satisfacer, un débito moral pero también económico, pues no pocos de los genes que utilizamos en Mejora proceden de esos ambientes extremos.

Pero incluso para nuestra propia agricultura, la actual y la que venga, hace falta el estudio de los estreses abióticos para obtener nuevas variedades. No vamos a sembrar en un saladar ni en una bocamina, pero si se consigue un avance en la tolerancia a la sal, por pequeño que sea, se podrán utilizar para el riego aguas salobres no potables, esas aguas llamadas “duras” o “amargas”, inutilizables ahora para todo uso. O si se obtiene una variedad que “resista” un grado más de temperatura, no hará falta gastar tanto combustible en su cultivo en invernadero. La resistencia al frío en algodón no busca variedades que soporten temperaturas bajo cero, sino que puedan germinar a temperaturas más bajas que las suyas habituales con objeto de garantizar una siembra temprana en primavera evitando el acolchado con plástico. Tendemos, pues, a un fin asequible, práctico no sólo para el agricultor sino para el ciudadano común, pues obviamente se puede hacer mucho, con mínimas ganancias, para maximizar el uso de recursos naturales y aumentar, puede que prodigiosamente, el ahorro de energía, y quién sabe si aportar un granito de arena para evitar los temibles “efecto invernadero” y “cambio climático”, se crea o no en ellos.



Hay que tener en cuenta que, si bien para el mejorador son características como otras cualquiera, en la práctica las resistencias a condiciones ambientales son caracteres fisiológicos complejos con multitud de componentes, porque cuando cualquier individuo se desarrolla en un ambiente hostil, todos sus genes están funcionando para poder sobrevivir en él. No es fácil sustituir complejos sistemas génicos presentes en cultivos que sufrieron selección durante miles de años en zonas de ambientes extremos. Por ello, hablar, por ejemplo, de “un gen resistente a la salinidad”, es señalar un gen que controla una reacción más o menos importante, pero integrada en un conjunto de otras reacciones encaminadas al mismo fin. De ahí lo difícil que resulta aislar genes “de resistencia” a partir de especies silvestres o de formas primitivas muy adaptadas a condiciones extremas: todo en ellas forma un bloque de genes responsable de una máxima adaptación a dichas condiciones, y mientras más extremo el ambiente, más compacto será el bloque y más interrelacionados sus componentes.

Las bajas heredabilidades que se obtienen para estos caracteres no son más que la consecuencia de la complejidad genética y una extrema interacción con el ambiente. La dificultad en la labor de mejora es evidente, máxime si se considera que no se trata sólo de obtener una línea experimental que satisfaga tanto el ego del investigador como una tesis doctoral, sino una variedad de uso comercial. Esto obliga a seleccionar siempre en un fondo genético de alta producción; de ahí que la selección para estreses ambientales se realice frecuentemente en un programa combinado con selección sin estrés.

Para el manejo de estos caracteres en Mejora se necesita, pues, la existencia de variabilidad genética para el mismo, el conocimiento del sistema genético que lo controla y su interacción con el ambiente. La correcta medición del carácter, es, como con cualquier otro caso, esencial, aunque aquí se tropieza con grandes dificultades metodológicas. No es la menor el hecho de que los estreses ambientales no suelen presentarse en solitario de tal forma que podamos descomponerlos en componentes, estudiar la herencia de éstos y diseñar un elegante plan de acción. Lamentablemente, la sequía suele ir acompañada de altas temperaturas y, frecuentemente, con exceso de calcio o alta salinidad; las tierras frías suelen ser húmedas y ácidas, etc.

Las nuevas técnicas en Genética y en Estadística y Biología Molecular vienen en ayuda del mejorador, pero éste ha de estar bien preparado o, lo que viene a ser igual, tener acceso a la información necesaria. No se puede saber de todo, pero sí se debe saber a dónde y a quién acudir. Libros como el presente tratan de dar esta información.

En la presente obra se presentan las técnicas y los métodos, a veces en forma de casos de estudio, para atacar los problemas que los estreses ambientales ofrecen al mejorador. Se han buscado enfoques metodológicos desde campos muy distintos, de ahí que se pueda percibir un cierto solape entre capítulos, pero es un solape que enriquece al proceder de distintos puntos de arranque buscando soluciones distintas. La variabilidad en técnicas es tan conveniente como la que necesariamente debe darse en el material de partida en una plan de mejora genética. El aislamiento de genes, el estudio de la expresión génica, los análisis genéticos cualitativos y cuantitativos, el diseño de experimentos y la selección clásica se entremezclan en esta obra ofreciendo abundante bibliografía para que el estudiante, el investigador, el técnico agrícola y, en definitiva, el mejorador, que es una mixtura de todos ellos, tengan en sus manos una herramienta que les facilite su labor.

CAPÍTULO **2**

---

**EL ANÁLISIS GENÉTICO  
DE CARACTERES QUE  
PRESENTAN ALTA  
INFLUENCIA AMBIENTAL**

*Ana M. Pérez de Castro  
Fernando Nuez Viñals*





## EL ANÁLISIS GENÉTICO DE CARACTERES QUE PRESENTAN ALTA INFLUENCIA AMBIENTAL

---

Ana M. Pérez de Castro y Fernando Nuez Viñals

**Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad  
Valenciana (COMAV)**  
fnuez@btc.upv.es

---

### 2.1. INTRODUCCIÓN

Muchos de los caracteres con interés en la mejora vegetal se ven muy influidos por el ambiente, entre otros, caracteres como el rendimiento, la resistencia a plagas y enfermedades, la tolerancia a estreses abióticos, los procesos relacionados con la floración o con la maduración, el contenido de la planta o del fruto en compuestos relacionados con la calidad organoléptica o nutritiva, etc. Las características a nivel fenotípico que muestra un individuo se deben, por tanto, no sólo al efecto del genotipo, sino también al ambiente en el que éste se desarrolla y a la interacción entre ambos factores.

Con frecuencia la existencia de variación continua se asocia a caracteres con un control genético poligénico. Sin embargo, el resultado de la acción del ambiente es importante tanto en caracteres con un control genético sencillo como en caracteres controlados por muchos genes con efectos pequeños. En el primer caso, la influencia del ambiente tiene como resultado la imposibilidad de establecer una relación inequívoca entre la presencia de un gen y la expresión de un carácter. Por ejemplo, para aquellos genes que presentan penetración incompleta, no todos los individuos portadores del gen manifiestan el fenotipo asociado al mismo. En otros casos se detecta que individuos portadores de un mismo gen muestran una variedad de fenotipos, debido a la expresividad variable del gen. Como consecuencia, para caracteres con elevada influencia ambiental, no resulta posible establecer una relación biyectiva genotipo-fenotipo, ya que, individuos que manifiestan el mismo fenotipo pueden tener genotipos distintos, a la vez que individuos con un mismo genotipo pueden mostrar distintos fenotipos.

El objetivo final del mejorador es seleccionar genotipos superiores para una característica de interés. Sea cual sea esta característica, la imposibilidad de identificar los genotipos superiores a partir de la mera observación del fenotipo supone uno de los mayores problemas en cualquier programa de mejora. Para cualquier carácter con gran influencia del ambiente el análisis genético se ve muy dificultado, incluso en casos en los que el control genético es sencillo.

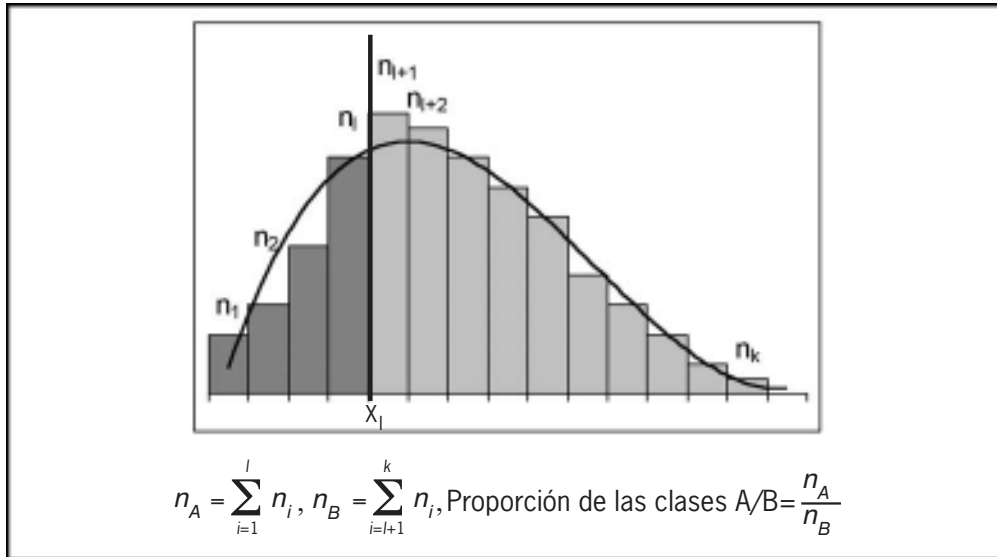
Por otra parte, es fundamental determinar el control genético del carácter de interés, distinguiendo en primer lugar si está controlado por uno o pocos genes, o si se trata de un carácter poligénico. La identificación de marcadores moleculares asociados a las regiones del genoma que contribuyen con efectos significativos a la variación continua de una característica de interés ha proporcionado una de las vías para realizar el análisis genético de caracteres complejos. Se trata del análisis de QTLs (“Quantitative Trait Loci”). Esta aproximación metodológica, aunque no está exenta de críticas por la validez de los resultados que proporciona, en la actualidad puede considerarse dominante. Gran parte de su auge se debe a las facilidades que ofrece al investigador. Se fenotipa una generación segregante para los caracteres de interés y se genotipa para un conjunto de marcadores. Los programas de ordenador se ocupan del resto. El investigador no tiene que hacer un “análisis artesanal” del control genético. La facilidad se impone. Este tipo de aproximación se analiza en el capítulo 4.

Otra variante para analizar regiones genómicas que contribuyan al control genético de caracteres cuantitativos es el empleo de NILs (“Near Isogenic Lines”). Se trata de un conjunto de líneas que tienen introgresados pequeños fragmentos del genoma de una determinada fuente de variación. En teoría, si entre una determinada NIL y el parental recurrente existe una diferencia fenotípica significativa, el QTL correspondiente debe estar ubicado en el fragmento introgresado en la NIL.

En cualquier caso, no se dispone para todas las especies de interés agronómico de las herramientas necesarias para abordar el estudio mediante estas estrategias. No obstante, el auge de estas metodologías alternativas no excluye la posibilidad de otros análisis genéticos convencionales. Resulta de interés disponer de modelos que permitan realizar el análisis genético de caracteres que muestran alta influencia ambiental, y por tanto variación continua, a partir de datos fenotípicos, en ausencia de asociación con marcadores moleculares. Ello es así porque simultáneamente al estudio del control genético permiten profundizar en la naturaleza de la variación, así como estimar parámetros esenciales para el mejorador. Por ejemplo, ¿cuál es el grado de penetración? ¿Cómo afecta la dosis génica a la expresión de la resistencia? ¿Cambia la penetración de un gen con la fase de desarrollo? ¿Existen procesos de escape y antixenosis? En este tipo de aproximación se centra este capítulo.

## 2.2. DISCRETIZACIÓN DE CARACTERES CONTINUOS

La aproximación más primaria para realizar un análisis mendeliano de caracteres que muestran variación continua es establecer un criterio que permita estructurar los datos en clases discretas. En su forma más simple consiste en dicotomizar los datos estableciendo un valor barrera  $x_l$  que separe las observaciones en dos clases (Figura 2.1)



**Figura 2.1.** Dicotomización de caracteres continuos. Histograma de frecuencias observadas y establecimiento de dos clases, A y B.

El aspecto crítico de esta aproximación estriba en situar adecuadamente el valor barrera,  $x_l$  dentro del objetivo de mejora.

El diseño experimental consiste en construir una familia formada por dos líneas parentales que difieran en el carácter de interés, la  $F_1$  y todas las generaciones segregantes posibles.

*Ejemplo: Control genético de la partenocarpia en pepino dulce (Solanum muricatum Aiton).*

El pepino dulce es un cultivo de origen andino del que se consume el fruto como postre refrescante. Presenta problemas de cuajado en condiciones diferentes a las de su zona de origen, por lo que algunos de los esfuerzos de mejora se han centrado en desarrollar cultivares capaces de cuajar frutos en condiciones desfavorables. Algunos clones de pepino son partenocárpico, de forma que son más productivos debido a la capacidad de desarrollar frutos en condiciones adversas, fundamentalmente con altas temperaturas. Resulta de interés la selección de este tipo de clones para la adaptación del cultivo a zonas templadas.

El cuajado de frutos es un proceso que se ve muy influido por las condiciones en las que se desarrolla la planta. El pepino dulce es extremadamente sensible a las altas temperaturas, ya que se ven afectados tanto la polinización como la fecundación. Como consecuencia, los frutos sin semillas que se desarrollan en estas condiciones pueden tener peso y tamaño muy variables, desarrollándose desde frutos de muy pequeño tamaño, que suelen considerarse en realidad pseudo-frutos y no frutos verdaderos, hasta frutos de tamaño similar al de los frutos con semillas cuajados en condiciones favorables. Por tanto, es necesario establecer un nivel umbral para el tamaño de los frutos desarrollados a partir del cual se considere que la planta es partenocárpica. Debe imponerse un criterio práctico. Desde el punto de vista comercial, partenocarpia es la “capacidad de una planta de producir uno o más frutos sin semillas similares en tamaño y forma a los frutos con semillas” (George et al., 1984). De forma que, según este criterio, el valor umbral viene determinado por el tamaño de los frutos con semillas. Esta forma de definir la partenocarpia implica una dicotomización de un carácter continuo. Es decir, aun siendo la partenocarpia un carácter cuya expresión se ve muy influida por las condiciones ambientales, mostrando una gran variación de tamaños, es posible establecer un criterio que permite clasificar cualquier planta analizada como partenocárpica o no partenocárpica.

En el estudio de Prohens et al. (1998) se incluyeron un parental partenocárpico ( $P_p$ ), un parental no partenocárpico ( $P_{np}$ ), y las generaciones  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $BC_p$  (retrocruce hacia el parental partenocárpico) y  $BC_{np}$  (retrocruce hacia el parental no partenocárpico). Se incluyeron además las generaciones procedentes de la autofecundación de los parentales. Se construyeron dos familias, difiriendo en el parental partenocárpico. Dado que los resultados para ambas familias fueron similares, se comentan los resultados obtenidos para una de ellas. Mediante el diseño de campo apropiado se determinó el número de plantas partenocárpicas de cada generación (Tabla 2.1).

Ambos parentales mostraron una respuesta homogénea. Todas las plantas de las generaciones  $F_1$  y  $BC_p$  fueron partenocárpicas. En las generaciones  $F_2$  y  $BC_{np}$  se observó una segregación compatible con un control genético de la partenocarpia por un gen dominante. Este gen se denominó P (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Número de plantas partenocárpicas (P) y no partenocárpicas (NP) en cada una de las generaciones ensayadas, razón esperada suponiendo un control monogénico dominante y comprobación estadística del ajuste de los datos al modelo propuesto.

Generación	P	NP	Razón esperada	$\chi^2$	P
$P_p$	6	0	1:0	-	1
$P_p \otimes$	27	0	1:0	-	1
$P_{np}$	0	21	0:1	-	1
$P_{np} \otimes$	0	27	0:1	-	1
$F_1$	6	0	1:0	-	1
$BC_p$	19	0	1:0	-	1
$BC_{np}$	9	12	1:1	0,43	0,51
$F_2$	56	15	3:1	0,57	0,45

La dicotomización con objeto del estudio del control genético es frecuente en distintos tipos de caracteres, tales como resistencia a enfermedades (Kim et al., 2004) o el color en flores (Kwon y Dane, 1999; Kloos et al., 2005), en hojas (Yogesh Kumar et al., 2005) y frutos (López-Anido et al., 2003), entre otros.

### 2.3. CARACTERES CONTROLADOS POR GENES CON PENETRACIÓN INCOMPLETA

En muchos casos, aun estando un carácter controlado por uno o pocos genes, y siendo posible establecer clases discretas para la clasificación de los fenotipos, es necesario incluir en el modelo planteado para el control genético ciertos parámetros que cuantifiquen los efectos ambientales sobre la expresión de los caracteres. Es el caso de genes que presentan penetración incompleta. Si en el parental homocigoto portador de la característica de interés aparecen individuos que no manifiestan el fenotipo correspondiente, entonces podemos asumir que el gen o los genes que controlan el carácter presentan penetración incompleta. Muchos genes de resistencia a enfermedades en plantas presentan penetración incompleta.

En este caso debe incluirse un parámetro en el modelo que considere la penetración incompleta del gen. Supongamos un carácter controlado por un gen con dos alelos,  $A$  y  $a$ . Denominemos  $p$  al parámetro que mide la penetración incompleta del alelo  $A$  en homocigosis, es decir,  $p$  es la proporción de individuos homocigotos para el alelo  $A$  que no manifiestan el carácter conferido por este alelo. En el caso más general, es necesario incluir además otro parámetro para considerar un posible efecto de dosis génica. Este nuevo parámetro,  $q$ , representa la proporción de individuos heterocigotos que no manifiestan el carácter conferido por el alelo dominante. Bajo estos supuestos, se puede determinar la proporción de individuos que se espera que muestren el carácter conferido por el alelo dominante o recesivo en cada una de las generaciones de una familia completa.

Por ejemplo, en la generación  $F_2$ , las proporciones esperadas de cada uno de los genotipos posibles son:  $1/4 AA$ ,  $1/2 Aa$  y  $1/4 aa$ . Si denominamos  $A$  al alelo del gen que confiere fenotipo dominante, el número de individuos que se espera que muestren el fenotipo recesivo en esta generación, es decir, la probabilidad de que un individuo de la  $F_2$  muestre fenotipo recesivo  $P(a/F_2)$  será igual a:

$$P(a/F_2) = P(aa) \times P(a/aa) + P(AA) \times P(a/AA) + P(Aa) \times P(a/Aa)$$

Todos los individuos de genotipo  $aa$  mostrarán fenotipo recesivo. De los individuos  $AA$ , manifestarán fenotipo recesivo una proporción  $p$ , y de los heterocigotos, una proporción  $q$ . Por lo tanto, la frecuencia de individuos con fenotipo recesivo en la generación  $F_2$  será de:

$$P(a/F_2) = \frac{1}{4} \times 1 + \frac{1}{4} \times p + \frac{1}{2} \times q$$

De forma similar a lo descrito para la generación  $F_2$ , se puede determinar la proporción de individuos con fenotipo dominante o recesivo esperados en cada una de las generaciones, expresado en función de los parámetros  $p$  y  $q$  (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Frecuencia relativa de individuos con fenotipo recesivo ( $a$ ) y dominante ( $A$ ) en cada una de las generaciones ensayadas, suponiendo un control monogénico, en función de los parámetros  $p$  (proporción de individuos homocigotos  $AA$  que muestran fenotipo recesivo) y  $q$  (proporción de individuos heterocigotos  $Aa$  que muestran fenotipo recesivo).

Generación	Fenotipo	Frecuencia
$P_1$	$a$ $A$	1 0
$P_2$	$a$ $A$	$p$ $1 - p$
$F_1$	$a$ $A$	$q$ $1 - q$
$F_2$	$a$ $A$	$0,25 + 0,25p + 0,5q$ $0,75 - (0,25p + 0,5q)$
$BC_1$	$a$ $A$	$0,5 + 0,5q$ $0,5 - 0,5q$
$BC_2$	$a$ $A$	$0,5p + 0,5q$ $1 - (0,5p + 0,5q)$

A partir de las ecuaciones planteadas para cada una de las generaciones consideradas es posible estimar los valores para los parámetros  $p$  y  $q$ , calcular el número de individuos esperados en cada clase fenotípica y comparar los resultados obtenidos con los esperados para validar el modelo monogénico.

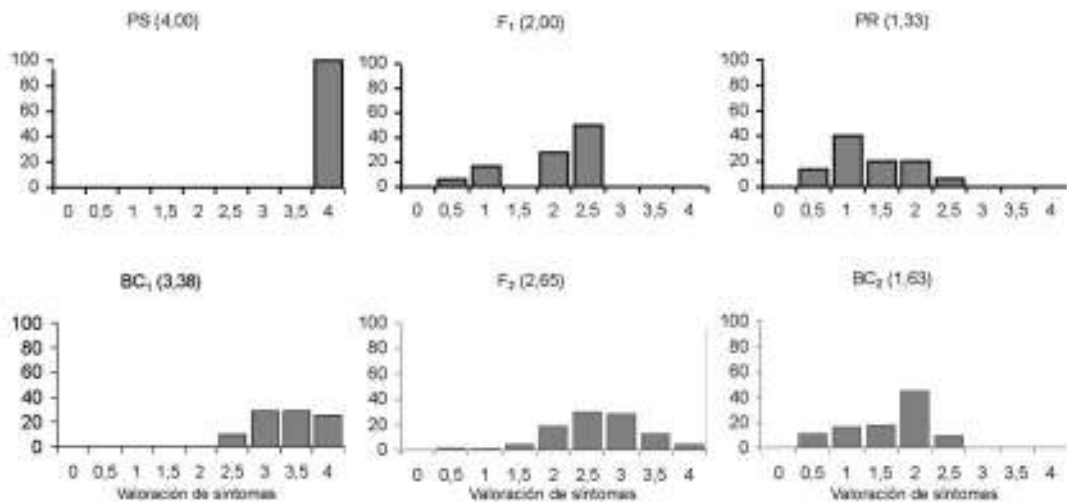
Ejemplo: Penetración incompleta de la resistencia al geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en tomate.

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) está causada por un complejo de virus pertenecientes a la familia *Geminiviridae*, género *Begomovirus*, transmitidos en la naturaleza por la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius. La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida por todas las regiones cálidas y templadas del planeta, causando en ocasiones pérdidas de hasta el 100% de la producción de tomate. No se ha identificado resistencia en la especie cultivada, de forma que como fuentes de resistencia se han empleado especies silvestres relacionadas con el tomate. Los materiales comerciales desarrollados hasta el momento poseen sólo resistencia parcial a la enfermedad, por lo que distintos grupos de investigación a nivel mundial continúan trabajando con el objetivo de identificar niveles elevados de resistencia en entradas silvestres, para el desarrollo de nuevas variedades comerciales.

En una entrada de la especie *Solanum pimpinellifolium* L. se observó ausencia de síntomas o manifestación de síntomas ligeros en la mayor parte de las plantas (Picó et al., 2000). Sólo un pequeño porcentaje de plantas mostraban síntomas medios o graves de la enfermedad. Se seleccionó una de las plantas que había permanecido asintomática y se cruzó con una planta de una línea susceptible de tomate. Al comprobarse de nuevo un comportamiento heterogéneo entre las plantas de esta primera generación  $F_1$ , se optó por realizar varias generaciones de autofecundación, con el objetivo de fijar la resistencia. Se llevaron a cabo cinco generaciones de autofecundación y selección, siendo la respuesta similar en todas ellas, de forma que siempre un porcentaje variable de plantas, entre el 7 y el 30%, mostraban síntomas medios o graves. Se asumió que tras cinco generaciones de autofecundación la resistencia debía estar fijada, dado además que en todas las generaciones se observó un comportamiento similar. Se seleccionó, por tanto, una planta (PR) de la generación  $F_6$  para cruzarla con una susceptible (PS) y construir la familia empleada en el estudio del control genético de la resistencia. Se obtuvieron las generaciones  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $BC_1$  y  $BC_2$  (Pérez de Castro et al., 2007).

Los síntomas en cada una de las plantas se determinaron según una escala de 0 (planta sin síntomas) a 4 (planta con síntomas graves), a distintas fechas después de la inoculación (Figura 2.2). Se eligió la última fecha ensayada (60 días después de la inoculación), por el interés agronómico, ya que se asume que los síntomas manifestados en esta fecha son los que pueden repercutir sobre el rendimiento obtenido al final del cultivo. Todas las plantas del parental susceptible mostraron la máxima valoración de síntomas a los 60 días después de la inoculación. Sin embargo, en el resto de las generaciones se observó variabilidad, incluso en aquellas homogéneas a nivel de genotipo, como son el parental resistente PR y la generación  $F_1$ .

Algunos autores, en estudios similares para la determinación del control genético realizados en tomate con virosis similares a la estudiada en este ejemplo, al observar distribuciones de este tipo en la manifestación de síntomas de varias generaciones han empleado diferentes criterios para la clasificación de las plantas como resistentes y susceptibles. En algunos de estos estudios, se clasifican como resistentes únicamente aquellas plantas que permanecen asintomáticas a lo largo del ensayo, siendo el resto susceptibles (Hassan et al., 1984; Kasrawi, 1989; Pilowsky y Cohen, 1990). Otros autores, clasifican como resistentes las plantas asintomáticas y como susceptibles aquellas valoradas con el máximo valor de síntomas, considerando que el resto, en categorías intermedias de síntomas, presentan resistencia parcial a la enfermedad (Kasrawi y Mansour, 1994).



**Figura 2.2.** Porcentaje de plantas clasificadas en cada una de las categorías de síntomas (en una escala de 0, planta asintomática, a 4, planta con síntomas severos), de cada una de las generaciones ensayadas, a los 60 días después de la inoculación con TYLCV. Entre paréntesis se indica el valor medio de síntomas para cada generación.

Algunos autores han asumido un control poligénico al obtener distribuciones de este tipo (Griffiths y Scott, 2001). Sin embargo, estos mismos autores comprobaron más tarde que la mayor parte de la resistencia encontrada se podía explicar con uno o pocos genes para los que detectaron marcadores moleculares asociados (Ji y Scott, 2005).

En el trabajo de Pérez de Castro et al. (2007), teniendo en cuenta la utilidad en mejora, se estableció un criterio que considerase los posibles efectos sobre la producción asociados a la manifestación de síntomas. Este criterio, la pérdida de producción, es sin duda el más importante a la hora de determinar la utilidad de una fuente de resistencia. Sin embargo, sólo es posible evaluar las pérdidas de producción en fases avanzadas del programa de mejora, en las que la resistencia ya ha sido introgresada en un fondo genético de la especie cultivada con buenas características agronómicas. De esta forma, según la escala empleada en este ensayo, fue posible asumir que las plantas con valores de síntomas por debajo de 2 no sufrirían pérdidas de producción como consecuencia de la enfermedad, pudiendo ser clasificadas como resistentes, mientras que las plantas con una puntuación de síntomas igual o superior a 2 fueron clasificadas como susceptibles (Tabla 2.3).



**Tabla 2.3.** Número de plantas susceptibles (S) y resistentes (R) a TYLCV en cada una de las generaciones ensayadas, a los 60 días después de la inoculación.

Generación	Fenotipo	Nº de plantas
P <sub>1</sub>	<b>S</b>	19
	<b>R</b>	0
P <sub>2</sub>	<b>S</b>	4
	<b>R</b>	11
F <sub>1</sub>	<b>S</b>	14
	<b>R</b>	4
F <sub>2</sub>	<b>S</b>	116
	<b>R</b>	8
BC <sub>1</sub>	<b>S</b>	96
	<b>R</b>	0
BC <sub>2</sub>	<b>S</b>	46
	<b>R</b>	38

Sobre la base de este criterio, se estableció la proporción de plantas resistentes y susceptibles en cada una de las generaciones ensayadas. Se planteó un modelo monogénico, con penetración incompleta de la resistencia y efecto de dosis génica. Bajo estos supuestos se determinó la proporción de individuos resistentes y susceptibles esperados en todas las generaciones ensayadas, considerando la composición en cuanto a genotipos de cada una de las generaciones.

Para calcular las estimas de los valores de los parámetros  $p$  y  $q$ , se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados, empleando como peso para cada generación el número de plantas analizadas (Cuadro 2.1). Los valores obtenidos para los parámetros fueron de 0,272 y 0,995, para  $p$  y  $q$ , respectivamente, siendo ambos significativos. La comprobación del ajuste de los datos al modelo se realizó comparando los resultados obtenidos con los esperados según las estimas obtenidas para los parámetros  $p$  y  $q$  (Tabla 2.4). La comparación se realizó mediante una prueba  $\chi^2$  pesada, empleando como peso el número de plantas de cada generación, según la siguiente expresión:

$$\chi^2_{\text{pesada}} = \sum [(frecuencia\ relativa\ observada - frecuencia\ relativa\ esperada)^2 \times \text{peso}]$$

**Tabla 2.4.** Frecuencias observada y esperadas (según las estimas de los parámetros del modelo) de plantas resistentes (R) y susceptibles (S) en cada una de las generaciones incluidas en el modelo y comprobación estadística del ajuste de los datos al modelo propuesto.

Generación	Fenotipo	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	$\chi^2$	P
P <sub>2</sub>	S	0,2667	0,2725	0,0005	0,9818
	R	0,7333	0,7275	0,0005	0,9818
F <sub>1</sub>	S	0,7778	0,9952	0,8512	0,3562
	R	0,2222	0,0048	0,8512	0,3562
F <sub>2</sub>	S	0,9355	0,8158	1,7775	0,1825
	R	0,0645	0,1842	1,7775	0,1825
BC <sub>1</sub>	S	1,0000	0,9976	0,0005	0,9818
	R	0,0000	0,0024	0,0005	0,9818
BC <sub>2</sub>	S	0,5476	0,6339	0,6252	0,4291
	R	0,4524	0,3661	0,6252	0,4291

Para el ajuste global del modelo se sumaron los valores de  $\chi^2$  (uno por generación ensayada), teniendo esta comparación 3 grados de libertad (número de generaciones menos parámetros estimados por el modelo).

**CUADRO 2.1.** Estimación de los parámetros mediante el programa Statgraphics® Plus 5.1. Penetración incompleta.

Para la determinación de las estimas para los dos parámetros incluidos en el modelo se empleó el programa Statgraphics® Plus 5.1. Se utilizaron únicamente las generaciones P<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub>, ya que el parental susceptible no aporta información al ser todas las plantas susceptibles según lo esperado. Los datos a introducir para realizar el análisis son los siguientes:

Generación	Fenotipo	Nº plantas <sup>a</sup>	Respuesta <sup>b</sup>	$m^c$	$p^c$	$q^c$	Respuesta- $m^d$
P <sub>2</sub>	S	15	0,2667	0	1	0	0,2667
	R	15	0,7333	1	-1	0	-0,2667
F <sub>1</sub>	S	18	0,7778	0	0	1	0,7778
	R	18	0,2222	1	0	-1	-0,7778
F <sub>2</sub>	S	124	0,9355	0,25	0,25	0,5	0,6855
	R	124	0,0645	0,75	-0,25	-0,5	-0,6855
BC <sub>1</sub>	S	96	1,0000	0,5	0	0,5	0,5000
	R	96	0,0000	0,5	0	-0,5	-0,5000
BC <sub>2</sub>	S	84	0,5476	0	0,5	0,5	0,5476
	R	84	0,4524	1	-0,5	-0,5	-0,5476

<sup>a</sup> Número total de plantas de la generación correspondiente

<sup>b</sup> Proporción de plantas susceptible y resistentes, respectivamente

<sup>c</sup> “ $m$ ”, “ $p$ ” y “ $q$ ” son, respectivamente, la constante, y los coeficientes para los parámetros  $p$  y  $q$  de las ecuaciones planteadas en la Tabla 2.2.

<sup>d</sup> Diferencia entre la respuesta y la constante del modelo

Dado que los valores para la constante ( $m$ ) son conocidos y fijos, se elimina la constante del modelo y se emplea como variable “respuesta -  $m$ ” ganando así un grado de libertad en el análisis.

Empleando la opción de “dependencia”, “regresión múltiple”, se deben incluir:

Variable dependiente: Respuesta -  $m$

Variabes independientes:  $p$  y  $q$

Peso: Nº de plantas

Entre las opciones del análisis de regresión múltiple se encuentra la de incluir o no la estimación de una constante en el modelo. Ya que por defecto el programa incluye una constante, es necesario en este caso modificar esta opción.

La salida del análisis de regresión múltiple muestra la estima para cada uno de los parámetros, así como el error estándar y la significación del parámetro. Además, se incluye el análisis de la varianza del modelo. Si se quieren obtener los intervalos de confianza de las estimas, se puede seleccionar la opción en “opciones tabulares”.

Por tanto, los resultados obtenidos eran compatibles con el modelo monogénico planteado. El hecho de que el parámetro  $p$  fuese significativo indicó que el gen de resistencia presenta penetración incompleta, de forma que aproximadamente el 27% de las plantas homocigóticas para este gen serán susceptibles a la enfermedad. Por otra parte, el valor de la estima para el parámetro  $q$  fue muy superior a la de  $p$ , indicando un efecto de dosis génica, pudiéndose afirmar en este caso, dado el valor de  $q$ , próximo a 1, que el gen presenta recesividad parcial.

En trabajos similares, encaminados al estudio del control genético de la resistencia al virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) derivada de *S. peruvianum* L. se comprobó que la penetración puede depender del mecanismo de inoculación así como del aislado del virus empleado (Roselló et al., 1998).

## 2.4. PENETRACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Para determinados caracteres, la influencia del ambiente varía en función del momento en el que se realiza el análisis. Es, por ejemplo, el caso de aquellos caracteres para los que se producen variaciones de la penetración a lo largo del tiempo. En esta situación, resulta de interés no limitar las conclusiones a un único muestreo, sino realizar un estudio secuencial del proceso. De esta forma, es posible determinar las variaciones de la penetración en función del tiempo, tomando especial importancia las conclusiones biológicas que se pueden obtener del análisis.

Entre los caracteres para los que puede tener importancia la variación de la penetración en función del tiempo se encuentra la resistencia a enfermedades, principalmente si la resistencia es parcial o depende de la presión de inóculo. Es frecuente en estos casos que la penetración del gen o los genes de resistencia disminuya a lo largo del proceso, debido, bien a que el patógeno supera progresivamente los mecanismos de resistencia, bien a que se produce un aumento gradual de la presión de inóculo como consecuencia del contacto continuado entre el patógeno y la planta. En los materiales en los que la resistencia es de este tipo, puede suceder que, aun estando el progreso de la infección retrasado con respecto a los materiales susceptibles, todas las plantas muestren susceptibilidad en fases avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, cuando no se dispone de otras fuentes con niveles de resistencia más elevados, resulta útil en mejora aprovechar el retraso en la manifestación de síntomas observado en este tipo de materiales.

El modelo planteado en estos casos es similar al descrito en el apartado 2.3, si bien se extiende el análisis a las distintas fechas en las que se haya realizado la evaluación en las generaciones analizadas. Para validar el modelo se comparan la curva de progreso de la enfermedad obtenida con la esperada según el modelo, mediante el coeficiente de determinación total.

Ejemplo: Análisis secuencial de la penetración incompleta de la resistencia al amarilleamiento del melón (*Cucumis melo* L.).

El amarilleamiento en melón está causado por un conjunto de virus de la familia *Closteroviurs*, transmitidos por distintas especies de mosca blanca. Muchos de estos virus pertenecen al género *Crinivirus*. Uno de ellos (*Beet pseudo-yellow virus*, BPYV) causa importantes pérdidas en los cultivos de melón, tanto protegidos como al aire libre, del sudeste español. Se ha descrito resistencia a la enfermedad causada por BPYV en distintas especies relacionadas con la especie cultivada; sin embargo, las fuertes barreras de cruzabilidad entre las fuentes de resistencia identificadas y el melón han

impedido su empleo en programas de mejora. Algunas entradas de la especie cultivada de origen asiático poseen niveles variables de resistencia o tolerancia a la enfermedad (Esteve y Nuez, 1992). Además, en la entrada *Cma* de la especie *Cucumis melo* L. ssp. *agrestis* se identificó resistencia a BPYV (Nuez et al., 1991). La resistencia en esta entrada se manifestaba como un retraso en la manifestación de síntomas, siendo estos más leves que los observados en los materiales susceptibles.

Como paso previo al empleo de la resistencia descrita en esta entrada, se caracterizó en profundidad el modo de herencia del carácter y el nivel de protección proporcionado (Nuez et al., 1999). Para ello se obtuvieron dos familias completas (PS, PR, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub>) a partir del cruce de la fuente de resistencia, *Cma* (PR), con dos variedades de melón típicas españolas (PS), “Amarillo” y “Piel de sapo”. Con cada una de las familias se realizaron dos ensayos de inoculación artificial mediante *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, en dos años consecutivos. Se realizó la evaluación de síntomas de forma periódica en todas las plantas en cada uno de los ensayos. Se determinó el porcentaje de plantas con síntomas en cada generación, confirmándose la infección por BPYV mediante la técnica DAS-ELISA. Únicamente las plantas asintomáticas en las que no se detectó el virus se consideraron resistentes. Dado que los resultados para ambas familias y en ambos ensayos fueron similares, se muestran los resultados obtenidos para una de las familias en uno de los ensayos (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5.** Porcentaje de plantas asintomáticas tras la inoculación con BPYV en cada una de las generaciones del cruce entre el parental resistente *Cma* (PR) y la variedad susceptible de melón (PS).

Generación	Días después de la inoculación							
	29	31	33	38	42	49	53	57
PS	0	0	0	0	0	0	0	0
PR	80	75	70	48	43	35	27	17
F <sub>1</sub>	18	16	11	0	0	0	0	0
F <sub>2</sub>	17	13	11	7	6	4	3	2
BC <sub>1</sub>	16	9	5	1	1	1	0	0
BC <sub>2</sub>	20	16	14	7	6	6	2	2

Al final del ensayo (84 días después de la inoculación, datos no mostrados) el 100% de las plantas del parental resistente mostraron síntomas de la enfermedad, si bien los síntomas eran más leves que los observados en plantas de otras generaciones. En cualquier caso, el retraso en la infección de la fuente de resistencia y la manifestación de síntomas más leves resulta de interés para su aprovechamiento en mejora. Para evaluar el proceso a lo largo del tiempo se consideró un modelo similar al descrito en el apartado 2.3., estimando cada uno de los parámetros del modelo en todas las fechas disponibles. A partir de los 38 días después de la inoculación, considerando que en la generación F<sub>1</sub> todas las plantas mostraban susceptibilidad a la enfermedad, se eliminó el parámetro *q* del modelo (tomando, por tanto, el valor 1). Se asumió que la aparición de una planta resistente en la generación BC<sub>1</sub> se debía a factores distintos a la expresión del gen de resistencia.

A partir de las estimas para los parámetros  $p$  y  $q$  (Tabla 2.6), se determinaron las curvas de progreso de la enfermedad esperadas según el modelo (Figura 2.3).

**Tabla 2.6.** Valores de las estimas para los parámetros  $p$  y  $q$  en las distintas fechas de muestreo, según el modelo monogénico planteado.

Generación	Días después de la inoculación							
	29	31	33	38	42	49	53	57
$p$	0,47	0,49	0,53	0,70	0,69	0,85	0,85	0,90
$q$	0,89	0,97	1	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>

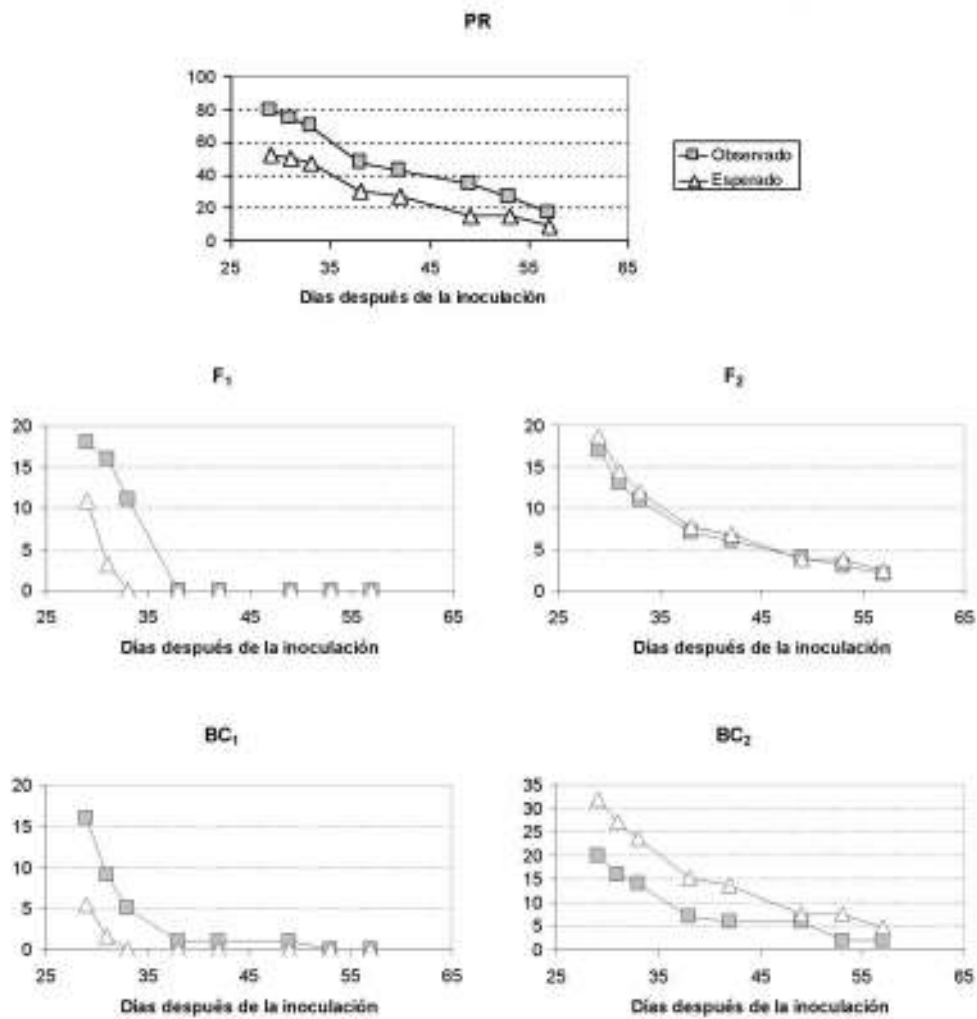
A partir de los 38 días después de la inoculación se eliminó el parámetro  $q$  del modelo dado que todas las plantas de la generación F1 eran susceptibles.

La correlación entre las curvas observada y esperada para cada generación se analizó mediante el coeficiente de determinación (Tabla 2.7).

En cualquier caso, se observó en varias generaciones una desviación entre la respuesta observada y la esperada según el modelo planteado, debida a un exceso de plantas resistentes, excepto en la generación BC<sub>2</sub> en la que se observó un exceso de plantas susceptibles. Era necesario, por tanto, plantear un modelo que incluyese otros parámetros que permitiesen explicar los resultados obtenidos. Los nuevos modelos se discutirán en los siguientes apartados.

**Tabla 2.7.** Coeficiente de determinación para las curvas observadas y esperada en cada una de las generaciones ensayadas.

Generación	PR	F1	F2	BC1	BC2
Coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	0,98	0,60	0,99	0,88	0,96



**Figura 2.3.** Comparación entre las curvas de progreso de la enfermedad observadas ( $\Delta$ ) y esperadas ( $\square$ ) en las generaciones PR, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub>, considerando un control monogénico de la resistencia, con penetración incompleta y dominancia parcial.

## 2.5. INTRODUCCIÓN DE PARÁMETROS DE ESCAPE EN MODELOS DE RESISTENCIA

En los ensayos de evaluación de resistencia a enfermedades, si la presión de inoculación no es lo suficientemente elevada, es relativamente frecuente que se produzcan escapes a la infección. Como consecuencia, no se puede asumir que todos los individuos en los que no se detecta infección posean resistencia. En estos casos, para el estudio del control genético, es necesario incluir en el modelo un parámetro que considere la probabilidad de escape a la infección. Supongamos el caso más sencillo, con un control monogénico dominante de la resistencia y asumiendo una probabilidad de escape igual para todos los genotipos. Únicamente observaríamos el efecto del escape en aquellas generaciones en las que hay individuos homocigotos recesivos, es decir, el parental susceptible y la generación BC<sub>1</sub>. La estima del parámetro de escape se realizaría a partir del número de individuos “resistentes” observados en estas generaciones.

La situación suele ser más compleja, ya que si el gen de resistencia tiene penetración incompleta y, además, hay efecto de dosis génica, en todas las generaciones se confunde el efecto de escape con la penetración incompleta del gen en homocigosis y en heterocigosis. En estos casos, el modelo debe incluir los parámetros necesarios para considerar estos factores. De las plantas que manifiesten fenotipo resistente (R) en cada generación, una parte vendrán determinadas por la probabilidad de escape, mientras que entre las plantas que no escapen a la infección mostrarán resistencia aquellas en las que el gen se exprese:

$$P(R) = P(\text{escape}) \times P(R / \text{escape}) + P(\text{noescape}) \times P(R / \text{noescape})$$

Como ejemplo, en la generación F<sub>2</sub> sabemos que de las plantas que no escapan a la infección, la proporción de resistentes es (Tabla 2.2):

$$P = 0,75 - (0,25p + 0,5q)$$

Todas las plantas que escapen a la infección manifestarán fenotipo resistente, de forma que, si la probabilidad de escape es  $pe$ , la proporción de plantas que muestran fenotipo resistente en la generación F<sub>2</sub> es:

$$P(R) = pe \times 1 + (1 - pe) \times [0,75 - (0,25p + 0,5q)]$$

De forma similar a lo descrito para la generación F<sub>2</sub>, se puede determinar la proporción de individuos resistentes y susceptibles esperados en cada una de las generaciones, expresado en función de los parámetros  $p$ ,  $q$  y  $pe$  (Tabla 2.8).

La estimación en estos modelos es más compleja, ya que no se trata en este caso de modelos lineales. Como consecuencia, es necesario realizar un proceso iterativo para obtener las estimas de los parámetros incluidos en el modelo.



**Tabla 2.8.** Frecuencia relativa de individuos susceptibles (S) y resistentes (R) en cada una de las generaciones ensayadas, suponiendo un control monogénico, en función de los parámetros  $p$  (proporción de individuos homocigotos para el gen de resistencia que son susceptibles),  $q$  (proporción de individuos heterocigotos para el gen de resistencia que son susceptibles) y  $pe$  (proporción de plantas que escapan a la infección).

Generación	Fenotipo	Frecuencia
P <sub>1</sub>	S	$1 - pe$
	R	$pe$
P <sub>2</sub>	S	$1 - [pe + (1 - pe) (1-p)]$
	R	$pe + (1 - pe) (1-p)$
F <sub>1</sub>	S	$1 - [pe + (1 - pe) (1-q)]$
	R	$pe + (1 - pe) (1-q)$
F <sub>2</sub>	S	$1 - [pe + (1 - pe)(0,25 (1-p) + 0,5 (1-q))]$
	R	$pe + (1 - pe)[0,25 (1-p) + 0,5 (1-q)]$
BC <sub>1</sub>	S	$1 - [pe + (1 - pe) 0,5 (1-q)]$
	R	$pe + (1 - pe) 0,5 (1-q)$
BC <sub>2</sub>	S	$1 - [pe + (1 - pe)(0,5 (1-p) + 0,5(1-q))]$
	R	$pe + (1 - pe)[0,5 (1-p) + 0,5 (1-q)]$

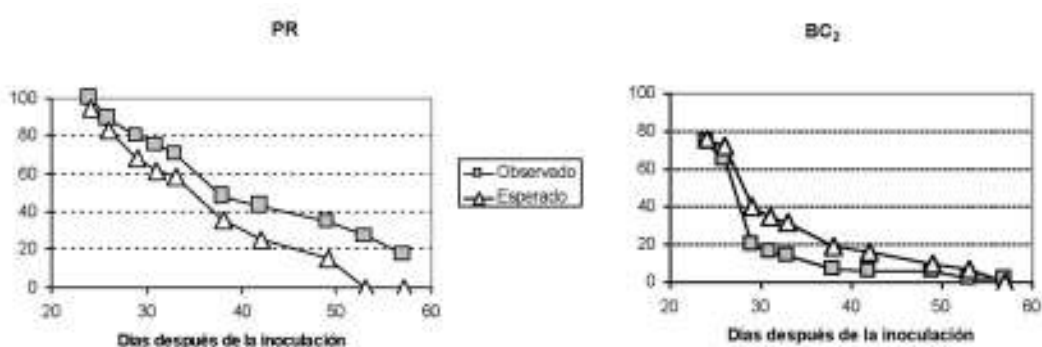
*Ejemplo: Introducción de parámetros de escape en el estudio del control genético de la resistencia al amarilleamiento del melón.*

En el trabajo comentado en el apartado anterior (2.4), se observó que algunas de las plantas del parental susceptible no resultaban infectadas durante las primeras fechas de muestreo (Tabla 2.9).

**Tabla 2.9.** Porcentaje de plantas asintomáticas tras la inoculación con BPV en cada una de las generaciones del cruce entre el parental resistente *Cma* (PR) y la variedad susceptible de melón (PS), en las primeras fechas de muestreo.

Generación	Días después de la inoculación	
	24	26
PS	36	14
PR	100	89
F <sub>1</sub>	72	61
F <sub>2</sub>	53	49
BC <sub>1</sub>	48	44
BC <sub>2</sub>	74	65

Para explicar estos resultados era necesario incluir en el modelo un parámetro de escape. Se asumió que la probabilidad de escape era igual para todas las generaciones estudiadas y se calcularon los valores esperados en cada una de las generaciones. El ajuste con este nuevo modelo fue bueno para la mayor parte de las generaciones. Sin embargo, se observó, de nuevo, un exceso de plantas asintomáticas en el parental resistente, mientras que en la generación BC<sub>2</sub> el nivel de resistencia esperado era superior al observado experimentalmente (Figura 2.4). Aun siendo el coeficiente de determinación elevado en ambas generaciones (0,99 y 0,94 en PR y BC<sub>2</sub>, respectivamente), se incluyó un nuevo parámetro en el modelo definitivo que proporcionaba un mejor ajuste de los datos observados (apartado 2.6).



**Figura 2.4.** Comparación entre las curvas de progreso de la enfermedad observadas(■) y esperadas (△) en las generaciones PR y BC<sub>2</sub>, considerando un control monogénico de la resistencia, con penetración incompleta y dominancia parcial, e incluyendo un parámetro de escape.

## 2.6. INTRODUCCIÓN DE PARÁMETROS DE ANTIXENOSIS EN MODELOS DE RESISTENCIA

En el caso de enfermedades transmitidas por un insecto vector, en ocasiones la resistencia se produce como consecuencia de mecanismos de antixenosis o no preferencia, de forma que la transmisión por el vector natural se ve dificultada. Si la antixenosis es uno de los mecanismos implicados en la respuesta de la fuente de resistencia, es necesario considerarlo en el modelo planteado, siempre que la inoculación se haya realizado empleando el vector. El mecanismo de antixenosis tendrá efecto, fundamentalmente, en el parental resistente. Sin embargo, puede ser además necesario considerar este efecto en otras generaciones, siendo generalmente la generación BC<sub>2</sub> (por poseer mayor proporción del genoma de la fuente de resistencia) la más afectada.

Para incluir los parámetros de antixenosis en el modelo, basta con considerar que la proporción de plantas resistentes en las generaciones afectadas será superior a la esperada por el efecto únicamente del gen de resistencia. Dado que el efecto de antixenosis puede ser distinto en cada una de las generaciones consideradas, se deben incluir tantos parámetros como generaciones afectadas se esperen (Tabla 2.10).

**Tabla 2.10.** Frecuencia relativa de individuos susceptibles (S) y resistentes (R) en las generaciones PR y BC<sub>2</sub>, suponiendo un control monogénico, en función de los parámetros  $p$  (proporción de individuos homocigotos para el gen de resistencia que son susceptibles) y  $q$  (proporción de individuos heterocigotos para el gen de resistencia que son susceptibles) y  $pe$  (proporción de plantas que escapan a la infección), incluyendo además los parámetros de antixenosis en PR ( $pa1$ ) y BC<sub>2</sub> ( $pa2$ ).

Generación	Fenotipo	Frecuencia
P <sub>2</sub>	S	$1 - [pe + (1 - pe)(1 - p + pa1)]$
	R	$pe + (1 - pe)(1 - p + pa1)$
BC <sub>2</sub>	S	$1 - [pe + (1 - pe)(0,5(1 - p + pa2) + 0,5(1 - q))]$
	R	$pe + (1 - pe)(0,5(1 - p + pa2) + 0,5(1 - q))$

*Ejemplo:* Introducción de parámetros de antixenosis en el estudio del control genético de la resistencia al amarilleamiento del melón.

Como se ha comentado previamente, la inclusión de parámetros de penetración incompleta y escape no resultaron suficientes para explicar al control genético de la resistencia a BPYV de la entrada *Cma*. La manifestación de antixenosis en el parental resistente podría explicar el hecho de que el porcentaje de plantas asintomáticas observado en esta generación fuese superior al esperado según el modelo propuesto. La antixenosis supondría un aumento del nivel de resistencia frente al esperado al considerar únicamente el gen de resistencia. Además, como consecuencia de no considerar el posible efecto de antixenosis, se estaría sobreestimando el parámetro de escape y subestimando el parámetro que mide la penetración incompleta del gen. Esto explicaría el exceso de plantas resistentes esperadas en la generación BC<sub>2</sub> frente a las realmente observadas. Se incluyeron en el modelo dos parámetros de antixenosis, uno para el parental resistente y otro para la generación BC<sub>2</sub>. Únicamente resultó significativo el efecto de antixenosis en la generación parental, si bien lo fue en todas las fechas de muestreo (Tabla 2.11).

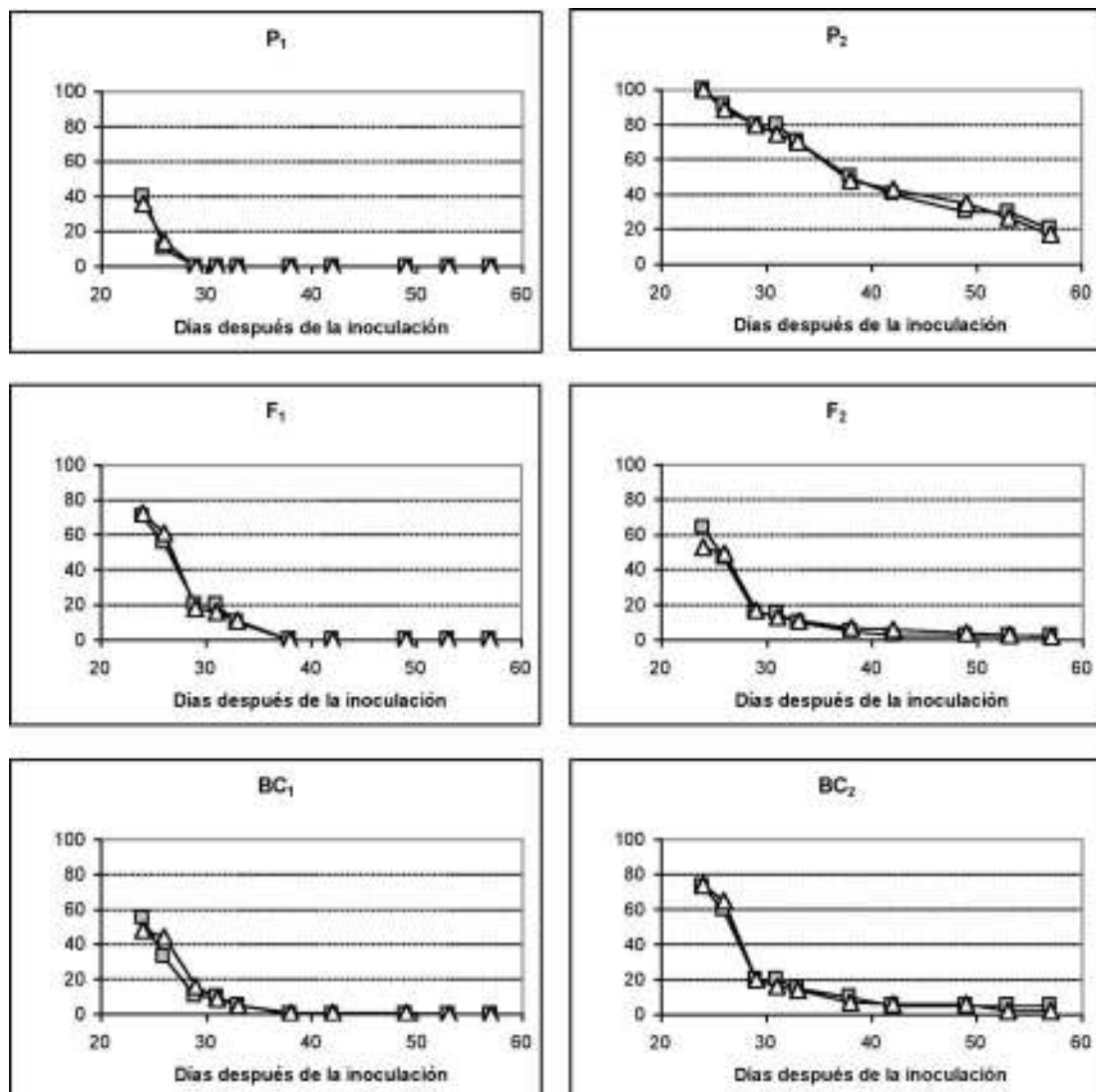
**Tabla 2.11.** Valores de las estimas de los parámetros en las distintas fechas de muestreo, según modelo monogénico que considera penetración incompleta en homocigosis ( $p$ ) y en heterocigosis ( $q$ ), escapes a la infección ( $pe$ ) y antixenosis en la fuente de resistencia ( $pa1$ ).

Parámetro	Días después de la inoculación									
	24	26	29	31	33	38	42	49	53	57
$p$	0,4	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9
$q$	0,5	0,5	0,8	0,8	0,9	1	1	1	1	1
$pe$	0,4	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
$pa1$	0,4	0,3	0,6	0,6	0,5	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1

Con las estimas de todos los parámetros incluidos en el modelo definitivo (Tabla 2.11) se construyeron las curvas esperadas, comprobándose en este caso que se obtenía un muy buen ajuste entre las curvas observadas y esperadas (Figura 2.5).

Se comprobó, por tanto, que el exceso de plantas resistentes observadas frente a las esperadas en la generación PR se debía al hecho de no considerar el efecto de antixenosis en esta generación.

Por tanto, el control genético de la resistencia a BPVY en la entrada *Cma* se ajustó a un modelo monogénico con penetración incompleta y dominancia parcial, además de mecanismos de antixenosis en la fuente de resistencia. La penetración del gen que confiere resistencia fue menor a medida que transcurría el tiempo después de la inoculación, siendo esta reducción más acusada en las plantas heterocigotas. La probabilidad de escapar a la infección fue significativa en las primeras fechas de muestreo tras la inoculación, si bien este efecto desapareció con el tiempo.



**Figura 2.5.** Comparación entre las curvas de progreso de la enfermedad observadas (□) y esperadas (△) en las generaciones PR, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub>, considerando un control monogénico de la resistencia, con penetración incompleta y dominancia parcial, incluyendo un parámetro de escape igual en todas las generaciones y un parámetro de antixenosis en el parental resistente.

## 2.7. EXTENSIÓN DEL ANÁLISIS MENDELIANO A CARACTERES EN LOS QUE NO ES POSIBLE DISCRETIZAR LOS DATOS

Existen caracteres para los que, siendo el control genético sencillo, no es posible establecer clases discretas para la clasificación de los fenotipos observados, debido a que la elevada influencia del ambiente impide detectar los efectos de genes mayores. El análisis genético en estos casos se basa en la comparación de las distribuciones obtenidas con las esperadas según una hipótesis planteada. La situación más frecuente cuando se plantea un estudio de control genético en el contexto de un programa de mejora, dado que se trabaja con familias, es conocer las frecuencias de genotipos esperadas en cada una de las generaciones. De forma que, a partir de la información disponible en cuanto a las distribuciones de los parentales y la generación  $F_1$ , y en función del control genético asumido, se plantean los resultados esperados en las generaciones segregantes. En cualquier caso, el análisis también se puede realizar aunque no se disponga de familias completas.

### 2.7.1. Asignación de valores promedio a los genotipos

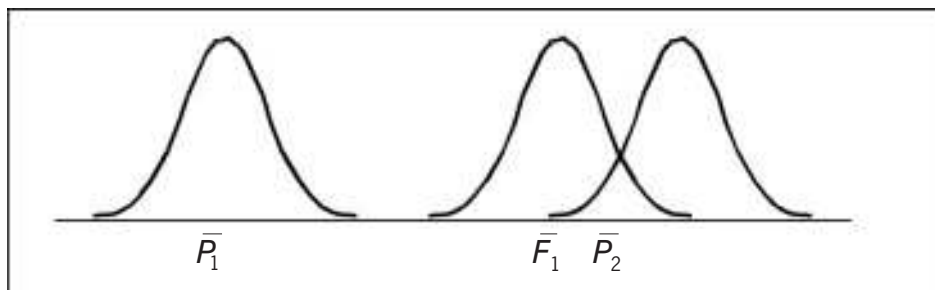
El análisis mendeliano es posible aun sin necesidad de establecer una clasificación discreta de los datos, utilizando los valores medios de las generaciones no segregantes. Para muestras grandes el valor promedio de una generación segregante puede estimarse a partir de las proporciones en que se espera aparezcan los genotipos de  $P_1$ ,  $P_2$  y  $F_1$  según el modelo. Así asumiendo un control monogénico, y conociendo los valores medios de las distribuciones para las generaciones  $P_1$ ,  $P_2$  y  $F_1$  (Figura 2.6), se pueden expresar las medias esperadas en las generaciones segregantes como:

$$\bar{F}_2 = \frac{1}{4}\bar{P}_1 + \frac{1}{2}\bar{F}_1 + \frac{1}{4}\bar{P}_2$$

$$\overline{BC}_1 = \frac{1}{2}\bar{P}_1 + \frac{1}{2}\bar{F}_1$$

$$\overline{BC}_2 = \frac{1}{2}\bar{F}_1 + \frac{1}{2}\bar{P}_2$$

Mediante una comparación de las medias pueden contrastarse los valores observados con los esperados según el modelo y así establecer la validez del mismo. El método es muy sensible a los errores cometidos en la estima de los valores medios de generaciones no segregantes, si los tamaños muestrales son pequeños.



**Figura 2.6.** Distribución fenotípica en las generaciones  $P_1$ ,  $P_2$  y  $F_1$ , y valor medio fenotípico para cada uno de los genotipos.

Sin embargo, la verificación de estas relaciones no sería una prueba inequívoca de la existencia de un control monogénico. Bajo un modelo aditivo-dominante también se cumplirían dichas relaciones, incluso con un modelo poligénico (Tabla 2.12). En consecuencia, el modelo monogénico dialélico sería solamente la explicación más sencilla.

**Tabla 2.12.** Relaciones entre las medias de generaciones derivadas del cruce entre dos líneas puras asumiendo un modelo aditivo dominante (modificada de Mather y Jinks, 1982).

---


$$\bar{F}_2 = \frac{1}{4}\bar{P}_1 + \frac{1}{4}\bar{P}_2 + \frac{1}{2}\bar{F}_1$$

$$\bar{F}_3 = \frac{1}{4}\bar{P}_1 + \frac{1}{4}\bar{P}_2 + \frac{1}{2}\bar{F}_2 = \frac{3}{8}\bar{P}_1 + \frac{3}{8}\bar{P}_2 + \frac{1}{4}\bar{F}_1$$

$$\bar{F}_n = \frac{1}{4}\bar{P}_1 + \frac{1}{4}\bar{P}_2 + \frac{1}{2}\bar{F}_{n+1} = \left[ \frac{1}{2} - \left( \frac{1}{2} \right)^n \right] (\bar{P}_1 - \bar{P}_2) + \left( \frac{1}{2} \right)^{n-1} \bar{F}_1$$

$$\overline{BC}_1 = \frac{1}{2}\bar{P}_1 + \frac{1}{2}\bar{F}_1$$

$$\overline{BC}_2 = \frac{1}{2}\bar{P}_2 + \frac{1}{2}\bar{F}_1$$

$$\overline{BC}_{11} = \frac{3}{4}\bar{P}_1 + \frac{1}{4}\bar{F}_1 \quad BC_{11} = BC_1 \times P_1$$

$$\overline{BC}_{12} = \frac{1}{4}\bar{P}_2 + \frac{3}{4}\bar{F}_1 \quad BC_{12} = BC_1 \times P_2$$

$$\overline{BC}_{21} = \frac{1}{4}\bar{P}_1 + \frac{3}{4}\bar{F}_1 \quad BC_{21} = BC_2 \times P_1$$

$$\overline{BC}_{22} = \frac{3}{4}\bar{P}_2 + \frac{1}{4}\bar{F}_1 \quad BC_{22} = BC_2 \times P_2$$

$$\overline{BC}_{1S} = \frac{5}{8}\bar{P}_1 + \frac{1}{8}\bar{P}_2 + \frac{1}{4}\bar{F}_1 \quad BC_{1S} = BC_1 \otimes$$

$$\overline{BC}_{2S} = \frac{5}{8}\bar{P}_2 + \frac{1}{8}\bar{P}_1 + \frac{1}{4}\bar{F}_1 \quad BC_{2S} = BC_2 \otimes$$

$$\bar{F}_2 = \frac{1}{2}\overline{BC}_1 + \frac{1}{2}\overline{BC}_2 = \frac{1}{4}\overline{BC}_{11} + \frac{1}{4}\overline{BC}_{12} + \frac{1}{4}\overline{BC}_{21} + \frac{1}{4}\overline{BC}_{22}$$

$$\bar{F}_3 = \frac{1}{2}\overline{BC}_{1S} + \frac{1}{2}\overline{BC}_{2S} = \frac{1}{2}\overline{BC}_{11} + \frac{1}{2}\overline{BC}_{22}$$


---

Ejemplo: Estudio del control genético de la eficiencia de la partenocarpia en pepino dulce.

El cuajado de frutos partenocárpico tiene a menudo una naturaleza facultativa. En condiciones ambientales adecuadas, principalmente dependientes de la temperatura e iluminación, la planta puede desarrollar tanto frutos semillados como frutos partenocárpico, carentes de semillas. El grado de partenocarpia facultativa mide la proporción de verdaderos frutos sin semillas respecto al número total de frutos producidos. Es un carácter cuantitativo con fuerte influencia ambiental y control poligénico.

Siguiendo con el ejemplo de la partenocarpia en pepino dulce, comentado en el apartado 2.2, un carácter asociado es la eficiencia del cuajado partenocárpico. Aunque se define como la proporción de frutos partenocárpico respecto al total de frutos cuajados, implica un diseño experimental especial. Se trata de estimar la capacidad de competición en el desarrollo de frutos interraccimo. Prohens et al. (1998) dejaron en cada uno de los cuatro primeros racimos de la planta seis flores emasculadas, tres fueron polinizadas y en las otras tres se impidió la polinización. El índice de cuajado de frutos partenocárpico (ICFP) se calculó como el cociente entre dos veces el número de frutos partenocárpico y el total de frutos cuajados. Se observó que el carácter presentaba una variación continua, tanto en el parental partenocárpico como en la  $F_1$  de su cruce con otro parental no partenocárpico.

La eficiencia observada en el parental partenocárpico fue superior a la observada en la generación  $F_1$ . Estos resultados sugieren un efecto de dosis génica en la expresión del carácter eficiencia de partenocarpia. Se planteó un modelo para tratar de determinar si se podía explicar la eficiencia obtenida, considerando la proporción de plantas  $PP$  y  $Pp$  en cada una de las generaciones. Se definieron los parámetros  $f_1$  y  $f_2$ , como eficiencia en el homocigoto ( $PP$ ) y en el heterocigoto ( $Pp$ ), respectivamente. Se establecieron los coeficientes  $c_1$  y  $c_2$ , o proporción de homocigotos y heterocigotos en cada generación. Según este modelo, la eficiencia esperada en cada generación sería la definida por la siguiente expresión:

$$\text{Eficiencia(ICFP)} = c_1 f_1 + c_2 f_2$$

Por ejemplo, en la generación  $F_2$ , la eficiencia esperada sería:

$$\text{Eficiencia}(F_2) = \frac{1}{3} f_1 + \frac{2}{3} f_2$$

Para la estima de los parámetros  $f_1$  y  $f_2$  se empleó el método de regresión por mínimos cuadrados, empleando como peso el recíproco del error estándar de la media (Cuadro 2.2).

El valor estimado para el parámetro  $f_1$  fue de  $0,98 \pm 0,03$ , y para  $f_2$ ,  $0,62 \pm 0,04$ . Las estimas de estos parámetros permitieron determinar la eficiencia de partenocarpia esperada en cada una de las generaciones analizadas (Tabla 2.13). Por último, para validar el modelo se comprobó el ajuste de los valores observados y los esperados mediante el coeficiente de determinación total.

**Tabla 2.13.** Valores observados y estimados (media  $\pm$  error estándar) para el índice de cuajado de frutos partenocárpicos (ICFP) en las plantas clasificadas como partenocárpicas.

Generación	Valor observado (ICFP)	$c_1^a$	$c_2^a$	Valor esperado (ICFP)
$P_p$	1,07 $\pm$ 0,06	1	0	0,98 $\pm$ 0,03
$P_p \otimes$	0,92 $\pm$ 0,04	1	0	0,98 $\pm$ 0,03
$F_1$	0,61 $\pm$ 0,07	0	1	0,62 $\pm$ 0,04
$BC_p$	0,85 $\pm$ 0,08	1/2	1/2	0,80 $\pm$ 0,04
$BC_{np}$	0,53 $\pm$ 0,07	0	1	0,62 $\pm$ 0,04
$F_2$	0,80 $\pm$ 0,05	1/3	2/3	0,74 $\pm$ 0,04

<sup>a</sup>  $c_1$  y  $c_2$  representan la proporción de genotipos  $PP$  y  $Pp$  sobre el total de plantas partenocárpicas de cada generación.

Los resultados obtenidos a partir del modelo planteado sugirieron que las diferencias observadas en cuanto a la eficiencia de partenocarpia en las generaciones estudiadas, medida según el índice ICFP, son compatibles con un control monogénico con efecto de dosis génica. Parece posible que una planta sea partenocárpica si supera un nivel umbral de hormonas durante un período crítico en antesis. En este estudio, tanto los individuos homocigóticos como los heterocigóticos para el gen  $P$  superarían el nivel umbral necesario. Sin embargo, las diferencias en la concentración de reguladores, como consecuencia del efecto de dosis génica, podrían explicar las diferencias en la eficacia de partenocarpia en homocigotos y heterocigotos. Aunque no puede descartarse un modelo poligénico aditivo-dominante, la explicación más sencilla apunta a un efecto pleiotrópico del gen  $P$ , ya que condiciona tanto la partenocarpia como la eficiencia de la misma.

**CUADRO 2.2.** Estimación de los parámetros mediante el programa Statgraphics® Plus 5.1. Asignación de valores promedio a los genotipos

Para la determinación de las estimas para los dos parámetros incluidos en el modelo se empleó el programa Statgraphics® Plus 5.1. Los datos a introducir para realizar el análisis son los siguientes:

Generación	Eficiencia	$c_1$	$c_2$	Inverso del error estándar de la media
$P_p$	1,07	1	0	16,67
$P_p \otimes$	0,92	1	0	25,00
$F_1$	0,61	0	1	14,29
$BC_p$	0,85	1/2	1/2	12,50
$BC_{np}$	0,53	0	1	14,29
$F_2$	0,80	1/3	2/3	20,00

Empleando la opción de “dependencia”, “regresión múltiple”, se deben incluir:

Variable dependiente: Eficiencia

Variables independientes:  $c_1$  y  $c_2$

Peso: Inverso del error estándar de la media

La estimación se realiza de forma similar a lo descrito en el cuadro 2.1.



### 2.7.2. Comparación de distribuciones

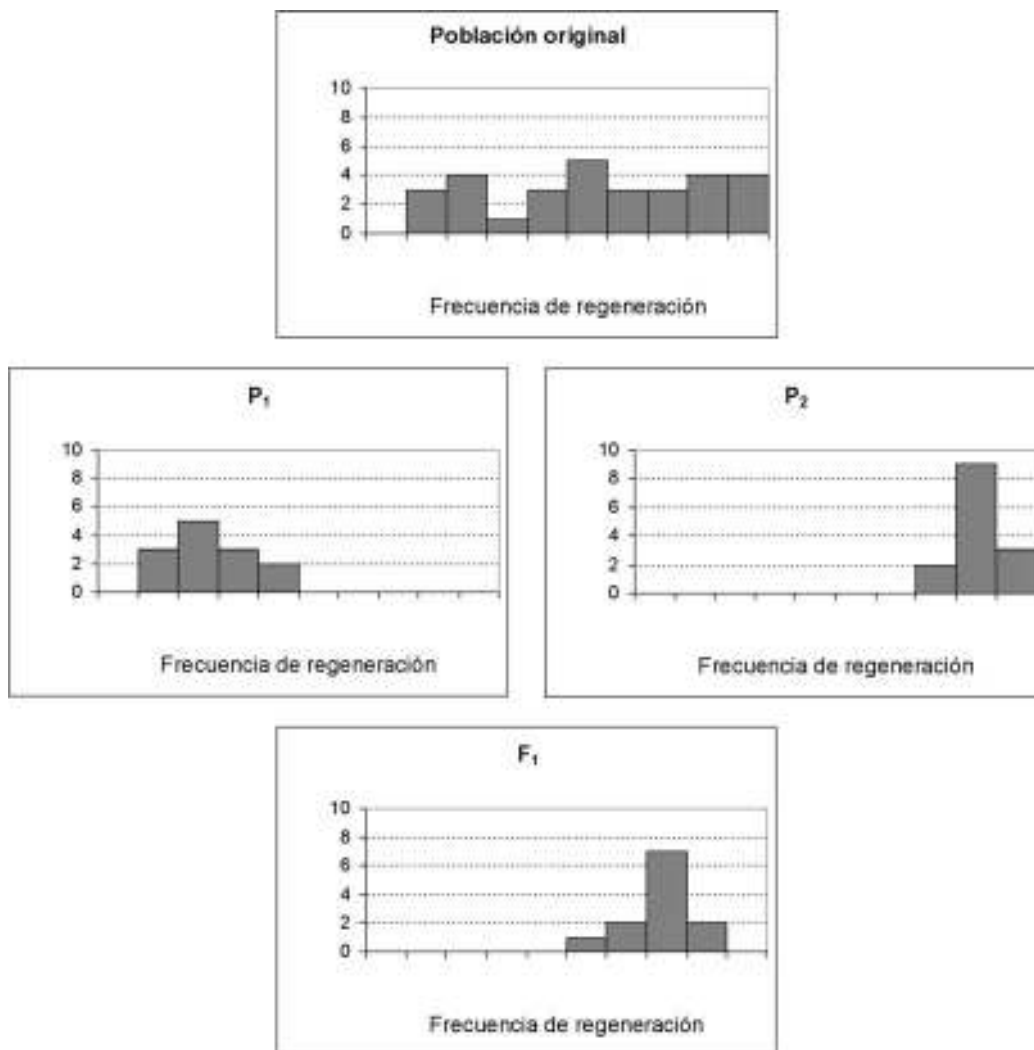
La aproximación anterior sólo tiene en cuenta las medias de las distribuciones, pero no el resto de características de las distribuciones (dispersión, asimetría y curtosis). Sin embargo, si se conoce cómo se distribuyen los valores fenotípicos en las generaciones no segregantes, es posible obtener la distribución esperada, en función del control genético asumido, en las generaciones segregantes disponibles. El modelo se valida mediante la comparación de las distribuciones observadas y esperadas en las generaciones segregantes.

*Ejemplo: Estudio del control genético de la capacidad de regeneración en melón.*

Son numerosos los estudios de regeneración realizados en melón a partir de distintos tipos de explantes. En muchos de ellos se ha descrito gran variabilidad en cuanto a la capacidad de regeneración, influida por factores tanto ambientales como genéticos, sin haberse determinado la importancia relativa de cada uno de ellos. Además, en muchos de los estudios en los que se ha encontrado variabilidad dentro de entrada no se ha considerado el hecho de que, siendo el melón una especie alógama, la variabilidad genotípica entre plantas de una misma entrada puede ser elevada.

En el trabajo realizado por Molina y Nuez (1996), como paso previo al estudio del control genético del carácter, se seleccionaron plantas con alta y con baja capacidad de regeneración a partir de una entrada en la que se observó variabilidad para el carácter (Figura 2.7). Las descendencias por autofecundación de las plantas seleccionadas permitieron comprobar que las diferencias observadas se debían a diferencias genéticas (Figura 2.7). Para abordar el estudio del control genético se cruzaron plantas de cada una de las poblaciones, una con alta y otra con baja capacidad de regeneración. Los valores medios de regeneración en las poblaciones seleccionadas como parentales eran de 0,26 y 0,85, respectivamente. A partir del cruce entre individuos de estas dos poblaciones se obtuvieron las generaciones  $F_1$  y  $F_2$  empleadas para el estudio.

Entre las plantas de la generación  $F_1$  no se observaron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de regeneración, confirmándose la uniformidad genotípica de esta generación para el carácter estudiado. La capacidad de regeneración media observada en la  $F_1$  fue de 0,73. Este resultado indicaba dominancia parcial hacia el parental con mayor capacidad de regeneración. Por otra parte, según era esperable debido a la naturaleza segregante de la generación, entre las plantas de la  $F_2$  se observaron diferencias significativas para la capacidad de regeneración.



**Figura 2.7.** Distribución de la frecuencia de regeneración (proporción de explantes que regeneran ápices después de 25 días de cultivo) en la población original de “Cantalupo Charentais”, en las poblaciones procedentes de la autofecundación de plantas seleccionadas de la población parental, con baja ( $P_1$ ) y alta ( $P_2$ ) frecuencia de regeneración, y en la generación procedente del cruce entre las anteriores ( $F_1$ ).

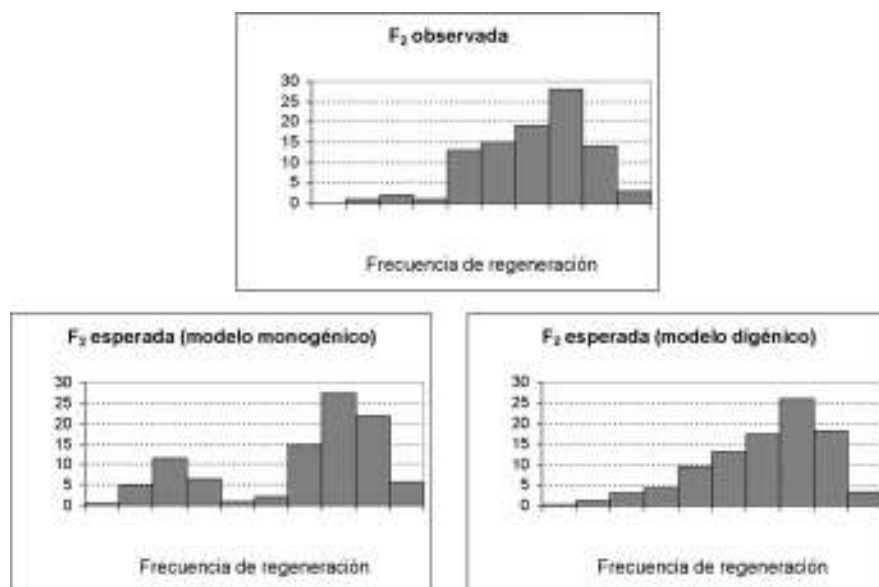
Para explicar el control genético de este carácter se planteó en primer lugar el modelo más sencillo, un modelo monogénico. Se asumió una distribución normal de la frecuencia de regeneración, siendo la media de los homocigotos la estimada en las poblaciones  $P_1$  y  $P_2$ , respectivamente, y la del heterocigoto, la media de la generación  $F_1$ . La varianza se estimó como:  $V = x(1 - x) / N$ , siendo  $x$  la frecuencia media de regeneración y  $N$  el número total de explantes (Molina y Nuez, 1995). Por tanto, considerando las frecuencias medias de regeneración de cada genotipo como 0,86 (AA), 0,73 (Aa) y 0,26 (aa), se generó la distribución de la frecuencia de regeneración de la generación  $F_2$  superponiendo las distribuciones correspondientes a los tres genotipos, con un peso de 1/4, 1/2 y 1/4, respectivamente. Las frecuencias de regeneración observadas se compararon con las esperadas según el modelo (Tabla 2.14, Figura 2.8) mediante el estadístico  $\chi^2$ . Se amalgamaron las clases con frecuencia absoluta esperada menor a 5 (Tabla 2.14).

**Tabla 2.14.** Distribución observada de la frecuencia de regeneración en la generación F<sub>2</sub> procedente del cruce entre dos parentales que difieren para el carácter y distribución esperada suponiendo un control monogénico para la frecuencia de regeneración.

Clases fenotípicas	Número de plantas			
	observadas		esperadas	
0 – 0,1	0		0,456	
0,1 – 0,2	1	1 <sup>a</sup>	4,776	5,232 <sup>a</sup>
0,2 – 0,3	2	2	11,52	11,52
0,3 – 0,4	1		6,48	
0,4 – 0,5	13	29 <sup>a</sup>	0,88	9,59 <sup>a</sup>
0,5 – 0,6	15		2,23	
0,6 – 0,7	19	19	14,71	14,71
0,7 – 0,8	28	28	27,36	27,36
0,8 – 0,9	14	14	21,89	21,89
0,9 - 1	3	3	5,732	5,732

<sup>a</sup> Valor resultante de sumar las clases contiguas con una frecuencia absoluta esperada menor a 5.

La comparación mediante una  $\chi^2$  indicó que había motivos para rechazar el ajuste de los datos a un modelo monogénico ( $\chi^2=67,86$ , con 6 grados de libertad). Las diferencias entre las distribuciones observada y esperada (Figura 2.8) se debían a un exceso de individuos para los valores de frecuencia de regeneración bajos y un defecto en las clases intermedias en la distribución esperada según el modelo monogénico. Por tanto, era necesario suponer un mayor número de clases genotípicas, para lo que se planteó un modelo digénico.



**Figura 2.8.** Distribución de la frecuencia de regeneración (proporción de explantes que regeneran ápices después de 25 días de cultivo) obtenida en la generación F<sub>2</sub> procedente del cruce entre dos parentales que difieren para el carácter. Se muestran las distribuciones esperadas suponiendo un control monogénico del carácter y un control digénico con efectos similares de ambos genes y dominancia parcial.

Asumiendo que el carácter capacidad de regeneración estaba controlado por dos genes con efectos similares y dominancia parcial, las nueve clases fenotípicas esperadas en la generación  $F_2$  se podían agrupar en seis clases fenotípicas que aparecen en proporciones conocidas, suponiendo segregación independiente (Tabla 2.15).

De estas seis clases, se conocían las distribuciones asociadas a los dos doble homocigotos y al doble heterocigoto. La frecuencia de regeneración media para las tres clases restantes se determinó mediante una simulación algebraica. La varianza se determinó de forma similar a lo descrito anteriormente. Se comprobó que el mejor ajuste entre las distribuciones observada y esperada en la generación  $F_2$  se obtenía para los valores de frecuencia de regeneración media que se muestran en la Tabla 2.15 ( $\chi^2=5,47$ , con 5 grados de libertad).

**Tabla 2.15.** Genotipos y clases fenotípicas esperadas en la generación  $F_2$ , suponiendo un modelo digénico con dominancia parcial y efectos similares de los dos genes. Se indican los valores de frecuencia de regeneración y media, así como la varianza asociada, en cada una de las clases fenotípicas.

Clases fenotípicas	1	2	3	4	5	6
Genotipos	AABB	AaBB AABb	AaBb	AAbb aaBB	Aabb aaBb	aabb
Proporción	1/16	4/16	4/16	2/16	4/16	1/16
Frecuencia de regeneración media	0,86	0,80	0,73	0,65	0,50	0,26
Varianza	0,004	0,005	0,006	0,006	0,008	0,006

Por tanto, se podía asumir que la capacidad de regeneración en la entrada de melón ensayada estaba controlada por dos genes, con efectos similares y dominancia parcial.

La aproximación de la comparación entre la distribución obtenida y la esperada según un modelo propuesto ha sido empleada para el estudio del control genético de distintos caracteres. Así Bencheikh y Gallais (1996) estudiaron la capacidad de formar embriones somáticos en guisante (*Pisum sativum* L. y *Pisum arvense* L.) a partir de cruces entre seis líneas que diferían para el carácter estudiado. El modelo que mejor explicaba la distribución obtenida en la generación  $F_2$  procedente del cruce entre dos genotipos extremos fue un modelo digénico con dominancia parcial en los dos *loci*.

En muchos casos, sin embargo, una vez realizada la comparación de las distribuciones, la comprobación de los datos al modelo se realiza mediante una discretización. Empleando este tipo de aproximación, Barker et al. (1994) determinaron que el control genético de la resistencia a la multiplicación del virus del enrollado de la hoja de patata (*Potato leaf roll virus*, PLRV) en patata (*Solanum tuberosum* L.) está controlado por dos genes mayores dominantes no ligados, siendo ambos necesarios para que se exprese la resistencia.

## 2.8. NÚMERO DE GENES IMPLICADOS

Resulta de interés para el mejorador conocer el número de genes implicados en el control genético de un carácter, ya que de ello va a depender la estrategia de mejora.

Entre las aproximaciones disponibles para estimar el número de genes implicados en el control genético de los caracteres cuantitativos, nos centraremos en este capítulo en la aproximación biométrica, es decir, en los métodos basados en el análisis de la distribución fenotípica de distintas poblaciones.

Gracias a los avances en las técnicas de aplicación de los marcadores moleculares, se han desarrollado otros métodos basados en la búsqueda de asociación entre marcadores moleculares y variación genética cuantitativa. Esta aproximación se trata en el capítulo 4. También el empleo de NILs constituye una herramienta poderosa para establecer el número de QTLs implicados en el control genético de un carácter.

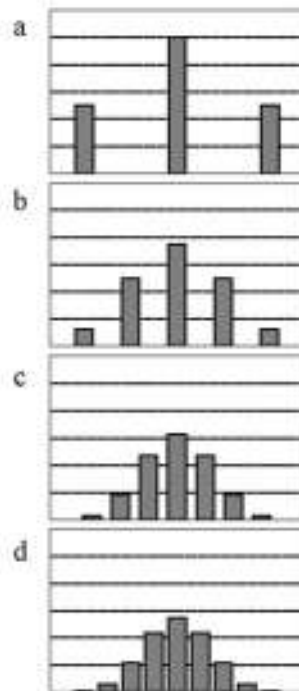
### 2.8.1. Estimador de Castle-Wright

Entre los métodos biométricos, uno de los más utilizados ha sido el estimador desarrollado por Castle (1921) y Wright (1968). Este estimador se puede emplear cuando se dispone de información en cuanto a la media y la varianza de dos líneas parentales, así como de las generaciones derivadas del cruce entre ellas ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $BC_1$ ,  $BC_2, \dots$ ). Las asunciones para el empleo de este estimador en la determinación del número de genes que controlan un carácter son las siguientes:

- la acción génica es aditividad
- se detectan únicamente *loci* no ligados
- los efectos de los alelos sobre el fenotipo son pequeños e iguales
- todos los alelos con efectos positivos están en una de las líneas parentales, siendo la otra portadora de todos los alelos con efectos negativos

Es importante tener en cuenta que el número de genes detectado en este tipo de diseños experimentales está limitado a los genes para los que difieren las líneas parentales, de forma que se suele hablar de “número de factores o *loci* efectivos”. Por otra parte, el número de *loci* detectados no puede ser superior al número de fragmentos cromosómicos segregantes.

La idea intuitiva de este estimador se basa en el hecho de que la varianza genotípica en generaciones segregantes provenientes del cruce inicial planteado, disminuirá a medida que aumente el número de genes implicados en el control genético de la diferencia entre los parentales (Otto y Jones, 2000). En este sentido, si el carácter está controlado únicamente por un gen, en la generación  $F_2$  aparece un número elevado de individuos con el mismo fenotipo que los parentales y el rango de variación se extiende entre los valores de los parentales. A medida que aumenta el número de genes implicados, los valores fenotípicos de los individuos de la generación  $F_2$  se concentran en torno a la media entre las líneas parentales (Figura 2.9). Por este motivo, la varianza debida a factores genéticos detectada da información acerca del número de genes implicados en el control genético del carácter.



**Figura 2.9.** Resultado, en cuanto a proporción de individuos por cada fenotipo, del cruce entre dos heterocigotos para 1 (a), 2 (b), 3 (c) o 4 (d) parejas de alelos. Se asume aditividad para todos los genes y ausencia de efecto ambiental sobre la expresión del fenotipo.

Considerando  $\alpha_i$  la aportación al fenotipo de cada uno de los alelos que influyen en el carácter, la diferencia entre la media de dos líneas que difieran para  $n$  loci será:

$$\Delta P = \bar{P}_2 - \bar{P}_1 = 2n\alpha_1$$

El valor fenotípico medio en las generaciones  $F_1$  y  $F_2$  será:

$$\bar{F}_2 = \bar{F}_1 = n\alpha_1$$

Entonces, la varianza genotípica,  $Var(S)$ , (calculada en este caso en la generación  $F_2$ ) se puede expresar como:

$$Var(S) = Var(F_2) - Var(E) = \frac{1}{2}n\alpha_1^2$$

siendo  $Var(E)$  la varianza ambiental. De donde:

$$n = \frac{(\Delta P)^2}{8Var(S)}$$

En la práctica, para el cálculo del número de factores efectivos se utilizan los valores muestrales obtenidos a partir de las generaciones disponibles, siendo el estimador expresado como:

$$\hat{n}_e = \frac{(\bar{P}_1 - \bar{P}_2)^2 - \text{Var}(\bar{P}_1) - \text{Var}(\bar{P}_2)}{8\text{Var}(S)}$$

En esta expresión del estimador de Castle-Wright,  $\bar{P}_i$  y  $\text{Var}(\bar{P}_i)$  son la media muestral y la varianza asociada a esta media, para el parental  $i$ -ésimo. En ocasiones no se incluyen los términos de varianza del numerador, pero esto supone no considerar los errores de muestreo para las estimas de las medias de los parentales (Cockerham, 1986).

Existen distintas formas de estimar la varianza genotípica, en función fundamentalmente de las generaciones disponibles para el análisis. Lande (1981) propuso cuatro distintas. Únicamente con información de las generaciones  $F_1$  y  $F_2$  es posible realizar una estima de  $\text{Var}(S)$ . Toda la varianza observada en las generaciones  $P_1$ ,  $P_2$  y  $F_1$  es ambiental, ya que según el modelo planteado son generaciones homogéneas genotípicamente. Sin embargo, la varianza observada en la generación  $F_2$  será debida en parte al genotipo. De forma que es posible estimar  $\text{Var}(S)$  empleando alguna de las siguientes expresiones:

$$V_1 = \text{Var}(S) = \text{Var}(F_2) - \text{Var}(F_1)$$

$$V_2 = \text{Var}(S) = \text{Var}(F_2) - \left[ \frac{1}{4}\text{Var}(P_1) + \frac{1}{2}\text{Var}(F_1) + \frac{1}{4}\text{Var}(P_2) \right]$$

Si además se dispone de los retrocruces hacia ambos parentales, considerando la composición en cuanto a genotipos de cada una de las generaciones de la familia, se puede estimar  $\text{Var}(S)$  como:

$$V_3 = \text{Var}(S) = 2\text{Var}(F_2) - \text{Var}(BC_1) - \text{Var}(BC_2)$$

o bien:

$$V_4 = \text{Var}(S) = \text{Var}(BC_1) + \text{Var}(BC_2) - \left[ \text{Var}(F_1) + \frac{1}{2}\text{Var}(P_1) + \frac{1}{2}\text{Var}(P_2) \right]$$

La varianza de la estima para el número de factores efectivos  $n_e$ , asumiendo normalidad y considerando la expresión para la varianza de un cociente, tiene como límite superior:

$$\text{Var}(\hat{n}_e) = \hat{n}_e^2 \left[ \frac{4[\text{Var}(\bar{P}_1) + \text{Var}(\bar{P}_2)]}{(\bar{P}_1 - \bar{P}_2)^2} + \frac{\text{Var}[\text{Var}(S)]}{[\text{Var}(S)]^2} \right]$$

La estima de  $Var[Var(S)]$  depende de las generaciones empleadas para calcular  $Var(S)$ . Por ejemplo, si se ha empleado la expresión  $V_1$ , entonces  $Var[Var(S)]$  es la suma de las varianzas máximas para  $Var(F_1)$  y  $Var(F_2)$ , según la siguiente expresión:

$$Var[V_1] = \frac{2[Var(F_2)]^2}{n_{F_2} + 2} + \frac{2[Var(F_1)]^2}{n_{F_1} + 2}$$

siendo  $n_{F_2}$  y  $n_{F_1}$  los tamaños muestrales de las generaciones  $F_2$  y  $F_1$ , respectivamente. Este resultado deriva del hecho de que  $Var(F_1)$  y  $Var(F_2)$  son dos estimas independientes y, asumiendo normalidad, el límite superior de la varianza muestral de una varianza es  $2Var^2/(n+2)$ .

En los casos en los que  $Var(S)$  se ha estimado según  $V_2$ ,  $V_3$  y  $V_4$ ,  $Var[Var(S)]$  se estima respectivamente como:

$$Var[V_2] = \frac{2[Var(F_2)]^2}{n_{F_2} + 2} + \frac{1}{2} \times \frac{[Var(F_1)]^2}{n_{F_1} + 2} + \frac{1}{8} \times \frac{[Var(P_1)]^2}{n_{P_1} + 2} + \frac{1}{8} \times \frac{[Var(P_2)]^2}{n_{P_2} + 2}$$

$$Var[V_3] = \frac{8[Var(F_2)]^2}{n_{F_2} + 2} + \frac{2[Var(BC_1)]^2}{n_{BC_1} + 2} + \frac{2[Var(BC_2)]^2}{n_{BC_2} + 2}$$

$$Var[V_4] = \frac{2[Var(BC_1)]^2}{n_{BC_1} + 2} + \frac{2[Var(BC_2)]^2}{n_{BC_2} + 2} + \frac{2[Var(F_1)]^2}{n_{F_1} + 2} + \frac{1}{2} \times \frac{[Var(P_1)]^2}{n_{P_1} + 2} + \frac{1}{2} \times \frac{[Var(P_2)]^2}{n_{P_2} + 2}$$

Si se dispone de los retrocruces hacia ambos parentales la estima se puede obtener por mínimos cuadrados pesados (Cockerham, 1986). De esta forma, se combina en un solo estimador toda la información disponible.

### Ejemplo

Powers (1942) estudió la varianza en el peso del fruto de tomate en una familia desarrollada a partir del cruce inicial Danmark (*Solanum lycopersicum* L.) x Red Currant (*S. pimpinellifolium* L.) (Tabla 2.16). A partir de los datos obtenidos por Powers, Wrigth (1968) propuso una transformación del tipo  $x' = \log(x-a)$  que permitía asumir aditividad como modo de acción génica (Tabla 2.16). Trabajando con los datos transformados, Lande (1981) calculó el número de factores efectivos empleando distintas formas de estimar la varianza genotípica.

En primer lugar es necesario calcular la estima para la varianza genotípica. Dado que se dispone de todas las generaciones, existen cuatro posibles expresiones para el cálculo. Los resultados según las distintas estimas para la varianza genotípica se resumen en la tabla 2.17.



**Tabla 2.16.** Datos para el peso del fruto en las distintas generaciones a partir del cruce inicial Danmark (*Solanum lycopersicum* L.) ( $P_2$ ) x Red Currant (*S. pimpinellifolium* L.) ( $P_1$ ). Se incluye la transformación de los datos sugerida por Wright (1968). (Modificado de Lande (1981)).

Generación	Nº frutos	Variable original		Variable transformada	
		Peso del fruto (g)		Log(peso-0,153)	
		$\hat{\mu}$	$\hat{\sigma}^2$	$\hat{\mu}$	$\hat{\sigma}^2$
$P_1$	420	0,915	0,053	-0,137	0,0165
$P_2$	456	51,170	236,94	1,689	0,0165
$F_1$	475	5,480	2,258	0,710	0,0144
$F_2$	932	5,380	10,032	0,653	0,0570
$BC_1$	932	2,095	0,743	0,249	0,0339
$BC_2$	931	16,105	50,940	1,163	0,0344

**Tabla 2.17.** Estima del número de *loci* efectivos implicados en el control genético del peso del fruto en tomate (Modificado de Lande (1981)).

Expresión para $Var(S)$	$V_i$	$n_e$	$Var(V_1)$	$Var(n_{ei})$	$S(n_{ei})$
1	0,0426	9,8	$7,81 \times 10^{-6}$	0,385	0,6
2	0,0416	9,9	$7,37 \times 10^{-6}$	0,427	0,7
3	0,0457	9,1	$3,05 \times 10^{-6}$	1,217	1,1
4	0,0374	11,1	$6,49 \times 10^{-6}$	0,572	0,8

A pesar de ser sesgado, el estimador de Castle-Wright es uno de los más empleados. Dos de las asunciones del modelo se cumplen en muchos casos:

- todos los alelos con efectos positivos están en una de las líneas parentales, siendo la otra portadora de todos los alelos con efectos negativos: se suele recurrir a la selección artificial de líneas con fenotipos extremos, dentro del rango de variación disponible, durante varias generaciones antes de realizar el cruce inicial (Zeng et al., 1990).
- la acción génica es aditividad: se asume que existe una escala de medida para cualquier variable que hace que exista aditividad para la varianza genética (Lande, 1981) de forma que existen distintas transformaciones que permiten conseguir que se cumpla este requisito (Wright, 1968).

Entre los trabajos recientes en los que se ha empleado el estimador de Castle-Wright se incluyen los siguientes estudios de control genético: resistencia a virosis en sandía (Xu et al., 2004), partenocarpia en pepino (Sun et al., 2006), contenido en carotenoides en zanahoria (Fernandes Santos y Simon, 2006), transmisión de luteovirus mediante el vector natural (Burrows et al., 2007).

### 2.8.2. Extensiones de Wright del estimador de Castle-Wright

Existen modificaciones del estimador que permiten incluir efectos de dominancia y contribuciones distintas de cada *locus* (Wright, 1968).

#### Dominancia dentro de loci

Si se asume que existe dominancia constante para todos los *loci*, medida como  $h = \frac{\alpha_1}{\alpha_1 + \alpha_2}$ , siendo  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  las aportaciones respectivas de cada uno de los alelos al fenotipo, entonces la varianza genotípica en la generación  $F_2$  viene determinada por:

$$\text{Var}(S) = \text{Var}(F_2) - \text{Var}(E) = \frac{n}{16}(\alpha_1 + \alpha_2)^2 [3 - 4h(1 - h)]$$

con lo que la estima para el número de *loci* efectivos viene dada por:

$$\hat{n}_e = \frac{(\Delta P)^2 [3 - 4h(1 - h)]}{16\text{Var}(S)}$$

Cuando existe dominancia, la estima para el número de *loci* efectivos, en comparación con la obtenida en el caso de semidominancia, se ve incrementada para cualquier valor de  $h$  distinto de 0,5. Este incremento es máximo cuando la dominancia es completa ( $h=0$  ó  $h=1$ ).

En realidad es de esperar que los efectos de dominancia difieran entre *loci*. En cualquier caso siempre que el fenotipo de la generación  $F_1$  no sea igual a la media de los fenotipos parentales se puede asumir que existe cierto grado de dominancia. El efecto mínimo de la dominancia se obtiene de asumir efectos similares en todos los *loci*, pudiendo estimarse mediante el cociente  $(\bar{F}_1 - \bar{P}_1) / (\bar{P}_2 - \bar{P}_1)$

#### Contribuciones distintas de cada locus

No es frecuente que la contribución de todos los *loci* sobre la expresión del carácter sea la misma. Los modelos que asumen contribuciones distintas de cada *locus*, incluyen efectos de genes mayores y genes menores con efectos individuales pequeños.

Si el fenotipo se debe al efecto de un gen mayor con semidominancia, con contribución  $2\alpha$ , y varios genes menores, cuya contribución total se puede expresar como  $2\Sigma\beta$ , entonces la varianza genotípica en la generación  $F_2$  sería:

$$\text{Var}(S) = \frac{1}{2}\alpha^2 + \frac{1}{2}\Sigma\beta^2$$

siendo el término  $\Sigma\beta^2$  despreciable.

La estima para el número de *loci* efectivos es en este caso:

$$\hat{n}_e = \frac{(\Delta P)^2}{4\alpha^2}$$

Si el gen mayor es dominante, la estima es:

$$\hat{n}_e = \frac{(\Delta P)^2}{1,5\alpha^2}$$

Suponiendo varios genes mayores ( $n$ ) con semidominancia, se puede estimar el número de *loci* con efectos menores sobre el carácter como:

$$\hat{n}_e = \frac{(\Delta P)^2}{4n\alpha^2}$$

### 2.8.3. Otras extensiones del estimador de Castle-Wright

Basándose en las generalizaciones de Lande (1981) y Cockerham (1986), Lynch y Walsh (1998) propusieron el estimador:

$$\hat{n}_e = \frac{(\Delta P)^2(1+C_\alpha)}{8\alpha_s^2} - C_\alpha$$

donde  $C_\alpha$  es el cuadrado del coeficiente de variación de  $\alpha$  ( $C_\alpha = \text{Var}(\alpha)/(\bar{\alpha})^2$ )

Este estimador se obtiene de asumir que el carácter está controlado por muchos *loci* con efectos pequeños, pero distintos para cada *locus*, con lo que

$$\bar{P}_2 - \bar{P}_1 = 2n\bar{\alpha}$$

$$\bar{F}_2 = \bar{F}_1 = n\bar{\alpha}$$

y entonces, la varianza genotípica de la generación  $F_2$  se puede expresar como

$$\text{Var}(S) = \frac{1}{2}n [\text{Var}(\alpha) + (\bar{\alpha})^2]$$

siendo  $\bar{\alpha}$  la media del efecto aditivo de todos los *loci*.

Resulta difícil disponer de una estima para  $C_\alpha$ , por lo que para realizar las estimas del número de *loci* se suele asumir que sigue una distribución muy leptocúrtica (normal truncada en la media o exponencial negativa), ya que suelen existir muchos genes con efectos pequeños sobre el carácter. Futuros trabajos de cartografía de QTLs permitirán disponer de datos útiles en cuanto a la distribución de los efectos alélicos.

### 2.8.4. Estimador de Ollivier y Janss

Ollivier y Janss (1993) propusieron un método para estimar el número de *loci* dominantes, considerando la información de las generaciones  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $BC_1$  y  $BC_2$ . Se define el efecto de la heterosis como la desviación de la generación  $F_1$  respecto a la media de los parentales:

$$H = \bar{F}_1 - \frac{(\bar{P}_1 + \bar{P}_2)}{2}$$

En general, para cualquier cruce, sean o no los parentales líneas puras, se puede estimar el número de *loci* que expresan dominancia,  $n_d$ , como:

$$n_d = \frac{H^2}{8\text{Var}(B) - 4\text{Var}(S) + 2\text{Var}(C)}$$

Siendo  $\text{Var}(S)$  la varianza genotípica de la generación  $F_2$  y estimando  $\text{Var}(B)$  y  $\text{Var}(C)$  como:

$$\text{Var}(B) = \frac{1}{2} [\text{Var}(BC_1) + \text{Var}(BC_2)] - \text{Var}(F_1)$$

$$\text{Var}(C) = \text{Var}(F_1) - \frac{1}{2} [\text{Var}(P_1) + \text{Var}(P_2)]$$

En el caso en el que las dos líneas que se cruzan inicialmente sean homocigotas para los genes que controlan el carácter, el término  $\text{Var}(C)$  es igual a cero, con lo que se obtiene un estimador simplificado eliminando este término.

### 2.8.5. Estimador de Zeng

Como resultado de no considerar efectos distintos entre *loci* segregantes ni el ligamiento entre *loci*, el estimador de Castle-Wright subestima el número de *loci* implicados en el control genético de un carácter. Se han propuesto distintas correcciones para el estimador. La formulada por Zeng (1992) incluye los dos factores citados, es decir, ligamiento y efectos distintos de los *loci*, según la siguiente expresión:

$$\hat{n} = \frac{2\bar{c}\hat{n}_e + C_\alpha(\hat{n}_e - 1)}{1 - \hat{n}_e(1 - 2\bar{c})}$$

En esta expresión,  $n_e$  es el calculado considerando efectos iguales de cada uno de los *loci* que afectan al carácter,  $\bar{c}$  es la frecuencia de recombinación media entre todos los pares de *loci* y  $C_\alpha$  es el cuadrado del coeficiente de variación de los efectos aditivos específicos de *locus*  $\alpha$ . La varianza asociada a este estimador es:

$$\text{Var}[\hat{n}] = \frac{4\bar{c}^2(1 + C_\alpha)^2 \text{Var}[\hat{n}_e]}{[1 - \hat{n}_e(1 - 2\bar{c})]^4}$$

Por lo tanto, para poder utilizar la corrección de Zeng (1992) es necesario disponer de estimas para  $C_{\alpha}$  y  $\bar{c}$ . Como se ha comentado previamente, no se dispone de estimas para  $C_{\alpha}$ . Existen estimas de  $\bar{c}$  para aquellas especies de las que se cuenta con mapas con cierta resolución (O'Brien 1990; Lynch y Walsh, 1998). Para las especies de las que no se dispone de estimas de  $\bar{c}$ , si se conoce el número haploide de cromosomas ( $M$ ) propio de la especie, se puede estimar como (Zeng, 1992):

$$\bar{c} = \frac{M-1}{2M}$$

Esta expresión, basada en la función de mapa de Haldane, asume que los genes están uniformemente distribuidos en el genoma, que todos los cromosomas contienen el mismo número de genes y que los genes en el mismo cromosoma presentan ligamiento completo.

Las estimas de  $\bar{c}$  calculadas según esta expresión son, en general, muy similares a las obtenidas cuando se dispone de información más precisa (Lynch y Walsh, 1998). Por ejemplo, en el caso del tomate ( $M=12$ ), la estima proporcionada es de 0,458, mientras que la estimada con datos de mapa es de 0,479.

## REFERENCIAS

- Barker, H., Solomon-Blackburn, R.M., McNicol, J.W. and Bradshaw J.E. (1994). Resistance to potato leaf roll virus multiplication in potato is under major gene control. *Theor. Appl. Genet.* 88: 754-758.
- Bencheikh, M. and Gallais, A. (1996). Somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L. and *Pisum arvense* L.): Diallel analysis and genetic control. *Euphytica* 90: 257-264.
- Burrows, M.E., Caillaud, M.C., Smith, D.M. and Gray, S.M. (2007). Biometrical genetic analysis of luteovirus transmission in the aphid *Schizaphis graminum*. *Heredity* 98: 106-113.
- Castle, W.E. (1921). An improved method of estimating the number of genetic factors concerned in cases of blending inheritance. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6904-6907.
- Cockerham, C.C. (1986). Modifications in estimating the number of effective genes for a quantitative character. *Genetics* 114: 659-664.
- Esteva, J. and Nuez, F. (1992). Tolerance to a whitefly-transmitted virus causing muskmelon yellows disease in Spain. *Theor. Appl. Genet.* 84: 693-697.
- Fernandes Santos, C.A. and Simon, P.W. (2006). Heritabilities and minimum gene number estimates of carrot carotenoids. *Euphytica* 151: 79-86.
- George, W.L., Scott, J.W. and Splittstoesser, W.E. (1984). Parthenocarpy in tomato. *Hortic. Rev.* 6: 65-84.
- Griffiths, P.D. and Scott, J.W. (2001). Inheritance and linkage of *Tomato mottle virus* resistance genes derived from *Lycopersicon chilense* accession LA1932. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126: 462-467.
- Hassan, A.A., Mazayd, H.M., Moustafa, S.E., Nassar, S.H., Nakhla, M.K. and Sims, W.L. (1984). Inheritance of resistance to Tomato yellow leaf curl virus derived from *Lycopersicon cheesmannii* and *Lycopersicon hirsutum*. *HortScience* 19: 574-575.

- Ji, Y. and Scott, J.W. (2005). Identification of RAPD markers linked to *Lycopersicon chilense* derived begomovirus resistant genes on chromosome 6 of tomato. *Acta Hort.* 695: 407-416.
- Kasrawi, M.A. (1989). Inheritance of resistance to Tomato yellow leaf curl virus in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Plant Dis.* 73: 435-437.
- Kasrawi, M.A. and Mansour, A. (1994). Genetics of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato. *J. Hortic. Sci.* 69: 1095-1100.
- Kim, Y.K., Brown-Guedira, G.L., Cox, T.S. and Bockus W.W. (2004). Inheritance of resistance to *Stagonospora nodorum* Leaf Blotch in Kansas winter wheat cultivars. *Plant Dis.* 88: 530-536.
- Kloos, W.E., George, C.G. and Sorge, L.K. (2005). Dark disk color in the flower of *Gerbera hybrida* is determined by a dominant gene, *Dc*. *HortScience* 40: 1992-1994.
- Kwon, Y.S. and Dane, F. (1999). Inheritance of light green flower color (*gf*) in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Cucurbit Genet. Coop. Rpt.* 22 : 31-33.
- Lande, R. (1981). The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics* 99: 541-553.
- López-Anido, F., Cravero, V., Asprelli, P., Cointry, E., Firpo, I. and Garcia, S.M. (2003). Inheritance of immature fruit color in *Cucurbita maxima* var. zapallito (Carriere) Millan. *Cucurbit Genet. Coop. Rpt.* 26: 48-50.
- Lynch, M. and Walsh, B. (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Mather, K. and Jinks, J.L. (1982). *Biometrical genetics*. Chapman and Hall L.T.D. Londres-Nueva York. 396 pp.
- Molina, R.V. and Nuez, F. (1995). Characterization and classification of different genotypes in a population of *Cucumis melo* based on their ability to regenerate shoots from leaf explants. *Plant Cell Tiss. Org.* 43: 249-257.
- Molina, R.V. and Nuez, F. (1996). The inheritance of organogenic response in melon. *Plant Cell Tiss. Org.* 46: 251-256.
- Nuez, F., Esteva, J., Soria, C. and Gómez-Guillamón, M.L. (1991). Search for sources of resistance to a whitefly transmitted yellowing disease in melon. *Cucurbit Genet. Coop. Rpt.* 14-59-60.
- Nuez, F., Picó, B., Iglesias, A., Esteva, J. and Juárez, M. (1999). Genetics of Melon yellows virus resistance derived from *Cucumis melo* ssp. *agrestis*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 453-464.
- O'Brien, S.J. (1990). *Genetics maps*. 5ª Edición. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Ollivier, L. and Janss, L.L.G. (1993). A note on the estimation of the effective number of additive and dominant loci contributing to quantitative variation. *Genetics* 135: 907-909.
- Otto, S.P. and Jones, C.D. (2000). Detecting the undetected: estimating the total number of loci underlying a quantitative trait. *Genetics* 156: 2093-2107.
- Pérez de Castro, A., Díez, M.J. and Nuez, F. (2007). Inheritance of *Tomato yellow leaf curl virus* resistance derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV16991. *Plant Dis.* 91: 879-885.

- Picó, B., Sifres, A., Elía, M., Díez, M.J. and Nuez, F. (2000). Searching for new resistance sources to *Tomato yellow leaf curl virus* within a highly variable wild *Lycopersicon* genetic pool. *Acta Physiol. Plant.* 22: 344-350.
- Pilowsky, M. and Cohen, S. (1990). Tolerance to Tomato yellow leaf curl virus derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Dis.* 74: 248-250.
- Powers, L. (1942). The nature of the series of environmental variances and the estimation of the genetic variances and the geometric means in crosses involving species of *Lycopersicon*. *Genetics* 27: 561-575.
- Prohens, J., Ruiz, J.J. and Nuez, F. (1998). The inheritance of parthenocarpy and associated traits in pepino. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123: 376-380.
- Roselló, S., Díez, M.J. and Nuez, F. (1998). Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicum peruvianum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 499-509.
- Sun, Z., Lower, R.L. and Staub, J.E. (2006). Analysis of generation means and components of variance for parthenocarpy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Breed.* 125: 277-280.
- Wright, S. (1968). *Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press. Chicago, USA.
- Xu, Y., Kang, D., Shi, Z., Shen, H. and Wehner, T. (2004). Inheritance of resistance to Zucchini Yellow Mosaic Virus and Watermelon Mosaic Virus in watermelon. *J. Hered.* 95: 498-502.
- Yogesh Kumar, Mishra, S.K., Tyagi, M., Singh, S.P. and Sharma, B. (2005). Linkage between genes for leaf colour, plant pubescence, number of leaflets and plant height in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Euphytica* 145: 41-48.
- Zeng, Z.B. (1992). Correcting the bias of Wright's estimates of the number of genes affecting a quantitative character: a further improved method. *Genetics* 131: 987-1001.
- Zeng, Z.B., Houle, D. and Cockerham, C.C. (1990). How informative is Wright's estimator of the number of genes affecting a quantitative character? *Genetics* 126: 235-247.





CAPÍTULO **3**

---

**EL BLUP Y LOS  
MÉTODOS BAYESIANOS.  
APLICACIÓN A LA  
MEJORA GENÉTICA  
VEGETAL**

*Manuel Baselga  
Agustín Blasco*



## EL BLUP Y LOS MÉTODOS BAYESIANOS. APLICACIÓN A LA MEJORA GENÉTICA VEGETAL

---

Manuel Baselga y Agustín Blasco

**Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universidad Politécnica de Valencia**  
**Apartado 22012. Valencia 46071**  
***mbaselga@dca.upv.es, ablasco@dca.upv.es***

---

### 3.1. EL MODELO MIXTO

En el análisis y mejora genética de los caracteres de interés en producción vegetal y animal, una de las primeras cuestiones que se plantea es la elección del modelo con el que pretendemos explicar los datos que, entre sus componentes, contiene factores como el valor genético o genotípico de individuos, o el efecto de determinados cruces o variedades, que son centrales en la toma de decisiones de un programa de mejora.

En principio, la calidad de cualquier análisis estadístico depende de la calidad del modelo propuesto para describir los datos. El modelo debe representar el modo en que se han obtenido los datos y los aspectos de la biología de los caracteres que se analizan. En la práctica, el modelo que se utiliza viene a ser el resultado de un compromiso dependiente de la información que se tenga y de la disponibilidad de los métodos estadísticos necesarios. Si el modelo exige excesivas simplificaciones e hipótesis añadidas respecto al ideal, pudiera llegar la situación de cuestionarse el valor del análisis de los datos.

En el modelo, los elementos que se consideran para explicar los datos observados se llaman factores, distinguiéndose entre *factores fijos* y *aleatorios*. La consideración de un factor como fijo o aleatorio, no siempre es clara, siendo de ayuda las respuestas a las siguientes preguntas:

- a. ¿Cuántos niveles del factor se consideran en el modelo? Si son pocos, el factor probablemente sea fijo, si muchos aleatorio.
- b. ¿Es en la población el número de niveles suficientemente grande para considerarlo infinito? En caso afirmativo, probablemente el factor sea aleatorio.
- c. ¿Podrían volver a utilizarse los mismos niveles del factor si se repitiese el experimento? Si así fuera, el factor pudiera ser fijo.
- d. ¿Van a extrapolarse las inferencias a niveles no incluidos en el experimento? Si sí, el factor debiera ser aleatorio.
- e. ¿Se determinaron aleatoriamente los niveles del factor? En caso negativo, el factor debe tratarse como fijo.

Cuando los efectos de los factores actúan aditivamente para explicar las observaciones el modelo es *lineal* y a continuación damos la fórmula matricial, comúnmente utilizada para definirlo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Zu} + \mathbf{e} \quad (1)$$

en la que,

**y**, representa el vector de observaciones, con n componentes.

**b**, es el vector representando los distintos niveles de los factores fijos.

**u**, es el vector de los efectos de los distintos niveles de los factores aleatorios.

**e**, es el vector de los residuales. Tiene tantas componentes como observaciones.

**X**, es la matriz de diseño que muestra para cada observación los efectos fijos que le corresponden. Tiene tantas filas como observaciones y tantas columnas como componentes tiene **b**.

**Z**, es la matriz de diseño referida a los efectos aleatorios.

La determinación del modelo se completa especificando las esperanzas de los términos aleatorios:

$$E \begin{bmatrix} \mathbf{y} \\ \mathbf{u} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{Xb} \\ \mathbf{0} \\ \mathbf{0} \end{bmatrix} \quad (2)$$

y la matriz de varianzas-covarianzas de los mismos:

$$V \begin{bmatrix} \mathbf{u} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{G} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{R} \end{bmatrix} \quad (3)$$

$$\mathbf{V}[\mathbf{y}] = \mathbf{V} = \mathbf{ZGZ}' + \mathbf{R} \quad (4)$$

Los modelos que únicamente tienen como factor aleatorio el residual se llaman *modelos de efectos fijos*. Aquéllos que únicamente tienen un factor fijo con un solo nivel (la media) y efectos aleatorios se llaman *modelos de efectos aleatorios*. En el caso de que se consideren varios niveles de efectos fijos y algún efecto aleatorio, además del residual, el modelo se considera como *modelo mixto*.

## 3.2. EL BLUP

### 3.2.1. Estimación de efectos fijos y predicción de efectos aleatorios

La estimación de los efectos fijos de (1), conocido (3), a través de un estimador de mínima varianza (Best), lineal respecto a los datos (Linear) e insesgado (Unbiased), BLUE, es:

$$\hat{\mathbf{b}} = (\mathbf{X}'\mathbf{V}^{-1}\mathbf{X})\mathbf{X}'\mathbf{V}^{-1}\mathbf{y} \quad (5)$$

que es una solución de mínimos cuadrados generalizados, a un modelo de efectos fijos en el que la varianza de residuales es la matriz  $\mathbf{V}$  en lugar de  $\mathbf{I}\sigma_e^2$ .

La predicción de los efectos aleatorios de (1), conocido (3), a través de un estimador de mínima varianza (Best), lineal respecto a los datos (Linear) e insesgado (Unbiased), BLUP, es:

$$\hat{\mathbf{u}} = \mathbf{GZ}'\mathbf{V}^{-1}(\mathbf{y} - \mathbf{X}\hat{\mathbf{b}}) \quad (6)$$

que sería la fórmula de los índices de selección, si y se centrara con el verdadero valor de  $\mathbf{u}$  en lugar de con  $\hat{\mathbf{b}}$ .

Es conveniente advertir aquí el matiz diferencial de la propiedad de insesgamiento según se aplique a efectos fijos o a efectos aleatorios. En el caso de los efectos fijos se expresa,

$$E(\hat{\mathbf{b}}) = \mathbf{b} \quad (7)$$

mientras que en el de los efectos aleatorios,

$$E(\hat{\mathbf{u}}) = E(\mathbf{u}) = 0 \quad (8)$$

Como se comentará más adelante el BLUP tiene la propiedad de la contracción (*shrinkage*), de tal manera que las predicciones de los valores aleatorios tienden a estar menos separadas de la media que los verdaderos valores.

Es obvio que para obtener verdaderas soluciones BLUE y BLUP es necesario conocer las matrices de varianzas-covarianzas de los efectos aleatorios ( $\mathbf{G}$ ) y de los residuales ( $\mathbf{R}$ ) que nos permiten calcular  $\mathbf{V}$ . En general esto no es así y, en la práctica, se sustituyen dichas matrices por estimas de ellas, por lo que las soluciones obtenidas no son propiamente BLUE o BLUP y suelen llamarse, BLUE y BLUP empíricos. Esta solución es aceptable en la práctica, si son suficientemente precisas las estimas (Gianola y Fernando, 1986). La estimación de las componentes de varianza-covarianza, cuando la estructura de los datos no es equilibrada, lo que es la norma en la mayor parte de las situaciones de mejora genética, debe hacerse con metodologías adecuadas para datos desequilibrados, como es el caso del método REML (Patterson y Thompson, 1971).

Un problema de cálculo que presentan las soluciones (5) y (6) es que requieren el cálculo de la inversa de  $\mathbf{V}$ , lo que es un problema insoluble o de costo prohibitivo, cuando el número de datos es muy grande, lo cual es normal en muchos programas de mejora genética en animales. Recordemos, que si  $\mathbf{V}$  no tiene una estructura especial que facilite el cálculo de su inversa, el coste computacional de ella crece con el cubo del número de observaciones. El problema que

acabamos de comentar impidió durante muchos años el aplicar la metodología BLUE-BLUP en modelos mixtos complejos. La solución llegó a través de lo que se llama las *ecuaciones del modelo mixto* (Henderson, 1950) que tratamos a continuación.

### 3.2.2. Las ecuaciones del modelo mixto

El siguiente sistema de ecuaciones (Henderson, 1950),

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z} & \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z} + \mathbf{G}^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{u}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} \end{bmatrix} \quad (9)$$

que son conocidas como las *ecuaciones del modelo mixto*, tiene como soluciones de  $\hat{\mathbf{b}}$  y  $\hat{\mathbf{u}}$  las mismas que se obtendrían con (5) y (6). El sistema se puede resolver de forma iterativa sin necesidad de invertir la matriz de coeficientes. Requiere sin embargo invertir la matriz  $\mathbf{R}$  que es de la misma dimensión que  $\mathbf{V}$  y la matriz  $\mathbf{G}$  cuya dimensión coincide con la de los elementos de  $\mathbf{u}$  y que, por tanto, puede ser muy elevada en algunos casos. No obstante en la mayoría de las situaciones no hay problemas serios en la inversión de estas matrices, pues  $\mathbf{R}$  suele ser diagonal o bloque diagonal y para la matriz  $\mathbf{G}$  en la que suele estar implicada la matriz de parentesco  $\mathbf{A}$  existen soluciones sencillas (Henderson, 1976; Quaas, 1976).

El cálculo de la matriz de varianzas-covarianzas de  $\hat{\mathbf{b}}$  y de los errores de predicción  $\mathbf{e} = \hat{\mathbf{u}} - \mathbf{u}$ , requiere sin embargo el cálculo de una inversa generalizada de la matriz de coeficientes, que llamaremos  $\mathbf{C}$ , de la que mostramos a continuación una partición, acorde a las partes del sistema correspondiente a los efectos fijos y aleatorios,

$$\mathbf{C} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}_{xx} & \mathbf{C}_{xz} \\ \mathbf{C}_{zx} & \mathbf{C}_{zz} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{Z} + \mathbf{G}^{-1} \end{bmatrix} \quad (10)$$

que nos permite escribir directamente la matriz de varianzas-covarianzas mencionada (Henderson, 1984),

$$V \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{u}} - \mathbf{u} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}_{xx} & \mathbf{C}_{xz} \\ \mathbf{C}_{zx} & \mathbf{C}_{zz} \end{bmatrix} \quad (11)$$

Apoyándonos en el resultado anterior se pueden plantear pruebas de hipótesis relativas a los efectos fijos. Si las filas de la matriz  $\mathbf{K}'$  representan contrastes de efectos fijos y se quiere probar la hipótesis nula,

$$\mathbf{K}'\mathbf{b} - \mathbf{c} = \mathbf{0} \quad (12)$$

siendo  $\mathbf{c}$  un vector de constantes, calcularemos  $\mathbf{s}$  como,

$$\mathbf{s} = (\mathbf{K}'\hat{\mathbf{b}} - \mathbf{c})'(\mathbf{K}'\mathbf{C}_{xx}\mathbf{K})^{-1}(\mathbf{K}'\hat{\mathbf{b}} - \mathbf{c}) \quad (13)$$

y SCE (suma de cuadrados del error), como

$$\text{SCE} = \mathbf{y}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} - \hat{\mathbf{b}}'\mathbf{X}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} - \hat{\mathbf{u}}'\mathbf{Z}'\mathbf{R}^{-1}\mathbf{y} \quad (14)$$

entonces, el estadístico F que nos permite probar la hipótesis nula es

$$F = \frac{s / r(\mathbf{K}')}{\text{SCE} / (n - r(\mathbf{X}))} \quad (15)$$

En (15)  $r$  es el operador rango de una matriz y los grados de libertad de F son respectivamente  $r(\mathbf{K}')$  y el número de observaciones ( $n$ ) menos  $r(\mathbf{X})$ .

### 3.2.3. Consideraciones de utilidad respecto al BLUP

Un primer aspecto a resaltar es que el método BLUP permite el análisis de datos desequilibrados, lo cual es prácticamente la norma en la mejora genética animal o vegetal. En este último caso suele ser mayor el número de datos disponibles de los mejores genotipos, pues ellos se prueban más extensamente que los inferiores, los cuales se descartan antes.

Otro aspecto de interés es la consideración de las relaciones entre los efectos aleatorios, a través de la matriz  $\mathbf{G}$ , lo que permite explotar mejor la información disponible. Esto es particularmente evidente cuando en los efectos aleatorios se consideran los genotipos y en la matriz  $\mathbf{G}$  se tiene en cuenta las relaciones derivadas del parentesco de los individuos. Este aspecto es crucial en mejora genética animal cuando nuestro interés es predecir el valor aditivo de los animales candidatos a la selección, que en casos extremos, como la valoración de machos para caracteres que sólo se expresan en las hembras, tiene que hacerse estrictamente con información de parientes. Así, en mejora genética vegetal la comparación entre dos líneas consanguíneas, en lugar de hacerse en base a sus estrictos rendimientos, puede utilizar también datos de otras líneas consanguíneas emparentadas (Bernardo, 2002), al igual que en cualquier programa de mejora en el que se controle la genealogía. Más adelante comentaremos algunas aplicaciones en plantas que aprovechan relaciones entre los efectos aleatorios.

El BLUP multi-carácter permite considerar las relaciones entre los caracteres, que se recogen en las matrices  $\mathbf{G}$  y  $\mathbf{R}$ , con lo que el aprovechamiento de la información es mejor. En la sección siguiente mostraremos un ejemplo. Un aspecto distinto que puede hacer necesario el análisis multivariante es el relacionado con el análisis de caracteres, que no han sido criterios de selección pero que pertenecen a una población que ha sido sometida a selección por otros caracteres. La cuestión radica en el sesgo en que se puede incurrir cuando se analizan aquéllos de forma univariante. Para evitar el sesgo es necesario analizar conjuntamente los caracteres de interés con todos aquéllos que han intervenido en las decisiones de selección. Se ha demostrado la validez del BLUP y del REML en el análisis de datos de poblaciones seleccionadas siempre que se consideren todos los datos y relaciones de parentesco implicados en el proceso de selección hasta una población base de origen que se considera en equilibrio (Thompson, 1973; Henderson, 1975). Piepho et al. (2007) indican que una situación en plantas en que los datos de un programa de selección quizá se pueden ligar con una población base en equilibrio es la de un programa con genealogía completa que parte de una  $F_2$  procedente del cruce de dos genotipos de una especie autógena y se ignora el ligamiento. Lo mismo se cumpliría en el caso de cruces simples en especies alógamas, si los datos y la genealogía llegan hasta la  $F_2$ .

Ya se ha comentado anteriormente la propiedad de contracción del BLUP, que puede ser una propiedad interesante en el grado que incrementa la precisión de la predicción, pese al “sesgo” que presenta. Su error cuadrático medio es menor que el del estimador BLUE, pues el efecto del sesgo es más que compensado por la reducción de la varianza. Esta mayor precisión del BLUP frente al BLUE es esperable pues el primero utiliza la información adicional de la distribución *a priori* del carácter. De hecho, James y Stein (1961) mostraron que el BLUP es mejor en precisión que el BLUE, si el factor en cuestión tiene más de dos niveles, debido a su propiedad de contracción.

### 3.2.4. Contribuciones a la mejora genética animal

El desarrollo del BLUP en cuanto a aplicaciones y algoritmos de cálculo que facilitan su uso ha tenido lugar principalmente en el campo de la mejora genética animal. En este apartado vamos a mostrar, con un poco más de detalle, lo que ha venido a ser el modelo central en este campo, que es el llamado *modelo animal*, para comentar luego extensiones y modificaciones que permiten abordar muy diversa problemáticas. Todo esto será de interés para comprender mejor la utilidad que el BLUP puede tener en la mejora genética vegetal.

En los programas de selección de los animales, basados en los efectos aditivos de los genes, el punto central de la evaluación es la predicción del valor aditivo de cada animal para los caracteres objeto de selección. Un modo de obtener estas predicciones es plantear modelos en los que se incluye, como factor, el valor aditivo del animal que produce el dato, con independencia de la consideración de cuantos efectos fijos se deban incluir y de otros efectos aleatorios. En su forma más simple, considerando una situación uni-carácter y como único factor aleatorio el valor aditivo del animal, el modelo se escribiría así,

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Za} + \mathbf{e}$$

en el que **a** representa el vector de valores aditivos de todos los animales desde la población base hasta el momento actual.

En este contexto la ecuación (3) sería

$$V \begin{bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{G} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{R} \end{bmatrix} \quad (16)$$

en la que

$$\mathbf{G} = \mathbf{A}\sigma_A^2 \quad (17)$$

**A** es la matriz con el doble de los coeficientes de parentesco entre todos los animales

$\sigma_A^2$  la varianza aditiva del carácter,

$$\mathbf{R} = \mathbf{I}\sigma_e^2 \quad (18)$$

$\sigma_e^2$  es la varianza residual.



De acuerdo con lo anterior, (4) sería

$$V[\mathbf{y}] = \mathbf{V} = \mathbf{ZAZ}'\sigma_A^2 + \mathbf{I}\sigma_e^2 \quad (19)$$

y (9) sería

$$\begin{bmatrix} \mathbf{XX} & \mathbf{XZ} \\ \mathbf{ZX} & \mathbf{ZZ} + \mathbf{A}^{-1}\alpha \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{u}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{Xy} \\ \mathbf{Zy} \end{bmatrix} \quad (20)$$

siendo ,

$$\alpha = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_A^2} = \frac{1-h^2}{h^2}$$

y  $h^2$  la heredabilidad del carácter.

La construcción de este sistema de ecuaciones, únicamente presenta el problema del cálculo de  $\mathbf{A}^{-1}$  que puede implicar a un muy elevado número de animales y por tanto podría presentar las mismas dificultades que el cálculo de  $\mathbf{V}^{-1}$  y esto podría ser un problema que limitase la utilización del BLUP en cualquiera de sus procedimientos de resolución. No obstante, ya hemos comentado que Henderson (1976) y Quaas (1976) resolvieron este problema demostrando que el cálculo de  $\mathbf{A}^{-1}$  podía hacerse directamente a partir de una genealogía completa de los individuos de los que se tienen datos y de sus antecesores hasta la población de partida.

Advirtamos que por este procedimiento, debido a la consideración del parentesco entre los individuos ( $\mathbf{A}$ ) se pueden predecir los valores aditivos de individuos de los que no se tienen datos. También puede hacerse una valoración, aunque poco precisa, de animales no nacidos de apareamientos que pueden programarse para, por ejemplo, obtener machos candidatos a una prueba de descendencia.

Es claro que en el análisis de muchos caracteres de interés se exige la consideración de más efectos aleatorios. Por ejemplo, cuando un animal tiene varios registros de un mismo carácter, resulta necesario considerar en el modelo, además del efecto aditivo, el resto de efectos permanentes que afectan a todos los registros del carácter del animal. Este modelo es el que se llama *modelo animal de repetibilidad*. En otro tipo de caracteres, especialmente los relacionados con animales jóvenes de especies prolíficas, es frecuente que las crías compartan factores ambientales comunes, que para algunos de sus caracteres pueden ser muy influyentes y que por tanto tenemos que considerar en el modelo. Por otra parte es bien conocida la influencia de los efectos maternos sobre algunos caracteres, como es el caso del tamaño de camada en especies prolíficas. A continuación vamos a detallar uno de los modelos anteriores (Mrode, 1996), en concreto el modelo animal de repetibilidad, para mostrar como las ecuaciones del modelo mixto, aparecen de un modo sencillo. Este modelo se puede escribir así:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Z}_1\mathbf{a} + \mathbf{Z}_2\mathbf{p} + \mathbf{e} \quad (21)$$

en el que  $\mathbf{p}$  es el vector de efectos permanentes, no aditivos, que afectan a los datos repetidos de un mismo animal. En este modelo se asume que

$$\mathbf{G} = V \begin{bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{p} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{A}\sigma_A^2 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I}\sigma_p^2 \end{bmatrix} \quad (22)$$

La matriz de varianzas covarianzas de los datos será

$$V(\mathbf{y}) = \mathbf{Z}_1\mathbf{A}\mathbf{Z}_1'\sigma_A^2 + \mathbf{Z}_2\mathbf{Z}_2'\sigma_p^2 + \mathbf{I}\sigma_e^2 \quad (23)$$

y las correspondientes ecuaciones del modelo mixto

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X}\mathbf{X} & \mathbf{X}\mathbf{Z}_1 & \mathbf{X}\mathbf{Z}_2 \\ \mathbf{Z}_1'\mathbf{X} & \mathbf{Z}_1'\mathbf{Z}_1 + \alpha_1\mathbf{A}^{-1} & \mathbf{Z}_1'\mathbf{Z}_2 \\ \mathbf{Z}_2'\mathbf{X} & \mathbf{Z}_2'\mathbf{Z}_1 & \mathbf{Z}_2'\mathbf{Z}_2 + \alpha_2\mathbf{I} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{a}} \\ \hat{\mathbf{p}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}_1'\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}_2'\mathbf{y} \end{bmatrix} \quad (24)$$

en las que

$$\alpha_1 = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_A^2} = \frac{1-r}{h^2} \quad \text{y} \quad \alpha_2 = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_p^2} = \frac{1-r}{r-h^2}$$

siendo  $r$  la repetibilidad del carácter.

Otra extensión de interés es la del modelo de grupos genéticos (Westell et al., 1986) que resuelve la situación de cuando se incorporan animales a un programa de selección, desde diferentes poblaciones base (grupos genéticos). El procedimiento para tratar esta situación es, aparentemente, inmediato y bastaría con introducir un nuevo factor fijo que es el *grupo genético*. El modelo lo escribiríamos como,

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}_1\mathbf{b} + \mathbf{X}_2\mathbf{g} + \mathbf{Za} + \mathbf{e} \quad (25)$$

donde  $\mathbf{g}$  es el factor fijo en el que se contemplan los distintos efectos de los grupos genéticos. El problema reside aquí en la construcción de la matriz  $\mathbf{X}_2$  que para cada individuo debiera expresar las fracciones en que los genes de los distintos grupos entran en su composición, lo que puede ser muy complicado tras unas pocas generaciones desde la incorporación del animal. Westell et al. (1988) mostraron que el problema anterior se simplificaba enormemente con la consideración de lo que llamaron *padres fantasma* y la asignación de éstos a grupos genéticos definidos.

En muchos programas de mejora genética los objetivos son múltiples y las decisiones de selección exigen la evaluación genética de los animales para varios caracteres, que adecuadamente ponderadas permiten obtener un índice sobre el que se racionalizan las decisiones de selección. Si los caracteres están correlacionados genética y ambientalmente es conveniente plantear un modelo conjunto que explique cada uno de los caracteres y que a su vez tenga en cuenta sus relaciones. De este modo aprovechamos la información que unos caracteres tienen sobre otros y, además, como en los casos uni-carácter la información de los individuos emparentados entre sí. La varianza del error de predicción disminuye, y consecuentemente la precisión aumenta, en función de la

información disponible. Los caracteres con heredabilidades más bajas se ven claramente favorecidos en un análisis multi-carácter con caracteres de mayor heredabilidad y significativamente correlacionados con ellos. Otra ventaja del análisis multi-carácter proviene de la mejora de la precisión por una mejor conexión entre los datos debida a la covarianza residual entre los caracteres.

Un aspecto distinto que puede hacer necesario el análisis multi-carácter, que ya se ha comentado anteriormente, es el relacionado con el análisis de caracteres, que no han sido criterios de selección pero que pertenecen a una población que ha sido sometida a selección por otros caracteres.

Junto con las ventajas señaladas del análisis multi-carácter existen algunos inconvenientes. El primero es el costo, pues el análisis conjunto de  $c$  caracteres es muy superior al de  $c$  análisis uni-carácter, pues en el primer caso, si no se recurre a estrategias especiales, la necesidad de memoria puede crecer con el cuadrado de  $c$  y el de cómputo con el cubo. Obviamente, la eficacia de un análisis multi-carácter depende de la precisión con que se conozcan los parámetros de relación entre los caracteres. Algunos de ellos, como las correlaciones genéticas, en algunos casos, tienen dificultades intrínsecas para ser estimadas con precisión y por otra parte conforme el número de caracteres a analizar aumenta, el número de parámetros necesarios se incrementa de forma no lineal.

Vamos a ejemplificar, para un caso bi-carácter, cómo plantear los modelos uni-carácter y el modelo bi-carácter correspondiente. El punto esencial es la definición de la matriz de varianzas-covarianzas de los factores aleatorios implicados en ambos modelos uni-carácter. Para evitar expresiones largas, vamos a considerar todos los factores aleatorios reunidos en un único vector por carácter que llamaremos  $u_1$  o  $u_2$ . Los modelos uni-carácter serían

$$\begin{aligned} y_1 &= X_1 b_1 + Z_1 u_1 + e_1 \\ y_2 &= X_2 b_2 + Z_2 u_2 + e_2 \end{aligned} \quad (26)$$

en donde los subíndices 1 y 2 se refieren al primero y al segundo carácter respectivamente.

El modelo bivalente sería,

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 & 0 \\ 0 & X_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Z_1 & 0 \\ 0 & Z_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} u_1 \\ u_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \end{bmatrix} = y = Xb + Zu + e \quad (27)$$

en el que los datos se ordenan por animal dentro de carácter y, consecuentemente, la matriz de varianzas-covarianzas de los efectos aleatorios sería,

$$V \begin{bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ e_1 \\ e_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} G_{11} & G_{12} & 0 & 0 \\ G_{21} & G_{22} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & R_{11} & R_{12} \\ 0 & 0 & R_{21} & R_{22} \end{bmatrix} \quad (28)$$

y su inversa,

$$\left( V \begin{bmatrix} \mathbf{u}_1 \\ \mathbf{u}_2 \\ \mathbf{e}_1 \\ \mathbf{e}_2 \end{bmatrix} \right)^{-1} = \begin{bmatrix} \mathbf{G}^{11} & \mathbf{G}^{12} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{G}^{21} & \mathbf{G}^{22} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{R}^{11} & \mathbf{R}^{12} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{R}^{21} & \mathbf{R}^{22} \end{bmatrix} \quad (29)$$

Lo que permite construir las ecuaciones del modelo mixto, (9). Es ilustrativo mostrar cómo se aborda el cálculo de la inversa de los efectos aleatorios y, por simplicidad, vamos a hacerlo en el caso de que el único factor aleatorio diferente al residual sea el valor aditivo, es decir cuando  $\mathbf{u}=\mathbf{a}$ . Entonces

$$V(\mathbf{a}) = \mathbf{G} = \mathbf{G}_0 \otimes \mathbf{A} \quad (30)$$

y

$$V(\mathbf{e}) = \mathbf{R} = \mathbf{R}_0 \otimes \mathbf{I} \quad (31)$$

siendo,  $\otimes$  el operador producto directo,  $\mathbf{G}_0$ , la matriz de varianzas- covarianzas aditivas entre los  $c$  caracteres considerados y  $\mathbf{R}_0$  la matriz similar de varianzas- covarianzas residuales, cuya inversión no ofrece ningún problema, calculándose las inversas de  $\mathbf{G}$  y  $\mathbf{R}$ , del siguiente modo,

$$\mathbf{G}^{-1} = \mathbf{G}_0^{-1} \otimes \mathbf{A}^{-1} \quad (32)$$

y

$$\mathbf{R}^{-1} = \mathbf{R}_0^{-1} \otimes \mathbf{I} \quad (33)$$

Hay situaciones que permiten estrategias de cálculo especiales que simplifican mucho las necesidades de cálculo. La situación más clara es la del análisis multi-carácter que tiene el mismo modelo para los distintos caracteres, con las mismas matrices de diseño para cualquiera de ellos y que además únicamente considera un factor aleatorio, cuando todos los caracteres se han medido en todos los individuos. En este caso, se hace uso de la transformación canónica (Thompson, 1977), que reduce el análisis conjunto de  $c$  caracteres en  $c$  análisis uni-carácter, lo que divide las necesidades de memoria por  $c$  y las necesidades de tiempo de cómputo por  $c^2$ . Ducrocq y Besbes (1993) han hallado un procedimiento que permite seguir utilizando la transformación canónica, con los consiguientes ahorros de memoria y cómputo, cuando hay individuos en los que faltan registros de algunos datos.

En la exposición anterior no se ha pretendido ser exhaustivo, y muchas más son las situaciones en las que el BLUP ha sido de utilidad, como la consideración de la dominancia y de la epistasia (Hoeschele y Van Raden, 1991, o en el análisis de cruzamientos de razas o líneas (Wei y van der Werf, 1994). Sin embargo hay un aspecto, no comentado, que vale la pena resaltar y es la elevada frecuencia en que las ecuaciones del modelo mixto aparecen en muy diversos contextos, frecuentistas o bayesianos, lineales y no lineales, asociadas a algoritmos de cálculo eficientes (Gianola, 2001)

### 3.2.5. El BLUP y la Mejora Genética Vegetal

Aunque la mayoría de las aplicaciones y desarrollos del BLUP se han realizado dentro del campo de la mejora genética animal, es cada vez más frecuente el sentir de que el BLUP podría ser de utilidad en diversos contextos de la mejora genética vegetal y aprovechar, de diversos modos, las

relaciones entre niveles de factores que podrían considerarse como aleatorios. En este sentido, por ejemplo, Flacheneker et al. (2006) iniciaron un programa en maíz de selección recurrente de familias de hermanos completos (FS), en el que se registra la genealogía de todas las familias FS a lo largo de los ciclos de selección. Consideran efectos aditivos, dominantes y epistáticos, y las relaciones dentro de ellos y pretenden investigar la utilidad de predecir, con la media aditiva BLUP de los padres, el valor de la descendencia, si bien no encuentran ventaja respecto al uso de la media de las familias FS parentales. En una situación muy diferente, Smith et al. (2006) muestran las ventajas del análisis con un modelo mixto en caracteres de calidad de trigo, que se miden en laboratorio tras una primera fase de ensayo de campo. Estos experimentos suelen tener una estructura muy desequilibrada e importantes fuentes de variación no genética con niveles correlacionados. Los autores muestran que en el caso en que exista tendencia en la fase de laboratorio (correlación entre efectos residuales en análisis sucesivos realizados el mismo día) el uso de replicaciones en dicha fase incrementa la ganancia genética realizada frente a los diseños sin replicación. Similarmente, en ensayos de campo la predicción BLUP de los efectos genotípicos o de interacción genotipo-medio mejoran al considerar modelos del campo con tendencias locales (semejanza entre los efectos residuales de parcelas en función de su situación). Actualmente se están utilizando rutinariamente modelos que consideran esta estructura de los efectos espaciales en los análisis de datos de evaluación de variedades de plantas (Smith et al., 2005).

En la Universidad de Bonn el Departamento de “Crop Science and Plant Breeding” tiene un proyecto titulado “Predicción de valores de mejora (BLUP) en plantas de cultivo”, cuyo objetivo es la aplicación del BLUP en la mejora genética vegetal. Esto, con el propósito de reducir el número de cruzamientos necesarios para desarrollar un nuevo cultivar, aumentando la eficacia de los programas y reduciendo su coste.

Recientemente, Piepho et al. (2007) han escrito un extenso trabajo en el que revisan las aplicaciones actuales del BLUP a la mejora genética vegetal y a la prueba de variedades. Hacen una amplia consideración de posibilidades de uso del BLUP, revisando primeramente las aplicaciones en que no se considera información genealógica, tanto en ensayos simples como en ensayos multi-ambiente en los que se considera alguna estructura de correlación espacial tal como hemos comentado anteriormente. Seguidamente discuten las aplicaciones que utilizan la matriz de parentesco **A**, haciendo especial énfasis en las hipótesis que debieran cumplirse para su utilización. En este apartado distinguen las aplicaciones en plantas autógamias y alógamas. En estas últimas comenta especialmente la predicción del valor de los híbridos resultantes del cruzamiento de líneas consanguíneas, modelando los efectos de la aptitud combinatorias general y específica. Dentro del apartado del uso de la matriz **A** se ocupa del BLUP multivariante, del diseño de experimental, de la interacción genotipo-medio y del mapeo de QTL's. El último apartado de la revisión de aplicaciones se refiere a aquéllas en que el BLUP se basa en la genealogía, pero no utiliza la matriz **A** de forma explícita. Esto es posible cuando la estructura genealógica es sencilla, de tal modo que puede tenerse en cuenta a través de la incorporación al modelo de efectos jerarquizados, como sería el caso de la predicción de valores genotípicos dentro de líneas, o efectos cruzados, como en el caso de cruzamientos dialélicos o factoriales. El trabajo termina con una extensa y completa discusión general, en la que se vuelve a insistir sobre la realidad de las hipótesis que deben cumplirse para el uso de la matriz **A**; se analiza el uso de la información molecular para inferir relaciones genéticas y se plantea la cuestión de la robustez del BLUP, cuando no se cumplen las hipótesis en que está basado.

### 3.3. LA APROXIMACION BAYESIANA

#### 3.3.1. Introducción

La escuela bayesiana fue fundada por Laplace por medio de varios trabajos publicados de 1774 a 1812, y durante el siglo XIX ocupó un papel preponderante en la inferencia científica (Stigler, 1986). Antes que Laplace, y sin que al parecer éste tuviera conocimiento, se había presentado en la Royal Society de Londres un trabajo póstumo atribuido a un oscuro clérigo, el reverendo Thomas Bayes (quien no publicó trabajos matemáticos en vida), formalizando el mismo principio de inferencia. Al parecer este principio había sido formulado anteriormente, y Stigler (1983) lo atribuye a Sandercock, un profesor de óptica ciego, autor de numerosos trabajos en diversos campos de la matemática. Los trabajos sobre verosimilitud de Fisher en los años 20 y los de la escuela frecuentista en los 30 y 40 hicieron casi desaparecer a la escuela bayesiana, hasta que comenzó un “revival” a mediados de los 50 que dura *in crescendo* hasta nuestros días. En genética cuantitativa el bayesianismo fue introducido en los años 80 por Daniel Gianola, primero en trabajos sobre caracteres umbral en colaboración con J.L. Foulley, y posteriormente en artículos en los que se desarrollan aplicaciones a prácticamente todos los campos de la mejora genética animal. Una de las principales razones por las que la escuela bayesiana ha estado prácticamente ausente de la inferencia científica durante muchos años es el que, como veremos, para obtener sus resultados precisa de la resolución de integrales múltiples no siempre sencillas y a menudo imposibles de resolver analíticamente. El desarrollo de los ordenadores ha permitido resolver fácilmente estas integrales mediante métodos numéricos basados en muestreos aleatorios y cadenas de Markov (Monte Carlo Markov Chains, MCMC), lo que ha permitido la reciente expansión de la estadística bayesiana a prácticamente todos los campos de la investigación biológica, y singularmente al de la mejora genética (ver Blasco, 2001, para una revisión sobre los métodos bayesianos en mejora genética). Las ventajas de la inferencia bayesiana fueron subrayadas por el propio Ronald Fisher:

“Bayes perceived the fundamental importance of this problem and framed an axiom, which, if its truth were granted, would suffice to bring this large class of inductive inferences within the domain of the theory probability; so that, after a sample had been observed, statements about the population could be made, uncertain inferences, indeed, but having the well-defined type of uncertainty characteristic of statements of probability”.

Ronald Fisher, 1936. *Uncertain inference*.

En este apartado expondremos los usos de la inferencia bayesiana para las comparaciones de medias y para las inferencias en el modelo mixto, aunque como puede suponer el lector, la inferencia bayesiana tiene aplicación en todos los aspectos de la mejora genética.

#### 3.3.2. Bases de la inferencia bayesiana

##### 3.3.2.1. La descripción de la incertidumbre acerca del valor de un parámetro

La forma esencial de trabajar de la escuela bayesiana consiste en, dados los datos observados en el experimento, describir toda la incertidumbre que puede existir en torno a un parámetro mediante la probabilidad de que el parámetro tome determinados valores. Por ejemplo, en el caso de la heredabilidad se obtendría la función de densidad de probabilidad  $f(h^2|\mathbf{y})$  siendo  $\mathbf{y}$  el vector de valores observados. Una vez obtenida esa distribución se pueden hacer inferencias de múltiples maneras: por ejemplo, se puede desear averiguar entre qué valores se encuentra  $h^2$  con una

probabilidad del 95%, o cuál es el valor que como mínimo tomaría  $h^2$  con una probabilidad determinada. En los casos en los que es necesaria una estimación puntual de  $h^2$ , por ejemplo para un índice de selección, hay varios parámetros de la función de densidad  $f(h^2|y)$  que pueden ser usados como estimación puntual, y cuyo uso depende de la preferencia del investigador. Por ejemplo, la *moda*, que es el valor más probable de  $h^2$  dada la muestra  $y$ ; la *mediana*, cuyo valor hace tan probable que el valor verdadero sea superior como inferior a esta estima y minimiza el riesgo de estimación cuando la función de pérdidas es  $|h^2 - \hat{h}^2|$ ; o la *media*, que es el estimador que minimiza el riesgo mínimo cuadrático  $E(h^2 - \hat{h}^2)^2$ .

### 3.3.2.2. Teorema de Bayes e inferencia bayesiana

Para poder hacer todas estas inferencias es menester disponer de la función de densidad de probabilidad  $f(h^2|y)$ . De acuerdo con las leyes de la probabilidad, la probabilidad  $P(A,B)$  de que se presenten dos sucesos simultáneamente es

$$P(A,B) = P(A|B) \cdot P(B) = P(B|A) \cdot P(A)$$

con lo que

$$P(A|B) = P(B|A) \cdot P(A) / P(B)$$

Que es el *Teorema de Bayes*. En nuestro caso, aplicando el Teorema de Bayes a las funciones de densidad<sup>1</sup>, tenemos

$$f(h^2|y) = f(y|h^2) f(h^2) / f(y) = cte \cdot f(y|h^2) f(h^2)$$

donde  $f$  significa "función de densidad" (ver Apéndice I). Obsérvese que  $f(h^2|y)$  es una función de  $h^2$ , pero no de  $y$ , que está fijada; por tanto  $f(y)$  es una constante, ya que no depende de  $h^2$  e  $y$  está fijado, lo que nos permite trabajar proporcionalmente a  $f(y|h^2)$  y a  $f(h^2)$ . Aquí  $f(h^2)$  es la densidad de probabilidad de  $h^2$  que no depende de los datos, y se interpreta como la función de densidad que recoge la información de densidad antes de iniciar el experimento; esto es, la llamada información "*a priori*"<sup>2</sup>.

### 3.3.2.3. El problema de la información "a priori"

Las críticas más frecuentes al bayesianismo tienen que ver con esta última función de densidad de probabilidad *a priori* porque no depende de los datos, es previa al experimento. En ocasiones esta información está claramente determinada; por ejemplo, la probabilidad *a priori* de obtener un individuo recesivo en el cruce de dos heterocigotos es 1/4, y la matriz de parentesco que utiliza el modelo mixto es claramente información *a priori*, pero en nuestro ejemplo de la heredabilidad no está claro qué se quiere decir con esta probabilidad previa. En muchas ocasiones es difícil cuantificar la información *a priori* de una forma precisa. En esos casos los estadísticos no bayesianos consideran que no es posible aplicar el teorema de Bayes y el problema no tiene solución

<sup>1</sup> Una función de densidad no es una probabilidad, pero se le puede aplicar el Teorema de Bayes, ver Apéndice I

<sup>2</sup> El nombre tiende a confundir. Esta información *a priori* proviene de experimentos previos o de otro tipo de conocimiento experimental anterior, no tiene nada que ver con el "*a priori*" kantiano.

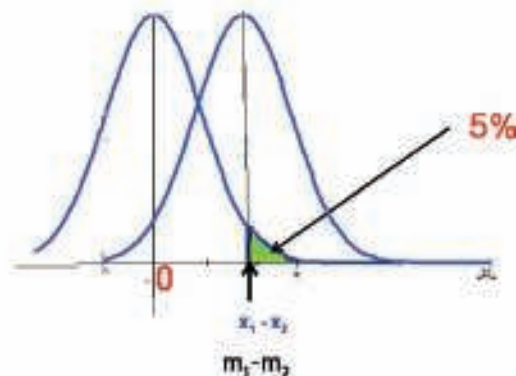
por la vía de las probabilidades. Dentro del campo bayesiano se ha intentado dar respuesta a esta dificultad de varias formas, bien definiendo la probabilidad como un estado de creencias del investigador, quien define  $f(h^2)$  según su opinión y los experimentos realizados previamente o consultados en la literatura, o bien eliminando en la práctica la influencia de la probabilidad a priori a base de aumentar el tamaño muestral. Si se dispusiera de suficientes datos, la probabilidad *a priori* no influiría en la distribución de la densidad posterior de probabilidades, por tanto se deben hacer experimentos con un número de datos suficiente como para que la función *a priori* carezca de relevancia. En ese caso la función de densidad de probabilidades *a priori* se busca de forma relativamente arbitraria (se procura que coincida en lo posible con una opinión defendible; p. ej., que no sea muy probable que la heredabilidad tenga un valor de 0.95), y habitualmente se procura que facilite los cálculos de la función posterior y que no conduzca a paradojas o a resultados inadmisibles. Es frecuente en ese caso probar varias funciones *a priori* diferentes para comprobar que el resultado final apenas se altera. Cuando no hay información a priori, o cuando se desea actuar como si no la hubiera, es imposible realizar inferencias, puesto que la probabilidad *a priori* es necesaria para poder aplicar el teorema de Bayes, y cualquier forma que tenga esa probabilidad es de alguna manera informativa. Se ha sugerido suponer que cuando no hay información sobre los distintos sucesos posibles, hay que asignarles a todos la misma probabilidad *a priori*. En el caso de variables continuas esto implica representarlas como una recta paralela al eje de las X en un intervalo concreto, por ejemplo al intervalo [0,1] para el caso de la heredabilidad, por lo que se les conoce también como *a prioris planos* o *no informativos*, siendo este último nombre inapropiado, puesto que sí que son informativos (no es lo mismo decir que se ignora la probabilidad de los distintos sucesos que decir que todos tienen la misma probabilidad). Estos *a prioris planos* son frecuentes en la literatura como funciones de referencia. Una exposición sucinta de otras soluciones más complejas puede encontrarse en Blasco (2001).

#### 3.3.2.4. Ventajas de la inferencia bayesiana

Las ventajas de la inferencia bayesiana derivan del hecho de trabajar con probabilidades. Este hecho no es necesariamente percibido a primera vista por quienes llevan mucho tiempo trabajando en estadística clásica, pero es un hecho fundamental, como indica la cita de Fisher al principio del apartado 3.3. Por ejemplo, el P-valor es interpretado a menudo como una probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta, y el intervalo de confianza al 95% parece indicar que la probabilidad de encontrar al verdadero valor en él sea del 95%; sin embargo ambas afirmaciones carecen de sentido. Imaginemos que un experimento da un P-valor del 5%, e imaginemos que el verdadero valor coincide con el de nuestra muestra. Si fuera así, en sucesivas repeticiones del experimento las muestras se distribuirían en torno al verdadero valor (Figura 3.1), lo que implica que en la mitad de los casos nos saldría un resultado “no significativo”. No es esta la impresión que da un P-valor del 5%, y argumentos similares se pueden usar para otros P-valores.

En el caso del intervalo de confianza, en cada repetición del experimento encontramos un intervalo distinto, de los que el 95% contiene al verdadero valor. Como sólo tenemos una muestra y un intervalo, *nos comportamos como si* el nuestro fuera de los que sí contienen al verdadero valor, esperando no equivocarnos mucho a la larga. Esto implica también que *no es más probable que el verdadero valor esté por el centro del intervalo que por los extremos*, como la engañosa intuición indica. El problema en ambos casos es que estamos trabajando con las probabilidades de la muestra, y no es ese precisamente nuestro interés; a nosotros nos interesa conocer las probabilidades de los parámetros que desconocemos. Si comparamos dos tratamientos no nos interesa saber cuál es la probabilidad de encontrar la muestra que hemos encontrado, sino cuál es la probabilidad de que ambos tratamientos difieran.





**Figura 3.1.** Distribución de las medias muestrales de diferencias entre tratamientos cuando el verdadero valor coincide con el de la muestra tomada. En ese caso, si se repitiera el experimento, la mitad de las veces se obtendrían diferencias “no significativas”

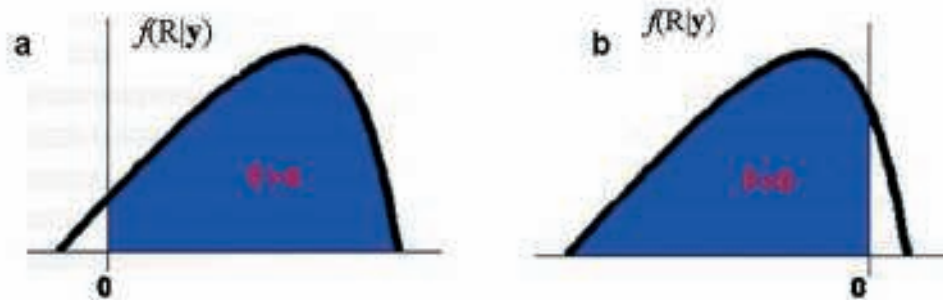
Las ventajas esenciales de trabajar con probabilidades son tres:

- Se expresa la incertidumbre de los parámetros desconocidos, no la incertidumbre sobre las muestras. Al trabajar con probabilidades se pueden establecer un gran número de intervalos de confianza (los bayesianos prefieren llamarlos “intervalos de credibilidad”) según la pregunta a la que se quiera dar respuesta.
- Se puede marginalizar los parámetros que no son de interés, y
- Se puede trabajar con modelos jerarquizados.

Estas ventajas las discutiremos a continuación

### 3.3.3. Incertidumbre sobre parámetros desconocidos

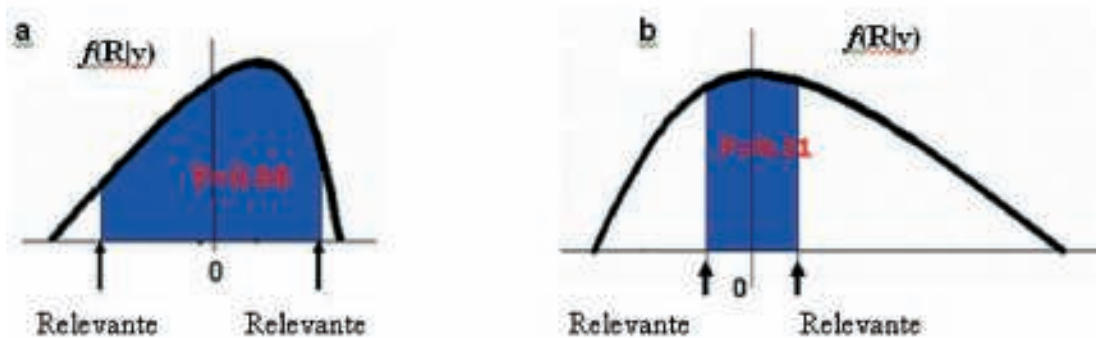
Supongamos que queremos estimar la respuesta a la selección comparando una población seleccionada S y una población control C. La respuesta será  $R = m_S - m_C$  donde  $m_S$  y  $m_C$  son los valores de las medias de las poblaciones respectivas. Para ello tomamos datos de la población seleccionada y datos de la población control, que agrupamos en un vector  $y' = [y_{S1}, y_{S2}, \dots, y_{C1}, y_{C2}, \dots]$ . El resultado de la inferencia bayesiana será una función de densidad de probabilidad  $f(R|y)$  que expresará la incertidumbre sobre la respuesta R, dada la muestra y. Esta función puede ser muy dispersa o estar muy concentrada dependiendo de la variabilidad del carácter y del tamaño de la muestra. Muestras grandes producen menos incertidumbre y por tanto funciones más agrupadas en torno a sus medias. Con esta función podemos hacer varias inferencias. La primera, averiguar la probabilidad de que la respuesta sea mayor o menor que cero (la selección puede ir a favor o en contra del carácter), como en la Figura 3.2.



**Figura 3.2.** a. Intervalo  $[0, +\infty)$  que indica la probabilidad de que la respuesta sea mayor o igual a cero. b. Intervalo  $(-\infty, 0]$  que indica la probabilidad de que la respuesta sea menor o igual a cero.

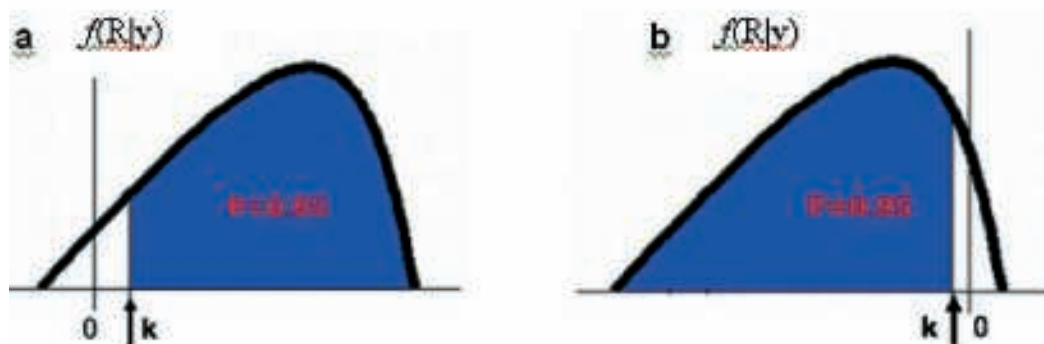
Obsérvese que el resultado de esta inferencia puede ser que la probabilidad de encontrar una respuesta positiva es del 93%. Esto no quiere decir que la diferencia entre la población seleccionada y la control no sea “significativa”; en el contexto bayesiano no hay “significación” porque no se asumen zonas de aceptación o de rechazo de hipótesis previas al experimento; aquí el 93% es la probabilidad exacta de que esa diferencia sea positiva (o negativa, en el caso b).

Otra inferencia posible es determinar con qué probabilidad la respuesta es distinta de cero. En variables continuas “distinto de cero” significa mayor o menor que una cierta cantidad que se considera *relevante* a efectos económicos o biológicos, puesto que las medias de la población control y la seleccionada nunca van a ser *exactamente* iguales. En la Figura 3.3 se muestra un ejemplo de este tipo de inferencias. En la Figura 3.3a se observa que se puede afirmar con una probabilidad del 96% que la respuesta no ha sido distinta de una cierta cantidad relevante (no ha sido “distinta de cero”), mientras que la Figura 3.3b muestra que no hay datos suficientes como para llegar a una conclusión. Esto es interesante, porque permite distinguir cuándo no aparecen diferencias entre las poblaciones y cuándo simplemente no se dispone de datos suficientes como para afirmar que hay diferencias. Recuérdese que en estadística clásica, un simple “no hay diferencias significativas” no permite precisar si en efecto no las hay o bien no disponemos de datos suficientes como para afirmarlo.



**Figura 3.3.** Probabilidad de similitud entre las poblaciones seleccionada y control. a. Las poblaciones son similares. b. No tenemos datos suficientes como para precisar si son similares, si la seleccionada es mayor que la control o lo contrario.

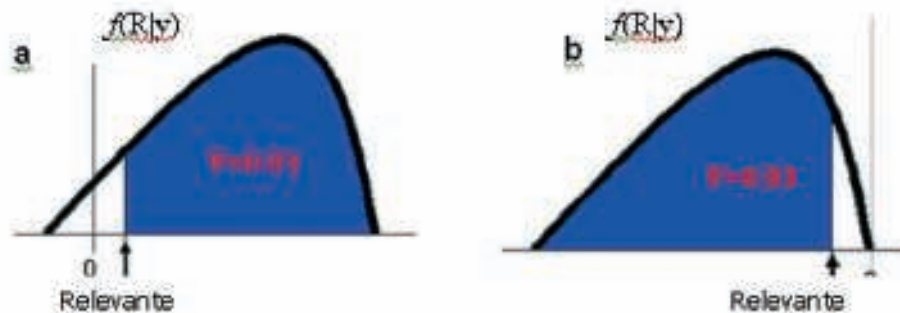
Otra inferencia interesante es conocer el mínimo valor de un parámetro con una probabilidad determinada. Frecuentemente se afirma, por ejemplo, que la heredabilidad de un carácter es relevante, de 0.20, cuando su intervalo de confianza puede ir de 0.01 a 0.39, con lo que en realidad podría ser irrelevante. Lo mismo ocurre con las diferencias entre dos variedades o respecto al efecto de un QTL, no basta con que haya diferencias significativas ni con que estas sean relevantes, es necesario además que el intervalo de confianza no incluya valores irrelevantes, porque no tenemos garantía de que el verdadero valor no pueda estar cercano a esos valores irrelevantes. Una inferencia interesante puede ser, pues, conocer el valor que *al menos* puede tener un parámetro (o una diferencia de medias, o el efecto de un QTL) con una probabilidad determinada. En la Figura 3.4 se representa el valor mínimo  $k$  que debe tener la respuesta a la selección (o máximo, si la selección es contra el carácter) con una probabilidad del 95%.



**Figura 3.4.** a. Intervalo  $[k, +\infty)$  indicando que la respuesta tiene un valor  $k$  o superior con una probabilidad del 95%. b. Intervalo  $(-\infty, k]$  indicando que la respuesta tiene un valor  $k$  o inferior con una probabilidad del 95%.

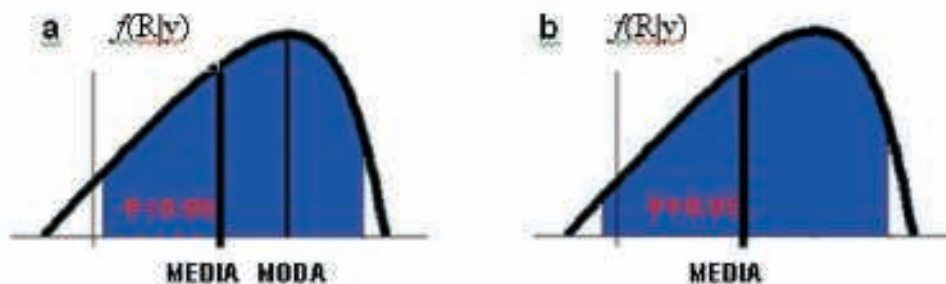
También puede ser interesante conocer la probabilidad de que un parámetro tome un valor relevante; por ejemplo, si se tiene que tomar la decisión de seleccionar o no un carácter, puede ser importante saber la probabilidad de que la heredabilidad sea superior a un valor por debajo del cual se toma la decisión de no seleccionar (por ejemplo, si la heredabilidad es inferior a 0.05, no se selecciona). Lo mismo se puede aplicar a comparación de variedades o en general a cualquier resultado experimental: es importante conocer la probabilidad de obtener resultados relevantes. En la Figura 3.5 se muestra la probabilidad de que la respuesta a la selección sea o no relevante.

Si hay que dar una estimación puntual del parámetro desconocido, se puede dar la media, la mediana o la moda, pero la incertidumbre puede ser la misma para los tres parámetros; en lugar de dar intervalos simétricos en torno al valor estimado, se puede dar el intervalo más corto (el más preciso, por tanto) con una probabilidad determinada, por ejemplo del 95%.



**Figura 3.5.** a. Intervalo desde una cantidad relevante hasta  $+\infty$ , mostrando la probabilidad de que la respuesta sea relevante. b. Intervalo desde  $-\infty$  hasta una cantidad relevante, mostrando la probabilidad de que la respuesta sea relevante.

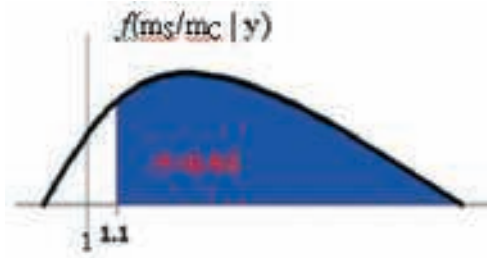
Estos intervalos son particularmente razonables cuando la función de densidad de probabilidad es asimétrica; por ejemplo en el caso de correlaciones próximas a  $+1$  ó a  $-1$ , en las que intervalos como “ $0.9 \pm 0.2$ ” carecen de sentido. En la Figura 3.6a se muestran dos estimaciones puntuales de la respuesta (media y moda), ambas con el mismo intervalo de credibilidad con el 95% de probabilidad, que no es simétrico ni alrededor de la media ni de la moda. En la Figura 3.6b se observa el intervalo de credibilidad con el 95% de probabilidad simétrico en torno a la media; obsérvese que el intervalo es más grande, y por lo tanto da una estimación menos precisa.



**Figura 3.6.** a. Intervalo de probabilidad más corto con el 95% de probabilidad. b. Intervalo de probabilidad simétrico en torno a la media, con el 95% de probabilidad.

Finalmente, puede interesarnos comparar la población seleccionada y control mediante un cociente y no necesariamente mediante una diferencia. Esto es útil, por ejemplo, cuando no es fácil determinar una cantidad relevante y deseamos saber cuál es la probabilidad de que una variedad supere a otra en un porcentaje determinado. Si aplicamos la estadística clásica, obtener un cociente no es un problema, pero sí lo es obtener la precisión del cociente, porque el error típico del cociente no es el cociente de los errores típicos<sup>3</sup>. El resultado bayesiano es una función de densidad de probabilidad del cociente, que permite realizar las inferencias anteriores. En la Figura 3.7 se muestra la probabilidad de que el cociente entre las medias de las poblaciones seleccionada y control supere 1.1; esto es, la probabilidad de que la población seleccionada sea un 10% mayor que la control.

<sup>3</sup> Pueden aplicarse métodos aproximados basados en desarrollos de series de Taylor de los cocientes, pero estos desarrollos no son siempre precisos, como ha indicado, por ejemplo, Visscher P.M. (1998).



**Figura 3.7.** Probabilidad de que la media de la población seleccionada S sea un 10% mayor que la media de la población control C.

Para obtener estas probabilidades, así como para la marginalización que veremos a continuación, hay que resolver integrales múltiples que supusieron el principal impedimento para la aplicación de la estadística bayesiana. Hoy en día estas integrales se resuelven mediante métodos numéricos basados en muestreos aleatorios y cadenas de Markov (Monte Carlo Markov Chains, MCMC), lo que ha permitido la reciente expansión de la estadística bayesiana a prácticamente todos los campos de la investigación biológica, y singularmente al de la mejora genética.

### 3.3.4. Marginalización

#### 3.3.4.1. Marginalización y modelos jerarquizados

Una de las principales ventajas del bayesianismo es la marginalización. En estadística clásica estimamos primero las componentes de varianza de uno o más caracteres y luego las empleamos en los índices o en el BLUP tomando estos valores como verdaderos<sup>4</sup>, sin tener en cuenta su error de estimación, con lo que los errores de estimación de los valores genéticos están *siempre infraestimados*. Si estimamos curvas de crecimiento, debemos estimar primero los parámetros de la curva para cada individuo y tomarlos como verdaderos para estimar los parámetros genéticos, que a su vez se tomarán como verdaderos para estimar los valores genéticos de los individuos. Para estos modelos, llamados jerarquizados, no hay solución desde el punto de vista de la estadística clásica, ni siquiera de forma aproximada<sup>5</sup>. En el mundo de la estadística bayesiana podemos tener en cuenta esos errores de estimación. Esto es posible porque la inferencia bayesiana se basa en probabilidades. Las inferencias son hechas sobre funciones de densidad de probabilidad *marginales*, en las que se ha multiplicado cada posible valor de los parámetros que no son de interés por su respectiva probabilidad, y se han sumado haciéndolos desaparecer. Por ejemplo, supongamos que estimamos la respuesta a la selección con un modelo estadístico simple que sólo tiene el efecto de grupo S (seleccionado) y C (control). Debemos estimar la diferencia entre las medias de ambos, S - C, y la varianza del error  $\sigma^2$ . Supongamos (es un ejemplo artificial) que la varianza del error sólo puede tomar dos valores,  $\sigma^2 = 0.5$  y  $\sigma^2 = 1$ . La distribución marginal posterior de la respuesta será la suma de  $f(S-C \text{ dados los datos y dado que } \sigma^2 = 0.5)$  y  $f(S-C \text{ dados los datos y dado que } \sigma^2 = 1)$  multiplicado por las probabilidades de que efectivamente  $\sigma^2$  tome esos valores; esto es,

$$f(S-C | \mathbf{y}) = f(S-C | \mathbf{y}, \sigma^2 = 0.5) P(\sigma^2 = 0.5) + f(S-C | \mathbf{y}, \sigma^2 = 1) P(\sigma^2 = 1)$$

<sup>4</sup> Dado que la estima BLUP es insesgada y de varianza mínima sólo si los valores de las componentes de varianza son los verdaderos, podemos asegurar que no hay nadie que haya obtenido realmente estimas BLUP salvo por casualidad.

<sup>5</sup> Pueden hacerse análisis de robustez de las estimas, pero estos análisis son inviábiles en cuanto aumenta un poco el número de parámetros por la enorme cantidad de posibilidades que se generan.

$$f(S-C | \mathbf{y}) = \int_0^{\infty} f(S-C, \sigma^2 | \mathbf{y}) d\sigma^2 = \int_0^{\infty} f(S-C | \mathbf{y}, \sigma^2) (\sigma^2) d\sigma^2$$

En la práctica,  $\sigma^2$  puede tomar todos los valores posibles de 0 a  $\infty$ , por lo que sumar es calcular la integral de  $f(S-C | \mathbf{y}, \sigma^2)$  para todos los valores de  $\sigma^2$ .

Por tanto, tomamos todos los posibles valores de los parámetros desconocidos (en este caso  $\sigma^2$ ), multiplicamos por su probabilidad<sup>6</sup>  $f(\sigma^2)d\sigma^2$  y sumamos. Esto conduce a que concentramos nuestros esfuerzos de estimación en el parámetro de interés únicamente; hemos transformado un problema multivariante en uno univariante. Por otra parte, hemos tenido en cuenta los errores de estimación del parámetro o parámetros desconocidos cuando estimamos el parámetro de interés.

### 3.3.4.2. Inferencias sobre el Modelo mixto

Tomemos ahora el modelo Mixto, expuesto anteriormente. La forma bayesiana de abordar el problema consiste en estimar las funciones de densidad de probabilidad posterior de todos los parámetros desconocidos de interés, por ejemplo de los valores genéticos  $f(u_1 | \mathbf{y})$ ,  $f(u_2 | \mathbf{y})$ , ..., de las componentes de varianza  $f(\sigma_u^2 | \mathbf{y})$  y  $f(\sigma_e^2 | \mathbf{y})$ , o también de combinaciones como la respuesta a la selección o la heredabilidad  $f(h^2 | \mathbf{y})$ . Estas funciones se estiman a partir de la función de densidad de probabilidad conjunta  $f(\mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2 | \mathbf{y})$  integrando las partes que no interesan; por definición de función de densidad de probabilidad, tenemos que

$$f(\sigma_u^2 | \mathbf{y}) = \int \dots \int f(\mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2 | \mathbf{y}) d\mathbf{b} d\mathbf{u} d\sigma_e^2$$

donde, por el teorema de Bayes,

$$f(\mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2 | \mathbf{y}) = f(\mathbf{y} | \mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2) f(\mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2) / f(\mathbf{y})$$

En principio conocemos  $f(\mathbf{y} | \mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2)$ , puesto que los datos se distribuyen de forma Normal, dados los valores de  $\mathbf{b}$ ,  $\mathbf{u}$ ,  $\sigma_u^2$ ,  $\sigma_e^2$ .

El primer problema aparece al considerar las densidades de probabilidad *a priori*  $f(\mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2)$ . Es frecuente considerar que estos parámetros son independientes

$$f(\mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2) = f(\mathbf{b}) \cdot f(\mathbf{u}) \cdot f(\sigma_u^2) \cdot f(\sigma_e^2)$$

y considerar  $f(\mathbf{b}) = \text{constante}$ , y a menudo también  $f(\sigma_u^2) = \text{constante}$ ,  $f(\sigma_e^2) = \text{constante}$ .

En cuanto a  $f(\mathbf{u})$  se le considera distribuida de forma Normal con media cero y varianza  $\mathbf{A} \sigma_u^2$  como ya vimos al exponer el modelo mixto. Finalmente,  $f(\mathbf{y})$  es la probabilidad de la muestra, una constante de proporcionalidad.

<sup>6</sup> Ver apéndice 1

### 3.3.4.3. Relación entre el BLUP y los estimadores bayesianos

El BLUP puede considerarse un caso particular de la inferencia bayesiana sobre el modelo mixto. Supongamos que en lugar de marginalizar las componentes de varianza les damos un valor supuestamente conocido a través de otros experimentos propios o bien extraídos de la bibliografía existente. La función de densidad posterior será

$$f(\mathbf{b}, \mathbf{u} \mid \sigma_u^2, \sigma_e^2, \mathbf{y}) = f(\mathbf{y} \mid \mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2) f(\mathbf{b}, \mathbf{u} \mid \sigma_u^2, \sigma_e^2) / f(\mathbf{y})$$

si consideramos, como antes, que la distribución a priori de los efectos ambientales  $\mathbf{b}$  es constante y que los efectos genéticos  $\mathbf{u}$  se distribuyen de forma Normal con media cero y varianza  $\mathbf{A} \sigma_u^2$ , entonces tenemos que

$$f(\mathbf{b}, \mathbf{u} \mid \sigma_u^2, \sigma_e^2, \mathbf{y}) = \text{cte} \cdot f(\mathbf{y} \mid \mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2) f(\mathbf{u} \mid \sigma_u^2, \sigma_e^2)$$

Ambas funciones de densidad son Normales y conocidas. Si se derivan respecto a  $\mathbf{b}$  y a  $\mathbf{u}$  para hallar el valor máximo (correspondiente a la vez a la moda, media, y mediana, ya que la función normal es simétrica), se obtienen inmediatamente las ecuaciones del modelo mixto. El BLUP no es sino la media (o la moda o la mediana) de la función posterior conjunta, sin marginalizar, de los valores ambientales  $\mathbf{b}$  y genéticos  $\mathbf{u}$  del modelo mixto, condicionado a los valores dados de las componentes de varianza  $\sigma_u^2, \sigma_e^2$ , y usando un valor constante *a priori* para los valores ambientales.

No es el mejor estimador bayesiano posible, puesto que por un lado no saca ventajas de la marginalización y por otro está condicionado a componentes de varianza que se suponen conocidas, pero está justificado utilizarlo si tenemos tan pocos datos que es preferible usar estimas de las componentes de varianza provenientes de la bibliografía en lugar de estimarlas con nuestros propios datos.

### 3.3.5. MCMC

Hemos visto que la inferencia bayesiana se lleva a cabo marginalizando la función de densidad posterior conjunta y obteniendo intervalos de probabilidad. Ambas operaciones dan lugar a integrales; el siguiente problema es resolver las integrales. Hasta hace pocos años este era uno de los puntos débiles más notorios de la aproximación bayesiana: era teóricamente posible, pero prácticamente no era factible resolver estas integrales. La aparición de técnicas de muestreo aleatorio en Cadenas de Markov (lo que se conoce como MCMC: Monte Carlo Markov Chains) permitió aproximar estas integrales, de forma que hoy en día es factible extraer muestras aleatorias de esas funciones de densidad. Mediante estas técnicas se puede obtener una matriz

$$\begin{bmatrix} \mathbf{b}_{11} & \mathbf{b}_{21} & \dots & \mathbf{u}_{11} & \mathbf{u}_{21} & \dots & \sigma_{u1}^2 & \sigma_{e1}^2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \mathbf{b}_{1i} & \mathbf{b}_{2i} & \dots & \mathbf{u}_{1i} & \mathbf{u}_{2i} & \dots & \sigma_u^2 & \sigma_e^2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \end{bmatrix}$$



cuyas filas son puntos extraídos aleatoriamente de la función multivariante  $f(\mathbf{b}, \mathbf{u}, \sigma_u^2, \sigma_e^2 | \mathbf{y})$ . Por tanto, la columna  $(b_{11}, \dots, b_{1i}, \dots)$  es un conjunto de puntos de  $f(b_1 | \mathbf{y})$ , y lo mismo se puede decir de las otras columnas; así, la columna  $(\sigma_{u1}^2, \dots, \sigma_{ui}^2, \dots)$  es una muestra de la función de densidad de probabilidad  $f(\sigma_u^2 | \mathbf{y})$ , y puede ser usada para hacer inferencias sobre  $\sigma_u^2$ .

Para hacer inferencias sobre la heredabilidad, creamos una nueva columna a partir de los valores de  $\sigma_u^2$  y  $\sigma_e^2$  que hay en cada fila.

El conjunto de puntos

$$\left[ \sigma_{u1}^2 / (\sigma_{u1}^2 + \sigma_{e1}^2), \dots, \sigma_{ui}^2 / (\sigma_{ui}^2 + \sigma_{ei}^2), \dots \right]$$

es una muestra aleatoria de la función de densidad de probabilidad  $f(h^2 | \mathbf{y})$ . Como el número de puntos que muestreamos aleatoriamente es arbitrario, se pueden obtener histogramas muy precisos de las funciones de densidad de probabilidad que queremos estimar. Blasco (2001) ofrece una interpretación intuitiva de las cadenas de Markov que se usan para realizar estos muestreos.

Las inferencias se hacen a partir de los puntos muestreados de la densidad posterior multivariante. Por ejemplo, supongamos que hemos muestreado 5.000 puntos de una densidad posterior conjunta y dispongo, pues, de 5.000 puntos de la función de densidad de probabilidad de la heredabilidad. Hallando la media de valores de heredabilidad obtenidos, tengo una estima de la media de la densidad posterior; creando un histograma o dibujando la función de densidad a partir de esos 5.000 valores puedo obtener una estima de la moda, y ordenándolos puedo obtener la mediana con facilidad.

Si quiero averiguar el valor mínimo de la heredabilidad con una probabilidad del 95%, (como en la Figura 3.4), ordeno las muestras de mayor a menor, tomo el 95% de ellas y veo cuál es la menor de todas; ese es el valor mínimo de la heredabilidad con el 95% de probabilidad. Si quiero saber la probabilidad de que la respuesta sea positiva, voy a la matriz anterior y tomo fila a fila la media de los valores genéticos de los individuos en la última generación. Así genero una nueva columna con números positivos y negativos. El porcentaje de números positivos es la probabilidad de que la respuesta sea mayor que cero.

## REFERENCIAS

- Bernardo, R. (2002). *Breeding for quantitative traits in plants*. Stemma Press. Woodbury, Minn., USA.
- Blasco, A. (2001). The Bayesian controversy in Animal Breeding. *J. Anim. Sci.* 79: 2023-2046.
- Ducrocq, V. and Besbes, B. (1993). Solutions of multiple trait animal models with missing data on some traits. *J. Anim. Breed. Gen.* 110:81-89.
- Fisher, R. (1936). Uncertain inference. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 71:245-258.
- Flacheneker, C., Frisch, M., Muminovic, J., Falke, K.C. and Melchinger, A.E. (2006). Modified full-sib selection and best linear unbiased prediction of progeny performance in a European F<sub>2</sub> maize population. *Plant Breed.* 125:248-253.



Gianola, D. (2001). Inferences about breeding values. pp 645-672, in Balding D.J. and Bishop M., Cannings C. (Ed.) *Handbook of Statistical Genetics*. Wiley and Sons. Chichester, UK.

Gianola, D. and Fernando, R.L. (1986). Bayesian methods in animal breeding theory. *J. Anim. Sci.* 63:217-244.

Henderson, C.R. (1950). Estimation of genetic parameters. *Ann. Math. Stat.* 21:309-310.

Henderson, C.R. (1976). A simple method for computing the inverse of a numerator relationship matrix used in predicting of breeding values. *Biometrics* 32:69-83.

Henderson, C.R. (1975). Best linear unbiased prediction under a selection model. *Biometrics* 31:423-447

Henderson, C.R. (1984). *Application of linear models in Animal Breeding*. University of Guelph Press, Guelph, Canada.

Hoeschele, I. and Van Raden P.M. (1991). Rapid inverse of dominance relationship matrices for noninbred populations by including sire by dam subclass effects. *J. Dairy Sci.* 74:557-569

James, W. and Stein, C. (1961). Estimation with quadratic losses. pp. 361-379, In *Proceedings of the Fourth Berkeley Symposium Math, Statist. Probab.* University of California Press, Berkeley, Cal., USA.

Mrode, R.A. (1996). *Linear models for the prediction of animal breeding values*. CAB International.

Patterson, H.D. and Thompson, R. (1971). Recovery of interblock information when block sizes are unequal. *Biometrika* 58:645-554.

Piepho, H.P., Möhring, J., Melchinger, A.E. and Büchse, A. (2008). BLUP for phenotypic selection in plant breeding and variety testing. *Euphytica* 161: 209-228

Quaas, R.L. (1976). Computing the diagonal elements of a large numerator relationship matrix. *Biometrics* 32:949-953.

Smith, A.B., Cullis, B.R. and Thompson, R. (2005). The analysis of crop cultivar breeding and evaluation trials: an overview of current mixed models approaches. *J. Agr. Sci.* 143:449-462.

Smith, A.B., Lim, P. and Cullis, B.R. (2006). The design and analysis of multi-phase plant breeding experiments. *J. Agr. Sci.* 44:393-409.

Stigler, S.M. (1983). Who discovered Bayes Theorem? *Am. Stat.* 37: 290-296.

Stigler, S.M. (1986). *The History of Statistics: The measurement of uncertainty before 1900*. Harvard University Press. Cambridge, Mass., USA

Thompson, R. (1973). The estimation of variance and covariance components with an application when records are subject to culling. *Biometrics* 29:527-550.

Thompson, R. (1997). Estimation of quantitative genetic parameters. pp 639-657. In *Proceedings of the International Conference on Quantitative Genetics*, Iowa State University Press. USA.

Visscher, P.M. (1998). On the Sampling Variance of Intraclass Correlations and Genetic Correlations. *Genetics* 149: 1605–1614.

Wei, M. and van der Werf, J. (1994). Maximizing genetic response in crossbreds using both purebred and crossbred information. *Anim. Prod.* 59:401-413.

Westell, R.A., Quaas, R.L. and Van Vleck, L.D. (1988). Genetic groups in an animal model. *J. Dairy Sci.* 71:1310-1318

### PARA SEGUIR LEYENDO

Bernardo, R. (2002). *Breeding for quantitative traits in plants*. Stemma Press. Woodbury, Minn., USA.

Blasco, A. (2001). The Bayesian controversy in Animal Breeding. *J. Anim. Sci.* 79: 2023-2046.

Gelman, A., Carlin J.B., Stern, H.S. and Rubin, D.B. (2003). *Bayesian Data Analysis*. (2<sup>nd</sup> ed.). Chapman and Hall.

Mrode, R.A. (1996). *Linear models for the prediction of animal breeding values*. CAB International. Wallingford, UK.

Piepho, H.P., Möhring, J., Melchinger, A.E. and Büchse, A. (2008). BLUP for phenotypic selection in plant breeding and variety testing. *Euphytica* 161: 209-228

Press, S.J. (2002). *Subjective and Objective Bayesian Statistics: Principles, Models, and Applications*. Wiley. Hoboken, NJ., USA.

Robert, C. and Casella, G. (2004). *Monte Carlo Statistical Methods* (2<sup>nd</sup> ed.). Springer-Verlag.

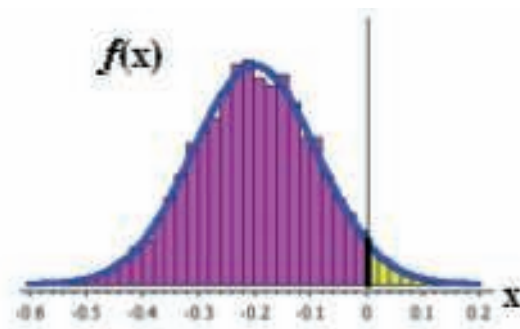
Sorensen, D.A. and Pianola, D. (2002). *Likelihood, Bayesian and MCMC methods in quantitative genetics*. Springer.

## APÉNDICE I. FUNCIONES DE DENSIDAD

Una función de densidad no es una probabilidad. La probabilidad de que la heredabilidad de un carácter se encuentre entre los valores  $a$  y  $b$  es

$$P(a \leq h^2 \leq b) = \int_a^b f(h^2) dh^2$$

Sin embargo, muchos de los teoremas de la probabilidad, como el Teorema de Bayes, son aplicables a funciones de densidad, porque aunque  $f(x)$  no es una probabilidad,  $f(x) \cdot \Delta x$  es aproximadamente una probabilidad cuando  $\Delta x$  es pequeño (ver Figura 3.8).



**Figura 3.8.** Áreas de probabilidad de  $f(x)$ ; por ejemplo, el área que corresponde a  $x > 0$  es el 6% del área total y representa por tanto una probabilidad del 6%. Los pequeños rectángulos de área  $f(x) \cdot \Delta x$  son probabilidades aproximadamente.



CAPÍTULO **4**

---

**MÉTODOS CUANTITATIVOS  
CONVENCIONALES Y  
TÉCNICAS MOLECULARES  
PARA LA SELECCIÓN DE  
CARACTERES COMPLEJOS**

*Jesús Moreno-González*



## MÉTODOS CUANTITATIVOS CONVENCIONALES Y TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA SELECCIÓN DE CARACTERES COMPLEJOS

---

Jesús Moreno-González

**Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo**  
**Apartado 10, 15080 A Coruña, Spain,**  
**e-mail:jesus.moreno.gonzalez@xunta.es**

---

### 4.1. COMPLEJIDAD DE LOS CARACTERES POLIGÉNICOS

La teoría de la Genética Cuantitativa ha sido desarrollada por numerosos autores desde el principio del siglo XX hasta la actualidad con un objetivo primordial: explicar el comportamiento, la variabilidad, la herencia y la arquitectura genética que subyace en los caracteres poligénicos, cuantitativos o complejos, que con frecuencia se muestran en la mayoría de los organismos vivos (Fisher 1918; Wright 1921; Haldane 1924; Comstock et al 1949; Henderson 1950, 1963; Kempthorne 1968; Crow y Kimura 1970; Falconer 1981; Dudley 1982, 1984, 2007, 2008; Lande y Thompson 1990; Bernardo 1996; Schön et al. 2004). Los caracteres complejos manifiestan un comportamiento que responde a una herencia genética no-Mendeliana. En general se asume que están gobernados por varios genes situados en diferentes loci. En cada uno de estos loci pueden residir uno o varios alelos que expresan efectos genéticos pequeños sobre el carácter que controlan, de acuerdo con un *modelo infinitesimal*. El *modelo infinitesimal* de la genética cuantitativa para caracteres complejos propuesto por Fisher (1918) ha sido confirmado por Schön et al. (2004), analizando QTLs en un amplio experimento que incluía 976 F<sub>4:5</sub> líneas evaluadas en 16 ambientes, utilizando 172 marcadores RFLP. A estos caracteres se les ha llamado también caracteres poligénicos, a diferencia de los caracteres cualitativos, monogénicos u oligogénicos, controlados por uno o dos genes y con segregación Mendeliana. A medida que el número de genes expresados en el carácter aumenta, el número de combinaciones segregantes incrementa y por tanto también la complejidad del carácter.

Se han propuesto modelos genéticos más o menos sencillos con efectos exclusivamente aditivos para interpretar su segregación fenotípica. Estos modelos son fáciles de analizar, pero generalmente no han sido suficientes para explicar la estructura compleja y la variabilidad de los caracteres en estudio. En general, se asume que los genes pueden interactuar con otros genes en el mismo locus (i.e., *grado de dominancia*) y con otros genes en diferentes loci (i.e., *epistasia aditiva x aditiva*, *aditiva x dominancia*, y *dominancia x dominancia*). Además, los efectos genéticos pueden ser también modulados por factores ambientales aleatorios (lo que da lugar a una mayor variabilidad de fenotipos de difícil predicción) y por su interacción con condiciones ambientales diferentes (lo que produce una complejidad adicional llamada *interacción genotipo x ambiente*).

Debido a la complejidad múltiple de los factores genéticos y su interacción con otros factores genéticos y los efectos ambientales aleatorios, el comportamiento de los fenotipos seleccionados para un carácter complejo en una generación determinada solo es parcialmente transmitido a la generación siguiente. Miles de posibles combinaciones de efectos genéticos y ambientales pueden ser reunidas en una población segregante, con el potencial para producir una amplia gama de fenotipos que son objeto de selección.

En un programa de selección artificial simple para un carácter a lo largo de  $n$  generaciones o ciclos de selección, se ha llamado “*heredabilidad realizada*” ( $h_{tr}^2$ ) al cociente entre el mejoramiento real de ese carácter (i.e., la respuesta a la selección después de completar los  $n$  ciclos,  $R_n$ ) y la selección diferencial (i.e.; diferencia entre la media de los fenotipos seleccionados y la media de la población en cada generación  $i$ ,  $S_i$ ) acumulada a lo largo de los  $n$  ciclos de selección.

$$h_{tr}^2 = \frac{R_n}{\sum_{i=1}^n S_i}$$

Solamente la parte aditiva genética de los múltiples efectos que concurren en un fenotipo es básicamente heredada en las generaciones siguientes. Este parámetro *heredabilidad realizada* tiene una importancia crucial en la selección de experimentos, primero porque es fácil de estimar, y segundo porque permite comparar la eficiencia real de los experimentos, independientemente de que esa heredabilidad esté más o menos de acuerdo con las *heredabilidad esperada* ( $h^2$ ) que ha sido definida como el cociente entre la varianza genética aditiva ( $\sigma_A^2$ ) y la varianza fenotípica ( $\sigma_P^2$ ) de una población.

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$$

La  $\sigma_A^2$  y la varianza de dominancia no son fáciles de estimar de forma fiable, aunque se han propuesto diseños de apareamientos para su estimación y para reducir el error asociado con ella, tales como los diseños de North Carolina I, II y III (Comstock y Robinson, 1948, 1952). La  $\sigma_P^2$  se estima directamente a partir de los experimentos de evaluación de los fenotipos de los individuos que son evaluados.

Basado en la complejidad de los caracteres poligénicos, es necesario diseñar experimentos de selección para hacer más eficiente la selección de los caracteres cuantitativos, tratando de maximizar en lo posible la selección de los efectos genéticos aditivos, así como reunir en los individuos seleccionados genes con efectos favorables complementarios de dominancia y epistáticos, sobre todo si el objetivo de la selección es mejorar cruces híbridos y variedades sintéticas. Hay muchos ejemplos en la literatura científica que demuestra la eficacia de estos experimentos.

Más abajo en esta publicación, se discutirán los resultados de algunos experimentos de selección publicados en los últimos años, y que pueden desvelar cuál es la configuración genética de los caracteres poligénicos. El análisis se centrará en experimentos de selección recurrente.



## 4.2. EFECTIVIDAD DE LA SELECCIÓN RECURRENTE EN LA MEJORA GENÉTICA CLÁSICA

La selección recurrente o cíclica ha sido propuesta para mejorar los caracteres cuantitativos de una población, donde los loci responsables de ese carácter están segregando con diferente frecuencia alélica, con excepción del caso de una población  $F_2$  derivada del cruce entre dos líneas puras, donde todos los alelos en segregación muestran una frecuencia de 0,5. El objetivo de los programas de selección es aumentar progresivamente, ciclo tras ciclo, la frecuencia de los alelos favorables que son responsables del carácter objeto de la selección. El esquema general implica tres etapas por ciclo de selección.

- (1) Creación de una estructura familiar;
- (2) evaluación de las familias en experimentos con repeticiones ensayados en diferentes ambientes;
- (3) recombinación de los genotipos seleccionados en los ensayos de evaluación (Moreno-González y Cubero, 1993).

Este esquema es la base de numerosos programas de selección que se han llevado a cabo, o se están realizando, en centros públicos de investigación, y empresas privadas de semilla y que han producido un éxito incuestionable en el mejoramiento del rendimiento de los caracteres objeto de la selección.

### 4.2.1. Ganancia genética de los métodos de selección

#### 4.2.1.1. Selección masal recurrente

El esquema general de un ciclo de selección puede ser modificado y adaptado a los diferentes métodos mediante un aumento o reducción del número de generaciones por ciclo. Por ejemplo en el caso más sencillo, las tres etapas de un ciclo pueden agruparse en una sola generación en el método de *selección masal recurrente simple* de plantas alógamas. En este método, las unidades de selección son plantas individuales. No hay creación de familias, y la selección de las plantas y su inter-cruzamiento se realizan en la misma generación. Si el carácter se selecciona después de la floración, las plantas seleccionadas son polinizadas aleatoriamente por el conjunto de las plantas de la población, y solamente hay un control maternal de selección. Si el carácter se selecciona antes de la floración, las plantas seleccionadas pueden ser polinizadas por otras plantas también seleccionadas, y el control de selección es de ambos padres. Esto tiene trascendencia en la ganancia genética esperada por ciclo que para la *selección masal* se presenta en la siguiente formulación:

$$\Delta G_m = \frac{ci\sigma_A^2}{\sigma_p} \quad \text{Ec.4.1}$$

donde  $\Delta G_m$  es la ganancia genética esperada,  $c$  es el control parental de la selección,  $i$  es la intensidad de selección (relacionada con la proporción de individuos seleccionados),  $\sigma_A^2$  es la varianza aditiva y  $\sigma_p$  es la desviación estándar fenotípica.

En el método de selección masal, el valor de  $c$  es 0,5 o 1, dependiendo si la descendencia deriva de la selección de uno o los dos padres, respectivamente.

#### 4.2.1.2. Selección recurrente intrapoblacional

Una ecuación similar a la Ec.4.1 aplicable a la mayoría de los métodos de selección recurrente intra-poblacional puede escribirse como sigue:

$$\Delta G = \frac{ck\sigma_A^2}{\sigma_P} \quad \text{Ec.4.2}$$

donde  $k$  es la parte de la varianza aditiva que se hereda y es característica de las unidades de selección que son evaluadas y recombinadas.

La varianza fenotípica a su vez se puede descomponer en varios componentes de la varianza de acuerdo a lo siguiente:

$$\sigma_P = \sqrt{\sigma_A^2 + \sigma_D^2 + \sigma_{AA}^2 + \sigma_{AD}^2 + \sigma_{DD}^2 + \frac{\sigma_e^2}{r} + \frac{\sigma_{GE}^2}{nr}} \quad \text{Ec.4.3}$$

Donde  $\sigma_D^2, \sigma_{AA}^2, \sigma_{AD}^2, \sigma_{DD}^2, \sigma_e^2, \sigma_{GE}^2$  son las varianzas de dominancia, de epistasis aditiva x aditiva, epistasis aditiva x dominancia, epistasis dominancia x dominancia, del error experimental, e interacción genotipo x ambiente;  $n$  y  $r$  son los números de ambientes y repeticiones dentro de ambiente del experimento de selección.

Las Ec. 4.2 y 4.3 revelan que pueden esperarse grandes diferencias entre las ganancias genéticas de los distintos métodos de selección. Estas diferencias son atribuibles a las características de los propios métodos que condicionan la reducción o aumento de  $c$ ,  $k$ ,  $r$ ,  $n$  y  $\sigma_P$ . En general, los métodos que utilizan familias para su evaluación reducen de forma importante  $\sigma_P$  debido a que se incrementa el número de plantas a evaluar por unidad de selección, y pueden sembrarse experimentos con repeticiones ( $r$ ) en diferentes ambientes ( $n$ ). Ello implica un aumento automático de la ganancia genética esperada en la Ec. 4.2, debido a que  $\sigma_P$  disminuye de forma considerable. Entre los métodos de selección familiar se pueden citar los de *medios hermanos*, *hermanos completos*, y los que utilizan generaciones autofecundadas, tales como *familias S<sub>1</sub>*, *S<sub>2</sub>* etc. Para el método de *medios hermanos*  $k = 1/4$ , mientras que para el de *hermanos completos*  $k = 1/2$ , debido a que esos coeficientes son la parte de la varianza aditiva atribuible a la varianza genética de las familias respectivas.

Algunos métodos de selección necesitan más de una generación por etapa. Por ejemplo, la selección familiar *S<sub>2</sub>*, requiere dos generaciones para completar la etapa de creación de familias. En otros programas de selección se puede optar por utilizar más de un año en la etapa de evaluación, con objeto de reducir la interacción *genotipo x año*. También en la etapa de recombinación se puede optar por utilizar más de una generación de recombinación o intercrucamiento con objeto de reducir el ligamiento entre los genes "en repulsión".

### 4.2.1.3. Selección recurrente recíproca

Otros métodos de selección tratan de capturar además de los efectos aditivos los efectos de dominancia que se producen cuando se cruzan dos poblaciones en la selección de caracteres que muestran heterosis, tal es el caso de la selección recurrente recíproca (SRR).

La SRR fue primeramente diseñada por Comstock et al. (1949) para la mejora genética del maíz, aunque también se ha aplicado a otros cultivos como el girasol. La SRR intenta alterar la frecuencia génica de las dos poblaciones con el objetivo de mejorar su cruce. El método en su forma original abarca las siguientes tres etapas por ciclo de selección: (1) Cada una de 100 a 200 plantas individuales de las dos poblaciones, A y B, son autofecundadas y al mismo tiempo cruzadas con 3 a 5 plantas al azar de las poblaciones recíprocas usadas como hembras “probadoras”, B y A, respectivamente; (2) La selección en cada población se basa en el rendimiento de las familias de medios hermanos cruzadas por la población recíproca “probadora”; (3) las semillas  $S_1$  de A y B, que fueron guardadas y corresponden a las familias de medios hermanos seleccionadas, son apareadas al azar dentro de cada población A y B, respectivamente, con objeto de formar nuevos ciclos de cada una de esas poblaciones A y B. En definitiva este método lo que pretende es elevar la frecuencia de los genes favorables en cada una de las poblaciones A y B para mejorar el cruce de A x B.

El cambio esperado por ciclo de selección en el cruce de las dos poblaciones A x B fue derivada por Moreno-González y Grossman (1976). Si se suprimen los términos de segundo orden, una fórmula útil y simple para ganancia genética de la SRR ( $\Delta G_{RRS}$ ) puede ser escrita como sigue (Moreno-González y Cubero, 1993):

$$\Delta G_{RRS} = \frac{i\sigma_{A(HSA)}^2}{4\sigma_{P(HSA)}} + \frac{i'\sigma_{A(HSB)}^2}{4\sigma_{P(HSB)}} \quad \text{Ec.4.4}$$

Donde  $i$  e  $i'$  son las intensidades de selección aplicadas a la población A y B, respectivamente;  $\frac{1}{4}\sigma_{A(HSA)}^2$ ,  $\frac{1}{4}\sigma_{A(HSB)}^2$ ,  $\sigma_{P(HSA)}$ ,  $\sigma_{P(HSB)}$  son las varianzas genéticas aditivas y la raíces cuadradas de la varianza fenotípica de las familias de medias hermanos de las poblaciones A y B, cuando fueron cruzadas por B y A, respectivamente.

Russell y Eberhart (1975) propusieron una modificación de SRR (en adelante, la llamaremos MSRR), en la que sugieren utilizar como “tester” de la población A una línea pura derivada o relacionada con la población B, en lugar de la misma población B. Recíprocamente, el “tester” de la población B es una línea pura derivada o relacionada con la población A.

### 4.3. RESULTADOS EN EXPERIMENTOS DE SELECCIÓN RECURRENTE

A continuación se presentan los resultados de algunos programas de mejora que demuestran la eficacia y el éxito de los métodos de selección cuando son aplicados a caracteres complejos.

#### 4.3.1. Selección para mejorar el rendimiento, la resistencia parcial a roya (*Puccinea coronata*) y el contenido de aceite del cariósido en avena (*Avena sativa* L.)

Un programa de selección recurrente para mejorar el rendimiento en avena fue llevado a cabo en la Universidad de Minnesota, EEUU, durante siete ciclos de selección (De Koeyer y Stuthman, 1998). El programa se realizó siguiendo un esquema similar al descrito anteriormente, manteniendo tres etapas por ciclo: (1) se seleccionaban 21 líneas  $F_{4,6}$  después de evaluar 630 (proporción de selección 3,33 %); (2) se creaban 63 híbridos  $F_1$ , cruzando las 21 líneas seleccionadas por otras tres; (3) se obtenían 10 líneas  $F_4$  de cada cruce. La regresión lineal de la respuesta a la selección para el rendimiento en los siete ciclos fue 2,2 % ciclo<sup>-1</sup>.

Siguiendo a los siete ciclos para el rendimiento, la población fue sometida a cuatro ciclos adicionales de selección recurrente para resistencia parcial a roya en una segunda fase, con un esquema similar al descrito antes, excepto que en la etapa 3 se obtenían líneas  $F_2$  en vez de  $F_4$ . La respuesta a la selección produjo una reducción en el área del progreso de la enfermedad de un 42 %, después de los cuatro ciclos de selección (Díaz-Lago et al., 2002).

En otro programa de mejora genética utilizando la selección recurrente para incrementar el contenido de aceite en la cariósido del grano de avena, llevado a cabo en la Iowa State University (ISU), en Ames, se ha obtenido un incremento en la regresión lineal de 6,5 % ciclo<sup>-1</sup> después de nueve ciclos, sin que ello acarree una reducción de la varianza genética (Frey y Holland, 1999).

#### 4.3.2. Selección recurrente para aumento del peso del grano en el trigo de primavera

Un programa de selección recurrente para incrementar el peso del grano en el trigo de primavera fue iniciado en la Universidad de North Dakota y posteriormente trasladado a la Universidad de Minnesota (Wiersma et al., 2001). El esquema de selección fue similar a los descritos antes. El tamaño del grano se incrementó linealmente en una tasa de 4,5 % ciclo<sup>-1</sup> a lo largo de ocho ciclos. Los resultados sugerían que el carácter era controlado por muchos genes con efecto pequeño (Wiersma et al., 2001).

Los experimentos referidos arriba son ejemplos de la eficacia de la selección recurrente para caracteres complejos en cultivo de especies autógamias. Existen muchas más publicaciones sobre la respuesta a la selección recurrente en plantas autógamias, tales como soja (Piper y Feher, 1987) y algodón (Miller y Rawlings, 1967).

#### 4.3.3. Selección masal recurrente para longitud divergente de la mazorca de maíz

Un programa de selección masal para longitud divergente de la mazorca de maíz (i.e., mazorcas cortas y largas) comenzó en la ISU en 1963 (López-Reynoso y Hallauer, 1998). Se utilizó un esquema modificado de la selección masal propuesto por Gardner (1961). La presión de selección fue del 7,5 % tanto para mazorcas largas como cortas y se completaba un ciclo cada año. La respuesta lineal a la selección fue 1,4 % ciclo<sup>-1</sup> para las mazorcas más largas y un 1,9 % ciclo<sup>-1</sup> para

las más cortas durante 27 ciclos de selección. Los datos del experimento también sugieren que los genes controlando la longitud de la mazorca tienen un efecto de dominancia favorable para las mazorcas más largas, debido a que fue más fácil fijar los alelos recesivos que controlaban las mazorcas más cortas que los alelos dominantes que son responsables de una mayor longitud de mazorca.

#### **4.3.4. Selección masal recurrente para aumento de la prolificidad de mazorcas de maíz**

Un programa de selección para incrementar el número de mazorcas por planta en el maíz fue iniciado en la Universidad de Winsconsin-Madison en 1971 (de Leon y Coors, 2002). La respuesta a la selección tuvo un incremento de 0,14 y 0,03 mazorcas planta<sup>-1</sup> ciclo<sup>-1</sup> cuando fue evaluada en baja y alta densidad de plantas (15000 y 73000 plantas ha<sup>-1</sup>), respectivamente, durante 24 ciclos de selección. La mayoría de la respuesta se produjo entre los ciclos 18 y 24. El incremento en el número de mazorcas produjo una reducción en otros componentes del rendimiento, tales como longitud y diámetro de la mazorca, y tamaño del grano, lo que indica que el rendimiento del grano es un carácter muy complejo y que la selección individual para un componente no produce necesariamente un incremento significativo en el rendimiento global del cultivo del maíz.

#### **4.3.5. Selección recurrente recíproca (SRR) para el incremento del rendimiento del grano en maíz**

##### **4.3.5.1. Método de Comstock et al. (1949)**

El programa SRR para mejorar el rendimiento del cruce entre las poblaciones sintéticas de maíz BSSS y BSCB comenzó en la ISU en el año 1949 (Keeratinijakal y Lamkey, 1993a) utilizando el método de Comstock et al. (1949). Numerosos estudios han sido publicados desde entonces a lo largo de la historia del programa de SRR (Eberhart et al. 1973; Smith, 1983; Oyervides-Garcia y Hallauer 1986; Rodriguez y Hallauer, 1988; Helms et al. 1989; Keeratinijakal y Lamkey, 1993a, 1993b; Holthaus y Lamkey, 1995 a, 1995b; Betrán y Hallauer, 1996 a, 1996b). La respuesta directa a la selección en el cruce de las dos poblaciones fue muy efectiva en cuatro estudios independientes, 4,1% ciclo<sup>-1</sup> (Penny et Eberhart, 1971), 4,3 % ciclo<sup>-1</sup> (Smith, 1983), 6,1 % ciclo<sup>-1</sup> (Betrán y Hallauer, 1996 a) y 6,9 % ciclo<sup>-1</sup> (Keeratinijakal y Lamkey, 1993a), cuando se evaluaron los primeros cinco, siete, nueve y 11 ciclos de selección, respectivamente. Sin embargo la respuesta indirecta a la selección fue mucho menor en las poblaciones “per se” que en el cruce de las dos poblaciones, variando de -1,6 % ciclo<sup>-1</sup> in BSCB (Rodriguez y Hallauer, 1988) a 2,6 % ciclo<sup>-1</sup> in BSSS (Holthaus y Lamkey, 1995a).

##### **4.3.5.2. Comparación del método SRR (Comstock et al., 1949) versus la modificación MSRR de Russell y Eberhart (1975) que utiliza una línea pura como probadora**

La comparación empírica de los dos métodos MRRS y RRS usando las poblaciones de maíz BS21 y BS22 se inició en la ISU en 1975. Los resultados indicaron que el método SRR fue superior al MSRR en dos estudios independientes. La respuesta directa lineal a la selección para rendimiento de grano en el cruce de las dos poblaciones BS21 x BS22 fue 4,9 y 1,1 % ciclo<sup>-1</sup> durante los tres primeros ciclos (Russell et al., 1992) y 4,2 y 1,6 % durante los seis primeros ciclos (Menz Rademacher et al., 1999) para los métodos SRR y el MSRR, respectivamente. Comstock (1979) ya había vaticinado que la SRR podía ser superior a la MSRR, usando la teoría genética cuantitativa. Comparó la mejora en el cruce de las dos poblaciones para ambos tipos de “testers”

(i.e., línea pura vs. población) sobre la base del cambio en la frecuencia de los alelos favorables. Concluyó que el “tester” línea pura no era superior a la población recíproca. Por el contrario, la población “tester” podía ser superior a la línea pura en algunas situaciones, especialmente si los efectos de sobredominancia y epistasis están presentes en las poblaciones.

Igualmente, Moreno-González y Grossman (1976) demostraron que la ganancia genética teórica de una población era mayor cuando la población “tester” había sido seleccionada para bajo rendimiento (i.e., con menor frecuencia de alelos favorables) que cuando el “tester” era la población original.

El cambio esperado en la frecuencia de alelos favorables ( $\Delta p_A$ ) en la población seleccionada A (Moreno-González y Grossman, 1976; Falconer, 1981) es:

$$\Delta p_A = \frac{ip_A(1-p_A)[a+(1-2p_T)d]}{2\sigma_p} \quad \text{Ec.4.5}$$

donde  $i$  es intensidad de selección;  $p_A$  y  $p_T$  son las frecuencias del alelo favorable en la población seleccionada y en la población probadora, respectivamente;  $a$  y  $d$  son los efectos aditivos y de dominancia; y  $\sigma_p$  es la desviación estándar fenotípica de los “testcross” o familias de medios hermanos. El numerador de la Ec. 4.5 debería tener el mismo valor esperado cuando el “tester” es la población recíproca B que cuando es una línea pura derivada aleatoriamente de B, sin embargo en el proceso de derivación de una línea pura la frecuencia media esperada de alelos favorables ( $p_T$ ) es mayor en la línea pura que en la población original debido a la eliminación de alelos deletéreos en las sucesivas generaciones de autofecundación y a efectos de selección involuntaria durante el proceso. Adicionalmente, la  $\sigma_p$  es mayor cuando el “tester” es una línea pura que una población (Comstock, 1979). Por tanto de acuerdo con la Ec. 4.5, el valor esperado de  $\Delta p_A$  es menor cuando el “tester” es una línea pura que cuando es la población original. Esto explica que el método SRR sea superior al MSRR.

#### 4.3.5.3. Selección recurrente recíproca de hermanos completos (SRRHC)

El método SRRHC aplicado a las poblaciones de maíz BS10 y BS11 en la ISU ha demostrado ser muy eficiente para mejorar el cruce de las dos poblaciones BS10 x BS11. (Hallauer, 1984; Rodríguez y Hallauer, 1986; Eyherabide y Hallauer, 1991; Frank y Hallauer, 1999). La respuesta directa a la selección para el rendimiento de grano en el cruce BS10 x BS11 fue 2,5, 6,5 y 1,6%  $\text{cycle}^{-1}$  cuando los primeros cinco, ocho y 10 ciclos de selección fueron evaluados en tres estudios independientes, respectivamente.

#### 4.3.6. Selección recurrente para alto y bajo contenido de aceite y proteína en el grano de maíz en un experimento de muy larga duración

El experimento de selección recurrente de la Universidad de Illinois de larga duración para contenido de aceite y proteína en el grano de maíz empezó en el año 1896 a partir de 163 mazorcas de una variedad local de grano blanco denominada 'Burr's White'. Las 24 mazorcas con mayor contenido en proteína, las 12 mazorcas con menor proteína, las 24 mazorcas con mayor contenido en aceite, y las 12 mazorcas con menor aceite sirvieron de base para iniciar las estirpes denominadas IHP ("Illinois high protein"), ILP ("Illinois low protein"), IHO ("Illinois high oil"), y ILO ("Illinois low oil"), respectivamente (Dudley y Lambert, 1992). Los resultados y estudios de este experimento han sido publicados en muchos informes durante muchos años (Leng, 1962; Dudley y Lambert, 1969; Dudley et al., 1974; Moreno-González et al., 1975; Dudley, 1977; Dudley et al., 1977; Dudley y Lambert, 1992; Dudley, 1994; Sughrue y Rochefort, 1994; Moose et al. 2004; Laurie et al., 2004; Dudley y Lambert, 2004; Clark et al., 2006; Dudley, 2007, 2008). Hasta ahora más de 106 ciclos de selección recurrente han sido completados con estas estirpes (Dudley, 2007). Los esquemas de selección cambiaron a lo largo de los años. En general se utilizaron los métodos de selección masal, y familias de medios hermanos o modificaciones de ellos.

Este experimento muestra los grandes cambios genéticos alcanzados en los caracteres cuantitativos, tales como contenido de proteína y aceite en el grano de maíz durante más de 100 generaciones de selección. Las respuestas a la selección cambiaron de 4,6 % de aceite a 19,6 % para IHO, y a 0,5 % para ILO después de 87 generaciones. Igualmente, las poblaciones cambiaron de 10,9 % de proteína a 32,5 % en IHP y a 4,2 % en ILP después de 90 generaciones. Cuando se computan estas ganancias en termino de desviación estándar aditiva ( $\sigma_a$ ) de las poblaciones, las ganancias genéticas llegan a ser muy grandes, 22  $\sigma_a$  para IHO y 26  $\sigma_a$  para IHP (Dudley y Lambert, 1992). Estas desviaciones están situadas en los extremos más apartados de las colas de una distribución normal, con probabilidades extremadamente bajas menores que  $10^{-105}$ , lo que implica que sería inimaginable encontrar una planta con tales características en un campo de maíz en donde crecieran trillones y trillones de plantas de la misma población original 'Burr's White'. Habría que inspeccionar un inabarcable número de espigas y no sería posible encontrar una sola mazorca, cuyo contenido en aceite se aproximase al que hoy alcanzan las estirpes IHO e IHP.

#### 4.3.7. Inferencias de los experimentos de selección

Estos experimentos muestran el potencial de la selección recurrente para seleccionar los caracteres cuantitativos. La selección y la recombinación de los genotipos seleccionados es una herramienta poderosa para mover la selección en el sentido deseado, que de otra manera tardaría un tiempo inconmensurable en alcanzarse. Los efectos aditivos favorables pueden ser fijados a través de la selección recurrente intrapoblacional, mientras que los efectos de dominancia se expresan mejor a través de la selección recurrente inter-poblacional. Los efectos epistáticos son importantes en los caracteres cuantitativos como demostró Dudley (2008) en un experimento que analizaba 499 y 478 SNPs en 500 líneas  $S_2$  derivadas de los cruces de IHP x ILP e IHO x ILO, respectivamente. La selección continuada, progresiva y moderada (con una proporción de selección alrededor del 20 % y un tamaño de población adecuado 20 a 30) y la recombinación hicieron que se fijasen combinaciones de alelos con efectos epistáticos favorables en las estirpes IHO, e IHP, y al contrario efectos epistáticos desfavorables en las estirpes ILO, e ILP. Estos experimentos han confirmado también que la distribución y la magnitud de los efectos genéticos de los caracteres complejos se ajusta al modelo infinitesimal propuesto por Fisher (1918) con muchos genes, más de 50 y efectos pequeños.



#### 4.4. LOS MARCADORES MOLECULARES Y SU ASOCIACIÓN CON GENES CONTROLANDO LOS CARACTERES CUANTITATIVOS (QTLs)

Una gran afluencia de datos científicos han sido acumulados durante los últimos veinte años, demostrando la utilidad de los marcadores moleculares (isoenzimas, RAPDs, RFLPs, SSRs, AFLPs, y SNPs) para examinar y mapear la identidad de los genotipos de diferentes variedades de maíz (Smith 1988; Smith et al. 1990; Smith y Smith, 1991; Smith et al. 1991; Burstin et al. 1994; Hahn et al. 1995; Senior et al. 1996; Dhillmann et al. 1997, Dhillmann y Guérin, 1998; Smith et al. 1997; Senior et al. 1998; Pejic et al. 1998; Dubreuil y Charcosset 1999) y otros cultivos. Los marcadores moleculares han confirmado también su utilidad para ayudar en la selección y en el desarrollo de nuevas variedades (Stuber et al. 1992; Ribaut y Hoisington 1998; Kraja y Dudley 2000; Charcosset y Gallais, 2002). Varios tipos de marcadores han sido usados en la caracterización de líneas puras, variedades autóctonas y poblaciones de maíz con objeto de optimizar la gestión de los recursos genéticos de los bancos de germoplasma. (Stuber y Goodman 1983; Llauradó et al. 1993; Dhillmann y Guérin 1998; Smith et al. 1997; Senior et al. 1998; Pejic et al. 1998).

Los marcadores moleculares han sido también usados para asistir en la selección de los caracteres cualitativos tales como los genes Bt de resistencia a lepidópteros (Ragot et al. 1994) y genes de resistencia a enfermedades (Johnson et al. 2002; Jefferies et al. 2003). Los marcadores han tenido un gran interés para ayudar en la introgresión de QTLs de alelos favorables de resistencia a enfermedades, adaptación a condiciones ambientales y para caracteres complejos como el rendimiento (Shen et al. 2001; Robert et al. 2001; Zhou et al. 2003; Concibido et al. 2003).

La mayor precisión en la estimación de QTLs ha sido posible gracias a modelos que utilizaban marcadores de bordura (mapeo de intervalos) asociados a métodos de máxima verosimilitud (Lander y Bostein 1989; Lou y Kersay 1992) o a métodos de regresión múltiple (Moreno-González 1992, 1993, 1999). La combinación del método de máxima verosimilitud y la regresión múltiple ha sido utilizada por Zeng (1994) para desarrollar el método de análisis "composite interval mapping", cuyo modelo es el siguiente:

$$y_i = \beta_0 + \beta_k^* X_{ki}^* + \sum_j \beta_j X_{ji} + \varepsilon_j \quad \text{Ec.4.6}$$

donde  $y_i$  es la observación fenotípica del genotipo  $i$ ;  $\beta_k^*$  es el efecto del QTL  $k$  que se está probando su entrada en el modelo;  $X_{ki}^*$  es el valor de la variable ficticia correspondiente a la clase marcadora  $k$  asociada al genotipo  $i$ ; igualmente,  $\beta_j$  es el efecto del QTL  $j$  ya incluido en el modelo;  $X_{ji}$  es el valor de la variable ficticia correspondiente a clase marcadora  $j$  del genotipo  $i$ .

La detección y precisión de los QTLs se incrementa, cuando el número de individuos evaluados a partir de una población en desequilibrio de ligamiento, el efecto genético del QTL, y la densidad de los marcadores moleculares en el genoma también aumenta. La precisión en la estimación se reduce cuando los QTLs están ligados en repulsión, porque se cancelan sus efectos en el entorno de la clase marcadora.

Con estos modelos ha sido posible detectar numerosos QTLs en muchos cultivos. Algunos de ellos citados recientemente son los que controlan la composición de ácidos grasos en maíz (Wasson et al. 2008), la calidad de la fibra en algodón (Wang et al. 2007), y el rendimiento en soja (Guzman et al. 2008).



## 4.5. LA ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE PARENTESCO POR MARCADORES MOLECULARES PARA SER USADOS EN EL ANALISIS DE CRUCES DE DIALELOS CON LINEAS EMPARENTADAS

### 4.5.1. Parámetros para estimar la similaridad genética basada en marcadores moleculares

Varios parámetros han sido desarrollados para estimar la similaridad genética entre dos genotipos  $i$  y  $j$  ( $S_{ij}$ )

#### 4.5.1.1. Coeficiente de similaridad simple (Sneath y Sokal 1973):

$$S_{ij} = (a + d)/(a + b + d + c + d) \quad \text{Ec.4.7}$$

donde  $a$  = número de bandas con correspondencia "1-1";  $b$  = número de bandas con correspondencia "1-0";  $c$  = número de bandas con correspondencia "0-1"; y  $d$  = número de bandas con correspondencia "0-0"; "1" significa presencia de un alelo; y "0" significa ausencia de ese mismo alelo. Este coeficiente es útil cuando se consideran el conjunto de alelos de un grupo de líneas puras para establecer la similaridad entre dos líneas, aun cuando algunos alelos no estén involucrados en esas líneas.

#### 4.5.1.2. Nei y Li's coefficient (Nei y Li 1979):

$$S_{ij} = 2n_{ij}/(n_i + n_j) \quad \text{Ec.4.8}$$

donde  $n_{ij}$  = número de bandas compartidas por las líneas  $i$  y  $j$ ; y  $n_i$  y  $n_j$  número de fragmentos o bandas en  $i$  y  $j$ , respectivamente.

Los coeficientes de similaridad de Sneath y Sokal, y de Nei-Li son los más ampliamente usados, dependiendo si se desea utilizar o no la comparación "0-0", respectivamente.

### 4.5.2. Relación entre pedigrí y datos moleculares

Muchos trabajos se han publicado para estudiar la relación entre la similaridad por pedigrí, determinado por el coeficiente de parentesco ( $f_c$ ), y la similaridad genética basada en marcadores moleculares ( $S$ ), determinada por el coeficiente Nei-Li (1979), o el de Sneath y Sokal (1973). El coeficiente de correlación ( $r_c$ ) entre los datos de pedigrí ( $f_c$ ) y la similaridad genética ( $S$ ) fue baja para marcadores RAPD ( $r_c = 0.40-0.49$ ) y alta para marcadores RFLP y SSR ( $r_c = 0.57-0.95$ ) en varios tipos de material de mejora incluyendo híbridos, y líneas puras lisas y dentadas de América y Europa (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Coeficientes de correlación ( $r$ ) entre el coeficiente de parentesco ( $f_c$ ) basado en datos de pedigrí y la similaridad genética ( $S$ ) basada en marcadores moleculares, RAPD, AFLP, RFLP, SSR.

Referencia	Material de mejora	RAPD	AFLP	RFLP	SSR
Smith et al. 1990	Híbrido		0.90		
Smith y Smith 1991	Híbrido		0.91		
Smith y Smith 1992	Híbrido		0.95		
Messmer et al. 1993	Línea lisa		0.84		
Messmer et al. 1993	Línea dentada		0.91		
Burstin et al. 1994	Línea pura		0.63		
Hahn et al. 1995	Línea lisa	0.42			
Hahn et al. 1995	Línea dentada	0.49			
Pejic et al. 1998	Línea pura	0.40	0.62	0.57	0.52
Smith et al. 1997	Línea pura			0.80	0.81
Lübberstedt et al. 2000	Línea lisa		0.79		
Lübberstedt et al. 2000	Línea dentada		0.69		

Bernardo et al. (2000) discutieron el concepto de bandas comunes (alelos) que son 'idénticas por descendencia' y bandas comunes que son 'iguales en estado' pero no idénticas por descendencia con objeto de estimar el coeficiente de parentesco basado en marcadores moleculares. Ellos estimaron las contribuciones genéticas de cada padre a los descendientes, usando el coeficiente de similaridad sencillo (Sneath y Sokal 1973), que utiliza bandas (alelos) similares y no similares cuando se comparan dos individuos.

Si se considera un cruce entre las líneas puras  $a \times b$ , y una línea  $i$  derivada del cruce, las siguientes relaciones existen (Bernardo et al. 2000):

$$S_{ai} = \lambda_a + \lambda_b S_{ab}$$

$$S_{bi} = \lambda_b + \lambda_a S_{ab}$$

$$\lambda_a = (S_{ai} - S_{bi} S_{ab}) / [1 - (S_{ab})^2] \quad \text{Ec.4.9}$$

$$\lambda_b = (S_{bi} - S_{ai} S_{ab}) / [1 - (S_{ab})^2] \quad \text{Ec.4.10}$$

donde,  $\lambda_a$  y  $\lambda_b$  son las contribuciones genéticas de  $a$  y  $b$  a  $i$ , respectivamente;  $S_{ai}$ ,  $S_{ab}$ , y  $S_{bi}$  son las similaridades basadas en marcadores de  $a$  con  $i$ ,  $a$  con  $b$ , y  $b$  con  $i$ , respectivamente.

De esta manera, Bernardo et al. (2000) pudieron recalcular los coeficientes de parentesco entre dos líneas  $i$  y  $j$  ( $f_{ij}$ ) como:

$$f_{ij} = \lambda_a f_{aj} + \lambda_b f_{bj} \quad \text{Ec.4.11}$$

donde  $f_{aj}$  y  $f_{bj}$  son los coeficientes de parentesco entre  $a$  y  $j$ , y  $b$  y  $j$ , respectivamente.

Otra forma de estimar el coeficiente de parentesco verdadero ( $f'_{AB}$ ) entre dos líneas A y B basado exclusivamente en marcadores moleculares (Bernardo 1993) es como sigue

$$f'_{AB} = (S_{AB} - \delta_{AB}) / (1 - \delta_{AB}) \quad \text{Ec.4.12}$$

donde  $S_{AB}$  es la similaridad genética basada en los coeficientes de Nei-Li; y  $\delta_{AB}$  es la probabilidad de que una banda (alelo) de A y otra banda (alelo) de B sean "iguales en estado", pero "no idénticas por descendencia".  $\delta_{AB}$  se estima promediando el porcentaje de bandas comunes (o similaridad genética) de ambas líneas A y B cuando son comparadas con otras líneas no emparentadas con ellas.

### 4.5.3. Aplicación de los coeficientes de parentesco basados en marcadores moleculares a modelos genéticos

#### 4.5.3.1 Modelo mixto

Uno de los elementos más importante en la selección de individuos es la estimación o predicción de los valores de mejora, los efectos aditivos principalmente, pero también los efectos de dominancia (como en el caso de los híbridos) que se heredan para las generaciones siguientes. Henderson (1950) desarrollo una metodología llamada BLUP (best linear unbiased prediction = mejor predicción lineal y no sesgada de los valores de mejora), usando el modelo lineal mixto de efectos fijos y aleatorios, que en su forma más simple es como sigue,

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Za} + \mathbf{e}, \quad \text{Ec.4.13}$$

donde  $\mathbf{y}$  = n x 1 vector de observaciones, con n registros;  $\mathbf{b}$  = p x 1 vector de efectos fijos con p niveles;  $\mathbf{a}$  = q x 1 vector de efectos genéticos aleatorios, con q niveles;  $\mathbf{X}$  es la matriz de orden n x p que relaciona los registros con los efectos fijos;  $\mathbf{Z}$  es la matriz de orden n x q que relaciona los registros con los efectos genéticos a estimar;  $\mathbf{e}$  = n x 1 es el vector de efectos de errores aleatorios. Las estimaciones de los efectos  $\mathbf{b}$  y  $\mathbf{a}$  se basa en métodos de máxima verosimilitud.

El modelo mixto de Henderson (1950, 1985) se ha utilizado ampliamente en mejora genética, animal pero solo limitadamente en mejora genética vegetal (Bernardo 1996, Moreno-González et al. 2004).

#### 4.5.3.2. Análisis de dialelos

Moreno-González et al. (2004) lo aplicaron al método 2 del análisis de dialelos de Griffing (1956), que incluía los n padres y todos los n(n-1) cruzamientos posibles.

El desarrollo de este modelo mixto para la predicción BLUP de un análisis dialélico se puede escribir en la siguiente forma (Moreno-González et al. 2004):

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Z}_g \mathbf{u}_g + \mathbf{Z}_h \mathbf{u}_h + \mathbf{Z}_{hs} \mathbf{u}_{hs} + \mathbf{e} \quad \text{Ec.4.14}$$

donde,  $\mathbf{y}$  es el vector de observaciones;  $\mathbf{X}$  es la matriz indicativa que relaciona las observaciones y los efectos fijos;  $\mathbf{b}$  es vector de efectos fijos;  $\mathbf{Z}_g$ ,  $\mathbf{Z}_h$ , y  $\mathbf{Z}_{hs}$ , son las matrices indicativas de ceros y unos que relacionan las observaciones con los efectos de la aptitud combinatoria general (ACG), la heterosis promedio, y los efectos de la aptitud combinatoria específica (ACE), respectivamente;  $\mathbf{u}_g$ ,  $\mathbf{u}_h$ , y  $\mathbf{u}_{hs}$  son los vectores de los efectos ACG, heterosis promedio, y ACE

que van a ser estimados, respectivamente; y  $\varepsilon$  es el vector de efectos del error. El número de efectos ACG, heterosis promedio y ACE para ser estimados en el dialelo son  $n$ , 1 y  $n(n-1)$ , respectivamente. Las ecuaciones del modelo mixto (EMM) (Henderson, 1985) son:

$$\begin{bmatrix} b \\ u_a \\ u_h \\ u_s \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'R^{-1}X & X'R^{-1}Z_g & X'R^{-1}Z_h & X'R^{-1}Z_{hs} \\ Z'_g R^{-1}X & Z'_g R^{-1}Z_g + V_g & Z'_g R^{-1}Z_h & Z'_g R^{-1}Z_{hs} \\ Z'_h R^{-1}X & Z'_h R^{-1}Z_g & Z'_h Z_h R^{-1} + V_h & Z'_h R^{-1}Z_{hs} \\ Z'_{hs} R^{-1}X & Z'_{hs} R^{-1}Z_g & Z'_{hs} R^{-1}Z_h & Z'_{hs} R^{-1}Z_{hs} + V_s \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} X'R^{-1}y \\ Z'_g R^{-1}y \\ Z'_h R^{-1}y \\ Z'_{hs} R^{-1}y \end{bmatrix}$$

donde  $V_g = G^{-1} \sigma_e^2 / \sigma_g^2$ ;  $V_h = H^{-1} \sigma_e^2 / \sigma_h^2$ ;  $V_s = S^{-1} \sigma_e^2 / \sigma_s^2$ ,  $R = I\sigma_e^2$

**G** es la matriz  $n \times n$  de coeficientes de parentesco entre los efectos aditivos (ACG) de las líneas parentales; **S** es la matriz  $n(n-1) \times n(n-1)$  de coeficientes de parentesco entre los efectos de dominance (ACE); **H** es la matriz unidad  $1 \times 1$ ; **I** es la matriz unidad con dimensión igual al número de observaciones;  $\sigma_g^2$ ,  $\sigma_s^2$  y  $\sigma_e^2$  son las varianzas de la ACG, ACE y el error; y  $\sigma_h^2$  es la varianza debida al efecto de promedio de heterosis.

La utilización de coeficientes de parentesco verdaderos entre las líneas parentales tal como se describió anteriormente (Ec. 4.11 y 4.12), en vez de los coeficientes de parentescos esperados (Malecot 1948), mejora la predicción de los efectos aditivos y de dominancia.

El Procedimiento mixto (Proc mixed) de SAS (SAS, 1999) permite la utilización de escribir la matriz **G** de coeficientes de parentesco entre los individuos evaluados en el experimento, utilizando la opción GDATA en el comando RANDOM.

## 4.6. SELECCION DE CARACTERES CUANTITATIVOS ASISTIDA CON MARCADORES MOLECULARES UTILIZANDO COMPONENTES PRINCIPALES

### 4.6.1. Selección asistida de caracteres cuantitativos basada en marcadores moleculares (MAS)

**MAS** ha sido utilizada de forma limitada en programas de selección recurrente. Entre los pocos estudios realizados, se encuentran algunos con desarrollos teóricos y otros con simulaciones. Todos demuestran que la selección asistida basada en marcadores moleculares es superior a la selección convencional, especialmente cuando la heredabilidad del carácter es baja y el número de individuos evaluados es elevado (Openshaw y Frascaroli, 1997; Moreau et al. 1998, 2000, 2001; Charcosset y Moreau, 2004).

Entre las muchas alternativas de la selección MAS está la propuesta por Lande y Thompson (1990). El modelo es muy sencillo y consiste en combinar los individuos predichos por los marcadores moleculares con la selección fenotípica. El modelo se basa en el desarrollo del índice de selección y tiene la siguiente ecuación:

$$I_i = Y_j + b_m P_{mj}$$

donde  $I_j$ ,  $Y_j$ , y  $P_{mj}$  son el índice de selección, el valor fenotípico, y el valor predicho basado en marcadores moleculares (Ec. 4.6) del genotipo  $i$ .  $b_m$  es el peso atribuido al valor predicho. La estimación de  $b_m$  se deduce a partir de la teoría del índice de selección y tiene la siguiente forma:

$$b_m = \frac{\sigma_P^2 - \sigma_G^2}{\sigma_G^2 - \sigma_m^2}$$

donde  $\sigma_P^2$ ,  $\sigma_G^2$ , y  $\sigma_m^2$  son las varianzas fenotípicas, genéticas y la explicada por los marcadores moleculares de predican  $P_{mj}$ .

#### 4.6.1. Resultados de simulación de una selección MAS

Se ha simulado una selección MAS considerando genotipos derivados de una generación  $F_2$  procedentes del cruce de dos líneas puras. Se ha considerado un genoma agrupado en 12 grupos de ligamento. A cada grupo de ligamento se le han asignado 10 marcadores, separados entre 5 y 15 cM. El número de QTLs distribuidos por el genoma fue 21, con las siguientes características. Dos de los QTLs segregaban independientes del resto. Los 19 restantes eran distribuidos en nueve grupos de ligamento, formando ocho grupos de dos QTLs, y un grupo de tres QTLs. La simulación permitía que los efectos de los QTLs ligados estuviesen en repulsión o en acoplamiento. Los efectos variaban de 0.2 a 1 unidades arbitrarias. Individualmente los QTLs explicaban entre el 0,25 y el 6,9 % de la varianza genética, y entre el 0,06 y el 6% de la varianza fenotípica en los casos más desfavorables y más favorables de la selección, respectivamente.

Se generaron 320 individuos con dos duplicaciones por ensayo (con el mismo genotipo pero distinto fenotipo de acuerdo con el error experimental) en cada uno de los diferentes experimentos con distintos valores para las variables de simulación. Cada experimento de simulación con los mismos valores de las variables fue simulado 160 veces (repeticiones).

Se estudiaron varias situaciones de simulación de acuerdo con la variación de los siguientes parámetros:

- (1) Se contemplaron dos intensidades de selección reteniendo el 5 y el 1,56 % de los individuos evaluados.
- (2) Se calcularon los componentes principales a partir de la matriz de las clases marcadoras.
- (3) Las predicciones de los fenotipos se realizaron con modelos de regresión paso-a-paso y niveles de significación del 15 y 10 % para la entrada de una variable en el modelo cuando se utilizaban las variables ficticias de las clases marcadoras. Se utilizaron también modelos de regresión paso-a-paso para las 48 primeras componentes principales y niveles de significación de 60 y 80 % para la entrada de una variable en el modelo.
- (4) La varianza del error experimental se hizo variar de 1 a 25 unidades, mientras que la varianza genotípica variaba de 2,4 a 4,9 unidades para los QTLs en repulsión y acoplamiento, respectivamente.

Las varianzas fenotípica y genética fueron obtenidas a partir de los fenotipos simulados en las dos repeticiones de cada ensayo. Igualmente, la varianza de marcadores asociada con los QTLs que explicaban una parte de la varianza genética fue estimada a partir de las predicciones de los individuos utilizando los modelos de regresión en las dos repeticiones de cada ensayo.

Los resultados indican que la selección MAS siempre fue mejor que la selección fenotípica convencional, para todas las condiciones de simulación. Las diferencias en las ganancias genéticas entre los dos sistemas de selección aumentaba a medida que la heredabilidad disminuía y cuando los QTLs estaban en acoplamiento en comparación con los QTLs en repulsión. Los niveles de significación del 10 y el 15 % fueron similares, pero mejores que los del 5 y el 1%. Estos resultados concuerdan con anteriores simulaciones (Charcosset y Moreau, 2004). La diferencia entre la ganancia genética de la selección MAS y la convencional aumentaba a medida que la proporción de los individuos seleccionados decrecía (5 vs. 1,56 %). El Método de regresión usando componentes principales fue siempre mejor que la regresión basada en las variables ficticias para cualquier situación de la simulación.

## REFERENCIAS

- Bernardo, R. (1993). Estimation of coefficient of coancestry using molecular markers in maize. *Theor Appl Genet* 85:1055-10062
- Bernardo, R., (1996) Best linear unbiased prediction of maize single-cross performance. *Crop Sci.* 36: 50-56.
- Bernardo, R., Romero-Sverson, J., Ziegler, J., Hauser, J., Joe, L., Hookstra, G. and Doerge, RW. (2000). Parental contribution and coefficient of coancestry among inbreds: pedigree, RFLP, and SSR data. *Theor Appl Genet* 100:552-556.
- Betrán, F.J., and Hallauer, A.R. (1996a) Characterization of interpopulation genetic variability in three hybrid maize populations. *J. Hered.* 87(4): 319-328.
- Betrán, F.J., and Hallauer, A.R. (1996b) Hybrid improvement after reciprocal recurrent selection in BSSS y BSCB1 maize populations. *Maydica* 41: 25-33.
- Burstin, J., De Vienne, D., Dubreuil, P., and Damerval, C. (1994). Molecular markers and protein quantities as genetic descriptors in maize. I. Genetic diversity among 21 inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 89: 943-950.
- Charcosset, A. and Gallais, A. (2002) Application of markers in selection. pp 153-176. En *Molecular Markers in Plant Genetics y Biotechnology*.
- Charcosset, A., and Moreau, L. (2004) Use of molecular markers for the development of new cultivars y the evaluation of genetic diversity. *Euphytica* 137: 81-94.
- Clark, D., Dudley, J.W., Rochefort, T.R. and Ledeaux, J.R. (2006) Genetic analysis of corn kernel composition in the random mated 10 generations of the cross of generations 70 of IHO ? ILO. *Crop Sci.* (in press).
- Comstock, R.E. 1979. Inbred lines versus the populations as testers in reciprocal recurrent selection. *Crop Sci.* 19: 881-887.

- Comstock, R.E. and Robinson, H.F. (1948) The component of genetic variances in populations of biparental progenies y their use in estimating the average degree of dominance. *Biometrics* 4: 254-266.
- Comstock, R.E. and Robinson, H.F. (1952) Estimation of the average dominance of genes. Pp. 494-496. En Owen. J.W. (ed.) *Heterosis*. Iowa State Univ. Press, Ames, Io.
- Comstock, R.E., Robinson, H.F. and Harvey, P.H. (1949) A breeding procedure designed to make maximum use of both general y specific combining ability. *Agron. J.* 41: 360-367.
- Concibido, V. C., La Vallee, B. McLaird, P., Pineda, N., Meyer, J. (2003). Introgression of a quantitative trait locus for yield from Glycine soja into commercial soybean cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 106: 575-582.
- Crow, J.F., and Kimura, M. (1970) *An introduction to population genetics theory*. Harper&Row, New York.
- De Koeper, D.L. and Stuthman, D.D. (1998) Continued response through seven cycles of recurrent selection for grain yield in oat (*Avena sativa*). *Euphytica* 104: 67-72.
- De Leon, N., and Coors, J.G. (2002) Twenty-four cycles of mass selection for prolificacy in the Golden Glow maize population. *Crop Sci.* 42: 325-333.
- Díaz-Lago, J.E., Stuthman, D.D. and Abadie, T.E. (2002) Recurrent selection for partial resistance to crown rust in oat. *Crop Sci.* 42: 1475-1482.
- Dillmann, C. and Guérin, D. (1998). Comparison between maize inbred lines: Genetic distances in the expert's eye. *Agronomie* 18: 659-667.
- Dubreuill, P. and Charcosset, A. (1999). Relationships among maize inbred lines and populations from European and Nort-America origins as estimated using RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99: 473-480.
- Dudley, J.W. (1977) Seventy-six generations of selection for oil y protein percentage in maize. In Pollack, E., Kempthorne, O., y Bailey, T.B. Jr.(eds.), *Proc. of the Int. Conf. on Quantitative Genetics*, Aug 16-21, 1976. The Iowa State University Press, Ames.
- Dudley, J.W. (1982) Theory for transfer of alleles. *Crop Sci.* 22: 631-637.
- Dudley, J.W. (1984) A method for identifying populations containing alleles not present in elite germplasm. *Crop Sci.* 24: 1053-1054.
- Dudley, J.W. (1994) Linkage disequilibrium in crosses between Illinois maize strains divergently selected for protein percentages. *Theor. Appl. Genet.* 87: 1016-1020.
- Dudley, J.W. (2007) From means to qtl: the illinois long-term selection experiment as a case study in quantitative genetics. *Crop Sci* 47: S-20-S-31.
- Dudley, J.W. (2008) Epistatic interactions in crosses of illinois high oil x illinois low oil y of illinois high protein x illinois low protein corn strains. *Crop Sci.* 48: 59-68.
- Dudley, J.W. and Lambert R.J. (1992) Ninety generations of selection for oil y protein in maize. *Maydica* 37: 81-87.

- Dudley, J.W. and Lambert, R.J. (2004) 100 generations of selection for oil y protein in corn. *Plant Breed. Rev.* 24: 79-110.
- Dudley, J.W., and Lambert, R.J. (1969) Genetic variability after 65 generations of selection in Illinois high oil, low oil, high protein y low protein strains of *Zea mays* L. *Crop Sci.* 9: 179-181.
- Dudley, J.W., Lambert, R.J. and Alexander, D.E. (1974) Seventy generations of selection for oil y protein concentration in the maize kernel. En Dudley, J.W. (ed.), *Seventy generations for oil y protein in maize*. Crop Sci. Soc. of Am., Madison, Wis.
- Dudley, J.W., Lambert, R.J. and de la Roche (1977) Genetic analysis of corn strains divergently selected for percent oil y protein. *Crop Sci.* 17: 111-117.
- Eberhart, S.A., Debela, S. and Hallauer, A.R. (1973) Reciprocal recurrent selection in the BSSS y BSCB1 maize populations y half-sib selection in BSSS. *Crop Sci.* 13: 451-456.
- Eyherabide, G.H. and Hallauer, A.R. (1991). Reciprocal full-sib recurrent selection in maize. I. Direct y indirect responses. *Crop Sci.* 31: 952-959.
- Falconer, D.S. (1981) *Introduction to quantitative genetics*, 2<sup>nd</sup> edn., Longman Inc., New York.
- Fisher, R.A. (1918) Correlations between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Tran. R. Soc. Edin.* 52: 339-433.
- Frank, T.E. and Hallauer, A.R. (1999) Inter- y intrapopulation genetic variances after ten cycles of reciprocal full-sib recurrent selection in the BS10 y BS11 synthetic maize populations. *Maydica* 33: 9-24.
- Frey, K.J. and Holland, J.B. (1999) Nine cycles of recurrent selection for increased groat-oil content in oat. *Crop Sci.* 39: 1636-1641.
- Gardner, C.O. (1961) An evaluation of effects of mass selection y seed irradiation with thermal neutrons on yield of corn. *Crop Sci.* 1: 241-245.
- Griffing, B. (1956). Concepts of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Austr. J. Biol. Sci.* 9:468-493.
- Guzman, P.S., Diers, B.W., Neece, D.J., St. Martin, S.K., LeRoy, A.R., Grau, C.R., Hughes, T.J. and Nelson, R.L. (2007). QTL associated with yield in three backcross-derived populations of soybean. *Crop Sci.* 47:111-122.
- Hahn, V., Blankernborn, K., Schwall, M. and Melchinger, A.E. (1995). Relationships among early European maize inbreds: III. Genetic diversity revealed with RAPD markers and Comparison with RFLP and pedigree data. *Maydica* 40: 299-310.
- Haldane. (1924) A mathematical theory of natural y artificial selection. Part I. *Trans. Cam. Phil. Soc.* 23: 19-41.
- Hallauer, A.R. (1984) Reciprocal full-sib selection in maize. *Crop Sci.* 24: 755-759.
- Hallauer, A.R. and Eberhart, S.A. (1970) Reciprocal full-sib selection. *Crop Sci.* 10: 315-316.
- Helms, T.C., Hallauer, A.R. and Smith, O.S. (1989) Genetic drift y selection evaluated from recurrent selection programs in maize. *Crop Sci.* 29: 602-607.



- Henderson, C.R. (1950) Estimation of genetic parameters. *Ann. Math. Stat.* 21: 309
- Henderson, C.R. (1963) Selection index y expected genetic advance. Pp. 141-163. En: Hanson, W.D. y Robinsin, H.F. (eds.), *Statistical genetics y Plant Breeding*. Publication 982, National Academics of Sciences, National Research Council, Washington DC.
- Henderson, C.R. (1985). Best linear unbiased prediction of non-additive genetic merits in non-inbred populations. *J. Animal Sci.* 60: 111-117.
- Holthaus, J.F. and Lamkey, K.R. (1995a) Population means y genetic variances in selected an unselected Iowa Stiff Stalk synthetic maize populations. *Crop Sci.* 35: 1581-1589.
- Holthaus, J.F. and Lamkey, K.R. (1995b) Response to selection y changes in genetic paramaters for 13 plant y ear traits in two maize recurrent selection programs. *Maydica* 40: 357-370.
- Jefferies, S. P., King, B.J., Barr, A.R., Warner, P., Logue, S.J. et al. (2003). Marker-assisted back-cross introgression of the Yd2 gene conferring resistance to barley yellow dwarf virus in barley. *Plant Breed.* 122: 52-56.
- Johnson, E. S., Wolff, M.F., Wernsman, E.A. and Rufty, R.C. (2002). Marker-assisted selection for resistance to black shank disease in tobacco. *Plant Dis.* 86: 1303-1309.
- Keeratinijakal, V. and Lamkey, K.R. (1993a) Responses to reciprocal recurrent selection in BSSS y BSCB1 maize populations. *Crop Sci.* 33: 73-77.
- Keeratinijakal, V. and Lamkey, K.R. (1993b) Genetic effects associated with reciprocal recurrent selection in BSSS y BSCB1 maize populations. *Crop Sci.* 33: 78-82.
- Kempthorne, O. (1969) *An introduction to Genetic statistics*. The Iowa State University Press, Ames.
- Kraja, A.T. and Dudley, J.W. (2000). QTL analysis of two maize inbred line crosses. *Maydica* 45:1-12.
- Lande, R. and Thompson, R. (1990) Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative genetics. *Genetics* 124: 743-756.
- Lander, E.S. and Bostein, D. (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Laurie, C.C., Chasalow, S.D., LeDeaux, J.R., McCarroll, R., Bush, D., Hauge, B., Lai, C., Lark, D., Rochefort T.R. and Dudley, J.W. (2004) The genetic response to long-term artificial selection for oil concentration in the maize kernel. *Genetics* 168: 2141-2155.
- Leng, E.R. (1962) Selection reversal in strains of corn previously long-term selected for chemical composition. *Crop Sci.* 2: 167-170.
- López-Reynoso, J. de J. and Hallauer, A.R. (1998) Twenty-seven cycles of divergent mass selection for ear length in maize. *Crop Sci.* 38: 1099-1107.
- Lou, Z.W. and Kearsey, M.J. (1992). Interval mapping of quantitative trait loci in an F<sub>2</sub> population. *Heredity* 69:36-242.
- Lübberstedt T., Melchinger, A.E., DuBle, C., Vuylsteke, M., Kuiper, M. (2000). Relationships among early European maize inbreds:IV. Genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD, and pedigree data. *Crop Sci.* 40: 783-791

- Llauradó, M. Moreno-Gonzalez, J. and Arús, P. (1993). Classification of Northern Spanish populations of maize by numerical taxonomy. II. Isozyme variation. *Maydica* 38: 249-258.
- Menz Rademacher, M.A., Hallauer, A.R. and Russell, W.A. (1999) Comparative response of two reciprocal selection methods in BS21 y BS22 maize populations. *Crop Sci.* 39: 89-97.
- Messmer, M.M, Melchinger, A.E., Herrmann, R.G. and Boppenmaier, J. (1993). Relationship among early European maize inbreds. II. Comparison of pedigree and RFLP data. *Crop Sci.* 33: 944-950.
- Miller, P.A. and Rawlings, J.O. (1967) Selection for increasing lint yield y correlated responses in upl y cotton, *Gossypum hirsutum* L. *Crop Sci.* 7: 637-640.
- Moose, S.P., Dudley, J.W. and Rochefort, T.R. (2004) Maize selection passes the century mark: a unique resource for 21<sup>st</sup> century genomics. *Trends in Plant Sci.* 9(7): 358-364.
- Moreau, L., Charcosset, A., Hospital, F. and Gallais, A. (1998). Marker-assisted selection efficiency in populations of finite size. *Genetics* 148: 1353-1365.
- Moreau, L., Charcosset A. and Gallais, A. (2001). Efficiency of marker-assisted selection compared with conventional selection. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* 8: 496-501.
- Moreau, L., Lemarie, S. Charcosset, A. and Gallais, A. (2000). Economic efficiency of one cycle of marker-assisted selection. *Crop Sci.* 40: 329-337.
- Moreno-González, J. (1992). Genetic models to estimate additive and non-additive effects of marker-associated QTL using multiple regression techniques. *Theor. Appl. Genet.* 85:435-444.
- Moreno-González, J. (1993). Efficiency of generations for estimating marker-associated QTL by multiple regression. *Genetics* 135:223-241.
- Moreno-González, J. (1999). Molecular markers and heterosis, pp. 257-268. In Coors. J.C and Pandey S. (eds.). *The genetics and exploitation of Heterosis*, American Society of Agronomy; Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Moreno-González, J. and Grossman, M. (1976) Theoretical modifications of reciprocal recurrent selection. *Genetics* 84: 95-111.
- Moreno-González, J., and Cubero, J.I. (1993) Selection strategies y choice of breeding methods. En: Hayward, M.D, Bosemark, N.O, Romagosa, I. (eds.) *Plant Breeding Principles y Prospects*, Chapman & Hall, London.
- Moreno-González, J., Andres Ares, JL, Alonso Ferro, R. and Campo Ramirez, L. (2004). Genetic and statistical models for estimating genetic parameters of maize resistance to *Fusarium graminearum* Schawabe root rot. *Euphytica* 137:55-61.
- Moreno-González, J., Dudley, J.W. and Lambert, J.R. (1975) A design III study of linkage disequilibrium for percent oil in maize. *Crop Sci.* 15: 840-843.
- Nei, M, and Li, W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273.
- Openshaw, S., Frascaroli, E. (1997). QTL detection and marker-assisted selection for complex traits in maize. in *Proc. 52th Annual Corn and Sorghum Research Conference.*, edited by ASTA, Washington DC.

- Oyervides-Garcia, M. and Hallauer, A.R. (1986) Selection-induced differences among strains of Iowa Stiff Stalk Synthetic maize. *Crop Sci.* 26: 506-511.
- Pejic, I., P. Ajmone-Marsan, M. Morgante, V. Kozumplik, P. Castiglioni, G. Taramino and M. Motto. (1998). Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1248-1255.
- Penny L.H. and Eberhart, S.A. (1971) Twenty years of reciprocal recurrent selection with two synthetic varieties of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 11: 900-903.
- Piper, T.E. and Fehr, W.R. (1987) Yield improvement in a soybean population by utilizing alternative strategies of recurrent selection. *Crop Sci.* 27: 172-178.
- Ragot, M., Biasioli, M., Delbut, M.F., Dell'Orco, A. and Malgarini, L. (1994). Marker-assisted backcrossing: a practical example, pp. 45-56 in A. Bervillé and M. Tersac (ed.). *Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires*. INRA, Montpellier, France.
- Ribaut, J.M. and Hoisington, D. (1998). Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci.* 3: 236-239.
- Robert, V. J. M., West, M.A.L., Inai, S., Caines, A., Arntzen, L. (2001). Marker-assisted introgression of blackmold resistance QTL alleles from wild *Lycopersicon cheesmanii* to cultivated tomato (*L. esculentum*) and evaluation of QTL phenotypic effects. *Mol. Breed.* 8: 217-233.
- Rodriguez, O.A. and Hallauer, R.A. (1988) Effects of recurrent selection in corn populations. *Crop Sci.* 28: 796-800.
- Russell, W.A. and Eberhart, S.A. (1975) Hybrid performance of selected maize lines from reciprocal recurrent y testcross selection program. *Crop Sci.* 15: 1-4.
- Russell, W.A., Blackburn, D.J. and Lamkey, K.R. (1992) Evaluation of modified reciprocal recurrent selection procedure for maize improvement. *Maydica* 37: 61-67.
- Schön, C.C., Utz, H.F., Groh, S., Truberg, B., Openshaw, S. and Melchinger, A.E. (2004). QTL mapping based on resampling in a vast maize testcross experiment confirms the infinitesimal model of quantitative genetics for complex traits. *Genetics* 167: 485-498.
- Senior, M.L., Murphy, J.P., Goodman, M.M. and Stuber, C.W. (1998). Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Sci.* 38: 1088-1098.
- Senior, M.L., Chin, E.C.L., Lee, M., Smith, J.S.C. and Stuber, C.W. (1996). Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GenBank database: map construction. *Crop Sci.* 36: 1676-1683.
- Shen, L., Courtois, B., McNally, K.L., Robin, S. and Li, Z. (2001). Evaluation of near-isogenic lines of rice introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. *Theor. Appl. Genet.* 103: 75-83.
- Smith, J.S.C. (1988). The diversity of U.S. hybrid maize germplasm; isozymic and chromatographic evidence. *Crop Sci.* 28: 63-70.

- Smith, J.S.C., Chin, E.C.L., Shu, H., Smith, O.S., Wall, S.J., Senior, M.L., Mitchell, S.E., Kresovich, S. and Ziegler J. (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays*, L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95: 163-173.
- Smith, J.S.C. and Smith, O.S. (1991). Restriction fragment length polymorphisms can differentiate among U.S. maize hybrids, *Crop Sci.* 31: 893-899.
- Smith, J.S.C., Smith, O.S., Bowen, S.L., Tenborg, R.A. and Wall, S.J. (1991). The description and assessment of distances between inbred lines of maize. III. A revised scheme for the testing of distinctiveness between inbred lines utilizing DNA RFLP's. *Maydica* 36: 213-226.
- Smith, O.S. (1983) Evaluation of recurrent selection in BSSS, BSCB1, y BS13 maize populations. *Crop Sci.* 23: 35-40.
- Smith, O.S., Smith, J.S.C., Bowen, S.L., Tenborg, R.A. and Wall, S.J. (1990). Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, grain yield, heterosis and RFLP's. *Theor. Appl. Genet.* 80: 833-840.
- Sneath, P.H.A., and R.R. Sokal. (1973). *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Co. San Francisco, USA.
- Stuber, C.W. and M.M. Goodman. (1983). Allozyme genotypes for popular and historically important lines of corn. *U.S. Agric. Res. Serv. Results, Southern, Ser.*, no.16.
- Stuber, C.W., S.E. Lincoln, D.W. Wolf, T. Helentjaris, and E.S. Lander. (1992). Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132: 823-829.
- Suhroue, J.R and Rochefort, T.R. (1994) Restriction fragment length polymorphism differences among Illinois long-term selection strains. *Theor. Appl. Genet.* 87: 916-924.
- Wang, B., Wu, Y., Guo, W., Zhu, X., Huang, N. and Zhang, T. (2007). QTL analysis and epistasis effects dissection of fiber qualities in an elite cotton hybrid grown in second generation. *Crop Sci* 47:1384-1392.
- Wasson, J.J., Mkelini, V., Bohn, M.O. and Rocheford, T.R. (2008). QTL for fatty acid composition of maize kernel oil IHO \_ B73 backcross-derived lines. *Crop Sci* 48:69-78.
- Wiersma, J.J., Bush, R.H., Fulcher, G.G. and Hareland, G.A. (2001) Recurrent selection for kernel weight in spring wheat. *Crop Sci.* 41: 999-1005.
- Wright, S. (1921) Systems of matings. *Genetics* 6: 111-178.
- Zheng, Z.B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457.
- Zhou, W. C., Kolb, F.L., Bai, G.H., Domier, L.L. and Boze, L.K. (2003). Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breed.* 122: 40-46.

CAPÍTULO **5**

---

**INTERACCIÓN  
GENOTIPO  
POR AMBIENTE**

*Ignacio Romagosa*

*Jordi Voltas*

*Marcos Malosetti*

*Fred A. van Eeuwijk*



## INTERACCIÓN GENOTIPO POR AMBIENTE

---

Ignacio Romagosa<sup>1</sup>, Jordi Voltas<sup>2</sup>, Marcos Malosetti<sup>3</sup> y Fred A. van Eeuwijk<sup>4</sup>

**1 Centre UdL-IRTA, Universidad de Lleida, Lleida. [iromagosa@pvcf.udl.es](mailto:iromagosa@pvcf.udl.es)**

**2 Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària, Universidad de Lleida, Lleida. [jvoltas@pvcf.udl.es](mailto:jvoltas@pvcf.udl.es)**

**3 Wageningen University, Biometris, Department of Plant Sciences, P.O. Box 100, 6700 AC Wageningen The Netherlands. [marcos.malosetti@wur.nl](mailto:marcos.malosetti@wur.nl)**

**4 Wageningen University, Biometris, Department of Plant Sciences, P.O. Box 100, 6700 AC Wageningen The Netherlands. [fred.vaneeuwijk@wur.nl](mailto:fred.vaneeuwijk@wur.nl)**

---

### 5.1. INTRODUCCIÓN

Un objetivo central a todos los programas de mejora es la evaluación de la respuesta fenotípica, en términos generalmente del rendimiento de un conjunto de variedades o líneas de mejora avanzadas, a un rango amplio de condiciones agroecológicas. Para ello los mejoradores llevan a cabo ensayos en múltiples localidades y/o durante varios años (ensayos multiambiente, EMA). En estos ensayos se evalúan un conjunto de genotipos en una muestra de condiciones ambientales que representan lo mejor posible la región donde dichos genotipos pueden cultivarse comercialmente. El objetivo final de los EMA puede consistir en identificar las variedades que presentan un rendimiento superior en todo el rango de ambientes, es decir, que muestran adaptación amplia, o bien identificar aquellas variedades que muestran alta producción en un subconjunto específico de ambientes, es decir, que presentan adaptación específica a estos ambientes. Estos ensayos consumen una parte importante de los recursos disponibles en un programa de mejora.

El análisis de las medias de  $g$  genotipos en un conjunto de  $e$  ambientes a partir de tablas bidimensionales (es decir, de doble entrada y generalmente completas) permite identificar fácilmente la presencia de interacción genotipo por ambiente (GE, por sus iniciales en inglés "Genotype by Environment Interaction"). El fenómeno de GE ocurre cuando, de un modo análogo a cualquier otro experimento factorial, las diferencias entre genotipos dependen del ambiente en que éstos se ensayan. La presencia de GE supone un importante reto para el mejorador en tanto que, por un lado, reduce el avance genético de los programas al disminuir la correspondencia genotipo – fenotipo, si bien también permite identificar nichos ecológicos para los que ciertos genotipos pueden presentar adaptación específica.

El estudio de GE es, junto con el diseño de experimentos, una de las áreas de la estadística aplicada más extensamente estudiada en el contexto de la mejora vegetal, (consultar, por ejemplo, Anicchiario (2002), Cooper y Hammer (1996), Fox et al. (1997), Gauch (1992), Kang (1990, 1998), Kang y Gauch (1996), Kempton y Fox (1997), Romagosa y Fox (1993), van Eeuwijk (1996, 2006), van Eeuwijk et al. (1996, 2001, 2002, 2005, 2007), Voltas et al. (2002)). Hasta no hace mucho tiempo, el análisis de GE se centraba en el análisis del comportamiento genotípico en un conjunto de ambientes a partir de tablas bidimensionales generalmente completas de las medias de  $g$  genotipos en  $e$  ambientes. Los análisis realizados describían *a posteriori* los comportamientos genotípicos sin proporcionar una base fisiológica o genética alguna a sus respuestas diferenciales frente a distintos ambientes. Actualmente, la relativa facilidad con la que es posible disponer de información detallada de variables edafoclimáticas descriptoras de los ambientes de ensayo permite integrar esa información, por ejemplo, en modelos estadísticos que incorporen una interpretación ambiental de la interacción GE. Por otro lado, y de modo creciente, existen herramientas de genotipado masivo económicamente asequibles para la mayoría de programas de mejora. Un ejemplo de éstas en el ámbito de los cereales de invierno y de muchos otros cultivos puede ser la tecnología DArT® ([www.diversityarrays.com](http://www.diversityarrays.com)), que presenta un coste por genotipo no muy superior al de una parcela individual de ensayo. En este contexto, se están destinando esfuerzos a tratar de incorporar información externa, ambiental y/o genética, a los modelos clásicos empíricos (*a posteriori*) que permita dilucidar los factores agroecológicos o genéticos responsables de GE.

Una publicación fundamental para comprender el uso integrado de variables fenotípicas, genéticas y fisiológicas en mejora vegetal es el texto editado por Cooper y Hammer (1996). En la actualidad disponemos de herramientas estadísticas que incorporan estas fuentes de información diversa en modelos, generalmente lineales, más o menos complejos y que permiten estimar parámetros con un significado fisiológico o genético más directo, presentando, por tanto, mayor utilidad en programas aplicados de mejora. En este sentido, los datos disponibles determinan el tipo de análisis que puede llevarse a cabo y, como consecuencia, la naturaleza de sus resultados: desde la estructura más sencilla de EMA, que se limita a registrar valores fenotípicos de interés en forma de variables paramétricas como el rendimiento, sus componentes o la fenología del cultivo, u otras no paramétricas como medidas cualitativas del desarrollo inicial o de resistencia/susceptibilidad a estreses bióticos o abióticos, hasta modelos más complejos que integran todo tipo de información disponible de naturaleza fenotípica, ambiental y genética, proporcionando así un análisis más profundo de la naturaleza de GE y facilitando el diseño de nuevas estrategias aplicadas de mejora.

Este capítulo seguirá la estructura definida por la Tabla 5.1 y desarrollada en van Eeuwijk et al. (2005) y Romagosa et al. (2008). Dado que este libro se dirige fundamentalmente a mejoradores aplicados y pretende tener un claro componente práctico, nos centraremos en modelos sencillos de análisis de varianza y de regresión, sin introducir en profundidad el desarrollo de modelos mixtos (por ejemplo, Piepho (1997, 2000), Verbyla et al. (2003), Piepho y Pillen (2004), Malosetti et al.) (2004, 2007), Smith et al. (2005), Boer et al. (2007). Este tipo de modelos son indudablemente más potentes, pero conceptualmente más complejos y, por tanto, de mayor dificultad en su aplicabilidad práctica. En este capítulo sólo se introducirán cuando sean realmente necesarios y en todo caso centrándonos en el desarrollo de modelos para los valores esperados, con objeto de obtener estimaciones no sesgadas de los diferentes efectos fijos. Los modelos mixtos también permiten caracterizar la variabilidad asociada a sus efectos aleatorios mediante la modelización de sus varianzas-covarianzas. Si bien este último aspecto está fuera de los objetivos aquí planteados, cabe señalar que representa un instrumento adicional muy potente en el análisis de GE y que redundará en una mayor precisión de los estimadores definidos por el modelo.



Después de cada uno de los procedimientos se incorporarán, a modo de ejemplo y siempre que sea posible, las instrucciones necesarias para su análisis empleando los programas SAS/STAT (SAS Institute Inc. 2004) y/o GenStat (Payne et al. 2006).

**Tabla 5.1.** Tipos de modelos disponibles para el análisis de GE en función de los datos disponibles y resultado

Datos necesarios para el análisis	Tipo general de modelo	Modelo específicos	Información básica que proporciona	Apartado
(1): Valores fenotípicos de <i>g</i> genotipos en <i>e</i> ambientes	Modelos básicos	Modelo aditivo de cada genotipo	Rendimientos medios	5.2.1
		Modelo lineal completo	Efectos principales e interacciones GxE para cada genotipo y ambiente	5.2.2
		Agrupamiento de G y E	Grupos de genotipos que se comportan de una forma análoga en un conjunto de ambientes	5.2.3
	Modelos Lineales –Bilineales básicos	Finlay y Wilkinson	Sensibilidad varietal (pendiente de una recta) a cambios en la productividad media de cada ambiente	5.2.4
		AMMI	Proporciona el mejor índice ambiental teórico para el que las sensibilidades genotípicas presentan variación máxima y que conjuntamente mejor explican GE.	5.2.5
		GGE	Permite identificar el genotipo más productivo en un conjunto de ambientes determinado o mega-ambiente.	5.2.5
(1)+ Caracterización ambiental	Modelos que incluyen covariables ambientales	Regresión factorial	Sensibilidad varietal a cambios en variables ambientales	5.3
(1) + Caracterización	Modelos que incluyen covariables genotípica (por ejemplo marcadores moleculares)	Regresión factorial genotípica genéticas	Marcadores asociados a loci de caracteres cuantitativos (QTL, Trait Loci) que presentan una respuesta común (efectos principales) o específica (QTLxE) a cada ambiente	5.4
(1)+Caracterización ambiental y genotípica	Modelos que integran covariables ambientales y genéticas	Regresión factorial genotípica y ambiental	Sensibilidad de cada QTL (generalmente en forma de pendiente de una recta) a variables ambientales	5.5

Para facilitar la comprensión de los distintos modelos a lo largo del capítulo se incorporarán progresivamente ejemplos de análisis de datos de EMA en cebada (*Hordeum vulgare* L.) llevados a cabo por los autores y ya publicados. Si se desean conocer con más detalle los experimentos originales, éstos pueden consultarse en la literatura.

## 5.2. ANÁLISIS DE TABLAS BIDIMENSIONALES COMPLETAS GE

### 5.2.1. Modelo de efectos principales

El modelo más sencillo para describir el comportamiento de un genotipo en un conjunto de ambientes es el modelo aditivo, que sólo incluye efectos principales; es decir, aquél en el que la respuesta fenotípica esperada del genotipo  $i$  ( $i = 1 \dots I$ ) en el ambiente  $j$  ( $j = 1 \dots J$ ),  $\mu_{ij}$ , viene definida por:

$$\mu_{ij} = \mu + G_i + E_j$$

donde  $\mu$  representa la media general,  $G_i$  es el efecto principal genotípico expresado como desviación de la media general y  $E_j$  es el efecto principal ambiental también expresado como desviación respecto a la media general. Para tablas completas, el estimador del efecto principal correspondiente al genotipo  $i$  es directamente el promedio de las observaciones de este genotipo en todos los ambientes tras sustracción de la media general. Análogamente, el estimador del efecto principal para el ambiente  $j$  es la media de todas las observaciones genotípicas en este ambiente corregida por la media general.

El ajuste de este modelo mediante SAS y GenStat emplea las instrucciones que aparecen en el siguiente recuadro. En negrita aparecen los términos específicos que deben incorporarse para un análisis particular. Asimismo, en cursiva aparecen los factores discretos (en nuestro ejemplo, se denominan genotipo y ambiente) y en mayúscula la variable continua objeto del análisis (en nuestro caso,  $Y$ ). Tradicionalmente, y así se recoge en este y en los siguientes programas, en el análisis de varianza de EMA, a diferencia del modelo anterior, se incluye antes el término ambiente que el genotipo.

SAS	<pre>proc GLM; class <b>genotipo ambiente</b>; model <b>Y = ambiente genotipo</b>; run;</pre>
GenStat	<pre>MODEL <b>Y</b> FIT [PRINT=accumulated] <b>ambiente + genotipo</b></pre>

El modelo de efectos principales es una versión muy simplificada de la realidad, ya que supone que todos los genotipos responden del mismo modo a los cambios ambientales, ignorando las interacciones GE que generalmente dominan los EMA. De cualquier manera resulta útil como base de comparación con modelos más complejos.

### 5.2.2. Modelo interactivo completo

En presencia de GE, las medias genotípicas no son la mejor representación para caracterizar el comportamiento de los genotipos ensayados. En ese caso, un modelo más realista debe considerar las reacciones diferenciales de los genotipos frente a cambios en las condiciones de ensayo, por ejemplo empleando el siguiente modelo lineal:

$$\mu_{ij} = \mu + G_i + E_j + (GE)_{ij}$$

A diferencia del modelo de efectos principales, este modelo agrega un parámetro para cada combinación de genotipo y de ambiente dando mayor flexibilidad al modelo para describir el comportamiento del genotipo  $i$  en el ambiente  $j$ . Asimismo, está claro que no permite predecir el comportamiento del genotipo  $i$  en un ambiente  $j$  en el que éste no ha sido ensayado, ya que en ese caso no es posible estimar el término particular  $(GE)_{ij}$ . Este modelo resulta útil para estimar la importancia relativa de cada término en base a la magnitud de su suma de cuadrados o su correspondiente  $R^2$  parcial o en base al componente de varianza estimable cuando para este fin consideremos aleatorios algunos de los términos  $G$ ,  $E$  y  $GE$ .

En SAS y GenStat se utilizarían las siguientes instrucciones que, cuando el origen de los datos sea una tabla de medias, generarán una salida del programa en la que el término de la interacción  $GE$  correspondería al error general:

---

SAS	<pre> * Modelo fijo: partición de suma de cuadrados en el análisis de varianza ; proc GLM; class <b>genotipo ambiente</b>; model <b>Y= ambiente genotipo</b>; run; * Modelo aleatorio: estimación de componentes de varianza; proc MIXED CL; class <b>genotipo ambiente</b>; model <b>Y=</b>; random <b>ambiente genotipo</b>; run;</pre>
GenStat	<pre> \ Modelo fijo: partición de suma de cuadrados en el análisis de varianza MODEL <b>Y</b> FIT [PRINT=accumulated] <b>ambiente + genotipo</b> \ Modelo aleatorio: estimación de componentes de varianza VCOMPONENTS RANDOM= <b>ambiente + genotipo</b> REML <b>Y</b></pre>

---

### 5.2.3. Modelo reducido. Agrupamiento de ambientes y de genotipos

Una mejora potencialmente muy importante del modelo completo puede conseguirse agrupando genotipos y ambientes de modo que la interacción entre grupos sea la mayor posible, minimizando las interacciones que puedan existir dentro de cada uno de estos grupos. Si fuera posible identificar grupos de genotipos ( $GG$ ) y de ambientes ( $EG$ ) con una base agronómica, éstos podrían ser utilizados en un modelo reducido de gran utilidad para explicar  $GE$ , diferenciando el comportamiento de los genotipos entre y dentro de cada grupo de ambientes.

La respuesta fenotípica esperada para el genotipo  $i$  ( $i = 1 \dots I$ ) que pertenece al agrupamiento genotípico identificado como  $GG_k$  ( $k = 1 \dots K$  y  $K < I$ ) en el ambiente  $j$  ( $j = 1 \dots J$ ), que a su vez pertenece al agrupamiento de ambientes  $EG_l$  ( $l = 1 \dots L$ ;  $L < J$ ),  $\mu_{i(j)k(l)}$ , puede ser representada por la ecuación siguiente, en la que cada término entre corchetes refleja una partición ortogonal de  $G$ ,  $E$  y  $GE$ .

$$\mu_{i(j)k(l)} = \mu + [GG_k + G'_{i(k)}] + [EG_l + E'_{j(l)}] + [(GG.EG)_{kl} + (GE)'_{i(k)j(l)}]$$

donde  $\mu$  representa la media general;  $GG_k$  es el efecto principal del agrupamiento genotípico  $k$  expresado como desviación de la media general;  $G'_{i(k)}$  es la desviación de la media del genotipo  $i$  del promedio de su agrupamiento genotípico  $GG_k$ . Análogamente,  $EG_l$  representa el efecto principal del agrupamiento ambiental  $l$  expresado como desviación respecto a la media general;  $E'_{j(l)}$  denota la desviación del ambiente  $j$  respecto a la media del grupo ambiental al que pertenece.  $(GG.EG)_{kl}$  es el componente de la interacción que estima la desviación respecto al modelo aditivo de la combinación del grupo genotípico  $k$  y el grupo ambiental  $l$ . El objetivo de definir estas agrupaciones es lograr que la parte de la interacción explicada por el término  $(GG.EG)_{kl}$  sea importante en relación con el residuo  $(GE)'_{i(k)j(l)}$

Existen distintas estrategias para definir los grupos  $GG_k$  y  $EG_l$ ; por ejemplo, mediante el empleo de variables independientes de la variable fenotípica de interés tales como una clasificación climática de los ambientes de ensayo o tipo u origen de las variedades ensayadas. También se puede utilizar el valor de la propia variable de análisis como criterio de clasificación (por ejemplo, ver Romagosa y Fox, 1993, o Fox et al., 1997). Corsten y Denis (1990) definieron un método particularmente útil para identificar un número potencialmente reducido de grupos de genotipos y de ambientes con similares comportamientos. El método se basa en ir agrupando genotipos y ambientes de manera que la mayor parte de la interacción  $GE$  sea explicada entre grupos de genotipos y de ambientes, minimizando la interacción  $GE$  residual. Para ello en un primer paso se lleva a cabo de un modo sistemático  $C_2^g \times C_2^e$  análisis de varianzas distintos considerando cada una de las posibles combinaciones entre dos ambientes y dos genotipos como pertenecientes a un mismo grupo genético o ambiental. Los dos genotipos y los dos ambientes cuya agrupación se traduzca en una interacción  $GE$  mínima se identifican como pertenecientes a una misma categoría genética y ambiental. Una vez agrupados estos dos genotipos y ambientes se vuelve a iniciar el procedimiento considerando como de una misma categoría a los genotipos y ambientes seleccionados en la etapa anterior. El proceso finaliza cuando se unen todos los genotipos y todos los ambientes en un único agrupamiento genotípico y en otro ambiental. Es posible llevar a cabo una prueba estadística de la bondad de los distintos agrupamientos utilizando un estimador del error intra ambiente o los cuadrados medios de los residuos no explicados por los distintos grupos.

Si bien este proceso es conceptualmente simple, su implementación práctica en paquetes estadísticos estándar tipo SAS o GenStat no es sencilla. Afortunadamente, entre los programas producidos por Biometris para GenStat ([www.biometris.nl](http://www.biometris.nl)) se incluye un procedimiento denominado CINTERACTION, desarrollado por J. Thissen y J. de Bree y que resuelve el algoritmo propuesto por Corsten y Denis (1990). Un procedimiento análogo podría ser eventualmente desarrollado utilizando macros de SAS.

---

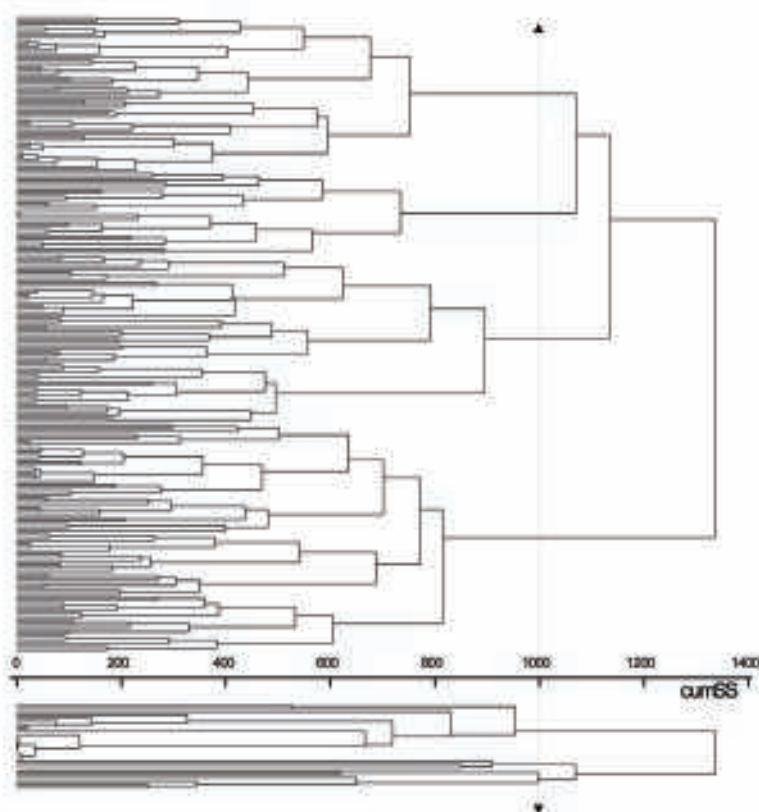
GenStat    *\ generamos una tabla bifactorial genotipo x ambiente que denominamos **ge***  
           *TABULATE [class=**genotipo, ambiente**] Y; MEANS=**ge***  
           *\ se identifica aproximadamente la varianza del error (en este caso 0.15) y el número*  
           *\ de grados de libertad del error, si no se puede dejar en blanco*  
           *CINTERACTION [VARIANCE=0.15; DF=500] **ge***

---

La Figura 5.1 presenta un ejemplo de dendrograma generado por el procedimiento CINTERACTION de GenStat para 192 genotipos de cebada (parte superior de la figura) evaluados en 26 ambientes de la región mediterránea (Psawarayi et al., 2008). En el eje horizontal se muestra la suma de cuadrados de la interacción  $GE$  que, de un modo acumulativo, queda retenida en cada

una de las distintas etapas del agrupamiento hasta alcanzar el valor total aproximado de 1350. La flecha vertical identifica, por ejemplo, cuatro agrupamientos genotípicos y tres ambientales que con tan sólo seis grados de libertad,  $(4-1)*(3-1)=6$ , frente a los 4774 grados de libertad de la interacción, explican aproximadamente una suma de cuadrados de  $1350-1000=350$ , o sea un 25 % del total de la suma de cuadrados de GE.

Para evaluar si estos agrupamientos son estadísticamente relevantes para explicar los efectos principales G, E y su interacción podemos utilizar pruebas F en las que los cuadrados medios de los términos  $GG_k$ ,  $EG_l$  y  $(GG.EG)_{kl}$  son contrastados con los cuadrados medios de los residuos  $G'_{i(k)}$ ,  $E'_{j(l)}$  y  $(GE)'_{i(k)j(l)}$ . Hay que señalar que dado que los agrupamientos se han generado *a posteriori* a partir de la propia variable dependiente objeto del análisis, estas pruebas F pueden tener valores *p* inferiores a los que cabría esperar si los agrupamientos se hubieran realizado en base a variables independientes externas. Sin embargo, en la medida que los grupos generados presenten cierta relación con características agroecológicas conocidas, este tipo de análisis puede ser de gran utilidad para interpretar GE.



**Figura 5.1.** Dendrograma producido por el procedimiento CINTERACTION de GenStat que genera agrupamientos de acuerdo a Corsten y Denis (1990) para un EMA de 192 genotipos de cebada en 26 ambientes mediterráneos. La línea discontinua vertical identifica cuatro agrupamientos genotípicos, parte superior, y tres ambientales que con  $(4-1)*(3-1) = 6$  grados de libertad explican aproximadamente un 25 % de GE.

Una vez identificados los grupos genotípicos (gg) y ambientales (ge), la partición de la suma de cuadrados en el análisis de varianza se ejecutaría del siguiente modo:

SAS	<pre>proc GLM; class <b>gg ge genotipo ambiente</b>; model <b>Y = ge ambiente(ge) gg genotipo(gg) ge * gg</b>; run;</pre>
GenStat	<pre>MODEL <b>Y</b> FIT [PRINT=accumulated] <b>ge/ambiente + gg/genotipo + ge.gg</b></pre>

Si más allá de determinar las sumas de cuadrados y los cuadrados medios se quisiera evaluar su significación estadística deberían utilizarse las siguientes instrucciones, que consideran como términos aleatorios del modelo los residuos  $G'_{i(k)}$ ,  $E'_{j(l)}$  y  $(GE)_{i(k)j(l)}$ , siendo éste último, cuando se parte de tablas de medias de genotipos y ambientes, el término correspondiente al error, por lo que no es necesario explicitarlo:

SAS	<pre>proc MIXED; class <b>gg ge genotipo ambiente</b>; model <b>Y = ge gg ge * gg</b>; random <b>ambiente genotipo</b>; run;</pre>
GenStat	<pre>VCOMPONENTS [FIXED = ge + gg + ge * gg] RANDOM = <b>ambiente + genotipo</b> REML [PRINT=model, components, waldTests, means] <b>Y</b></pre>

#### 5.2.4. Estudio de la interacción utilizando la caracterización fenotípica de ambientes

Uno de los métodos estadísticos más usado (y frecuentemente, abusado) en mejora genética es el denominado análisis de Finlay y Wilkinson (1963) (FW), o regresión sobre las medias ambientales. Este modelo describe la respuesta genotípica a cambios ambientales en base a rectas características para cada genotipo, utilizando como variable independiente la media de todos los genotipos en cada localidad. La idea que subyace en este método, y que suele ser muy cuestionable, es que en ausencia de variables ambientales explícitas (por ejemplo, edáficas o meteorológicas) una buena aproximación a la caracterización de un ambiente puede ser el comportamiento fenotípico medio de todos los genotipos ensayados. De este modo, dos genotipos pueden diferir tanto en la ordenada del origen como en la pendiente de sus respuestas frente a cambios, por ejemplo, de rendimiento medio.

Este método presenta un claro inconveniente de partida. Así, dos ambientes pueden tener perfectamente el mismo comportamiento medio pero ser esto debido a causas ecofisiológicas muy distintas, por ejemplo la presencia de una enfermedad fúngica, las consecuencias de una helada, o el impacto de un déficit hídrico intenso, por citar algunos ejemplos. No obstante, el modelo FW presupone que la respuesta de un genotipo en estos ambientes de comportamiento idéntico, es decir, su reacción frente a distintos estreses bióticos o abióticos, va a resultar análoga. Por ello, su empleo debería restringirse al caso en que las diferencias entre comportamientos genotípicos

fueran debidas a la presencia de un gradiente ambiental dominado por cierto estrés específico, y no por combinaciones de estreses. En este caso, sin embargo, cabría preguntarse porqué no utilizar una medida directa del estrés (como de hecho se analizará en el apartado 5.3) en lugar de una medida indirecta como es el comportamiento fenotípico medio.

Es posible transcribir este modelo de dos formas semejantes:

$$\mu_{ij} = \mu + G_i + E_j + \beta_i E_j$$

$$\mu_{ij} = \mu + G_i + E_j + \beta_i E_j = (\mu + G_i) + (1 + \beta_i)E_j = G'_i + \beta'_i E_j$$

Ambos modelos extraen de la interacción del modelo completo  $(GE)_{ij}$  una parte debida a la regresión en la que la variable independiente es la media del ambiente. En la primera ecuación la interacción se aproxima mediante un conjunto de sensibilidades genotípicas a las medias ambientales, representadas por el parámetro  $\beta_i$  cuyo valor promedio es igual a cero. La segunda ecuación permite estimar directamente las pendientes de las rectas,  $\beta'_i$ , de la forma más convencional, con promedio igual a uno. El interés práctico de estos modelos reside en la proporción de GE explicada por  $\beta_i E_j$ , es decir, debidas a diferencias en pendientes genotípicas.

Los programas en SAS y GenStat que permiten partir la suma de cuadrados del análisis de varianza, estimar las pendientes de FW y llevar a cabo una prueba estadística sobre la relevancia del modelo aparecen a continuación. Para ello es necesario disponer de una variable continua (covariable) que contenga la media del comportamiento de cada ensayo denominada en este caso ME. Con objeto de respetar el criterio establecido para identificar variables continuas, ME aparece en las instrucciones siguientes en negrita y mayúsculas, formato que, naturalmente, no es necesario incorporar en las instrucciones reales de los programas ejecutables. En GenStat existe un procedimiento específico, RJOINT, que lleva a cabo tanto la partición del análisis de varianza como la estimación del valor de las pendientes para cada genotipo.

---

SAS	<pre> * para determinar la magnitud de cada término y evaluar la significación del modelo FW frente al residuo GE; proc GLM; class <b>genotipo ambiente</b>; model <b>Y = ambiente genotipo genotipo*ME</b>/ss1; run; * para estimar directamente las pendientes FW con media igual a 1; proc GLM; class <b>genotipo</b>; model <b>Y = genotipo genotipo*ME</b>/solution; run; </pre>
GenStat	<pre> MODEL <b>Y</b> \ para determinar la magnitud de cada término del análisis de varianza; FIT [PRINT=accumulated] <b>ambiente+ genotipo+ genotipo.ME</b> \ para estimar directamente las pendiente de FW con media igual a 1; FIT [PRINT=accumulated, estimates] <b>genotipo+ genotipo.ME</b>  \alternativamente podríamos utilizar directamente las siguientes instrucciones MODEL <b>Y</b> RJOINT ENVIRONMENT = <b>ambiente</b>; VARIETY = <b>genotipo</b> </pre>

---

### 5.2.5. Otros modelos lineales – bilineales: los modelos AMMI y GGE

Los modelos lineales-bilineales (Gabriel, 1978, 1998; van Eeuwijk, 1995a, 1995b; Denis y Gower, 1996; Crossa y Cornelius, 2002) contienen un componente aditivo (lineal) y un componente multiplicativo (bilineal). De hecho, la regresión de Finlay y Wilkinson pertenece a esta familia de modelos, en el que  $G_i + E_j$ , o alternativamente  $G'_i$ , representan la parte lineal y  $\beta_i E_j$  o  $\beta'_i E_j$  el componente multiplicativo o término bilineal del modelo. Estos modelos lineales-bilineales permiten describir GE en términos de sensibilidades genotípicas diferenciales a valores ambientales, sensibilidades que pueden venir determinadas directamente por las medidas fenotípicas registradas en cada ambiente.

Un miembro muy popular de esta familia es el modelo de efectos principales aditivos y de interacción multiplicativa (AMMI, por su sigla en inglés 'Additive Main effects and Multiplicative Interaction') (Gollob, 1968; Mandel 1969; Gabriel 1978; Gauch, 1988). El modelo puede expresarse como:

$$\mu_{ij} = \mu + G_i + E_j + \sum_{k=1}^K a_{ki} b_{kj}$$

donde  $a_{ki}$  y  $b_{kj}$  representan los parámetros genotípico y ambiental, respectivamente, del término bilineal  $k$ , y  $K$  indica el número de términos multiplicativos necesarios para una aproximación adecuada de GE. Los valores ambientales correspondientes al primer término bilineal,  $b_{1j}$ , representan la mejor caracterización ambiental (empírica) posible para describir el término GE. Los valores genotípicos,  $a_{1i}$ , son interpretados como sensibilidades genotípicas a esta primera caracterización ambiental. El segundo término bilineal representa la segunda mejor caracterización ambiental, y así sucesivamente.

La significación estadística de un término bilineal  $k$  puede evaluarse mediante el cociente entre su cuadrados medio, con grados de libertad igual a  $I+J-1-2k$ , y el cuadrado medio del residuo para el modelo de orden  $k$ , con sus correspondientes grados de libertad (Mandel, 1969). Una forma alternativa muy sencilla para establecer el número de términos bilineales a retener consiste en determinar aquéllos que explican un porcentaje mayor que el esperado de acuerdo a la suma de cuadrados de GE. Este valor corresponde a dividir 100% por el mínimo del número de genotipos menos uno o del número de ambientes menos uno. En un ejemplo con 25 genotipos en 10 ambientes, se retendrían aquellos ejes que explicarían más de  $100\% / (10-1) = 11\%$  de la suma de cuadrados de GE.

Desde un punto de vista práctico, el ajuste de este modelo se realiza en dos etapas. En primer lugar, se estiman los efectos aditivos de acuerdo al primero de los modelos descritos en este capítulo (apartado 5.2.1). A continuación, se genera la matriz de la interacción GE como residuo de este modelo lineal simple y se somete a descomposición en valores singulares que permite estimar los parámetros genotípicos y ambientales. Las instrucciones necesarias para ejecutar AMMI en SAS y GenStat aparecen a continuación. En GenStat existe un procedimiento específico denominado AMMI que lleva a cabo tanto el análisis de varianza como la determinación de parámetros genotípicos y ambientales.

No existe ningún procedimiento SAS que directamente nos proporcione estimadores de los parámetros del modelo AMMI. Estos pueden obtenerse a partir de las instrucciones que aparecen a continuación que deben ajustarse para el número de genotipos en los datos originales. Este programa está preparado para un modelo AMMI que conserva cuatro ejes y para un total de 65 variedades que han sido identificadas en la base de datos con los nombres 'geno01' a 'geno65'. Los valores correspondientes a genotipos y ambientes aparecen sin escalar. Para obtener los valores característicos de este modelo habría que multiplicar y dividir los valores genotípicos y ambientales que este programa genera por la raíz cuarta de la suma de cuadrados asociada a cada término multiplicativo AMMI1 a AMMI4, respectivamente. Estas sumas de cuadrado se calculan multiplicando la suma de cuadrados general de GE que aparece como error en el análisis de varianza



por la proporción explicada por cada valor singular, EIGEN, que aparece en la salida del programa SAS a continuación de la tabla del análisis de varianza.

El modelo AMMI puede también puede ejecutarse en SAS empleando SAS/IML (Interactive Matrix Language) (SAS Institute, 1999a) y se puede obtener directamente de Jordi Voltas ([jvoltas@pvcf.udl.es](mailto:jvoltas@pvcf.udl.es)). La salida proporciona tanto la suma de cuadrados asociada a cada término bilineal (a partir del cuadrado de los valores singulares) como los valores genotípicos y ambientales convenientemente escalados.

---

SAS	<pre>proc GLM; class <b>ambiente genotipo</b>; model <b>Y=ambiente genotipo</b>/SS1; output out=resid r=res; DATA residuo; set resid; keep <b>ambiente genotipo</b> res; proc SORT; by <b>ambiente genotipo</b>; proc TRANSPOSE; BY <b>ambiente</b>; ID <b>genotipo</b>; proc PRINCOMP COV PREFIX=IPCA OUT=OUT1 OUTSTAT=OUT2 NOPRINT; proc TRANSPOSE DATA=OUT2 OUT=OUT3; DATA eigen; set OUT2; if _TYPE_ = 'EIGENVAL'; total = sum(of geno01-geno65); eigen1=geno01/total; eigen2=geno02/total; eigen3=geno03/total; eigen4=geno04/total; keep eigen1-eigen4; proc PRINT ; DATA pcageno; set OUT3; keep IPCA1-IPCA4; proc PRINT; DATA pcaenv; set OUT1 ; keep IPCA1-IPCA4; proc PRINT; quit;</pre>
GenStat	<pre>AMMI [PRINT=aovtable,genotype,environment; nroots=4] <b>Y</b>; \ GENOTIPO=<b>genotipo</b>; ENVIRONMENT=<b>ambiente</b></pre>

---

Los valores determinados por el modelo AMMI con dos términos bilineales,  $K=2$ , pueden ser directamente visualizados empleando una gráfica bidimensional, conocida generalmente por la acepción inglesa 'biplot' (Kempton 1984; Fox et al., 1997), en base a dos ejes designados IPCA1 y IPCA2, en el que IPCA ('Interaction Principal Component Axis') hace referencia al término bilineal correspondiente de la interacción.

La interpretación de esta gráfica, en el supuesto que la interacción GE esté adecuadamente explicada por IPCA1 y IPCA2, es muy sencilla y de gran utilidad potencial para describir GE. La posición del genotipo  $i$  en el biplot viene dada por las coordenadas definidas por sus parámetros genotípicos  $(a_{1i}, a_{2i})$  para los dos primeros componentes principales de la interacción; análogamente, el ambiente  $j$  queda definido por los dos primeros parámetros ambientales  $(b_{1j}, b_{2j})$ . Las distancias entre estos puntos y el origen  $(0, 0)$  son proporcionales a la interacción generada por un genotipo en todos los ambientes, o a la interacción detectada en un ambiente dado en relación a todos los genotipos, respectivamente. Genotipos próximos en el biplot presentan patrones de adaptación análogos; ambientes próximos generan interacciones similares.

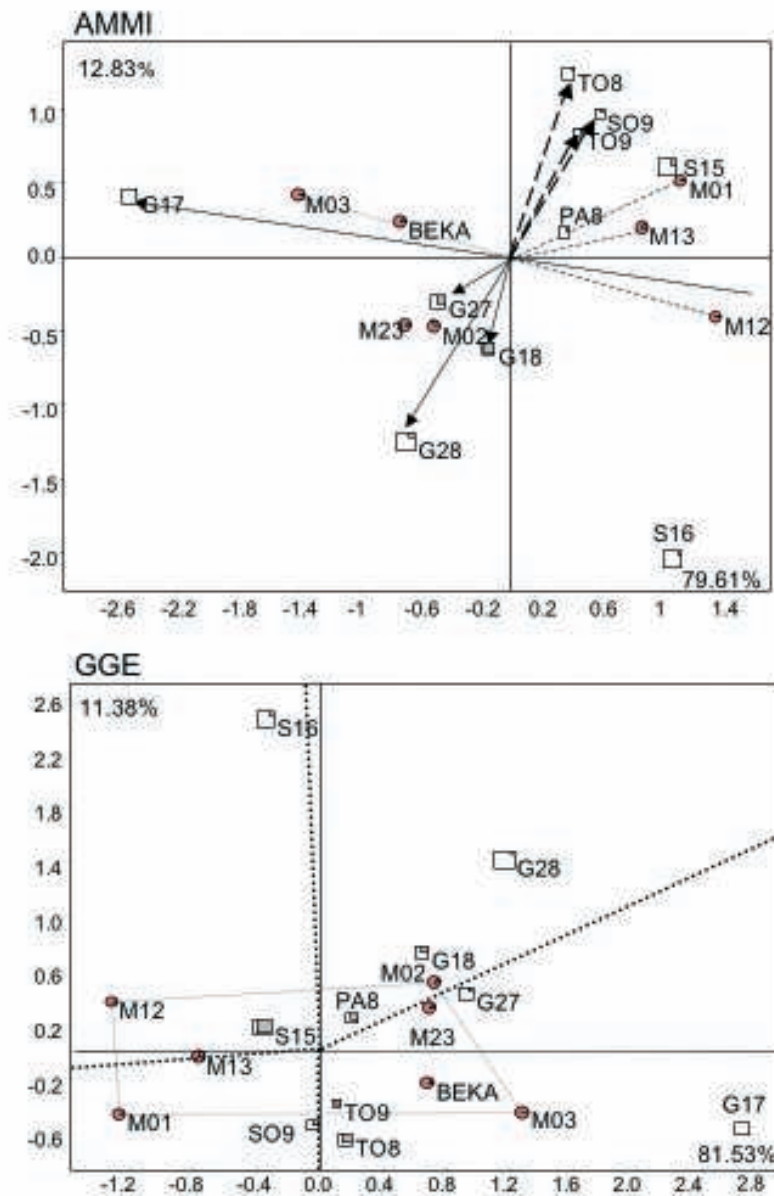
Podemos estimar la interacción del genotipo  $i$  en el ambiente  $j$  mediante la proyección perpendicular del punto generado por las coordenadas genotípicas  $(a_{1i}, a_{2i})$  al vector que une el origen  $(0,0)$  con la coordenada ambiental  $(b_{1j}, b_{2j})$ , o recta que pasa por el origen y que tiene pendiente  $b_{2j}/b_{1j}$ . La distancia de este punto de proyección respecto al origen aporta información sobre

la magnitud de la interacción del genotipo  $i$  en el ambiente  $j$ . La interacción será positiva si la proyección aparece en el sentido marcado por el vector y negativa si aparece en sentido contrario. Análogamente, el coseno del ángulo entre un vector genotípico  $i$  (generado de idéntica forma) y un vector ambiental  $j$  nos indica si genotipo y ambiente interactúan positivamente (cuando los ángulos son agudos), negativamente (si forman ángulos obtusos) o no interactúan (si el ángulo es recto). Dos ambientes cuyos vectores forman un ángulo agudo generan una interacción similar con los distintos genotipos; si el ángulo es obtuso generan interacciones contrarias; y si el ángulo es recto el comportamiento genotípico en uno de ellos es aproximadamente independiente del comportamiento genotípico en el otro.

La Figura 5.2 representa un ejemplo de biplot para un modelo AMMI generado a partir de un conjunto de siete genotipos de cebada. Estos son la variedad Beka, tres mutantes individuales y las tres combinaciones binarias de estos mutantes, que aparecen en la gráfica como círculos, en diez ambientes distintos, identificados mediante cuadrados. El análisis y discusión de estos datos generados por el Dr. José Luis Molina Cano ha aparecido en distintos trabajos (Molina-Cano et al., 1990; Romagosa et al., 1993; Voltas et al., 2002). En este EMA, la interacción GE está muy bien representada por un modelo AMMI con dos ejes, explicando más del 90% de la suma de cuadrados de GE. En el biplot el valor medio del rendimiento de cada ambiente y de cada genotipo es proporcional al área del símbolo que lo representa. Podemos observar que, claramente, existen más diferencias entre medias de rendimiento entre ambientes que entre genotipos. En el interior de cada símbolo aparece una sección de color más oscuro, y generalmente pequeña, que representa la proporción de suma de cuadrados no explicada por este modelo. Estas secciones son muy pequeñas para todos los ambientes, excepto G27 y G18, cuyos comportamientos no están correctamente representados en este biplot. Todos los genotipos parecen convenientemente descritos en esta gráfica. Beka es el genotipo que se encuentra más próximo al origen, por lo que es el que menos interactúa con los diez ambientes; por el contrario, los genotipos más interactivos son M12 y M03. Las localidades que generan más interacción GE, es decir, aquéllas en las que los rendimientos genotípicos se alejan más de las medias generales, son G17 y S16. Por el contrario la localidad palentina PA8, por ser la más próxima al origen, es la que presenta rendimientos genotípicos más próximos a las medias genotípicas de los diez ambientes.

En base a la posición relativa de genotipos y ambientes es posible inferir que el primer eje representa el comportamiento diferencial de los portadores de la primera mutación (M01, M12 y M13 con valores positivos, respecto al resto con valores negativos) que parecen estar peor adaptados a Granada (G en el biplot) que al resto de ambientes. El segundo eje, cuantitativamente mucho menos importante, parece asociado al mutante 2 (M02, M12 y M23 presentan valores negativos, el resto positivos), cuya adaptación específica a ciertos ambientes no parece tan clara como en el primer mutante. Si se observa el ángulo entre vectores ambientales puede inferirse que el comportamiento de los genotipos en las dos localidades de Toledo (T08 y T09) es muy similar en los dos años y muy parecido al de Soria (S08), ángulos todos ellos muy agudos. Sin embargo, T09 presenta un rendimiento medio, área del cuadrado, menor al de los otros dos ambientes. Si se comparan estos tres vectores ambientales con el determinado por G28 los ángulos que aparecen son próximos a  $180^\circ$  y sus cosenos aproximadamente igual a menos uno, con lo que se infiere que los genotipos que interactúan positivamente en G28 lo hacen negativamente en estas tres localidades, y viceversa. Si se observan, por ejemplo, las proyecciones de los genotipos sobre el vector ambiental G17 se concluye que M03 demuestra una buena adaptación específica a dicho ambiente, todo lo contrario que M12.

Es importante tener presente que la caracterización ambiental generada en este tipo de modelos se deriva de un criterio meramente estadístico y puede no tener ningún significado agroecológico. Sin embargo, para intentar dilucidar las razones que subyacen detrás de estas relaciones es posible correlacionar los valores ambientales para cada eje interactivo,  $IPCA_k$ , con medidas ambientales directas, como variables edáficas o meteorológicas (Vargas et al., 1999; Voltas et al., 1999a, 1999b, 2002).



**Figura 5.2.** Biplot para los modelos AMMI y GGE del rendimiento de siete genotipos de cebada (la variedad Beka y seis mutantes) en diez ambientes españoles distintos (Molina-Cano et al., 1990; Romagosa et al., 1993; Voltas et al., 2002).

Otro componente de la familia de modelos lineales-bilineales muy próximo al AMMI es el modelo de efectos principales ambientales y multiplicativo G + GE, denominado modelo GGE (Yan et al., 2000; Yan & Kang 2003). Este modelo es análogo al AMMI, pero la descomposición en valores singulares se lleva a cabo en la matriz G+GE, es decir, la matriz original a la cual se han sustraído únicamente las medias ambientales (matriz centrada por los valores ambientales). En un modelo AMMI, por el contrario, la descomposición en valores singulares se lleva a cabo en la matriz de residuos (valores originales a los que se han sustraído tanto las medias genotípicas como ambientales). El modelo correspondiente a GGE es el siguiente:

$$\mu_{ij} = \mu + E_j + \sum_{k=1}^K a_{ki} b_{kj}$$

El biplot del modelo GGE (Yan et al., 2001) aporta una información adicional de gran interés para los mejoradores al permitir identificar gráficamente el mejor genotipo en cada ambiente. Para ello es necesario unir los genotipos más extremos en el biplot formando un polígono irregular que encierre a los restantes. En el ejemplo anterior, este polígono es un cuadrilátero irregular definido por M12, M02, M03 y M01 y que encierra a la variedad original Beka y a los mutantes M13 y M23 (Figura 5.2). A continuación se trazan líneas perpendiculares por el origen a los lados del polígono (líneas de puntos de trazo grueso en el biplot GGE de la Figura 5.2). Los ambientes que se encuentran en los sectores así definidos constituyen grupos de ambientes, o megaambientes, en los que la recomendación genotípica es relativamente uniforme. Los mejores genotipos ('winning genotypes') en estos agrupamientos ambientales son los que aparecen en los vértices del polígono. Por ejemplo, M12 es el genotipo 'ganador' en el grupo de ambientes definidos por S15 y, particularmente, S16. El mutante M02 es el más productivo en el grupo de ambientes determinados por G18 y G28. La variedad original Beka no parece ser la mejor en ninguno de estos agrupamientos ambientales. Naturalmente, estas interpretaciones están sujetas a la condición, como ocurre en este ejemplo, de que la mayor parte de GGE esté explicada por los dos primeros ejes del modelo.

El modelo GGE puede ejecutarse en SAS de un modo análogo al AMMI, de acuerdo a las instrucciones que aparecen en la tabla siguiente en las que sólo se ha eliminado el término genotipo en las instrucciones *class* y *model* del *proc GLM* que aparece en la primera fila. A diferencia del AMMI, no existe un procedimiento específico en GenStat para GGE. Si consideramos un ejemplo en el que además de los 65 genotipos (geno01 a geno65) tuviéramos 12 ambientes (amb01-amb12) en un formato de tabla genotipo x ambiente mediante un conjunto de 12 vectores ambientales que representan las medias de cada uno de los 65 genotipo en cada ambiente, las instrucciones necesarias para determinar en GenStat los dos primeros ejes también en formato sin escalar, serían:

---

SAS	<pre> proc GLM; class <b>ambiente</b>; model <b>Y=ambiente</b> /SS1; output out=resid r=res; DATA residuo; set resid; keep <b>ambiente genotipo</b> res; proc SORT; by <b>ambiente genotipo</b>; proc TRANSPOSE; BY ambiente; ID genotipo; proc PRINCOMP COV PREFIX=IPCA OUT=OUT1 OUTSTAT=OUT2 NOPRINT; proc TRANSPOSE DATA=OUT2 OUT=OUT3; DATA eigen; set OUT2; if _TYPE_ = 'EIGENVAL'; total = sum(of geno01-geno65); eigen1=geno01/total; eigen2=geno02/total; eigen3=geno03/total; eigen4=geno04/total; keep eigen1-eigen4; proc PRINT; DATA pcageno; set OUT3; keep IPCA1-IPCA4; proc PRINT; DATA pcaenv; set OUT1 ; keep IPCA1-IPCA4; proc PRINT; quit; </pre>
GenStat	<pre> \ Asumiendo los datos en una tabla de doble entrada (genotipos x ambiente) BIPLOT [PRINT=singular,scores; STANDARDIZE=centre; METHOD=principal] \ !p(amb01,amb02,amb03,amb04,amb05,amb06,amb07,amb08,amb09,amb10,amb11,amb12) </pre>

---

Existe un cierto debate sobre la superioridad predictiva de uno u otro modelo multiplicativo (GGE o AMMI) para estimar el comportamiento de un genotipo en un ambiente determinado (Gauch 2006, Yan et al., 2007), si bien ambos proporcionan gráficos ('biplots') complementarios muy útiles que permiten explorar fácilmente las relaciones entre G y E. Mientras que los biplots AMMI se concentran en la descripción de la interacción (o desviaciones respecto al modelo aditivo), los biplots GGE son más sencillos de interpretar ya que representan simultáneamente tanto la parte aditiva G como la interacción GE, siendo de mayor interés general en programas de mejora y en ensayos de recomendación varietal.

### 5.3. MODELOS QUE INCLUYEN COVARIABLES AMBIENTALES EXPLÍCITAS. REGRESIÓN FACTORIAL

Todos los modelos anteriores, pese a basarse exclusivamente en respuestas observadas (por ejemplo, rendimientos) y no presentar base agroecológica alguna, facilitan el análisis *a posteriori* o empírico de la interacción GE presente en EMA. Como hemos comentado en relación al modelo AMMI, también nos permiten profundizar en la naturaleza de la interacción mediante la búsqueda de relaciones entre los valores ambientales obtenidos, como por ejemplo, pendientes de FW o ejes de los modelos AMMI o GGE, y distintas variables ambientales explícitas. El objetivo de la regresión factorial consiste en ir un paso más lejos e incorporar directamente estas variables ambientales explícitas en modelos lineales-bilineales. Por ejemplo, supongamos que se desea caracterizar la respuesta de un conjunto de variedades a la temperatura media de cada ambiente a lo largo del periodo de cultivo,  $T_j$ . Con objeto de incorporar dicha respuesta de acuerdo a un modelo lineal simple de primer grado podría emplearse el siguiente modelo lineal-bilineal:

$$\mu_{ij} = \mu + G_i + E_j + \beta_i T_j$$

donde  $G_i$  y  $E_j$  representan la parte aditiva del modelo y  $\beta_i T_j$  la multiplicativa, y en la que  $\beta_i$  expresa la sensibilidad diferencial del genotipo  $i$  frente a cambios en la temperatura media de cada localidad. En la medida que la suma de cuadrados asociada al término  $\beta_i T_j$  sea importante en relación al total del término de interacción,  $(GE)_{ij}$ , GE podrá interpretarse convenientemente en base a sensibilidades genotípicas diferenciales a esta variable ambiental.

De un modo análogo a la regresión de Finlay y Wilkinson, los estimadores de las sensibilidades genotípicas  $\beta_i$  correspondientes a la ecuación anterior no representan magnitudes absolutas sino que expresan valores diferenciales con media cero. Si queremos determinar los valores absolutos de las sensibilidades genotípicas debemos emplear la ecuación:

$$\mu_{ij} = G'_i + \beta'_i T_j$$

Los modelos que explican la interacción GE en base a sensibilidades genotípicas frente a cambios en variables ambientales explícitas pertenecen a la clase de modelos de regresión factorial (Denis, 1988; van Eeuwijk et al., 1995, 1996) Conceptualmente pueden extenderse a más de una variable explícita independiente y a curvas de respuesta complejas. Por ejemplo, si deseamos incorporar dos variables distintas  $z_{1j}$  (precipitación total) y  $z_{2j}$  (número de días con temperaturas superiores a 35°C en cierta fase del cultivo) de acuerdo a un modelo de segundo grado, un posible modelo resultante sería:

$$\mu_{ij} = \mu + G_i + E_j + \beta_{1i} z_{1j} + \beta_{2i} z_{2j} + \beta_{3i} z_{2j}^2$$

Las instrucciones necesarias para ajustar un modelo factorial para una única variable explícita ambiental, que denominamos VEA, son análogas a las del modelo de regresión de Finlay y Wilkinson, y aparecen reflejadas en la tabla siguiente. En ellas se detallan de forma independiente dos modelos distintos. En el primero es posible determinar, mediante una prueba F, si una variable ambiental es significativa, y estimar las sensibilidades genotípicas de forma diferencial respecto al último genotipo (en SAS) o respecto al primero (GenStat). El segundo modelo permite estimar directamente las sensibilidades genotípicas absolutas frente a cambios en la variable explícita ambiental. Si a estos estimadores les substraemos la media de todos ellos,

obtendríamos las sensibilidades diferenciales de cada uno de ellos. Un ejemplo adicional de ajuste mediante SAS de modelos de regresión factorial que incorporan más de una variable ambiental puede consultarse en Voltas et al. (2005).

SAS	<pre> * para determinar si la variable ambiental es significativa frente al residuo GE y para estimar las sensibilidades genotípicas diferenciales, respecto al último genotipo ; proc GLM; class <b>genotipo ambiente</b>; model <b>Y = ambiente genotipo genotipo*VEA</b>/SS1 solution; run; * para estimar directamente las sensibilidades genotípicas absolutas; proc GLM; class <i>genotipo</i>; model <b>Y = genotipo genotipo*VEA</b>/solution; run; </pre>
GenStat	<pre> model <b>Y</b> \ para determinar si la variable ambiental es significativa en explicar GE y \ para estimar las sensibilidades genotípicas diferenciales, respecto al primer genotipo ; FIT [print=accumulated] <b>ambiente + genotipo + genotipo.VEA</b> \ para estimar las sensibilidades genotípicas absolutas; FIT [print=estimates] <b>genotipo + genotipo.VEA</b> </pre>

Un aspecto importante de la regresión factorial, común a todos los modelos de regresión múltiple, es definir el proceso de selección de variables independientes. El número potencial de variables ambientales puede ser muy elevado y los criterios estrictamente estadísticos no necesariamente conducen a modelos agrónomicamente o fisiológicamente justificables. Por ello, es necesario identificar la mejor manera de describir un ambiente (Cooper y Hammer, 1996), lo que no es trivial, o someter los aspectos estrictamente estadísticos a criterios ecofisiológicos. Voltas et al. (1999 a,b) proporcionan ejemplos de la aplicación de regresión factorial a un EMA de cebada, incorporando dichos criterios en los distintos estados fenológicos. Para ello, seleccionan de acuerdo a un criterio ontogénico secuencial las mejores variables explícitas hasta ahijamiento, después las mejores en encañado y, finalmente, en el período de llenado del grano.

#### 5.4. MODELOS QUE INCLUYEN INFORMACIÓN GENÉTICA

De un modo análogo al apartado anterior en el que se han desarrollado modelos que permiten determinar sensibilidades genotípicas a cambios en variables ambientales explícitas, también es posible incorporar variables genéticas que potencialmente justifiquen las diferencias observadas en los efectos principales, G, o en la interacción GE. Los marcadores moleculares son las (co)variables genéticas que más fácilmente pueden ser utilizadas con este fin, pudiendo representar secuencias anónimas o estar asociados a genes candidatos de función plenamente conocida (Nuez y Carrillo, 2000; Nuez et al., 2004). En estos casos la regresión factorial permite detectar y localizar genes o QTLs (loci de caracteres cuantitativos) asociados a la expresión de efectos principales o de la interacción (Paterson, 1998).

Consideremos, por ejemplo, un marcador codominante con genotipos AA, Aa y aa en una especie diploide. Es posible definir una covariable genética  $x_i$  que presente como valor para el genotipo  $i$  su número de alelos A, es decir 2, 1 o 0 cuando el genotipo para este marcador sea AA, Aa y aa, respectivamente. Si se emplea esta covariable en un modelo de regresión factorial, y



suponiendo que el marcador coincide con un QTL, entonces su pendiente  $\rho$  expresa directamente el efecto de la sustitución del alelo del QTL  $m$  por  $M$ , es decir,  $\rho$  representa directamente el efecto aditivo del QTL. Análogamente, es factible definir una nueva covariable para este mismo locus con valores 0, 1 y 0, cuya pendiente asociada  $\rho'$  permite estimar el efecto dominante asociado a los efectos principales de este QTL.

El modelo de regresión factorial más sencillo que incluye información genética deriva directamente del modelo aditivo simple en el que se subdivide el término  $G_i$  en dos términos, uno de ellos en base a un marcador de efecto aditivo,  $x_i\rho$ , y un segundo como expresión de un residuo genotípico,  $G'_i$  :

$$\mu_{ij} = \mu + [x_i\rho + G'_i] + E_j$$

donde  $x_i$  representa los valores de una covariable genética, generalmente un marcador molecular de posición generalmente, pero no necesariamente, conocida dentro del genoma para el genotipo  $i$ ,  $\rho$  representa el valor de un posible QTL en la posición correspondiente a  $x_i$ , y  $G'_i$  es el efecto genotípico residual una vez incorporado el marcador  $x_i$ , que se podría considerar aleatorio con objeto de ser utilizado como error para determinar la significación del efecto principal del posible QTL. Desde un punto de vista estadístico si consideramos el residuo  $G'_i$  como factor aleatorio, este término no debería aparecer en la expresión anterior. Sin embargo, de cara a facilitar la comprensión de estos modelos y, en particular, la partición de la variación en una tabla de medias genotipo por ambiente, se incluirá en su definición el término  $G'_i$  como si se tratara de un factor fijo. En las instrucciones SAS y GenStat que desarrollaremos posteriormente este residuo será considerado aleatorio, ya que en la práctica ésta es la aproximación correcta.

Si se dispone de un número elevado de marcadores de posición conocida en un mapa de ligamiento, es posible sustituir secuencialmente las variables genotípicas  $x_i$  a lo largo de todo el genoma con objeto de detectar la presencia de QTLs de efectos principales. Si la ecuación anterior se aplica a un marcador  $x_i$  próximo a un QTL, entonces el término  $x_i\rho$  explicará una parte significativa de las diferencias entre genotipos. Este proceso facilita diseccionar el control genético de un carácter cuantitativo en base a un modelo de regresión factorial simple que, a su vez, permite detectar QTL individuales en base a mapeo o cartografiado de intervalos simples. Es posible implementar modelos con más de un QTL de acuerdo a técnicas de regresión factorial múltiple y a estrategias de cartografiado de intervalos compuestos. Para ello se incorporan en el modelo, antes del marcador  $x_i$  de interés, aquellos cofactores o marcadores que permiten corregir por el efecto de otros QTLs presentes en el genoma (Jansen y Stam, 1994; Zeng, 1994).

Como se ha comentado, el modelo anterior puede aplicarse de un modo sistemático a lo largo de todo el genoma simplemente substituyendo los diversos marcadores disponibles  $x_i$  en dicho modelo. Esto se traduce en un número muy elevado de pruebas estadísticas, tantas como marcadores reales o virtuales (Lynch y Walsh, 1998) se utilicen. Por ello, es necesario ajustar el nivel de significación  $\alpha$  para controlar el error de tipo I. Una primera alternativa es la corrección de Bonferroni, consistente en dividir el nivel de significación deseado por el número de marcadores. Sin embargo, esta aproximación asume que todos los marcadores son independientes, lo cual no es válido para marcadores próximos en un mismo grupo de ligamiento, resultando en niveles críticos de rechazo muy conservadores. Otra alternativa sencilla considera el número de pruebas estadísticas relativamente independientes llevadas a cabo en lugar del número total de marcadores.



Este valor puede aproximarse dividiendo el tamaño del genoma por 20-30 cM en las descendencias de un cruzamiento biparental, o 5-10 cM en el caso de un conjunto relativamente independiente de genotipos, por ejemplo, en cebada. En el segundo caso, para un nivel de significación de 0,05 y para un tamaño del genoma de 1000 cM emplearíamos un nivel crítico igual a

$$\frac{0,05}{1000/5} = 0,00025.$$

De un modo más estructurado, y estadísticamente más sólido, también se puede utilizar el procedimiento descrito por Benjamini y Hochberg (1995) para el control de la tasa de detección de falsos positivos (FDR, 'false discovery rate') que aparece implementado tanto en SAS (proc MULTTEST) como en GenStat (mediante el procedimiento FDRMIXTURE).

Las instrucciones necesarias para ajustar un modelo factorial de efectos principales de un único marcador molecular denominado MM aparecen reflejadas en la tabla siguiente que utiliza un modelo mixto en el que el marcador se considera factor fijo y el residuo genotípico, variación genética no explicada por este marcador, factor aleatorio:

SAS	proc MIXED CL; class <b>genotipo ambiente</b> ; model <b>Y = ambiente MM</b> /HTYPE=1 solution; random <b>genotipo</b> ; run;
GenStat	VCOMPONENTS [FIXED= <b>ambiente + MM</b> ] RANDOM= <b>genotipo</b> ; \ CONSTRAINTS=positive REML [PRINT=model,components,effects,waldTests; PTERMS= <b>MM</b> ] Y

Estos modelos de regresión factorial pueden aplicarse no sólo para detectar QTL de efectos principales, sino para identificar QTL que interaccionan con el ambiente:

$$\mu_{ij} = \mu + [x_i\rho + G'_i] + E_j + [x_i\rho_j + (GE)'_{ij}].$$

En la ecuación anterior el término  $(GE)_{ij}$  del modelo interactivo completo definido en el apartado 5.2.2 se divide en dos. El primero determina la expresión diferencial de un QTL próximo al marcador  $x_i$  en los distintos ambientes  $j$ ; el segundo representa un residuo  $(GE)'_{ij}$  que en la práctica se considera, como en el modelo anterior para  $G'_i$ , aleatorio. En presencia de interacción QTL por ambiente (QTLx $E$ ) significativa, los nuevos parámetros  $\rho_j$  ajustan el efecto medio del QTL,  $\rho$ , a niveles más apropiados para cada ambiente individual  $j$ .

Las instrucciones SAS y GenStat, considerando a  $G'_i$  y  $(GE)'_{ij}$  factores aleatorios aparecen a continuación. Hay que señalar que los estimadores  $\rho_j$  proporcionados por estos programas tienen como valor de referencia el 0 para el último (SAS) o para el primero de los ambientes (GenStat).

SAS	proc MIXED CL; class genotipo ambiente; model Y = ambiente MM MM* ambiente / HTYPE=1 solution; random genotipo; run;
GenStat	VCOMPONENTS [FIXED= ambiente + MM + MM.ambiente] \ RANDOM=genotipo; CONSTRAINTS=positive REML [PRINT=model,components,effects,waldTests; PTERMS=MM] Y

Un ejemplo de la aplicación de estos modelos para un conjunto de 65 variedades modernas de cebada cultivadas en 12 ambientes mediterráneos (Romagosa et al., 2008) aparece en la Tabla 5.2. La información que SAS y GenStat proporcionan es idéntica, aunque sin embargo se presenta de forma ligeramente distinta. En el estudio de QTLxE podemos observar que los parámetros estimados por SAS tienen como valor de referencia la última localidad (T5), mientras que GenStat refiere los estimadores de los parámetros  $\rho_j$  a la primera (D4) Sin embargo, tal como se señala en la Tabla 5.2, es muy sencillo obtener tanto los valores absolutos de estos parámetros como los estimadores centrados (con promedio igual a cero).

**Tabla 5.2.** Estimadores de los parámetros  $\rho_j$  que ajustan el efecto medio del QTL,  $\rho$ , a niveles más apropiados para cada ambiente individual  $j$  proporcionados por SAS y GenStat asociados a una covariable genética (MM) para un conjunto de 65 variedades modernas de cebada cultivadas en 12 localidades en la Cuenca Mediterránea (modificado de Romagosa et al., 2008).

		QTL				QTL.E											
Model	Term	D4+	D5	E4	E5	I4	I5	M4	M5	S4	S5	T4	T5	±	Efectos		
		$\rho_1$	$\rho_2$	$\rho_3$	$\rho_4$	$\rho_5$	$\rho_6$	$\rho_7$	$\rho_8$	$\rho_9$	$\rho_{10}$	$\rho_{11}$	$\rho_{12}$	s.e.d	medios		
SAS	QTL	-0,364 ± 0,087													-0,364 ± 0,087		
	QTL	0,388±0,214															
	QTL*E	-0,470	-0,027	-1,063	-0,268	-2,428	-0,905	-1,880	-0,850	-0,131	-1,101	0,097	0,000	±0,288			
	Efectos absolutos	-0,082	0,361	-0,675	0,120	-2,040	-0,517	-1,492	-0,462	0,257	-0,713	0,485	0,388	-0,364 ± 0,087			
	Efectos centrados	0,282	0,725	-0,311	0,484	-1,676	-0,153	-1,128	-0,098	0,621	-0,349	0,849	0,752				
GenStat	QTL	-0,364 ± 0,087													-0,364 ± 0,087		
	QTL	-0,082 ± 0,214															
	QTL*E	0,000	0,443	-0,593	0,201	-1,958	-0,435	-1,410	-0,380	0,338	-0,632	0,567	0,470	±0,288			
	Efectos absolutos	-0,082	0,361	-0,675	0,120	-2,040	-0,517	-1,491	-0,462	0,257	-0,713	0,485	0,388	-0,364 ± 0,087			
	Efectos centrados	0,282	0,725	-0,311	0,484	-1,676	-0,153	-1,127	-0,098	0,621	-0,349	0,849	0,752				

Código de ambientes: La primera letra hace referencia al país del ensayo (D: Argelia; E: España; I: Italia; M: Marruecos; S: Siria; y T: Turquía). La cifra a años de cosecha: 4: Campaña 2003/04; 5: Campaña 2004/05)

La presencia del marcador MM se traduce en un descenso medio en rendimiento de las líneas portadoras equivalente a 0,364 t/ha en el conjunto de las 12 localidades. Sin embargo, existe una elevada interacción de este QTL con el ambiente, ya que mientras en ciertas localidades el efecto puede ser positivo (por ejemplo en las dos localidades de Turquía), en otras, particularmente Italia 2004 (I4) y Marruecos 2004 (M4), el efecto es claramente negativo.

Los modelos anteriores pueden ser aplicados, en principio, a todo tipo de materiales genéticos, ya sean poblaciones segregantes procedentes de cruzamientos dirigidos o para un conjunto de genotipos en los que no existe una estructura familiar determinada. El problema en este último caso es que el desequilibrio debido a ligamiento entre marcadores y caracteres de interés, que es la base para identificar QTLs, no siempre es consecuencia exclusiva de ligamiento genético. Si en un conjunto de genotipos existe estructura poblacional pueden detectarse asociaciones marcador-carácter espurias, es decir, no debidas a ligamiento sino a diferencias en frecuencias alélicas entre

subpoblaciones. Por ello, de cara a utilizar los modelos definidos anteriormente es preceptivo su ajuste por el efecto de la estructura poblacional como paso previo a la detección de QTLs. El paquete estadístico *Structure* (Pritchard et al., 2000, disponible de forma gratuita en <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>) se ha empleado extensamente para detectar la presencia de estructura poblacional en un conjunto o panel de genotipos en base a un conjunto de marcadores moleculares. Sin embargo, otras formas alternativas de agrupamiento, computacionalmente menos exigentes, pueden resultar de igual utilidad.

El modelo de regresión factorial que permite detectar QTLs de efectos principales una vez efectuada la corrección por la estructura poblacional es el siguiente:

$$\mu_{i(kj)} = \mu + [GG_k + x_{i(k)}\rho + G'_{i(k)}] + E_j$$

donde  $GG_k$  es el efecto de la subpoblación  $k$  a la que el genotipo  $i$  pertenece, expresado como desviación respecto a la media general  $\mu$ ;  $x_{i(k)}$  representa el valor asociado al marcador de interés para el genotipo  $i$  que pertenece a la subpoblación  $k$ ;  $\rho$  es el efecto del QTL; y  $G'_{i(k)}$  corresponde al residuo genotípico. Así, estos modelos aplicados al conjunto de todos los marcadores estimarían, por un lado, los efectos principales de cada una de las subpoblaciones presentes y, por otro, los efectos principales de los QTLs que pudieran detectarse.

En SAS y GenStat pueden emplearse las siguientes instrucciones en las que el factor discreto **sbp** identifica las subpoblaciones obtenidas con el programa *Structure* (Pritchard et al., 2000) o con cualquier otro procedimiento de agrupamiento que pudiera emplearse.

---

SAS	Proc MIXED CL; class <b>sbp genotipo ambiente</b> ; model <b>Y = ambiente sbp MM</b> / HTYPE=1 solution; random <b>genotipo</b> ; run;
GenStat	VCOMPONENTS [FIXED= <b>ambiente + sbp + MM</b> ] RANDOM= <b>genotipo</b> ; \ CONSTRAINTS=positive REML [PRINT=model,components,effects,waldTests; PTERMS= <b>MM</b> ] <b>Y</b>

---

También es igualmente factible utilizar la regresión factorial para detectar interacciones QTLxE una vez corregidos los datos por la posible estructura poblacional presente. En este caso el modelo sería:

$$\mu_{i(kj)} = \mu + E_j + [GG_k + x_{i(k)}\rho + G'_{i(k)}] + [(GG.E)_{kj} + x_{i(k)}\rho_j + (GE)'_{i(kj)}]$$

donde  $GG_k$  es el efecto principal correspondiente a la subpoblación  $k$  a la que el genotipo  $i$  pertenece, expresado como desviación respecto a la media general  $\mu$ ;  $x_{i(k)}$  representa el valor asociado al marcador de interés para el genotipo  $i$  que pertenece a la subpoblación  $k$ ;  $\rho$  es el efecto medio de un posible QTL en todos los ambientes,  $\rho_j$  es la desviación del efecto principal del QTL para el ambiente  $j$  una vez corregido mediante el término  $(GG.E)_{kj}$  asociado a la estructura poblacional que estima la interacción correspondiente a la subpoblación  $k$  en el ambiente  $j$ ; y, finalmente,  $G'_{i(k)}$  y  $(GE)'_{i(kj)}$  son los residuos genotípicos y de la interacción GE que nuevamente no deberían aparecer en el modelo anterior si, como veremos en las instrucciones SAS y GenStat, se consideran aleatorios.

Para analizar este modelo podríamos emplear las siguientes instrucciones:

---

SAS	<pre>Proc MIXED CL; class <b>sbp genotipo ambiente</b>; model <b>Y = ambiente sbp MM sbp*ambiente MM*ambiente</b>/ HTYPE=1 solution; random <b>genotipo</b>; run;</pre>
GenStat	<pre>VCOMPONENTS [FIXED= <b>ambiente + sbp + MM+ sbp.ambiente+MM ambiente</b>] RANDOM=<b>genotipo</b>; \ RANDOM= <b>genotipo</b>; CONSTRAINTS=positive REML [PRINT=model,components,effects,waldTests;\ PTERMS=<b>MM+ sbp.ambiente+MM.ambiente</b>] Y</pre>

---

## 5.5. MODELOS QUE INCORPORAN DE FORMA SIMULTÁNEA INFORMACIÓN AMBIENTAL Y GENÉTICA EXPLÍCITA

La regresión factorial permite integrar en un único modelo todo tipo de información explícita disponible, ya sea genética o ambiental. En los apartados anteriores se ha ilustrado cómo los términos G y GE pueden subdividirse mediante la incorporación de covariables ambientales o genéticas. En este último caso, y tal y como se ha comentado, si  $x_i$  representa los valores de una covariable genética, generalmente un marcador molecular de posición conocida, es posible detectar si existe un QTL de efectos principales significativos y de valor  $\rho$ , o si éste interacciona con el ambiente, para lo que se estimarían una serie de valores  $\rho_j$ , tantos como ambientes, que ajustasen el valor promedio del QTL a cada ambiente particular  $j$ . Utilizando una covariable ambiental  $z_j$  es posible, aplicando un modelo de regresión factorial, relacionar la expresión diferencial de cierto QTL con un factor ambiental potencialmente importante de cara a explicar la interacción GE. Esto se consigue sustituyendo el término  $x_i\rho_j$  correspondiente a la interacción QTLxGE por un nuevo término de la regresión  $x_i(\lambda z_j)$  y un residuo  $\rho_i\rho'_j$ ,

$$\mu_{ij} = \mu + [x_i\rho + G'_i] + E_j + [x_i(\lambda z_j) + x_i\rho'_j + (GE)'_{ij}]$$

El nuevo parámetro  $\lambda$  es una constante que cuantifica cómo el cambio en una unidad de la covariable ambiental  $z_j$  altera el efecto del QTL dado por la covariable genética  $x_i$ .

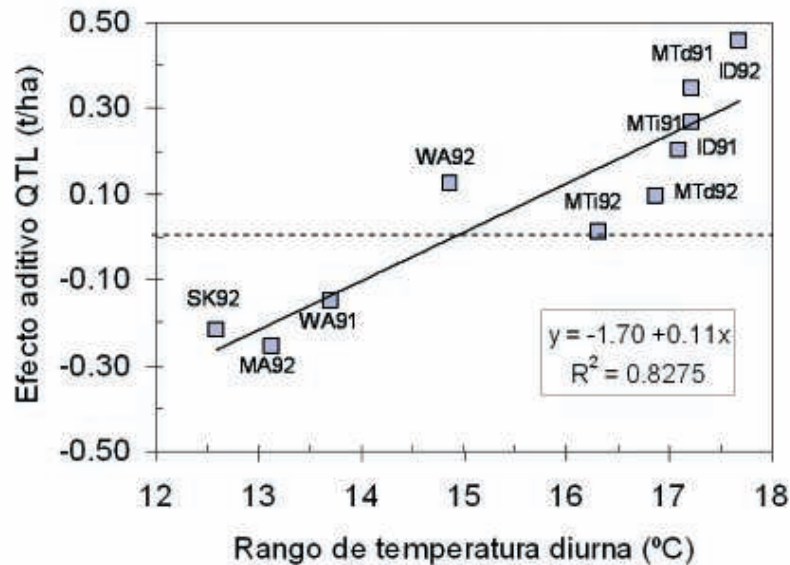
Este tipo de análisis puede llevarse a cabo a partir de las instrucciones siguientes, en las que MM, marcador molecular, y VEA, variable explícita ambiental, representan dos covariables, la primera genética y la segunda ambiental. En el análisis que aparece a continuación se considera el residuo genotípico como efecto aleatorio y el residuo ambiental como efecto fijo. Naturalmente esto puede cambiarse en función de la naturaleza de genotipos y ambientes. Si, de acuerdo con el modelo anterior, se ignora la existencia de estructura poblacional, las instrucciones necesarias en SAS y GenStat aparecen a continuación.

---

SAS	<pre>Proc MIXED CL; class <b>genotipo ambiente</b>; model <b>Y =VEA ambiente MM MM*VEA MM*ambiente</b>/ HTYPE=1 solution; random <b>genotipo</b>; run;</pre>
GenStat	<pre>VCOMPONENTS [FIXED= <b>VEA + ambiente + MM+ MM.VEA+ MM.ambiente</b>] RANDOM= <b>genotipo</b>; CONSTRAINTS=positive REML [PRINT=model,components,effects,waldTests;\ PTERMS=<b>MM+ MM.VEA+MM.ambiente</b>] Y</pre>

---

Este modelo permite predecir la respuesta diferencial de un QTL a cambios en variables ambientales. Así, Malosetti et al. (2004), tras incorporar información ambiental a datos de rendimiento de una población de haploides duplicados de cebada del cruzamiento Steptoe x Morex, cuantificaron el efecto de sustitución de cierto QTL ubicado en el cromosoma 2HS en  $0,11 \text{ t ha}^{-1}$  de rendimiento por cada incremento de un grado centígrado en la diferencia entre la temperatura máxima y mínima diaria (Fig. 5.3).



**Figura 5.3.** Relación entre los efectos de un QTL para rendimiento de grano en cebada localizado en el cromosoma 2HS y el rango de temperatura diaria en 10 localidades del Noroeste de América del Norte (modificado de Malosetti et al., 2004; van Eeuwijk et al., 2005).

## 5.6. CONCLUSIONES

La mayoría de los modelos estadísticos que se han descrito en este capítulo pertenecen a la clase de modelos lineales-bilineales o modelos de regresión factorial, en los que se incorporan distintos tipos de variables ambientales y genéticas. En su conjunto, estos modelos representan un instrumento muy valioso para profundizar en el análisis de la interacción GE. Si se dispone de información ambiental, permiten identificar aquellas variables edáficas, meteorológicas, ecológicas, etc., responsables de GE y estimar simultáneamente las sensibilidades genotípicas a éstas. Si existe información genética, generalmente en forma de marcadores moleculares, permiten asimismo subdividir los términos G y GE en QTLs de efectos principales y QTLxE y estimar sus efectos. Finalmente, la integración de información genética y ambiental en modelos combinados posibilita la identificación de aquellos QTLs cuya expresión está potencialmente relacionada con factores ambientales así como la cuantificación de su impacto sobre la variable respuesta de interés.

## AGRADECIMIENTOS

El Centro UdL-IRTA forma parte del Centro CONSOLIDER de Agrigenómica financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Este trabajo también ha recibido ayuda del proyecto AGL2005-07195-C02-02. Fred van Eeuwijk y Marcos Malosetti quieren agradecer a Generation Challenge la financiación del proyecto G4007.09: *Methodology and software development for marker-trait association analyses* muy relacionado con la temática de este capítulo.

## REFERENCIAS

- Annicchiarico, P. (2002). *Genotype x Environment Interactions - Challenges and Opportunities for Plant Breeding and Cultivar Recommendations*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57: 289-300.
- Boer, M., Wright, D., Feng, L., Podlich, D., Luo, L., Cooper, M. and van Eeuwijk, F.A. (2007). A mixed model QTL analysis for multiple environment trial data using environmental covariables for QTLxE, with an example in maize. *Genetics* 177:1801-1813.
- Cooper, M. and Hammer, G.L. (1996). *Plant Adaptation and Crop Improvement*. CAB International, Wallingford, UK.
- Corsten, L.C.A. and Denis, J.B. (1990). Structuring interaction in two-way tables by clustering. *Biometrics* 46: 207-215.
- Crossa, J. and Cornelius, P. (2002). Linear-bilinear models for the analysis of genotype-environment interaction. pp 305-322. In M.S. Kang (ed.), *Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding*. CAB International, Wallingford, UK.
- Denis, J.B. (1988). Two-way analysis using covariates. *Statistics* 19: 123-132.
- Denis, J.B. and Gower, J.C. (1996). Asymptotic confidence regions for biadditive models: interpreting genotype-environment interactions. *Appl. Stat.* 45: 479-492.
- Finlay, K.W. and Wilkinson, G.N. (1963). The analysis of adaptation in a plant breeding programme. *Aust. J. Agric. Res.* 14: 742-754.
- Fox, P.N., Crossa, J. and Romagosa, I. (1997). Multi-environment testing and genotype by environment interaction. pp 117-137. In R.A. Kempton and P.N. Fox (eds.), *Statistical Methods for Plant Variety Evaluation*. Chapman and Hall, London.
- Gabriel, K.R. (1978). Least squares approximation of matrices by additive and multiplicative models. *J. R. Statist. Soc. B* 40: 1861-196.
- Gabriel, K.R. (1998). Generalised bilinear regression. *Biometrika* 85: 689-700.
- Gabriel, K.R. and Zamir, S. (1979). Lower rank approximations of matrices by least squares with any choice of weights. *Technometrics* 21: 489-498.
- Gauch, H.G. (1988). Model selection and validation for yield trials with interaction. *Biometrics* 44: 705-715.

- Gauch, H.G. (1992). *Statistical Analysis of Regional Yield Trials*. Elsevier, Amsterdam
- Gauch, H.G. (2006). Statistical analysis of yield trials by AMMI and GGE. *Crop Sci.* 46: 1488-1500.
- Gollob, H.F. (1968). A statistical model which combines features of factor analysis and analysis of variance techniques. *Psychometrika* 33: 73-115.
- Jansen, R.C. and Stam, P. (1994). High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455.
- Kang, M.S. (1990). *Genotype-By-Environment Interaction and Plant Breeding*. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana.
- Kang, M.S. (1998). Using genotype-by-environment interaction for crop cultivar development. *Adv. Agron.* 62: 199-252.
- Kang, M.S. and Gauch, H.G. (1996). *Genotype by Environment Interaction: New Perspectives*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kempton, R.A. (1984). The use of biplots in interpreting variety by environment interactions. *J. Agric. (Australia)* 103: 123-135.
- Kempton, R.A. and P.N. Fox. (1997). *Statistical Methods for Plant Variety Evaluation*. Chapman and Hall, London.
- Lynch, M. and Walsh, J.B. (1998). *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Malosetti, M., Voltas, J., Romagosa, I., Ullrich, S.E. and van Eeuwijk, F.A. (2004). Mixed models including environmental variables for studying QTL by environment interaction. *Euphytica* 137: 139-145.
- Malosetti, M., van der Linden, C.G., Vosman, B. and van Eeuwijk, F.A. (2007). A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Genetics* 175: 879-889.
- Mandel, J. (1969). The partitioning of interaction in analysis of variance. *J. Res. NBS B* 73: 309-328.
- Molina-Cano, J.L., García del Moral, L.F., Ramos, J.M., García del Moral, M.B., Romagosa, I. and Roca de Togores, F. (1990). Quantitative phenotypical expression of three mutant genes in barley and the basis for defining an ideotype for Mediterranean environments. *Theor. Appl. Genet.* 1990: 762-768.
- Nuez, F. y Carrillo, J.M. (2000). *Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal*. Sociedad Española de Genética y SECH, Madrid.
- Nuez, F., Carrillo, J.M. y Lozano, R. (2004). *Genómica y Mejora Vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Paterson, A.H. (1998). *Molecular Dissection of Complex Traits*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Payne, R.W., Harding, S.A., Murray, D.A., Soutar, D.M., Baird, D.B., Welham, S.J., Kane, A.F., Gilmour, A.R., Thompson, R., Webster, R., Tunnicliffe, E. and Wilson, G. (2006). *GenStat release 9 Reference Manual, part 2 directives*. VSN International, Hemel Hempstead, UK.



- Piepho, H.P. (1997). Analyzing genotype-environment data by mixed models with multiplicative effects. *Biometrics* 53: 761-766.
- Piepho, H.P. (2000). A mixed model approach to mapping quantitative trait loci in barley on the basis of multiple environment data. *Genetics* 156: 2043-2050.
- Piepho, H.P. and Pillen, K. (2004). Mixed modeling for QTL x environment interaction analysis. *Euphytica* 137: 147-153.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*: 155: 945-959.
- Pswarayi, A., van Eeuwijk, F.A., Ceccarelli, S., Grando, S., Comadran, J., Russell, J.R., Francia, E., Pecchioni, N., Li Destri, O., Akar, T., Al-Yassin, A., Benbelkacem, A., Choumane, W., Karrou, M., Ouabbou, H., Bort, J., Araus, J.L., Molina-Cano, J.L., Thomas, W.T.B. and Romagosa, I. (2008). Barley adaptation and improvement in the Mediterranean basin. *Plant Breed* (in press).
- Romagosa, I. and Fox, P.N. (1993). Genotype-environment interaction and adaptation. pp 373-390. In M.D. Hayward, N.O. Bosermark and I. Romagosa (eds.), *Plant Breeding, Principles and Prospects*. Chapman and Hall, London.
- Romagosa, I., Fox, P.N., García del Moral, L.F., Ramos, J.M., García del Moral, B., Roca de Togores, F. and Molina-Cano, J.L. (1993). Integration of statistical and physiological analyses of adaptation of near-isogenic barley lines. *Theor. Appl. Genet.* 86: 822-826.
- Romagosa, I., van Eeuwijk, F.A. and Thomas, W.T.B. (2008). Statistical analyses of genotype by environment data. In M.J. Carena (ed.), *Cereals. Series: Handbook of Plant Breeding*, Vol. 3. Springer, New York.
- SAS Institute Inc. (2004). *SAS/STAT User's Guide, Version 9*. Cary, North Carolina.
- Smith, A.B., Cullis, B.R. and Thompson, R. (2005). The analysis of crop cultivar breeding and evaluation trials: an overview of current mixed model approaches. *J. Agric. Sci.* 143: 1-14.
- van Eeuwijk, F.A. (1995a). Linear and bilinear models for the analysis of multi-environment trials. I. An inventory of models. *Euphytica* 84: 1-7.
- van Eeuwijk, F.A. (1995b). Multiplicative interaction in generalized linear models. *Biometrics* 51: 1017-1032.
- van Eeuwijk, F.A. (1996). *Between and Beyond Additivity and Non-Additivity: the Statistical Modelling of Genotype by Environment Interaction in Plant Breeding*. PhD Thesis. Wageningen, The Netherlands.
- van Eeuwijk, F.A. (2006). Genotype by environment interaction: basics and beyond. pp. 155-170. In K. Lamkey and M. Lee (eds.), *Plant Breeding: The Arnell Hallauer International Symposium*. Blackwell Publishing, Oxford.
- van Eeuwijk, F.A., Keizer, L.C.P. and Bakker, J.J. (1995). Linear and bilinear models for the analysis of multi-environment trials. II. An application to data from the Dutch Maize Variety Trials. *Euphytica* 84: 9-22.
- van Eeuwijk, F.A., Denis, J.B. and Kang, M.S. (1996). Incorporating additional information on genotypes and environments in models for two-way genotype by environment tables. pp 15-50. In M.S. Kang and H.G. Gauch (eds.), *Genotype-by-environment interaction*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- van Eeuwijk, F.A., Crossa, J., Vargas, M. and Ribaut, J.M. (2001). Variants of factorial regression for analysing QTL by environment interaction. pp 107-116. In A. Gallais, C. Dillmann and I. Goldringer (eds.), *Quantitative genetics and breeding methods: the way ahead*. Les Colloques series 96. INRA Editions, Versailles.



- van Eeuwijk, F.A., Crossa, J., Vargas, M. and Ribaut, J.M. (2002). Analysing QTL by environment interaction by factorial regression, with an application to the CIMMYT drought and low nitrogen stress programme in maize. pp 245-256. In M.S. Kang (ed.), *Quantitative genetics, genomics and plant breeding*. CAB International. Wallingford, UK.
- van Eeuwijk, F.A., Malosetti, M., Yin, X., Struik, P.C. and Stam, P. (2005). Statistical models for genotype by environment data. From conventional ANOVA models to eco-physiological QTL models. *Aust. J. Agric. Res.* 56: 883-894.
- van Eeuwijk, F.A., Malosetti, M. and Boer M.P. (2007). Modelling the genetic basis of response curves underlying genotype by environment interaction. In J.H.J. Spiertz, P.C. Struik and H.H. van Laar (eds.), *Scale and Complexity in Plant Systems Research. Gene-Plant-Crop Relations*. Wageningen UR Frontier Series, Vol 21. Springer, New York.
- Vargas, M., Crossa, J., van Eeuwijk, F.A., Ramirez, M.E. and Sayre, K. (1999). Using AMMI, factorial regression, and partial least squares regression models for interpreting genotype x environment interaction. *Crop Sci.* 39: 955-967.
- Verbyla, A., Eckermann, P.J., Thompson, R. and Cullis, B. (2003). The analysis of quantitative trait loci in multi-environment trials using a multiplicative mixed model *Aust. J. Agric. Res.* 54: 1395-1408.
- Voltas, J., van Eeuwijk, F.A., Sombrero, A., Lafarga, A., Igartua, E. and Romagosa, I. (1999a). Integrating statistical and ecophysiological analysis of genotype by environment interaction for grain filling of barley in Mediterranean areas I. Individual grain weight. *Field Crop. Res.* 62: 63-74.
- Voltas, J., van Eeuwijk, F.A., Araus, J.L. and Romagosa, I. (1999b). Integrating statistical and ecophysiological analysis of genotype by environment interaction for grain filling of barley in Mediterranean areas II. Grain growth. *Field Crop. Res.* 62: 75-84.
- Voltas, J., van Eeuwijk, F., Igartua, E., Garcia del Moral, L.F., Molina-Cano, J.L. and Romagosa, I. (2002). Genotype by environment interaction and adaptation in barley breeding: basic concepts and methods of analysis. pp 205-241. In G.A. Slafer, J.L. Molina-Cano, R. Savin, J.L. Araus and I. Romagosa (eds.), *Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality*. Haworth Press. Binghamton, New York.
- Voltas, J., López-Córcoles, H., and Borrás, G. (2005). Use of biplot analysis and factorial regression for the investigation of superior genotypes in multi-environment trials. *Eur. J. Agron.* 22: 309-324.
- Yan, W. and Kang, M.S. (2003). *GGE Biplot Analysis: A Graphical Tool for Breeders, Geneticists, and Agronomists*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Yan, W., Hunt, L.A., Sheng, Q. and Szlavncs, Z. (2000). Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on the GGE biplot. *Crop Sci.* 40: 597-605.
- Yan, W., Cornelius, P.L., Crossa, J. and Hunt, L.A. (2001). Two types of GGE biplots for analyzing multi-environment trial data. *Crop Sci.* 41: 656-663.
- Yan, W., Kang, M.S., Baoluo Ma, B., Woods, S. and Cornelius, P.L. (2007). GGE biplot vs. AMMI analysis of genotype-by-environment data. *Crop Sci.* 47: 643-653.
- Zeng, ZB. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457-1468.



CAPÍTULO 6

---

LA RAÍZ Y EL DOSEL

*José Ignacio Cubero*  
*Salvador Nadal*



## LA RAÍZ Y EL DOSEL

---

José Ignacio Cubero<sup>1</sup> y Salvador Nadal<sup>2</sup>

**1 Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC / Departamento de Genética, UCO.  
Finca Alameda del Obispo, Av. Menéndez Pidal s/n Apdo. 4084, 14080.**

**2 Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA).  
Avda. Menéndez Pidal s/n, C.P. 14004, Córdoba  
E-mail: salvador.nadal@juntadeandalucia.es**

---

### 6.1. INTRODUCCIÓN

La planta, como todo ser vivo, es fruto de la expresión de sus genes en un determinado ambiente. Lo que vemos es el resultado final de un complicado proceso de desarrollo, y la experiencia nos dice, sin necesidad de estudio, que la planta que cultivamos en el campo o que cuidamos en el jardín es distinta si lo hacemos en otro lugar o con otras atenciones. El caso tantas veces mencionado en los textos clásicos de Biología de la diferencia de crecimiento del diente de león (*Taraxacum dens-leonis*) en el valle y en alta montaña, y el mantenimiento de dichas diferencias de generación en generación, es un buen ejemplo. Es difícil pensar cómo pudo creer Lamarck que tales diferencias, puramente ambientales, eran heredables, pues basta comprobar lo contrario intercambiando las semillas entre el valle y la montaña. Lamarck fue un hombre de grandes ideas pero con escaso interés en la experimentación.

No menos conocidos son los casos del color de las flores de *Primula sinensis* (rojas cultivada a menos de 30°, blancas conque ocho días antes de la floración se la coloque a más de 30°). O el de las de la hortensia, azules en suelo ácido, rojas si alcalino. O, finalmente, las hojas y flores de la genciana (*Genciana campestris*), grandes en lugares favorables, minúsculas en los límites de su ámbito ecológico. La variación puede ocurrir dentro del mismo individuo, como lo muestran los casos asimismo bien conocidos de las llamadas plantas anfibias tales como el ranúnculo acuático (*Ranunculus aquatilis*), con sus hojas aéreas normales, laciniadas sumergidas e intermedias en la zona de nivel variable.

La copa o dosel es la parte de la planta responsable de la forma que vemos, forma cuya importancia en la fructificación, y por lo tanto en el rendimiento, es evidente. Al ser la parte visible de la planta, los estudios sobre ella han sido numerosos desde todos los puntos de vista: morfológico, histológico, fisiológico, etc. Nos restringiremos en el presente capítulo a la relación más directa con el mejorador cual es la relación entre parte vegetativa y rendimiento.

Pero la parte aérea se asienta sobre la subterránea, la raíz, de la que dependen no pocas de las adaptaciones de la copa. La raíz, al contrario que ésta, es la parte más desconocida de la planta para el mejorador, y en la mayor parte de los casos la más ignorada, si bien los estudios puramente biológicos sobre su desarrollo también son abundantes (Grunewald et al., 2007). De tal dificultad es de lo que se tratará en este capítulo.

Raíz y dosel manifiestan la interacción con el ambiente responsable de la forma final buscada por el mejorador. Huelga decir que ofrecen las respuestas visibles a la acción de los ambientes extremos, es decir, a los estreses abióticos objeto del presente libro. Deben ser una y otro los que nos den las pautas para la selección de las formas adecuadas que nos permitan solventar la dificultad.

## 6.2. LA RAÍZ

### 6.2.1. Dificultades metodológicas

El problema no es estudiar algunas características de la raíz, tales como su volumen, longitud total (aunque es algo nada fácil), crecimiento, formación, etc., sino hacerlo en condiciones naturales. Desde el momento en que situamos la planta en condiciones apropiadas para la observación (por ejemplo, en un simple cajón, por amplio que sea), la raíz se desarrolla de forma diferente en cuanto llega a los límites del recipiente; la excavación, por su parte, presenta el mismo problema, esto es, alterar el curso natural del desarrollo.

Y, sin embargo, es fácil observar diferencias varietales dentro de una misma especie. Tales diferencias pueden hacer que las raíces de unas variedades exploren la capa superficial del suelo y las de otras, las más profundas. La importancia en el comportamiento frente a los factores abióticos salta a la vista. Se describirán, pues, en este párrafo los principales aspectos metodológicos en el estudio de la raíz. Una exhaustiva discusión puede verse en Polomski y Kuhn (2002).

#### 6.2.1.1. Excavación

La excavación produce resultados de tipo general, tales como la biomasa (total o por unidad de área o volumen) y longitudes y diámetros. Uno de los varios inconvenientes, no siendo el menor la dificultad de hacerlo en, por ejemplo, especies arbóreas, es la pérdida de material causada por la propia excavación. Otra de las dificultades, común a todos los métodos de excavación, es la alteración que sufre la propia estructura física del suelo.

Puede extraerse un cilindro de suelo utilizando una perforadora adecuada, operación que ha de hacerse con el mínimo grado de alteración de la estructura, lo que lo hace casi inviable en muchos tipos de suelo (por ejemplo, pedregosos); normalmente ha de empelarse una maquinaria especializada para obtener una muestra relativamente correcta en la que estudiar parámetros como la biomasa, su distribución espacial, dirección del crecimiento, etc. También se puede excavar en forma circular formando un cilindro de tierra del diámetro deseado, que debe extraerse con la mayor integridad posible, con objeto de estudiar las relaciones entre raíces y suelo. En ambos casos, no es necesario señalar el cuidado con el que ha de extraerse el cilindro de tierra; en algunos tipos de suelo (por ejemplo, en los arenosos) es prácticamente imposible asegurar su estabilidad.

---

Para estudios de dinámica del crecimiento, pueden emplearse mangas de gasa que se rellenan de sustratos sin raíces. El cilindro así conseguido se deja colonizar por éstas y, al cabo del tiempo que se estime conveniente, se extrae para observar la actividad radicular (permite, por ejemplo, la comparación entre variedades o el efecto del tipo de suelo), la variación estacional, tratamientos distintos, etc.

### 6.2.1.2. Observaciones in vivo

La observación de las raíces *in vivo* (por ejemplo, para estudiar el desarrollo y la velocidad de crecimiento) por medio de zanjas excavadas para este propósito tiene, de nuevo, el inconveniente de la disrupción del ambiente radicular natural, pero es un método factible y económico. Da una buena idea de la distribución espacial, proporción de raíces según tamaños, profundidad, etc. No se debe mantener la zanja al aire libre mucho tiempo por la desecación consiguiente, por lo que es mejor colocar ventanas de material transparente, a pesar del inconveniente contrario, esto es, la condensación de agua sobre la superficie de la ventana. La elección del lugar (distancia a la planta) y la profundidad han de elegirse en función de la especie en estudio.

El crecimiento fino puede observarse en cámaras de cristal (mucho mejor si son alargadas, para no constreñir el crecimiento en todas las direcciones) en las que crece la planta. Se han descrito varios modelos (*rizotrones*, *rizolabs*) según tamaños y grado de control de los experimentos. Como defecto cabe señalar que la planta no crece en un medio natural, por grandes que sean los recipientes, que, evidentemente, deben adecuarse al tamaño del laboratorio.

Para evitar este inconveniente, los recipientes pueden instalarse *in situ*; las dimensiones deben ser grandes (existen de hasta 200 m<sup>3</sup>) garantizar un crecimiento natural. Los grandes recipientes pueden sustituirse por baterías de tubos (*minirrizotrones*) de material transparente que se insertan en el suelo, lo que permite tomar muestras sucesivas con facilidad a través de largos periodos de tiempo. Las variables a considerar son muchas: tipo de material, tamaño de los tubos (depende del tipo de raíz a estudiar), número de tubos (pues las raíces son, frecuentemente, de crecimiento heterogéneo) inserción y posición en el suelo (se recomienda en ángulo, en general entre 30° y 45°), frecuencia de muestreo o de imágenes y tratamiento digital de éstas (un problema adicional es distinguir en este tratamiento el suelo de las raíces, así como entre raíces vivas y muertas), contacto con el suelo (debe ser íntimo), tiempo de espera hasta el muestreo (para permitir la recuperación de la naturalidad), incidencia de la luz en la toma de datos, etc.

### 6.2.1.3. Otros métodos

Aparte de numerosas modificaciones de los ya mencionados, son de interés los de marcaje mediante la inyección de sustancias en la planta o su colocación en el medio de cultivo. Los marcadores más empleados son isótopos radiactivos (tritio, C-14, S-35, P32 para experimentos a corto plazo; isótopos estables como C13, N-15, O-18 y S14 para largo plazo), tinciones con fluorescencia (eosina, acridina, etc.) o estándar (safranina, fuchina, yodo).

Con dichos marcajes se estudian principalmente caracteres bioquímicos o fisiológicos (transporte especialmente en el caso de la fluorescencia), así como vitalidad radicular (p.ej., la tinción del almidón con yoduro), crecimiento del meristemo terminal, etc.

#### 6.2.1.4. Comentario sobre los métodos

No es extraño el hecho de que la mayor parte de trabajos sobre la raíz se hayan realizado en laboratorio o en condiciones controladas en cultivo hidropónico, rizotrones, etc., sobre aspectos básicos, no todos los cuales conciernen directamente al mejorador. La estimación de la biomasa o la propia morfología de la raíz como un todo son algunos de los grandes problemas aún mal resueltos a causa de la propia dificultad del estudio in vivo. Existen arcillas especiales que permiten extraer con absoluta limpieza la raíz intacta; se utilizan, por ejemplo, para el estudio de enfermedades que afectan a la raíz o para el de bacterias nitrificantes como las del género *Rhizobium* y relacionados. Pero tales arcillas no son el substrato natural de las plantas.

La dificultad metodológica influye, evidentemente, en el conocimiento de los caracteres hereditarios que podría utilizar un mejorador.

Sólo en algunos casos es fácil el estudio, esto es, se puede realizar como sobre cualquier otro órgano. Es el caso de las especies que tienen raíces de valor económico, normalmente comestibles o aptas para la industria alimentaria por ser órganos de reserva de hidratos de carbono (las hay también con otros usos, como la rubia, de cuyas raíces se extrajo antiguamente el colorante rojo para la industria textil). Entre las más conocidas están la remolacha, el nabo, la achicoria (no como endivia sino como sucedáneo de café), la zanahoria, la batata o camote, la mandioca (*Manihot esculenta*, casava o "yuca" en la literatura anglosajona, pero sin relación con el género *Yuca*), el rábano y bastantes más de menor importancia.

Pero en el presente capítulo no se trata de ellas, auténticos órganos de reserva como pueden ser frutos o tubérculos, que pueden individualizarse y separarse con facilidad del resto del vegetal.

#### 6.2.2. La raíz como sistema complejo: la rizosfera

Para complicar aún más las cosas, la raíz no es un órgano que se baste a sí mismo en todos los grupos vegetales. Son bien conocidas las relaciones de la raíz de ciertos grupos vegetales con organismos fijadores de nitrógeno atmosférico, así como con una compleja microflora (*micorizas*) que envuelve todo un sistema radicular que resulta esencial a la hora de facilitar la asimilación de nutrientes. De ahí que deba denominarse todo el sistema como *rizosfera* más que como simplemente *raíz*. De ahí también que los microbiólogos acusen a los mejoradores de leguminosas de mejorar solo la mitad de la planta, pues, en efecto, la respuesta final de ésta dependa grandemente de la simbiosis o, mejor, interrelación entre bacteria fijadora y leguminosa.

##### 6.2.2.1. Las simbiosis fijadora de nitrógeno atmosférico

La fijación de nitrógeno atmosférico no ocurre sólo en las leguminosas, aunque este sea el caso más conocido y de mayor repercusión práctica y ecológica. Es más, ni siquiera ocurre en todas las leguminosas, estando ausente en los géneros más primitivos (Allen y Allen, 1981). Los agentes causantes de la fijación de nitrógeno son bacterias pertenecientes al antiguo género *Rhizobium*, hoy escindido en varios (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium*). Todos ellos son parientes cercanos de los *Agrobacterium*, y, como éstos, infectan realmente la raíz formando tumores en el caso de *Agrobacterium* y nódulos en el de los rizobios, siendo el sistema de penetración asimismo diferente.



No este el lugar de explicar el proceso de nodulación ni, mucho menos, el de fijación de nitrógeno. La literatura es abundante al respecto, con buenas revisiones (por ejemplo, Vance, 2002). Baste decir aquí que la “infección” necesita complejos sistemas genéticos tanto en el huésped como en la bacteria, como asimismo para la formación del nódulo. Se conocen más de 20 genes (*nod*) tan sólo para la nodulación, y un número que varía, en el huésped, entre 1 y 15 según especies que afectan tanto la nodulación como la fijación de nitrógeno. Es un caso claro de que la raíz está lejos de ser un sistema relativamente “automático” para la extracción de nutrientes y soporte de la parte aérea, sino un órgano en continua interacción con el ambiente, en este caso microbiano, que lo rodea.

Siempre se creyó que los rizobios formaban simbiosis sólo con las leguminosas (aunque no con todas como ya se ha dicho), pero no es cierto, aunque la excepción la constituya un solo caso: los *Bradyrhizobium* se asocian también con las ulmáceas del género *Parasponia* y forman nódulos en sus raíces.

Pero, sin ser rizobios, existen otras combinaciones simbióticas, particularmente entre actinomicetos y géneros de varias familias, incluso de distintos órdenes: *Alnus*, *Casuarina*, *Eleagnus*, *Myrica*, *Eleagnus*, *Myrica*, etc. También se conocen asociaciones de cianobacterias (*Nostoc*, *Anabaena*) con cícadas y aun con líquenes y helechos.

El potencial de fijación de nitrógeno es muy variable, siendo mayor (quizá por más estudiado) el de leguminosa-rizobio que, en cultivos herbáceos, puede variar entre los 60 y 200 kg de N<sub>2</sub> fijado como promedio por hectárea y año. Tampoco deben ignorarse los 300 kg fijados (aunque sea un límite máximo y no un promedio) por el actinomiceto *Frankia* en *Alnus*. El papel mejorante de las leguminosas fue, por ello, reconocido desde tiempos antiguos (los romanos decían que “estercolaban” el suelo), aunque hasta finales del XIX no se conoció la causa. La existencia universal de praderas en las que las leguminosas están presentes se justifica por este papel que enriquece el suelo en nitrógeno.

El papel de la raíz resulta, pues, esencial en el mantenimiento de la riqueza ecológica. No sólo esto es de interés para el mejorador; es muy posible, en efecto, que los grandes valores de la interacción genotipo-ambiente tan característicos de las leguminosas cultivadas en relación con por ejemplo, los cereales se deban a la existencia en distintos lugares de diferentes poblaciones de rizobios. La crítica antes dicha de que “los mejoradores de leguminosas sólo mejoran media planta” tiene así una gran base biológica.

#### **6.2.2.2. Micorrizas y endofitos**

Las micorrizas son un complejo de microorganismos en el que participan bacterias y hongos asociado, quizá en simbiosis, a las raíces. Se descubrió en 1885 en algunos árboles forestales de tomó como un caso particular. Tras la importancia que se le dio en el cultivo artificial de orquídeas en 1900 provocó un gran número de estudios que condujeron a aceptarlas en la totalidad de las plantas verdes superiores.

Su papel en la asimilación de macro y de micronutrientes está fuera de duda, permitiendo solubilizarlos para poder ser absorbidos por las raíces (Föhse et al, 1991; Gildon y Tinker, 1983; Hayman y Mosse, 1971, entre otros muchos estudios). Se ha estudiado también la posibilidad de una especialización varietal (p.ej., Hetrick et al., 1992).

Se les atribuye, asimismo, una labor protectora frente a parásitos y mantienen la actividad radicular. Algunos componentes son también fijadores de nitrógeno atmosférico, como es el caso de *Azospirilla*, *Acetobacter* y otros que, a diferencia de los rizobios y cianofíceas mencionadas en el párrafo anterior, tienen vida libre. Como en el caso de los organismos fijadores de nitrógeno, su descripción sobrepasa los límites del presente capítulo. Puede verse una buena revisión en Kapulnik y Okon (2002).

No terminan con ellas las complejidades de la raíz. Existen también numerosos organismos (bacterias, actinomicetos, protozoos y hongos) que residen en los tejidos corticales de la raíz como endofitos; más correctos serían otros términos como *endomicetos*, *endobacterias*, etc., pues endofito significa literalmente “una planta que vive dentro de otra”. Los problemas de detección e identificación son, como se puede suponer, numerosos e importantes, y el campo, como el de las micorrizas, está totalmente abierto. De hecho, la transición entre micorrizas y endofitos es más bien vaga. Se han detectado en numerosas especies vegetales, por lo que parece que su presencia debe ser también general (Sieber, 2002).

### **6.2.2.3. Un órgano complejo**

De lo descrito en esta sección se puede deducir que, como ya se ha dicho, la raíz está lejos de ser un simple soporte de la planta, como tampoco es un órgano que permite pasivamente la entrada de agua y nutrientes. Es, por el contrario, un órgano complejísimo y activo, en relación con numerosos organismos de los más dispares órdenes biológicos que resultan esenciales para la vida de la propia raíz y, por tanto, del vegetal. El efecto directo de la raíz sobre el rendimiento es algo que, además de lógico, reposa sobre no pocos estudios experimentales

Un mal manejo del terreno y de la vegetación que lo cubre, sea cultivada o natural, puede hacer que tal riqueza de organismos disminuya e incluso que desaparezca. Su reintroducción es difícil por no decir imposible en la mayor parte de los casos, y existen numerosos ejemplos que, lamentablemente, muestra lo dicho, de los cuales el más conocido, aunque ni mucho menos el único, es el famoso *Dust Bowl*, una serie de tormentas de polvo registradas en las praderas norteamericanas en los años treinta del pasado siglo. La degradación de los suelos africanos es otro de los lamentables ejemplos de un mal cuidado de la raíz y su entorno.

## **6.2.3. Los estudios de genética de la raíz**

### **6.2.3.1. Estudios de tipo tradicional**

La dificultad en el método de estudio descrita anteriormente, que es la responsable del olvido de la raíz en los estudios de genética, no ha impedido la ejecución de trabajos sobre la genética de la morfología, formación y desarrollo de la raíz, si bien, como cabe esperar, no son numerosos y, sobre todo, no se han realizado más que en muy pocas especies (si descontamos, en tiempos recientes, *Arabidopsis*), trigo, arroz y maíz particularmente, con la notable excepción del banano, si bien en este último caso los estudios se han realizado exclusivamente en condiciones controladas y muestran claramente, a pesar de ello, todas las dificultades del estudio del sistema radicular (Draye, 2002).

Se han efectuado estudios sobre la relación del tipo de trigo (semienano y alto) con las raíz (Cholick et al., 1977), el patrón de enraizamiento en líneas casi isogénicas de trigo semienano (Miralles et al., 1997), la variabilidad genética de la raíz en trigo (duro y harinero) en diferentes estados de crecimiento (Motzo et al., 1993; O'Brien, 1979). Un resultado claro es la diferencia en sistema radicular según el grado de ploidía (algo también observado en banano: Draye, 2002), así como entre razas silvestres, locales y cultivares modernos, con una tendencia de las formas primitivas a depender más de la asociación con micorrizas que los modernos. Una buena revisión hasta 1987 de la variabilidad genética de la raíz puede verse en O'Toole y Bland (1987).

Se han realizado, asimismo en trigo, estudios generales sobre la genética de la raíz (Monyo y Whittington, 1970), con el resultado de un predominio de la varianza aditiva y de valores medios de la heredabilidad (0.62 para la longitud, 0.42 para la ramificación; la heredabilidad en sentido estricto varió de 0.38 a 0.42 para la longitud), e incluso de los componentes de la varianza genética de la proporción raíz/tallo, con un valor significativo (un tercio aproximadamente) de varianza aditiva (Kazemi et al., 1979).

La formación de la raíz de maíz también ha sido analizada desde un punto de vista genético (Feix et al., 2002). El resultado, previsible como en los casos citados del trigo, es la interacción de numerosos genes y un claro patrón de herencia poligénica, pero se consigue seleccionar líneas con diferentes tipos de raíz (superficiales o profundas), localizándose, incluso, algunos QTL para componentes de la formación de la raíz

También en arroz se han localizado QTL para varios componentes de la morfología radicular como grosor basal, número de raíces, longitud total y peso fresco y seco (Zheng et al., 2000; Li et al., 2005), habiéndose localizado entre 7 y 12 QTL de efectos básicamente aditivos.

Una nueva vía de estudio es la obtención de mutantes para la forma de la raíz por medio de tratamientos de polen con EMS o con transposones en el caso de líneas que contenían gran cantidad de transposones activos. Habida cuenta de la dificultad de medir el carácter, se necesitan grandes familias  $F_2$  para localizar las formas adecuadas por medio de la observación visual del desarrollo temprano (4 semanas) de la raíz en papel de filtro. Los posibles mutantes han de ser autofecundados para obtener líneas con suficiente grado de homocigosis y poder ser incluidas en un programa de cruzamientos. Así se obtuvieron siete líneas caracterizadas por mutantes recesivos para la iniciación, elongación y maduración de la raíz (Feix et al., 2002) que se mapearon en tres cromosomas. A pesar de identificarse genes de tipo cualitativo, hay que hacer constar que el resultado final sobre la formación radicular de maíz es el resultado de la interacción de todos ellos.

La aplicación a trabajos concretos de Mejora genética es, como mucho, más bien escasa. Aparte de las líneas de maíz ya mencionadas, cuya utilidad práctica no es inmediata, cabe citar la selección en alfalfa para la forma de la raíz, practicada en dos ciclos de selección divergente (Lamb et al., 1999), con el objetivo de incrementar la actividad fitorremediadora de dicho cultivo; se midieron diversos parámetros (raíces laterales, masa radicular y diámetro de los ápices y se consiguió diferenciar dos tipos de alfalfa por su raíz, con heredabilidades realizadas más bien bajas (21 a 48% para la masa y 11-43% para las raíces laterales), por lo que la posibilidad práctica de alta respuesta a la selección es dudosa.

### 6.2.3.2. Genética molecular en la raíz

Las líneas actuales de investigación van, como en tantos otros campos, por el uso de plantas modelo y, en lugar de estudiar directamente morfología, formación, etc., por la identificación de genes de desarrollo o responsables de funciones fisiológicas (absorción, secreción, transporte de iones), análisis de expresión génica e identificación de promotores. La planta más utilizada es, lógicamente, *Arabidopsis thaliana*, estando *Medicago truncatula*, tabaco y tomate en un lugar, por ahora al menos, secundario, si bien hay trabajos en otras especies como *Vigna unguiculata* y *Vicia sativa* (Mendoza y Alvarez-Buylla, 2000; Bucher, 2002). La ingeniería genética en la raíz no ha hecho más que comenzar, pero es, sin duda, la línea de actuación en el futuro próximo.

Las técnicas empleadas son las usuales en genética molecular: identificación de ARN mensajeros, obtención de ADNc, identificación de la actividad génica, etc. Se han clonado varios genes de proteínas específicas en varias especies, tales como los codificadores de extensinas y proteínas semejantes. Asimismo, genes responsables de proteínas de transporte de potasio, amonio y nitrato. No pocos genes identificados en tejidos radiculares y que podían creerse específicos de este órgano se encuentran también en otras partes de la planta, como por ejemplo los que se necesitan para la iniciación y extensión de los pelos radiculares en *Arabidopsis*. Se ha publicado un mapa de expresión génica de la raíz de *Arabidopsis* (Birnbaum et al., 2003).

Se estudia la regulación de la expresión génica por los nutrientes, como, por ejemplo, la absorción y asimilación de nitratos, transporte de sulfatos y fosfatos, etc. Es evidente que es una vía prometedora para el estudio de estreses abióticos y, asimismo, bióticos, pues se han identificado expresiones diferenciales en las estructuras que se forman tras el ataque de nematodos (Bucher, 2002). La simbiosis con rizobios y micorrizas (utilizando *M. truncatula*) es, lógicamente, objeto de estudio, si bien el proceso es todavía algo cuyo conocimiento parece lejano aunque el catálogo de genes crece continuamente. También en este caso se encuentran genes (los responsables de las nodulinas para la nodulación por *Rhizobium* por ejemplo) que no sólo están presentes en la raíz sino en el resto de la planta. Se ha podido comprobar, además, la similitud de muchas etapas estructurales y funcionales en la simbiosis con micorrizas y rizobios.

La identificación de promotores específicos de tejido radicular es un campo de notable actividad, como en otros aspectos de la ingeniería genética de plantas. Los hay para la expresión en transporte de nutrientes, formación de paredes celulares, extensinas, desarrollo de diferentes partes de la raíz, etc (Helariutta et al., 2000; Bucher, 2002). La aplicación a la utilización de la raíz para obtener proteínas específicas por la llamada *rizosecreción* es una posibilidad demostrada en cultivo hidropónico pero aún no una actividad comercial. La modulación de la resistencia a parásitos de suelo, por ahora los nemátodos, es asimismo otro campo abierto, así como la fitorremediación, especialmente a mercurio, ya que existen mutantes resistentes en *Arabidopsis*, y a algunos iones pesados en tabaco. Los datos sugieren la posibilidad de manipulación genética, pero el problema es qué hacer con las plantas que han extraído el agente contaminante.

### 6.3. EL DOSEL

En la literatura inglesa la palabra normalmente utilizada para la parte aérea de la planta es *canopy* que tiene el mismo significado que en español *dosel*, aunque en ambas lenguas no corresponda con el conjunto de tallo, ramas y hojas que caracteriza a la parte visible de la planta sino al conjunto de las copas de los árboles de un bosque, especialmente el tropical. No obstante, a falta de mejor expresión, la adoptamos aquí para toda la parte aérea.

En esta sección omitimos el estudio de los tallos pues se tratan en otros dos capítulos (8 y 19). Fundamentalmente, pues, trataremos del dosel y, en particular, de su medida más conocida, el índice de cosecha.

#### 6.3.1. La estructura del dosel

La disposición de hojas, tallos o ramas y hojas es una característica varietal que puede llegar a constituir facies regionales fácilmente reconocibles; por ejemplo, las variedades de leguminosas adaptadas a climas con poca insolación suelen presentar hojas anchas y esparcidas, permitiendo así la interceptación del máximo de radiación solar; por el contrario, las de climas mediterráneos presentan hojas (foliolos) elongados, con disposición frecuentemente más cerrada al no ser la radiación un problema.

La estructura de dicha disposición, que garantiza insolación y aireación, ha motivado un gran número de estudios generalmente relacionados con la resistencia a estreses abióticos y al incremento de la tasa de asimilación fotosintética. Tanto en las colecciones de germoplasma como entre las variedades modernas de un gran número de cultivos se registra una importante variación genética utilizable en Mejora. Las modernas variedades de los cereales más importantes son un buen ejemplo, pero vale la pena citar también el llamado “garbanzo de invierno” o de siembra otoñal. Por su morfología y su buen crecimiento durante otoño e invierno en zonas mediterráneas, manejando adecuadamente variedades y densidades de siembra, cubre rápidamente el terreno formando un tapiz vegetal continuo a 70-100 cm del suelo: aparte de su alta producción y su excelente aptitud a la recogida mecánica, la “limpieza” del terreno en lo que a malas hierbas se refiere es notable.

#### 6.3.2. El índice de cosecha. La medición del carácter

Ya en 1920, Beaven, definió el término *coeficiente de migración* con el que expresaba la relación entre la cantidad de grano y la de paja de la cebada, pero no fue hasta principios de los años sesenta, en Australia, cuando Donald (1962, 1968) trabajando en trigo fijó el término índice de cosecha (“harvest index” HI), para expresar la proporción entre la producción de grano y la producción total de biomasa, el rendimiento del grano expresado como la fracción decimal del rendimiento biológico total.

Quedó por tanto definida la razón “índice de cosecha” como la relación entre la producción de grano con respecto a la producción total de la materia seca de la planta. Caben diferentes matizaciones; así, si en lugar de referir el término a la cantidad de grano se refiere a la cantidad de espigas se obtendría el índice de cosecha por espiga (Maich et al., 2007), por vaina, o por lo que se precise.

Sin embargo, teniendo en cuenta la dificultad que puede entrañar la determinación de la biomasa total, ya que hay que tener presente la biomasa perteneciente a las raíces, y esta determinación en ocasiones se hace normalmente imposible o, cuando menos, muy imprecisa, determinados

autores han redefinido al índice de cosecha como la proporción entre la biomasa de semillas y la biomasa total de la planta por lo alto del suelo (Donald y Hambling, 1976; Lecoeur y Sinclair, 2001). Así para la determinación del índice de cosecha, por lo menos para cultivos herbáceos anuales, se indica que sea cortado manualmente todo lo que esté sobre el suelo, puesto a secar hasta que el peso sea constante, realizar la pesada del total de la biomasa, trillar el grano, y proceder a la determinación de su peso (Donald y Hamblin, 1976; Innes et al., 1981), con esto tendremos los parámetros necesarios para calcular el índice de cosecha. Sin embargo, es necesaria la estandarización de la técnica en el cultivo específico con el objeto de minimizar pérdidas, y reducir los errores intrínsecos al procedimiento. Así, es necesario establecer la altura de corte sobre el suelo, ya que en función de los materiales que queramos comparar, más altos o más bajos, se puede llegar a producir pérdidas de hasta el 5% (Hay, 1995). Otra cuestión será el momento en el que se termine el índice de cosecha. En leguminosas, por ejemplo, en la madurez del cultivo se suele producir una elevada defoliación, lo cual representa una pérdida de biomasa total, y un incremento erróneo del índice de cosecha, frente a los cereales que mantienen en madurez las hojas senescentes. Otra cuestión a tener en cuenta es la traslocación de asimilados a las raíces, estando descrito alrededor del 10% de la biomasa del cultivo en cereales (Gregory et al., 1978; Barraclough, 1984).

Debido a esta dificultad intrínseca en la aplicación del término, se desarrolló el *índice de cosecha aparente*, en el cual sí se consideran las raíces dentro de la biomasa (Walker y Fioritto, 1984), pero como fácilmente se supone (véase la parte primera del presente capítulo) de difícil estima, ya que no se podrá asegurar el conseguir toda la biomasa de raíces del suelo, a no ser que el ensayo se realice en macetas o en algún tipo de contenedor, pero entonces el crecimiento del cultivo no tiene por qué ser similar al que tenga en condiciones de campo, lo que supone introducir quizás más error en la determinación. Prueba de ello es que este último parámetro no es utilizado, evaluándose el descrito por Donald.

Este problema es el responsable de la dificultad de evaluación del carácter en cultivos como los tubérculos, donde además, como en el caso de la patata que pierde toda su biomasa sobre el terreno, llegando a valores irreales de HI de 0,92 (Osaki et al., 1991).

En la Tabla 6.1 se muestran valores de índices de cosecha para diferentes cultivos. En general, los cereales muestran valores superiores a las leguminosas y oleaginosas, debido fundamentalmente al alto costo energético que se precisan para sintetizar mayores contenidos de lípidos y proteínas (Sinha et al., 1982).

**Tabla 6.1.** Valores de Índice de Cosecha de diferentes cultivos (tomados de Hay, 1995).

Especies	Tipo	Índice de Cosecha	Fuente
Triticum aestivum	Invierno	0,43-0,54	McLaren, 1981; Austin et al., 1989.
	Primavera	0,31-0,51	Gent y Kiyomoto, 1989 ; Hucl y Baker, 1987; Stapper y Fisher, 1990
Hordeum vulgare	Invierno	0,43-0,57	Ellis y Rusell, 1984
	Primavera	0,55-0,63	Ellis y Rusell, 1984
Triticale		0,45-0,47	Ford et al., 1984
Oryza sativa		0,35-0,62	Anon, 1978 ; Sahu et al., 1980.
Zea mays	Híbridos	0,36-0,57	Remison y Fajemisin, 1982; Deloughery y Crookston, 1979; Place y Brown, 1987.
Glycine max.		0,35-0,53	Schapaugh y Wilcox, 1980
Cicer arietinum	Invierno	0,28-0,36	Siddique, Sedgely y Marshall, 1984.
Vigna unguiculata	Determinado	0,44-0,64	Fernández y Miller, 1985
	Indeterminado	0,15-0,29	Fernández y Miller, 1985
Vigna radiata		0,23-2,47	Singh et al., 1980
Vigna mungo		0,17-0,30	Singh et al., 1980
Cajanus cajan		0,17-0,29	Singh et al., 1980
Brassica napus	Invierno	0,22-0,38	Huhn, Grosse y Leon, 1991
Manihot esculenta		0,30-0,65	Ramanujam, 1985
Solanum tuberosum		0,47-0,62	Knowles y Botar, 1992

### 6.3.3. Mejora del Índice de Cosecha

Tradicionalmente, el aumento de la productividad agrícola ha sido el principal fin de la mejora de plantas (sólo cuando las necesidades de alimentación han sido cubiertas sobradamente es cuando se plantean otros objetivos de mejora, como la mejora de la calidad). A la hora de utilizar el índice de cosecha como criterio de selección por su posible valor predictivo sobre el rendimiento final, la respuesta obtenida varía en función del cultivo o grupo de cultivos.

Así, en el caso de los cereales y en concreto en los trigos, el aumento del rendimiento de las modernas variedades se ha debido principalmente a la mejor distribución de la materia seca en el grano, o lo que es lo mismo a un incremento del índice de cosecha, pasando del 34 al 50% (López-Bellido, 1991). Passioura (1977) afirmó que el índice de cosecha resultó ser el factor más importante en el mejoramiento alcanzado para el rendimiento en semilla de trigo en ambientes secos de Australia. En experimentos realizados en trigo duro, se han obtenido correlaciones entre rendimiento e índice de cosecha superiores a 0,8 (Bouthiba et al., 2008). Mientras el rendimiento obtenido en plantas espaciadas (materiales  $F_{2-3,4}$ ) tiene poco valor predictivo, el índice de cosecha de esas plantas parece estar relacionado con su rendimiento en siembras comerciales (Syme, 1972; Fischer and Kertesz, 1976; Donald y Hamblim, 1976). Syme (1972) encontró que el índice de cosecha medido en plantas individuales cultivadas en parcelas explicaba más del 70% de la variabilidad para el rendimiento del grano en más de 40 cultivares de trigo de primavera; aunque no puede sustituir a la selección visual en  $F_2$  que hace el mejorador (Borghi et al., 1998).



En este grupos de plantas, el índice de cosecha es un parámetro más estable que el rendimiento de grano cuando es evaluado en diferentes ambientes (Hay, 1995), estando ambos caracteres positivamente correlacionados (Sharma et al., 1987; Paccaud, et al., 1985; Ellison et al., 1985), especialmente en altas densidades de cereal (Nass, 1980), y con materiales semi-enanos (McVetty y Evans, 1980).

Otros trabajos, sin embargo son críticos al respecto del uso del índice de cosecha como criterio de selección, sosteniendo que no tiene por qué presentar más ventajas (o desventajas) que el propio rendimiento de grano (Whan et al., 1981). La existencia de interacción genotipo x ambiente es la culpable de esto (Allan, 1983). El índice de cosecha lógicamente está influido por las condiciones ambientales, afectando éstas a los dos guarismos que componen la razón del índice, la producción del grano y la producción de biomasa. Diferentes factores influyen sobre una u otra producción; así, por ejemplo, la densidad de siembra del cultivo influye de forma significativa sobre la producción de la biomasa (Gimplinger et al., 2008), con la consecuente disminución del índice de cosecha. La fecha de siembra, fecha de recolección, temperatura (Lecoeur y Sinclair, 2001), etc., influirán igualmente. Toda esta variación es la que diversos autores justifican para que no sea usado como criterio de selección en generaciones tempranas. En este supuesto parece que se encuentran las leguminosas. Trabajos realizados en *Lathyrus sativus* y en *Cicer arietinum* así lo constatan (Lal, 1976; Turk et al., 2007).

Sin embargo, sí que puede ser usado como estrategia para mejorar el uso eficiente del agua en los cultivos, entendiéndose como la cantidad de biomasa acumulada por agua consumida (Zhang y Yang, 2004).

#### 6.3.4. Uso del índice en modelos de simulación

Un incremento lineal en el índice de cosecha respecto del tiempo ( $dHI/dt$ ) es una característica muy generalizada de la producción de semilla en una gran variedad de especies, entre las que se incluyen la soja (Spaeth y Sinclair, 1985; Sinclair, 1986), guisante (Lecoeur and Sinclair, 2001), *Cajanus cajan* (Robertson et al., 2001), cacahuete (Bennett et al., 1993; Hammer et al., 1995), sorgo (Muchow, 1988), maíz (Muchow, 1990; Echarte y Andrade, 2003), girasol (Bange et al., 1998) y trigo (Moot et al., 1996) Recientemente, Kemanian et al. (2007) han presentado un método para estimar el índice de cosecha el cual ha sido testado satisfactoriamente en cebada, trigo, y sorgo. En garbanzo, sin embargo, no se mantiene el incremento lineal en función del tiempo constante, dependiendo de diversas condiciones de cultivo (Soltani et al., 1999, 2004, 2005).

#### 6.3.5. Consideraciones finales

El índice de cosecha se toma como una medida de la eficacia en la distribución de asimilados. A lo largo del proceso de domesticación, esa redistribución es una constante a causa de la selección continuada a favor de mayor cantidad de grano. Hay, pues, una correlación alta entre índice de cosecha y rendimiento en grano, por lo que es una magnitud que ayuda a explicar lo que ha producido, pero no el cómo. Aunque los trigos CIMMYT de caña corta muestran un excelente índice de cosecha, no se obtuvieron midiéndolo: el índice se redujo como consecuencia de la obtención de líneas productivas semienanas derivadas de Norín-10 y no al revés. Tampoco los midió antes Strampelli, quien sin embargo siempre seleccionó cañas más cortas a igualdad de producción. En uno y otro caso se obtuvieron a posteriori mayores índices de cosecha, pero sin ser el objetivo inicial. En general, cuando se comparan trigos modernos y antiguos, el incremento en



producción es siempre paralelo al aumento de índice de cosecha (medido como grano/[grano+paja]). En todo caso, aunque las variedades modernas produzcan proporcionalmente más cantidad de grano y menos de paja que las antiguas, unas y otras producen igual cantidad de materia seca total, lo que de nuevo debe tomarse como prueba de las complejas relaciones entre los caracteres que definen la planta.

Un inconveniente adicional del índice de cosecha como objetivo primario de mejora es su baja heredabilidad, algo esperable, puesto que en él puede decirse que intervienen *todos* los genes de la planta y que la acción del ambiente es manifiesta sobre la estructura açerea.

## REFERENCIAS

- Allan, R.E. (1983). Harvest index of backcross-derived wheat lines differing in culm height. *Crop Sci.* 23: 1029-1032.
- Allen, O.N. and Allen, E.K. (1981). *The Leguminosae*. Madison, University of Wisconsin Press, Wis, EEUU.
- Anon (1978). Harvest index: criterion for selection for high yield ability. Annual Report of the International Rice Research Institute for 1977, pp: 21-25.
- Austin, R.B., Ford, M.A. and Morgan, C.L. (1989). Genetic improvement in the yield of winter wheat: a further evaluation. *J. Agric. Sci. Cambridge* 112: 295-301.
- Bange, M. P., Hammer, G.L. and Rickert, K.G. (1998). Temperature and sowing date affect the linear increases of sunflower harvest index. *Agron. J.* 90: 324-328.
- Barracough, P.B. (1984). The growth and activity of winter wheat roots in the field: root growth of high-yielding crops in relation to shoot growth. *J. Agric. Sci. Cambridge* 103: 439-442.
- Beaven, E.S. (1920). Breeding cereals for increased production. *J. Farmers' Club, London* 6: 107-131.
- Bennett, J.M., Sinclair, T.R., Ma, L. and Boote, K.J. (1993). Single leaf carbon exchange and canopy radiation use efficiency of four peanuts cultivars. *Peanut Sci.* 20: 1-5.
- Birnbaum, K., Shasha, D. E., Wang, J. Y., Jung, J. W., Lambert, G. M. and Galbraith, D. W. (2003). A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science*, 302: 1956-1960.
- Borghini, B., Accerbi, M. and Corbellini, M. (1998). Response to early generation selection for grain and harvest index in bread wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Breed.* 117: 13-18.
- Bos, I. and Caligari, P. (1995). *Selection methods in plant breeding*. Chapman and Hall, New York.
- Bouthiba, A., Debaeke, P. and Hamoudi, S.A. (2008). Varietal differences in the response of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) to irrigation strategies in a semi-arid region of Algeria. *Irrig. Sci.* 25 (3): 239-251.
- Bucher, M. (2002). Molecular root bioengineering. Pp. 279-294 En Waisel, Y, Eshel, A. and Kafkafi, U. (eds.), *Plant roots: the hidden half*. Marcel Dekker Inc., New York, EEUU.
- Cho, H-T and Cosgrove, D.J. (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 3237-3253

- Cholick, F.A., Welsh, J.R. and Cole, C.V. (1977). Rooting patterns of semidwarf and tall winter wheat cultivars under dryland field conditions. *Crop Sci.* 17:637-639.
- Deloughery, R.L. and Crookston, R.K. (1979). Harvest index of corn affected by population density, maturity, rating and environment. *Agron. J.* 71: 577-580.
- Donald, C.M. (1962). In search of yield. *J. Austr. Inst. Agric. Sci.* 28: 171-178.
- Donald, C.M. (1968). The breeding of crop ideotypes. *Euphytica* 17:385-403.
- Donald, C.M. and Hamblin, J. (1976). The biological yield and harvest index of cereals as agronomic and plant breeding criteria. *Adv. Agron.* 28: 361-405.
- Draye, X. (2002). Banana roots: architecture: and genetics. Pp. 261-277 En Waisel, Y, Eshel, A. and Kafkafi, U. (eds.), *Plant roots: the hidden half* . Marcel Dekker Inc., New York, EEUU.
- Echarte, L. and Andrade, F.H. (2003). Harvest index stability of Argentinean maize hybrids released between 1965 and 1993. *Field Crops Res.* 82: 1-12.
- Ellis, R.P. and Rusell, G. (1984). Plant development and grain yield in spring and winter barley. *J. Agric. Sci. Cambridge* 102: 85-95.
- Ellison, F.W., Latter, B.D.H. and Anttonen, T. (1985). Optimal regimes of selection of for grain yield and harvest index in spring wheat. *Euphytica* 34: 625-639.
- Feix, G., Hochholdinger, F. and Park, W.J. (2002). Maize root system and genetic analysis of its formation. Pp. 239-248 in Waisel, Y, Eshel, A. and Kafkafi, U. (eds.), *Plant roots: the hidden half* . Marcel Dekker Inc., New York, EEUU.
- Fernández, G.C.J. and Miller, J.C. (1985). Yield component analysis of five cowpea cultivars. *J. Am. Soc. Hortc. Sci.* 110: 553-559.
- Fischer, R.A. and Kertes, Z. (1976). Harvest index in spaced populations and grain weight in microplots as indicators of yielding ability in spring wheat. *Crop Sci.* 16: 55-59.
- Föhse, D., Claassen, N. And Jungk, A. (1991). Phosphorus efficiency of plants, II: significance of root radius, root hairs and cation-anion balance for phosphorus influx in seven plant species. *Plant Soil* 132: 261-272.
- Ford, M. A., Austin, R.B., Gregory, R.S. and Morgan, C.L. (1984). A comparison of the grain and biomass yields of winter wheat, rye and triticale. *J. Agric. Sci. Cambridge* 103: 395-403-
- Gent, M.P.N. and Kiyomoto, R.K. (1989). Assimilation and distribution of photosynthate in winter wheat cultivars differing in harvest index. *Crop Sci.* 29: 120-125.
- Gildon, A. And Tinker, P.B. (1983). Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. *New Phytol.* 95:247-261.
- Gimplinger, D.M., Erley, G.S.A., Dobos, G. and Kaul, H.P. (2008). Optimum crop densities for potential yield and harvestable yield of grain amaranth are conflicting. *Eur. J. Agron.* 28 (2): 119-125.
- Gregory, P.J., McGowan, M., Biscoe, P.V. and Hunter, B. (1978). Water relations of winter wheat. 1. Growth of the root system. *J. Agric. Sci. Cambridge* 91: 91-102.

- Grunewald, W., Parizot, B., Inzé, D., Gheysen, G. and Beeckman, T. (2007). Developmental biology of roots: one common pathway for all angiosperms?. *Intern. J. Plant Develop. Biol.* 1 (2): 212-225.
- Hammer, G.L., Sinclair, T. R., Boote, K.J., Wright, G.C., Meinke, H. and Bell, M.J. (1995). A peanut simulation model: I. Model development and testing. *Agron. J.* 87: 1085-1093.
- Hay, R.K.M. (1995). Harvest index. A review of its use in plant breeding and crop physiology. *Ann. Appl. Biol.* 126: 197- 216.
- Hayman, D.S. and Mosse, B. (1971). Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Growth of endogene inoculated plants in phosphate deficient soils. *New Phytol.* 70:19-27.
- Hetrick, B.D.A., Wilson, G.W.T. and Cox, T.S. (1992). Mycorrhizal dependence of modern wheat varieties, landraces and ancestors. *Can. J. Bot.* 70:2032-2040.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Jung, J. and Benfey, N. (2000). The short-root gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signalling. *Cell* 101: 555-567.
- Hucl, P. and Baker, R.J. (1987). A study of ancestral and modern Canadian spring wheats. *Can. J. Plant Sci.* 67: 87-97.
- Huhn, M., Grosse, F. and Leon, J. (1991). On harvest indices of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Agron. Crop Sci.* 166: 308-317.
- Innes, P., Blackwell, R.D., Austin, R.B. and Ford, M.A. (1981). The effects of selection for number of ears on the yield and water economy of winter wheat. *J. Agric. Sci. Cambridge* 97: 523-532.
- Kapulnik, Y. And Okon, Y. (2002). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria. Pp. 869-885 in Waisel, Y, Eshel, A. and Kafkafi, U. (eds.), *Plant roots: the hidden half* . Marcel Dekker Inc., New York, EEUU.
- Kazemi, H., Chapman, S.R. and McNeal, F.H. (1979). Components of genetic variance for root/shoot ratio in spring wheat. Pp. 597-605. *Proc. 5th. Int. Wheat genet. Symp.*, New Delhi, India
- Kemanian, A.R., Stöckle, C.O., Huggins, D.R. and Viega, L.M. (2007). A simple methods to estimate harvest index in grain crops. *Field Crops Res.* 110 (3): 208-210.
- Knowles, N.R. and Botar, G.I. (1992). Effect of altering the physiological age of potato seed tubers in the fall on subsequent production in a short-season environment. *Can. J. Plant Sci.* 72: 275-287.
- Lal, S. (1976). Relationship between grain and biological yields in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Tropical Grain Legume Bull.* 6:29-31.
- Lamb, J. F. S., Barnes, D. K. and Henjum, K.I. (1999). Gain from two cycles of divergent selection for root morphology in alfalfa. *Crop Sci.* 39 (4): 1026-1035.
- Lecoeur, J. and Sinclair, T.R. (2001). Harvest index increase during seed growth of field pea. *Eur. J. Agron.* 14 (3): 173-180.
- Li, Z., Mu, P., Li, C., Zhang, H., Li, Z., Gao, Y. and Wang, X. (2005). QTL mapping of root traits in a doubled haploid population from a cross between Upland and lowland japonica rice in three environments. *Theor. Appl. Genet.* 110:1244-1252.

- López-Bellido, L. (1991). *Cultivos Herbáceos. Vol. I. Cereales*. Ediciones MundiPrensa. Madrid
- Maich, R., Manero de Zumelzú, D. and Davidenco, V. (2007). Recurrent selection in hexaploid triticale (*X Triticosecale* Wittmack) under rainfed conditions. *Agriscientia* XXIV (1): 57-60.
- McLaren, J.S. (1981). Field studies of the growth and development of winter wheat. *J. Agric. Sci.* 97: 685-697.
- McVetty, P.B.E. and Evans, L.E. (1980). Breeding methodology in wheat. II. Productivity, harvest index, and height measured on F<sub>2</sub> spaced plant for yield selection in spring wheat. *Crop Sci.* 20: 587-589.
- Mendoza, L. and Alvarez-Buylla, E. R. (2000). Genetic regulation of root hair development in *Arabidopsis thaliana*: a network model. *J. Theor. Biol.* 204: 311-326.
- Miralles, D.J., Slafer, G.A. and Lynch, V (1997). Roting patterns in near-isogenic lines of spring wheat for dwarfism. *Plant Soil* 197:79-86.
- Monyo, J.H. and Whittington, W.J. (1970). Genetic analysis of root growth in wheat. *J. Agric. Sci. Cambridge* 74:329-338.
- Motzo, R., Atenne, G. and Deidda, M. (1993). Genotypic variation in durum wheat root Systems at different stages of development in a Mediterranean environment. *Euphytica* 66:197-206.
- Muchow, R.C. (1988). Effect of nitrogen supply on the comparative productivity of maize and sorghum in a semi-arid tropical environment. III. Grain yield and nitrogen accumulation. *Field Crops Res.* 18: 31-43.
- Muchow, R.C. (1990). Effect of high temperature on grain-growth in field-growth maize. *Field Crops Res.* 23: 145-158.
- Moot, D.J., Jamieson, P.D., Henderson, A.L., Ford, M.A. and Porter, J.R. (1996). Rate of change of harvest index during grain-filling of wheat. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 136: 387-395.
- Nass, H.G. (1980). Harvest index as a selection criterion for grain yield in two spring wheat crosses grown at two population densities. *Can. J. Plant. Sci.* 60: 1141-1146.
- O'Brien, L. (1979). Genetic variability of root growth in wheat. *Austr. J. Agric. Res.* 30:587-595.
- Osaki, M., Morikawa, K., Shimano, T., Urayama, M. and Tadano, T. (1991). Productivity of high-yielding crops. 2. Comparison of N, P, K, Ca and Mg accumulation and distribution among high yielding crops. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37: 445-454.
- O'Toole, J.C. and Bland, W.L. (1987). Genotypic variation in crop plant root Systems. *Adv. Agron.* 41:91-145.
- Paccaud, F.X., Fossati, A. and Hong, S. (1985). Breeding for yield and quality in winter wheat: consequences for nitrogen uptake and partitioning efficiency. *Z. Pflanzenzüchtg.* 94: 89-100.
- Passioura, J.B. (1977). Grain yield, harvest index and water use of wheat. *J. Aust. Inst. Agr. Sci.*, 43: 117-120.
- Place, R.E. and Brown, D.M. (1987). Modelling corn yields from soil moisture estimates: description, sensitivity analysis and validation. *Agric. Forest Meteorol.* 41: 31-56.

- Polomski, J. and Kuhn, N. (2002). Root research methods. pp. 295-321 in Waisel, Y, Eshel, A. and Kafkafi, U. (eds.), *Plant roots: the hidden half*. Marcel Dekker Inc., New York, EEUU.
- Ramanujam, T. (1985). Leaf density profile and efficiency in partitioning dry matter among high and low yielding cultivars of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Field Crops Res.* 10: 291-303.
- Remison, S.U. and Fajemisin, J.M. (1982). Comparative growth of maize cultivars with differences leaf orientation. *J. Agric. Sci. Cambridge* 99: 61-66.
- Robertson, M.J., Silim, S., Chauhan, Y.S. and Ranganathan, R. (2001a). Predicting growth and development of pigeonpea: biomass accumulation and partitioning. *Field Crops Res.* 70: 89-100.
- Robertson, M.J., Carberry, P.S., Chauhan, Y.S., Ranganathan, R. and O'Leary, G.J. (2001b). Predicting growth and development of pigeonpea: a simulation model. *Field Crops Res.* 71: 195-210.
- Royo, C., Martos, V., Ramdani, A., Villegas, D., Rharrabti, Y. and del Moral, L.F. (2008). Changes in yield and carbon isotope discrimination of Italian and Spanish durum wheat during the 20th century. *Agronomy J.* 100 (2): 352-360.
- Sahu, G., Murty, K.S. and Vinay Rai, R.S. (1980). Effect of season, nitrogen rate and planting density on harvest index in rice. *Oryza* 17: 28-33.
- Schapaugh, W.T. and Wilcox, J.R. (1980). Relationships between harvest index and other plant characteristics in soybeans. *Crop Sci.* 20: 529-533.
- Sharma, R.C. and Smith, E.L. (1987). Effect of seeding rates on harvest index, grain yield, and biomass yield in winter wheat. *Crop Sci.* 27: 528-531.
- Siddique, K.H.M., Sedgeley, R.H. and Marshall, C. (1984). Effect of plant density on growth and harvest index of branches in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Res.* 9: 193-203.
- Sieber, T.N. (2002). Fungal root endophytes. Pp 887-917 in Waisel, Y, Eshel, A. and Kafkafi, U. (eds.), *Plant roots: the hidden half*. Marcel Dekker Inc., New York, EEUU.
- Sinclair, T.R. (1986). Water and nitrogen limitations in soybean grain production. I Model development. *Field Crops Res.* 15: 125-141
- Singh, H.P., Saxena, M.C. and Sahu, J.P. (1980). Harvest index in relation to yield of grain legumes. *Tropical Grain Legume Bull.* 17/18: 6-8
- Sinha, S.K., Bhargava, S.C. and Goel, A. (1982). Energy as the basis of harvest index. *J. Agric. Sci. Cambridge* 99: 237-238.
- Soltani, A., Galeshi, S., Attarbashi, M.R. and Taheri, A.H. (2004). Comparison of two methods for estimating parameters of harvest index increase during seed growth. *Field Crops Res.* 89: 369-378.
- Soltani, A., Ghassemi-Golezani, K., Khoosheh, F.R. and Moghaddam, M. (1999). A simple model for chickpea growth and yield. *Field Crops Res.* 62: 213-224.
- Soltani, A., Torabi, B. and Zarei, H. (2005). Modeling crop yield using a modified harvest index based approach: application in chickpea. *Field Crops Res.* 91(2-3): 273-285.
- Spaeth, S.C. and Sinclair, T.R. (1985). Linear increase in soybean harvest index during seed-filling. *Agron. J.* 77: 207-211.

- Stapper, M. and Fischer, R.A. (1990). Genotype, sowing date and plant spacing influence on high-yielding wheat in southern New South Wales. 2. Growth, yield and nitrogen use. *Austr. J. Agric. Res.* 41: 1021-1041.
- Syme, J.R. (1972). Single plants characteristics as a measure of field plot performance of wheat cultivars. *Aust. J. Agric. Res.* 26: 753-760
- Turk, M., Albayrak, S. and Celik, N. (2007). Estimates of broad-sense heritability for seed yield and yield components of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Turkish J. Agric. Forestry*, 31 (3): 155-158
- Vance, C.P. (2002). Root-bacteria interactions: symbiotic N<sub>2</sub> fixation. Pp. 839-868 in Waisel, Y, Eshel, A. and Kafkafi, U. (eds.), *Plant roots: the hidden half*. Marcel Dekker Inc., New York, EEUU.
- Walker, A.K. and Fioritto, R.J. (1984). Effect of cultivation and plant pattern on yield and apparent harvest index of soyabean. *Crop Sci.* 24: 154-155.
- Whan, B.R., Rathgen, A.J. and Knight, R. (1981). The relation between wheat lines derivated from F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, and F<sub>5</sub> generations for grain yield and harvest index. *Euphytica* 30: 419-430.
- Zhang, J. and Yang, J. (2004). Improving harvest index is an effective way to increase crop water use efficiency. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Crop Science Congress* Brisbane, Australia, 26 Sep.-1 Oct 2004.
- Zheng, H.G., Babu, R.C., Pathan, M.S., Ali, L., Huang, N., Courtois, B and Nguyen, H.T. (2000). Quantitative trait loci for root-penetration ability and root thickness in rice: comparison of genetic backgrounds. *Genomics* 43:53-61.

CAPÍTULO **7**

---

**FENOLOGÍA  
Y ADAPTACIÓN  
DE LA CEBADA**

*Ernesto Igartua  
Alfonso Cuesta  
José Manuel Lasa  
María Pilar Gracia  
Samia Yahiaoui  
Marian Moralejo  
José Luis Molina-Cano  
Francisco J. Ciudad  
Ana María Casas*





## FENOLOGÍA Y ADAPTACIÓN DE LA CEBADA

---

Ernesto Igartua<sup>1</sup>, Alfonso Cuesta<sup>5</sup>, José Manuel Lasa<sup>1</sup>, María Pilar Gracia<sup>1</sup>, Samia Yahiaoui<sup>6</sup>, Marian Moralejo<sup>2</sup>, José Luis Molina-Cano<sup>3</sup>, Francisco J. Ciudad<sup>4</sup> y Ana María Casas<sup>1</sup>

**1 Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apdo 13034, 50080- Zaragoza**

**2 Dep. de Química, ETSEA, Univ.de Lleida, Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida/Lérida**

**3 Área de Cultivos Extensivos, IRTA, Av. Rovira Roure 191, E-25198 Lleida/Lérida**

**4 Instituto de Tecnología Agraria, Junta de Castilla y León, Apartado 172, 47071, Valladolid**

**5 Dirección actual: Dept of Crop and Soil Science, Oregon State University, Corvallis, OR 97331, EEUU**

**6 Dirección actual: INRA Argelia, Argel  
E-mail: igartua@eead.csic.es**

---

La fenología es la ciencia que estudia la aparición de eventos en el desarrollo de los organismos vivos (por ejemplo, la floración o la hibernación) en respuesta a factores climáticos (umbrales de temperatura, temperaturas acumuladas, precipitación, etc). Por extensión, los caracteres fenológicos son características observables y medibles de los organismos que hacen referencia a alguno de esos eventos.

Las respuestas fenológicas han sido una de las categorías tradicionales de clasificación, tanto popular como taxonómica, de muchos organismos. Por un lado son fáciles de observar y por otro, sobre todo, son de gran utilidad práctica. Describen los ciclos de las especies de interés para el hombre, como los cultivos, y han servido como hitos de los calendarios naturales desde el inicio de la agricultura. Los cereales de invierno no han sido una excepción, y en este capítulo describiremos su principal carácter fenológico, el comienzo de la floración, y las implicaciones agronómicas que tiene.

### 7.1. UNOS CULTIVOS MUY ADAPTABLES

#### 7.1.1. Variedades de invierno y de primavera

Los cereales de grano pequeño se dividen en dos tipos de variedades, conocidas como “de invierno” y “de primavera”. Las variedades de invierno se siembran en otoño, florecen al comienzo de la primavera y se cosechan al final de ésta o al principio del verano. Las variedades de primavera se siembran en invierno o primavera (según las zonas) y se cosechan durante el verano.

Los agricultores conocen bien esta clasificación desde muy antiguo. El clásico gaditano-romano Lucio Juno Moderato Columela ya describió dos tipos principales de cebada presentes en la Hispania romana del siglo I, en uno de los primeros tratados publicados sobre agricultura (Columela, ca. 50, pp. 52-53). Por un lado estaba la cebada hexástica o caballuna, de seis carreras, que se debía sembrar entre el 5 de noviembre y el solsticio de invierno. Por otro, la cebada dística o galática, de dos carreras, que se sembraba en los mejores lugares de clima frío hacia el mes de marzo, aunque podía adelantarse su siembra hasta el 15 de enero si lo templado del invierno lo permitía.

Sorprende la vigencia de una descripción escrita hace 1900 años, pues esa situación se asemeja bastante a la actual, y es prácticamente similar a la que había en España antes de la introducción de las variedades modernas, en la segunda mitad del siglo XX.

### 7.1.2. ¿Qué diferencia a las variedades de invierno de las de primavera?

Para responder a esta pregunta debemos remitirnos a la propia naturaleza de las plantas terrestres. Éstas son organismos sésiles que no pueden escapar ni buscar refugio ante las condiciones adversas. Necesitan, por tanto, disponer de mecanismos que les permitan soportar las variaciones de las condiciones ambientales. Uno de estos mecanismos es la capacidad de alterar su programa de desarrollo en respuesta a los estímulos ambientales. Gracias a la modulación de su programa de desarrollo, las plantas se aseguran de que la floración ocurre en el momento en el que existe la mayor probabilidad de éxito para la polinización, el desarrollo y la dispersión de la semilla.

Un “interruptor” importante en el programa de desarrollo es el que marca la transición del estado vegetativo al reproductivo, el comienzo de la floración. En muchas especies, esta transición está determinada por los cambios estacionales que son detectados por la planta. El fotoperiodo y la temperatura son dos de las principales señales ambientales que las plantas detectan para activar este “interruptor” que determina la época correcta para florecer.

Una reacción específica a la temperatura en las plantas es el requisito de exposición a un periodo de bajas temperaturas, para que la planta adquiera la capacidad de realizar la transición del estado vegetativo al estado reproductivo y de florecer. Este mecanismo, que recibe el nombre de “vernalización”, previene el desarrollo de las flores durante el invierno, proporcionando protección contra el frío a los órganos florales.

En muchas especies de plantas, la vernalización requiere una exposición larga a las bajas temperaturas de un invierno típico. Es una adaptación útil, porque muchas especies que requieren vernalización tienen un hábito bianual: De este modo las plantas comienzan a crecer durante el primer año, pero florecen en la primavera del segundo año de crecimiento. En las especies que requieren vernalización, es crucial que las plantas no sean “engañadas” para florecer al final del otoño, tras una exposición transitoria al frío seguida por condiciones todavía cálidas, pero con las temperaturas potencialmente letales del invierno por delante. Este es el motivo de que el requerimiento de frío deba ser por un periodo prolongado. El florecimiento de muchas especies que requieren de vernalización también se promueve por la exposición a fotoperiodos largos, y este requisito proporciona otro dispositivo de seguridad para impedir que la floración ocurra al final del otoño, cuando los días son cortos (Sung y Amasino, 2004).

En los cereales, la denominación de “genotipos de invierno” se ha considerado sinónimo de genotipos que requieren vernalización. Actualmente se consideran como genotipos de invierno aquellos en los que se necesita una señal externa para inducir el paso a la fase reproductiva, pudiendo ser ésta una acumulación de horas de frío (Limin y Fowler, 2002) y/o un fotoperiodo de suficiente duración (Karsai et al., 1999). Habitualmente, los genotipos de invierno que tienen sensibilidad al fotoperiodo, sólo la manifiestan cuando las necesidades de vernalización se han satisfecho completamente (Bernier et al., 1981). Los genotipos de primavera serían aquellos que no tienen requerimiento de vernalización y falta de respuesta al día largo.

Aunque hay que aclarar que esta clasificación resulta un tanto simplificada, pues las respuestas existentes, al menos en la cebada, difícilmente se ajustan a una situación de blanco o negro, sino más bien a toda una gama de grises, con genotipos adaptados a una serie de situaciones intermedias.

### 7.1.3. ¿Cómo se desarrollaron estos tipos de variedades?

Las reflexiones del apartado anterior son válidas para los ancestros silvestres de los cereales de grano pequeño actuales, en sus hábitats naturales. Las especies actuales que se consideran más cercanas a los ancestros silvestres del trigo y la cebada son *Triticum monococcum* ssp *aegilopoides* (Link) Thell., *Triticum turgidum* ssp *dicoccoides* (Körn ex Asch. & Graebner) Thell, y *Hordeum vulgare* ssp *spontaneum* (K. Koch) Thell. Aunque no se han cerrado las disputas sobre otros posibles centros de origen, hay un amplio consenso que admite el área conocida como Creciente Fértil como uno de ellos. Hay evidencias de que en esa zona, los ancestros silvestres del trigo y la cebada crecían de modo espontáneo, y ya eran cosechados para consumo hace aproximadamente de 10.000 a 13.000 años (Feldman, 2001). Siguiendo a Cockram et al. (2007a), es razonable pensar que estas especies están adaptadas al clima de esa área, donde la mayor parte de la precipitación cae entre la segunda parte del otoño y el comienzo de la primavera, al que siguen unos meses cálidos y secos. Estas especies han desarrollado estrategias para maximizar su supervivencia, usando las lluvias del otoño para establecer las estructuras vegetativas antes del invierno, y empleando la vernalización para retrasar la floración hasta que el peligro de heladas ha pasado. Además, la capacidad de detectar y responder al aumento del fotoperiodo les permite florecer y llenar la espiga antes de las altas temperaturas del final de la primavera. De este modo, casi todos los ancestros silvestres de la cebada y el trigo desarrollaron un hábito de crecimiento invernal, con la excepción de algunas entradas de cebada silvestre que se consideran híbridos con cultivares de primavera (Takahashi et al., 1963, 1968). Los primeros cereales que se domesticaron en el Creciente Fértil compartieron probablemente estos fenotipos de sus ancestros silvestres.

Sin embargo, hoy en día la cebada tiene uno de los rangos de adaptación más extensos de todas las especies cultivadas. Actualmente se cultiva en un área de aproximadamente 55 millones hectáreas, en regiones fértiles o marginales, desde el nivel del mar hasta los 4.500 m de altitud en el Himalaya, desde países tropicales como Colombia hasta zonas cercanas al Círculo Polar Ártico en Norteamérica y Europa (von Bothmer et al., 2003). Se ha llegado a esta situación a través de la modificación de los patrones de desarrollo y el control del momento de la floración por medio de la selección humana, favoreciendo la producción máxima en cada ambiente.

Uno de los requisitos necesarios para que se haya producido la expansión de la producción de la cebada debe haber sido el desarrollo de un hábito de crecimiento de primavera (con un requerimiento de vernalización bajo o ausente). Este hábito es necesario para colonizar zonas en las que

las temperaturas excesivamente bajas impiden la supervivencia del cultivo durante el invierno (von Bothmer et al., 2003). Sólo se puede especular acerca de las causas que motivaron esa selección, pero es probable que los ciclos de crecimiento extremadamente cortos fueran preferidos por las comunidades Pre-Mesopotámicas con vida seminómada, y por las poblaciones que migraban hacia zonas con inviernos de fríos extremos, letales para la supervivencia de las plantas (Komatsuda y col, 2006).

Un rendimiento óptimo exige el ajuste del ciclo vital de los cereales a los recursos disponibles en los ambientes donde se cultivan. Como se ha comentado más arriba, el momento de la transición del crecimiento vegetativo al reproductivo es un interruptor crítico del desarrollo. La modulación de la ocurrencia de esa transición, buscando el momento óptimo para cada clima y región geográfica, ha sido uno de los principales recursos de los agricultores para maximizar sus cosechas en estos cultivos. Los ambientes templados con una estación de crecimiento larga permiten que las cosechas del cereal florezcan tarde en el año y exploten así un período vegetativo extendido para el almacenamiento de recursos. Por contra, la floración temprana se ha desarrollado como adaptación a las estaciones de crecimiento cortas. Con conocimiento o sin él, los agricultores a través de la historia y, por último, los mejoradores, han seleccionado las fechas de floración más adecuadas para aumentar la producción y adaptar el cultivo a distintas regiones ecogeográficas, con condiciones muy alejadas de las de sus ambientes originarios (Cockram y col, 2007a).

#### 7.1.4. Evidencias de selección para los caracteres fenológicos

La relación entre la duración de las etapas de desarrollo de las plantas, y específicamente del tiempo que tardan en alcanzar la floración, y la definición de ecotipos y su distribución geográfica es un fenómeno ampliamente conocido en muchas especies. Actualmente, empieza a haber evidencias que relacionan ese fenómeno con la distribución alélica de los genes relacionados con el requerimiento de vernalización o con la respuesta al fotoperiodo, probablemente en respuesta a selección natural o artificial.

En *Arabidopsis*, varios autores han puesto de manifiesto la existencia de clinas latitudinales en el tiempo de desarrollo hasta floración y en la distribución de alelos de los genes *FRI* y *FLC*, fundamentales en la determinación de la respuesta a la vernalización en esta planta silvestre (Caicedo et al., 2004; Ehrenreich y Purugganan, 2006). En el arroz en cambio, como planta de día corto, los causantes de la distribución latitudinal de las variedades son algunos de los genes responsables de la respuesta al fotoperiodo (*Hd1* y *Ehd1*; Izawa, 2007). En la cebada, Cockram y col (2007a), pusieron de manifiesto una clara diferencia latitudinal en la distribución de los alelos del gen de respuesta al fotoperiodo largo, apareciendo el alelo sensible (*Ppd-H1*) en latitudes menores y el insensible (*ppd-H1*) en latitudes europeas más altas. Hoogendoorn (1985) puso de manifiesto la relación entre la fecha de emergencia de la espiga y la distribución geográfica de las variedades de *Triticum aestivum*. Kato et al. (1998), estudiando *T. dicoccoides* en Israel, demostraron que los genotipos de floración temprana están adaptados a zonas más cálidas y secas, mientras que las tardías lo están a zonas más frías y húmedas. Goldringer et al. (2006) obtuvieron resultados similares con *T. aestivum* en Francia. Young y Elliott (1994), pusieron de manifiesto la importancia de la fecha de espigado en la elección de zonas de cultivo y las fechas de siembra de la cebada en las condiciones del Oeste de Australia.

En las cebadas españolas autóctonas, se ha observado que la distribución de los ecotipos locales en la Península sigue claramente la distribución climática (Figura 4 en Yahiaoui et al. 2008). En ese estudio pudimos distinguir cómo las cebadas españolas de seis carreras se agrupan fundamentalmente en dos poblaciones diferenciadas genética y geográficamente, ubicándose una en los climas más continentales de la Meseta, con inviernos más fríos, y la otra en los climas más suaves del sur, de la costa de Levante y del valle del Ebro. Estas poblaciones presentaron además una frecuencia muy distinta del gen principal de respuesta a la vernalización en la cebada (*Vrn-H1*, que se describirá posteriormente), lo que puede indicar una adaptación específica al tipo de invierno predominante en cada región.

Algunos autores han tratado de imitar los procesos de selección que pudieron sufrir los cultivos en su dispersión fuera de los centros de origen o diversidad, y así evaluar los cambios genéticos que se pudieron producir como consecuencia de la adaptación a nuevos ambientes. Rhoné et al. (2008), crearon una población de trigo combinando 16 parentales, que fue sembrada y cosechada en diversas localidades francesas, a lo largo de un gradiente latitudinal y climático, sin selección artificial consciente durante 12 generaciones. Al evaluar las distintas generaciones a posteriori, comprobaron que había habido una selección disruptiva a favor del hábito de crecimiento de invierno, y de ciertos alelos de los 3 genes *VRN-1* (ortólogos de *Vrn-H1*, correspondientes a los tres genomas del trigo harinero), fuertemente involucrados en la respuesta a la vernalización, en el norte de Francia, y a favor del hábito de crecimiento de primavera (y de otros alelos en los genes *VRN-1*) en el sur. Un experimento similar fue llevado a cabo con cuatro poblaciones biparentales de cebada, cultivadas hasta la F6 en cuatro localidades a lo largo de un gradiente norte-sur en Japón (Takahashi y Yasuda, 1971). Aunque en aquella época no se pudieron evaluar las frecuencias genéticas con marcadores moleculares, sí que se constató una selección disruptiva, a favor del hábito invernal y de un mayor requerimiento de vernalización en el norte, y de hábito primaveral en el sur. Curiosamente, en las dos localidades más centrales geográficamente, las poblaciones mantuvieron una mayor variación fenotípica con respecto al tiempo a floración y requerimiento de vernalización que en las dos localidades más extremas. Este hecho sugiere la acción de una selección balanceada (a favor del mantenimiento del polimorfismo de los genes responsables de los fenotipos), posiblemente debido a la alternancia de condiciones ambientales contrastantes.

### 7.1.5. El cultivo de la cebada en España

Los climas que existen en las zonas cerealeras de la Península van del Mediterráneo Continental al Mediterráneo Subtropical y Marítimo, según la clasificación de Papadakis. Los tipos de invierno que se dan en estos climas, según esa misma clasificación, engloban los denominados *Triticum*, *Avena*, *Citrus* y *Tropical*, por orden de más riguroso (o más días de helada) a más templado. Con esta gran variedad de climas y de temperaturas invernales, ¿cómo se ha realizado el cultivo de los cereales de invierno en España? Veremos cuál es la situación para la cebada, que puede extrapolarse también al trigo.

En ciertas zonas de España ha sido normal sembrar siguiendo las pautas clásicas para las variedades de invierno y primavera, descritas al principio del capítulo. Por ejemplo, en Soria se siembran las cebadas de primavera en febrero y marzo y, en Albacete las de invierno en noviembre. Sin embargo, en el sur de España se han sembrado todos los tipos de cebada normalmente entre noviembre y diciembre. Los resultados de López Fuster en el Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete han demostrado que muchas variedades de primavera pueden sembrarse en otoño, sin que sufran el más mínimo daño derivado de las heladas invernales o de las tardías

de primavera. Se consigue así incrementar sustancialmente los rendimientos en grano y la calidad del mismo (citado por Molina-Cano, 1989). Esta misma situación se da en amplias zonas del Valle del Ebro, pero es extraordinaria en Castilla y León, donde la siembra otoñal se debe realizar con variedades de invierno.

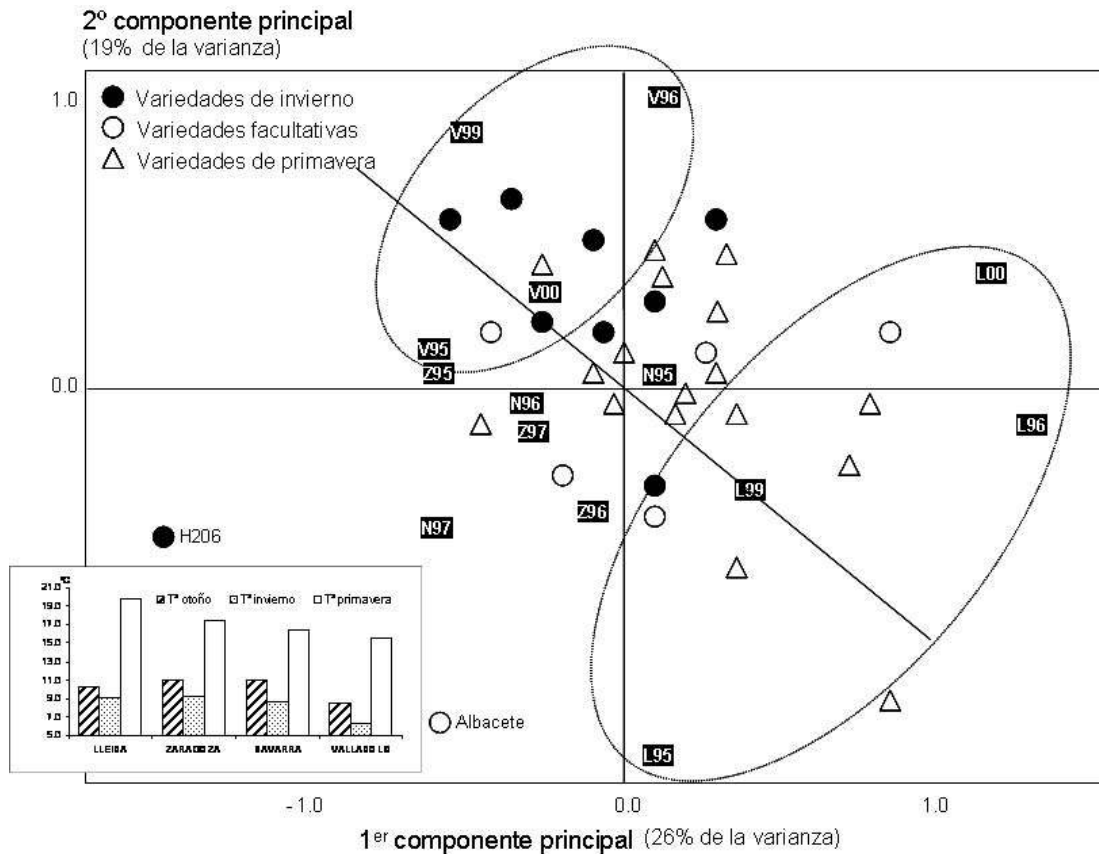
De modo que el cultivo típico de la cebada de primavera, sembrada en invierno, está restringido a zonas de la Meseta norte, de inviernos fríos y, sobre todo, de primaveras frescas que permiten un desarrollo final de la espiga en condiciones favorables al llenado del grano. En el resto de España la siembra del cereal se produce en otoño, en fechas variables según lo permita el tiempo de cada campaña. Aunque no es necesario sembrar a tempero, pues la siembra se puede realizar en seco, ésta puede verse retrasada por la sucesión de temporales de lluvias que mantengan la tierra demasiado húmeda durante semanas. Las variedades sembradas en otoño pueden ser de invierno o de primavera, dependiendo de la crudeza de las temperaturas invernales de cada región.

Vemos por tanto que España es una zona de transición para el cultivo de cereales en lo que respecta a la adaptación a la temperatura. En nuestro país coinciden climas parecidos a los existentes en las zonas originarias de la cebada y el trigo en Oriente Medio, con otros más parecidos a los centroeuropeos. Esto ha provocado que, además de las variedades típicas de invierno y primavera, en nuestro país se cultiven variedades denominadas facultativas, que presentan unas características intermedias. Estas variedades pueden tener, por ejemplo, una necesidad de vernalización reducida y/o una sensibilidad al fotoperiodo no dependiente de la satisfacción del requerimiento de vernalización.

Una serie de ensayos llevada a cabo en el marco del programa nacional de mejora de cebada junto con otros colaboradores (como el ITA de Navarra), empleó un conjunto de referencia de genotipos de cebada como instrumento de diagnóstico para describir las posibles adaptaciones agronómicas de los distintos tipos de variedades (Igartua y col, 2001). Este conjunto de 32 variedades y líneas de mejora incluía genotipos de invierno, primavera y facultativos. Todos ellos habían demostrado buenas condiciones agronómicas en condiciones españolas, aunque sus procedencias eran diversas, incluyendo genotipos de Europa, España y del Este del Mediterráneo. Se evaluaron durante varios años en siembras de otoño en zonas de la mitad norte de España (Lérida, Navarra, Valladolid y Zaragoza), y uno de los resultados más significativos se recoge en la Figura 1. En ella se representan los dos primeros ejes de un análisis AMMI para el rendimiento. Este análisis explica la interacción *genotipo por ambiente* del rendimiento gracias a un análisis de componentes principales sobre la variación no explicada por los factores principales (*genotipo* y *ambiente*). Los dos primeros componentes representados en la Figura 1 explican un 45% de esta variación, y conforman una situación en la que el principal contraste se produce entre los ensayos de Valladolid y los de Lérida (los ensayos aparecen resaltados en negro, con un código de una letra que indica la provincia y dos dígitos que indican el año de cosecha). Este contraste coincide con el de las temperaturas de las localidades, resumidas en el pequeño histograma insertado en la Figura 1. Lérida fue la más cálida, especialmente en invierno, y Valladolid la más fría. El hecho de que las variedades de invierno se sitúen más próximas a los ensayos de Valladolid, y las de primavera a los de Lérida (implicando mejor comportamiento relativo en estas últimas), sugiere también que este patrón de adaptación sigue un gradiente de temperatura invernal. Las variedades facultativas quedaron en posiciones intermedias, pero algo más cercanas a las de primavera.

Los ensayos de Navarra y Zaragoza quedaron en una posición intermedia con respecto al definido por Valladolid y Lérida. Este contraste guarda ciertas similitudes con la distribución de las dos poblaciones principales de cebadas autóctonas españolas, descrito anteriormente. De nuevo se revelan dos patrones de adaptación aparentemente ligados al clima, especialmente a la temperatura invernal.

Los dos únicos genotipos españoles del conjunto de las 32, Albacete y H206, aparecen designadas en el gráfico, y mostraron un comportamiento agronómico claramente diferenciado del resto de genotipos. Esta observación se vió refrendada por la evaluación agronómica de una colección amplia de cebadas autóctonas españolas. Esta colección, denominada la colección nuclear española de cebada, está constituida por 159 cebadas autóctonas y 16 variedades. Cuando se sembró en ensayos durante varios años y localidades, mostró características agronómicas singulares con respecto a las variedades europeas de invierno y primavera sembradas en esos mismos ensayos. La más destacable fue un mayor potencial de producción de las cebadas autóctonas que las variedades modernas, en condiciones de estrés hídrico (Yahiaoui, 2006).



**Figura 7.1.** Representación de los dos primeros componentes principales del análisis AMMI del rendimiento correspondiente a una serie de ensayos realizada con 32 genotipos de cebada a lo largo de varios años en localidades del norte de España. El histograma insertado representa las temperaturas medias estacionales medidas en las localidades donde se realizaron los ensayos.



### 7.1.6. La fenología y el rendimiento en la mejora de la cebada

En principio, la sensibilidad al fotoperiodo y el requerimiento de vernalización no tendrían por qué tener un efecto directo sobre el rendimiento. Es posible alcanzar rendimientos potenciales elevados con diversas combinaciones de alelos de los genes implicados en el control de esos procesos. Por ejemplo, Kirby y Appleyard (1980) no encontraron diferencias significativas de rendimiento asociadas a la sensibilidad al fotoperiodo en cebadas de primavera evaluadas en condiciones controladas. Sin embargo, en un estudio más reciente, Karsai et al. (1999) demostraron que los dos QTL que más afectan a la floración en la población Dicktoo x Morex (que luego demostraron ser *Ppd-H1* y *Vrn-H1*, que describiremos más adelante) muestran también un efecto detectable sobre varios caracteres agronómicos, incluyendo los componentes del rendimiento. Así que existen evidencias experimentales contradictorias sobre este punto.

Pese a que pudiera existir una contribución directa de los caracteres fenológicos al rendimiento de los cereales, su principal papel estriba en la influencia sobre la interacción genotipo por ambiente (GxE) del rendimiento, que es la expresión genotípica diferencial en función de los distintos ambientes. La interacción GxE aparece regularmente en los estudios sobre el rendimiento de los cereales de invierno en condiciones mediterráneas. Esta interacción dificulta sobremanera la identificación de los mejores genotipos en los programas de mejora. Además, su tipo y magnitud condiciona los objetivos de la mejora (adaptación amplia o específica) y la elección de las localidades de selección. Esta situación se ha trasladado igualmente a la detección de QTLs para el rendimiento, que suelen ser escasamente repetibles entre ensayos. Por este motivo, aunque se han detectado numerosos QTLs de rendimiento en un número importante de poblaciones, éstos han tenido un impacto limitado en la mejora asistida por marcadores (Thomas, 2003). Aunque hay otros motivos que contribuyen a explicar este relativo fracaso, como la limitada transferibilidad de QTLs entre trasfondos genéticos y los efectos modestos de muchos QTL.

En aquellas zonas donde los recursos hídricos son escasos, como en las regiones con clima mediterráneo, el factor principal de adaptación de los cultivos es el ajuste fenológico. En el caso de la cebada, la adecuación de la fecha de floración a las épocas del ciclo de cultivo en las que los recursos hídricos y ambientales son más favorables, determina el rendimiento final (van Oosterom y Acevedo, 1992). La variación que se produce en la fecha de floración en respuesta a las condiciones ambientales, se debe a la suma de los efectos directos e interacciones de los genes que regulan el momento de cambio del desarrollo vegetativo al reproductivo. Este hito determina a su vez la duración de las fases de desarrollo de la planta e, indirectamente, la producción de materia seca, el número de las estructuras que contribuyen al rendimiento final (hijuelos, espigas y granos), y la manera en que la materia seca es distribuida por la planta (Boyd 1996). Por ejemplo, las variedades precoces normalmente se comportan mejor en zonas de bajo rendimiento, debido a la menor disponibilidad de agua al final del ciclo (van Oosterom et al., 1993; Jackson et al., 1994). Otro ejemplo, las variedades que necesitan de mucha vernalización pueden sufrir notables retrasos en la floración en caso de falta de frío invernal, por lo que sufrirán un estrés hídrico terminal de mayor intensidad que otras variedades que necesiten de poca o ninguna vernalización.

Cuando se considera una serie de ensayos llevados a cabo a lo largo de una serie de localidades y años, como es habitual en los programas de mejora, es muy probable que se hayan dado condiciones ambientales contrastantes que favorezcan un tipo u otro de variedades, apareciendo casi inexorablemente la interacción GxE. El resultado es que la producción de variedades con buena adaptabilidad a zonas con variaciones climáticas anuales, como es el caso de los países de Europa Central o Meridional, se convierte en una tarea de dificultad notable (Worland et al., 1998).



En las condiciones de clima mediterráneo que se dan en España, la parte final del ciclo de cultivo suele ser seca y cálida. En consecuencia, es importante evitar floraciones tardías, que ocurrirían en épocas en las que el estrés hídrico produce una considerable disminución del rendimiento. Sin embargo, una excesiva precocidad en estas condiciones, impide al cultivo aprovechar al máximo las lluvias de principios de primavera y puede exponerlo a heladas tardías en un momento crucial del crecimiento. De este modo, existe un margen restringido de fechas de espigado en el que el cultivo puede expresar al máximo su potencial de rendimiento. Ese margen, probablemente distinto según zonas de cultivo, aún está por definir con precisión.

Los resultados obtenidos por Cuesta-Marcos y col (2008c) para una población de líneas haploides duplicadas de cebada en condiciones españolas, pusieron de manifiesto la estrecha interacción entre los genes que controlan la fecha de floración, las condiciones ambientales, y el rendimiento. Por un lado, los dos QTLs con un efecto mayor sobre la fecha de espigado mostraron a su vez un efecto QTL por ambiente para el rendimiento muy notable. Lo que ocurrió es que, dependiendo de la intensidad del estrés hídrico final, los genotipos más favorecidos podían ser los más tempranos o los más tardíos, por lo que el rendimiento aparecía afectado por la precocidad de modo variable según los ambientes. Por otra parte, al subdividir la población en tres clases homogéneas con respecto a la fecha de floración, y repetir la búsqueda de QTL en esas subpoblaciones, aparecieron nuevos QTLs para el rendimiento, no detectados en la población completa. El motivo fue que estos QTL estaban ocultos por la relación cambiante entre la fecha de floración y el rendimiento a lo largo de todo el rango de variación de floraciones de esa población de cebada.

## **7.2. FENOLOGÍA: FISIOLOGÍA, GENÉTICA Y MEJORA**

El manejo eficiente de los caracteres fenológicos en programas de mejora requiere conocer su control genético. La heredabilidad del carácter “fecha de floración” es bastante alta, por lo que es relativamente fácil de manipular por selección. Sin embargo, el control genético es bastante complejo, pues existen cinco o seis genes mayores involucrados, más un número elevado de QTL menores. Además, existen interacciones epistáticas entre algunos de los genes principales, por lo que son bastante habituales las segregaciones transgresivas y la variabilidad críptica (escondida). Por ejemplo, es posible obtener un genotipo con requerimiento de vernalización en un cruzamiento de dos parentales que no lo posean (Szucs y col, 2007). Por tanto, la manipulación de los caracteres fenológicos en programas de mejora se facilitará en gran medida si se conocieran sus características fisiológicas, la localización de los genes responsables y sus efectos.

### **7.2.1. Factores que determinan la fecha de floración**

Los primeros modelos propuestos para explicar las variaciones en la fecha de floración de la cebada eran modelos mendelianos simples. Nilan (1964) cita varios estudios que proponían segregaciones 3:1 (tanto a favor de floraciones tempranas como tardías), y otros que proponían modelos basados en dos genes, siendo la floración tardía dominante sobre la temprana. Además, se sabía que este carácter estaba muy influenciado por factores ambientales. Desde la década de los años 30 del siglo XIX, se sabía que la exposición a bajas temperaturas podía inducir la floración en las plantas (estudios citados en Salisbury, 1963). Por otro lado, Garner y Allard (1920) descubrieron que la floración en muchas plantas estaba condicionada por el fotoperiodo.

Estudios posteriores pusieron en evidencia que la variación en la fecha de floración, entre diferentes genotipos y entre individuos de poblaciones segregantes, era debida a factores como la fecha de siembra, la localización de los experimentos o los genotipos elegidos como parentales de las poblaciones segregantes. Esto llevó a Bell (1939) a proponer que la época de floración en la cebada suponía una relación compleja entre fisiología, genotipo y ambiente. Ya en 1958, Johnson y Taylor expresaron claramente que la fecha de floración es un carácter cuantitativo determinado por la interacción del genotipo y el ambiente, y en el que el fotoperiodo y la vernalización tenían una influencia directa sobre las tasas de desarrollo.

Posteriormente, el uso de técnicas moleculares de mapeo y análisis de aneuploides, permitió identificar numerosos genes, o regiones cromosómicas, asociados con el control de la época de floración en los cereales de invierno, al menos 20 en trigo y 16 en cebada (Laurie et al., 1995; Worland, 1996; Hayes et al., 1997). El estudio de la floración, suele ir acompañado del estudio de las diferentes fases de desarrollo (estados fenológicos), intentando explicar el efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre la duración de las diferentes fases fenológicas y, por tanto, su relación con el adelanto o retraso de la floración (García del Moral et al., 2002), así como el efecto de la interacción genotipo por ambiente y su variación en los diferentes estados fenológicos. Existen diversas clasificaciones de los diferentes estados fenológicos, bien por la apariencia externa de la planta (Large, 1954; Haun, 1973), o bien describiendo los cambios morfológicos que se producen en el meristemo apical (Kirby y Appleyard, 1986). Una de las más prácticas desde el punto de vista agronómico es la clasificación de García del Moral et al. (2002), quienes dividieron el desarrollo de la planta en tres estados o fases fenológicas: vegetativa (desde germinación hasta inicio de la floración), reproductiva (hasta antesis o espigado) y fase de llenado del grano (hasta madurez del grano).

En resumen, se puede afirmar que los principales componentes que influyen en el desarrollo son el fotoperiodo y la temperatura, tanto la temperatura *per se* como la baja temperatura asociada al requerimiento de vernalización. Mientras que el fotoperiodo y la vernalización afectan solamente a la tasa de desarrollo en determinadas fases fenológicas, la temperatura *per se* afecta a todas las fases y no se ha descrito ningún cultivar cuya tasa de desarrollo sea insensible a este factor (García del Moral et al., 2002).

¿Cómo afectan estas condiciones ambientales al desarrollo y la floración de los cereales, especialmente en la cebada, y cuál es el control genético de las respuestas genotípicas a las mismas?

### 7.2.2. Fotoperiodo

La respuesta de las plantas a los cambios en el número de horas de luz es uno de los principales factores determinantes de la duración de las diferentes fases de desarrollo y, por tanto, de adaptación al ambiente (Evans, 1993).

Los cereales de grano pequeño son, en general, plantas de día largo, es decir, florecen cuando el número de horas de luz de los días es creciente (Thomas y Vince-Prue, 1997). En el caso de la cebada, esta generalización está limitada por el hecho de que existe un umbral inferior de fotoperiodo, por debajo del cual la floración no ocurre de ninguna manera (8-10 horas en función de los genotipos), y un umbral superior por encima del cual un incremento en el fotoperiodo no supone un cambio en la tasa de desarrollo (13-18 horas en función de los genotipos, según Roberts et al., 1988). Entre ambos límites, la respuesta de los genotipos de cebada al fotoperiodo creciente permite su clasificación en diferentes grupos, tal como propusieron Boyd et al. (2003):

- genotipos que no responden, o que lo hacen mínimamente, al incremento en el fotoperiodo. Gallagher et al. (1991) se refieren a estos genotipos como insensibles al fotoperiodo, *Photoperiod insensitive* o PI, en contraposición con aquellos que sí responden (*Photoperiod sensitive* o PS);
- genotipos cuyo grado de sensibilidad al fotoperiodo varía a lo largo del desarrollo. Estos genotipos sensibles al fotoperiodo son, sin embargo, insensibles durante el periodo de tiempo que sigue inmediatamente a la germinación, denominado periodo preinductivo o periodo básico vegetativo (BVP, Major, 1980), y durante otro periodo que precede a la antesis, denominado postinductivo. El intervalo entre ambos periodos de insensibilidad se denomina periodo inductivo o periodo de sensibilidad al fotoperiodo (PSP, Major, 1980) y en él se produce una relación lineal entre el incremento en el fotoperiodo y el adelanto en el espigado, siendo la tasa de crecimiento variable en función de los genotipos y la temperatura (Ellis et al., 1988).

La respuesta de las plantas a la diferente duración de las fases de luz y oscuridad se debe a la presencia de pigmentos fotorreversibles denominados fitocromos. La forma inactiva del fitocromo, *Pr*, al absorber luz roja, se transforma en otra forma, *Pfr*, fisiológicamente activa pero inestable (Smith y Whitelam, 1990), capaz de absorber luz infrarroja. Este proceso se revierte en condiciones de oscuridad. La inducción de la floración en la cebada está promovida por la absorción de luz infrarroja (Jabben y Deitzer, 1979), con lo que el predominio de la forma *Pfr* sobre la *Pr*, que se da en condiciones de día largo, activa el proceso de inducción de la floración y en el caso contrario lo inactiva. El mecanismo de inducción parece ser debido a la acumulación de estímulos de floración en las hojas, que se translocan a los ápices de los tallos, desencadenando el proceso reproductivo. Hay evidencias del papel de las giberelinas en estos estímulos (Jackson y Thomas, 1997).

### 7.2.3. Control genético de la respuesta al fotoperiodo

Los estudios fundamentales llevados a cabo por Laurie et al. (1994, 1995) pusieron de manifiesto la presencia de dos QTL de gran efecto, que denotaban la existencia de dos genes mayores relacionados con la respuesta al fotoperiodo en la cebada, en un cruzamiento de una variedad de invierno por otra de primavera (Igri x Triumph). Estos genes, aún no identificados en ese momento, fueron denominados *Ppd-H1* y *Ppd-H2*, siguiendo la nomenclatura utilizada para el trigo (Law et al., 1993).

*Ppd-H1* se sitúa en el brazo corto del cromosoma 2H, a 1 cM del marcador MWG858, y confiere sensibilidad al fotoperiodo largo, de tal manera que el alelo sensible provoca el adelanto de la floración a medida que el fotoperiodo crece, mientras que la variación no es significativa en condiciones de fotoperiodo corto. El gen *Ppd-H2*, situado en el brazo largo del cromosoma 1H, tiene un efecto significativo en la variación de la floración solamente en condiciones de fotoperiodo corto. No existe evidencia de interacciones epistáticas entre ambos genes (Laurie et al., 1995).

Actualmente se han propuesto ya candidatos para ambos genes. Turner et al. (2005) identificaron *Ppd-H1* mediante clonaje posicional; se trata de *HvPRR7*, un gen *pseudo-response regulator 7*, que está bajo control del ritmo circadiano. Se dispone de un marcador STS diagnóstico del gen (un SNP al digerir con *BstUI*). Recientemente, se ha identificado *HvFT3* como candidato para el gen *Ppd-H2* (Faure et al., 2007).

Otros genes que causan diferencias en la fecha de floración en condiciones de fotoperiodo corto son *Eam6* (sinónimo *eps2s*, Franckowiak, 2007), *eam7* (sin. *ea<sub>7</sub>* o *e<sub>c</sub>*), en el brazo corto del cromosoma 6H (Stracke y Börner, 1998), *eam8* (sin. *ea<sub>k</sub>*, *ea-a*, o *mat-a*), en el brazo largo del cromosoma 1H (Franckowiak, 1997), *eam10* (sin. *ea<sub>sp</sub>*) en el brazo largo del cromosoma 3H (Börner et al., 2002), y *eam9* (sin. *ea<sub>c</sub>*) en el brazo largo del cromosoma 4H (Franckowiak, 1997; Lundqvist et al., 1997).

#### 7.2.4. Vernalización

Algunos genotipos de cebada precisan de un periodo de exposición a bajas temperaturas para inducir la floración. La diversidad de respuestas genotípicas es grande, desde aquellos en los que la acumulación de horas de frío adelanta la floración en mayor o menor medida, hasta aquellos en los que la vernalización es un requisito indispensable (Roberts et al., 1988). Existen, por otra parte, genotipos puros de primavera en los que el requerimiento de vernalización es nulo.

Salisbury (1963) propuso que la exposición a bajas temperaturas provocaba en la planta la síntesis de una sustancia, a la que denominó *vernalina*, que hacía a las plantas sensibles a los efectos del fotoperiodo. Hoy en día, sin embargo, aún no se ha demostrado la existencia fisiológica de la misma.

Se han propuesto varios modelos con intervención de interacción epistática para explicar el mecanismo de respuesta a la vernalización en *Triticum monococcum* (Dubcovsky et al., 1998; Tranquilli y Dubcovsky, 2000). Yan et al. (2004) propusieron un modelo para el trigo diploide según el cual, en aquellos genotipos que presentan un requerimiento de vernalización, existe un represor de la floración que deja de actuar cuando se ha acumulado un número suficiente de horas de frío, permitiendo el tránsito de la fase vegetativa a la reproductiva.

A diferencia de lo que ocurre con los efectos de la temperatura *per se*, la vernalización no afecta directamente a la tasa de iniciación de las hojas (o lo hace ligeramente), sino al número final de hojas. Por esta razón, a menudo se utiliza el número de hojas como un indicador de la sensibilidad a la vernalización, siempre que se hayan satisfecho los otros requisitos necesarios (Kirby et al., 1985).

Los rangos de temperatura entre los que existe efecto de vernalización en la cebada varían, según los autores, desde -5 hasta 16°C, con un efecto máximo entre 0 y 8°C (Roberts et al., 1988), o desde 3 hasta 12°C, con un efecto óptimo en 7°C (Trione y Metzger, 1970).

A diferencia de lo que ocurre con el fotoperiodo, aquí no se ha propuesto una translocación de estímulos desde las hojas hasta los ápices de los tallos, sino que las células en fase de división mitótica en el meristemo apical son las únicas capaces de percibir la influencia de la vernalización (Burn et al., 1994).

También es de gran relevancia el requerimiento de vernalización en los procesos de adaptación en la cebada y otros miembros de la familia *Triticeae*, por estar asociado a la resistencia al frío (Skinner et al., 2006).

### 7.2.5. Control genético del requerimiento de vernalización

El modelo clásico de control genético de las necesidades, formulado por Takahashi y Yasuda (1971) se basaba en 3 loci: *Sh/sh*, *Sh<sub>2</sub>/sh<sub>2</sub>* y *Sh<sub>3</sub>/sh<sub>3</sub>* (según la nomenclatura de los autores), con localización aparente en los cromosomas 4HL, 5HL, y 1HL, respectivamente. Estos genes presentan relaciones epistáticas entre sí. Sólo la combinación alélica *ShShsh<sub>2</sub>sh<sub>2</sub>sh<sub>3</sub>sh<sub>3</sub>* confiere hábito de crecimiento invernal. Todas las demás producen genotipos con hábito primaveral. Tanto *Sh<sub>2</sub>* como *Sh<sub>3</sub>* son epistáticos sobre el alelo de invierno dominante *Sh*, y el alelo recesivo de primavera *shsh* es epistático sobre *sh<sub>2</sub>* y *sh<sub>3</sub>* (Yasuda, 1981).

Takahashi y Yasuda (1971) estudiaron una gran cantidad de genotipos de cebada. Estos autores encontraron una gradación de requisitos de vernalización, aparentemente relacionada con la existencia de una serie alélica en el locus *Sh<sub>2</sub>*, donde varios alelos dominantes condicionan variaciones en la respuesta a las bajas temperaturas en aquellos genotipos que no son puramente de invierno. Tanto el alelo recesivo *sh<sub>1</sub>* como el dominante *Sh<sub>3</sub>*, ambos alelos de primavera, son epistáticos sobre el alelo dominante *Sh<sub>2</sub>* y son sólo funcionales en presencia de uno u otro de los alelos dominantes de *Sh<sub>2</sub>*, lo cual contribuye a mayores posibilidades de variación fenotípica (Boyd et al., 2003).

La clonación de los genes candidatos *Vrn1A<sup>m</sup>* y *Vrn2A<sup>m</sup>*, que regulan el requerimiento de vernalización en trigo diploide (Yan et al., 2003, 2004) ha servido para un mejor entendimiento del proceso en los cereales. También ha servido para la clonación de los genes correspondientes en la cebada (*Vrn-H2*, sinónimo de *Sh<sub>1</sub>* y *Vrn-H1*, sinónimo de *Sh<sub>2</sub>*), basándose en la ortología entre trigo y cebada (von Zitzewitz et al., 2005).

Las variantes alélicas en el locus *Sh<sub>3</sub>* (ahora también denominado *Vrn-H3*) habían sido descritas solamente en cebadas de latitudes extremadamente altas o bajas (Takahashi y Yasuda, 1971), con lo que en las variedades comúnmente utilizadas en Europa solamente se esperaba variación en los loci *Sh<sub>1</sub>* y *Sh<sub>2</sub>*. Recientemente, se ha identificado el gen *Vrn-H3*, que corresponde a un homólogo del gen *FT* de *Arabidopsis*, *HvFT1* (Yan et al., 2006; Faure et al., 2007). Este gen se ha localizado en el brazo corto del cromosoma 7H, y no en el 1H, como predecían los estudios clásicos de Takahashi.

Según el modelo molecular que explica la interacción epistática entre *Vrn2* y *Vrn1* en la familia *Triticeae*, propuesto por Yan et al. (2004), *Vrn2* codifica un represor dominante de la floración (gen candidato *ZCCT1*) que inhibe la expresión del gen de floración *Vrn1* (gen candidato *TmAP1*). La vernalización regula la expresión de *Vrn2* en la medida en que la disminuye, permitiendo la expresión de *vrn1* en los genotipos de invierno, mientras que no existe ningún requisito de vernalización en el caso de que no se produzca el represor (genotipo *vrn2*), independientemente del alelo presente en *Vrn1*. De la misma manera, no necesitan vernalización aquellos genotipos que producen el represor (alelo dominante *Vrn2*) pero carecen de un lugar de unión del represor (alelo dominante *Vrn1*).

Los genes candidatos ortólogos en cebada son, según von Zitzewitz et al. (2005), el cluster de genes *ZCCT-H* (correspondientes a *ZCCT1*) y *HvBM5* (correspondiente a *TmAP1*). Ambos son factores de transcripción, *HvBM5/Vrn-H1* de tipo "MADS box" y *HvZCCT/Vrn-H2* contiene un "zinc-finger" y un dominio CCT.

La variación alélica en *Vrn-H1* parece que se debe a diferencias en el primer intrón del gen (Fu et al., 2005; von Zitzewitz et al., 2005; Cockram et al., 2007b), aunque también se han propuesto variaciones debidas a diferencias en el promotor (Yan et al., 2003; Beales et al., 2005). Respecto a la variación alélica en *Vrn-H2*, Karsai et al. (2005) comprobaron que se debía a presencia/ausencia de los genes *ZCCT-H* mientras que Dubcovsky et al. (2005) propusieron que es el gen *ZCCT-Ha* el principal responsable. Evidencias posteriores parecen indicar que el responsable de la variación alélica en *Vrn-H2* podría ser *ZCCT-Hb* (Trevaskis et al., 2006, Szucs et al., 2007).

### 7.2.6. Interacción entre la vernalización y el fotoperiodo

La vernalización y la respuesta al fotoperiodo no son fenómenos independientes. La exposición a fotoperiodos de corta duración en las primeras etapas de crecimiento, en algunos genotipos que responden al incremento del fotoperiodo, puede tener un efecto similar a la exposición a bajas temperaturas. Evans (1987) propuso el nombre de “vernalización de día corto” para este fenómeno. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que este fenómeno es sólo aparente, y que se puede explicar por la suma del efecto de sensibilidad al fotoperiodo corto aportado por el alelo sensible en *Ppd-H2* al efecto epistático de los alelos de invierno en *Vrn-H1* y *Vrn-H2* (Cuesta-Marcos y col, 2008b).

El fenómeno de vernalización por bajas temperaturas tiene efecto en la reducción de la duración de la fase pre-inductiva (aquella que sigue a la nascencia, en la que la planta es insensible al incremento del fotoperiodo) y en la reducción del número de hojas del tallo principal (Roberts et al., 1988).

Parece probado que la expresión del gen *Vrn-H2* es reprimida por el fotoperiodo corto (Trevaskis y col, 2006). Aún no está claro dónde se produce la acción represora de *Vrn-H2*. Una hipótesis es que esta acción se efectúa sobre *Vrn-H3* (Yan y col, 2004) y otra defiende que es sobre *Vrn-H1* (por ejemplo, en Trevaskis y col, 2006). En cualquier caso, es un gen que interviene en las dos rutas, la de la vernalización y la del fotoperiodo, poniéndose de manifiesto los contactos entre ambas.

Una exposición moderada a bajas temperaturas tiene además el efecto de incrementar la resistencia al frío, necesaria en aquellas zonas donde se producen temperaturas por debajo de 0°C. La máxima tolerancia a las bajas temperaturas se consigue en la fase vegetativa del desarrollo (Fowler et al., 2001). Los genotipos de invierno suelen ser más resistentes al frío; sin embargo, este proceso de inducción de la resistencia se produce de la misma manera en los genotipos de primavera. Se ha comprobado, en un gran número de genotipos de invierno de cebada, que los fenotipos de respuesta al fotoperiodo, a la vernalización y la resistencia a las bajas temperaturas se encuentran en todas las combinaciones posibles (Karsai et al., 2001). El hecho de que estos tres fenómenos estén interrelacionados es más probable que sea atribuible a efectos de ligamiento que a pleiotropía (Francia et al., 2004). La identificación de los genes *CBF*, involucrados en la tolerancia al frío, en la proximidad de *Vrn-H1* apoya esta observación (Skinner et al., 2006).

### 7.2.7. Temperatura

De forma general, y como característica común a todos los procesos biológicos, el desarrollo del trigo y de la cebada y, por tanto, la fecha de floración, se ve adelantado según una relación lineal con el aumento en la temperatura, hasta un valor óptimo por encima del cual no se produce un adelanto mayor, o incluso se retrasa (Roberts et al., 1988). Esta relación se cumple en todos los genotipos y todas las fases de desarrollo de la cebada, si bien el grado de sensibilidad a la temperatura varía en función de los genotipos. Vamos a describir esta relación para la cebada, si bien es similar para el trigo.

Tradicionalmente, se ha empleado el concepto de integral térmica (grados-día acumulados), basado en la observación de que, en muchas circunstancias, se cumple esta relación lineal:

$$\frac{1}{f} = a + bT$$

Donde  $f$  es el tiempo entre siembra y floración (días), y  $1/f$  es la tasa de desarrollo.  $T$  es la temperatura media diurna ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $a$  es la temperatura base por debajo de la cual no se produce avance en el desarrollo y  $1/b$  es la integral térmica, siendo estos dos valores  $a$  y  $b$  constantes específicas de cada genotipo. Solamente si se cumple esta ecuación se puede afirmar que la floración ocurre cuando la integral térmica necesaria, diferente para cada genotipo, ha sido acumulada. Según Slafer y Rawson (1994), esta ecuación puede aplicarse independientemente a cada fase de desarrollo, y se puede obtener para cada genotipo, para un determinado fotoperiodo y bajo unas determinadas condiciones de vernalización. La temperatura, además de influir en la tasa de desarrollo y, por tanto, en la duración de las diferentes fases, también afecta a la tasa de iniciación de hojas y espiguillas y al filocrono o tasa de aparición de las hojas (Klepper et al., 1982).

Sin embargo, cuando se producen cambios en la duración del fotoperiodo, como ocurre en condiciones de campo, la tasa de desarrollo varía en función de la fenología, con lo que el concepto de integral térmica no es totalmente aplicable (Roberts et al., 1988). Para solventar esta dificultad, Ellis et al. (1988) introdujeron el concepto de integral fototérmica:

$$\frac{1}{f} = a + bT + cP$$

Donde  $P$  es el fotoperiodo en horas  $\text{día}^{-1}$ ,  $T$  es la temperatura media diurna ( $^{\circ}\text{C}$ ) y  $a$ ,  $b$  y  $c$  son constantes específicas de cada genotipo. Los límites de esta relación se encuentran entre una temperatura base mínima y una óptima, y entre unos valores de fotoperiodo mínimos (que impiden la floración) y máximos, cuya superación no supone un cambio en la respuesta.



### 7.2.8. Control genético de la precocidad intrínseca

Cuando la influencia de la vernalización y el fotoperiodo sobre la fecha de floración es eliminada experimentalmente, satisfaciendo las necesidades de los diferentes genotipos, se observa que aún existe variación en las mismas. Los genes implicados en esta variación, cuyos efectos no son directamente atribuibles a la vernalización o fotoperiodo, se han denominado en general *earliness per se* o genes de precocidad intrínseca (*eps*). Laurie et al. (1995) identificaron 8 loci *eps*: *eps2S* en el brazo corto del cromosoma 2H, próximo al centrómero; *eps3L* en el brazo largo del cromosoma 3H; *eps4L* en el brazo largo del cromosoma 4H; *eps5L* en el brazo largo del cromosoma 5H; *eps6L.1* y *eps6L.2*, ambos en el brazo largo del cromosoma 6H; *eps7S* en el brazo corto del cromosoma 7H y *eps7L* en el brazo largo del cromosoma 7H. Además, se han identificado otros loci causantes de precocidad denominados *Early maturity* QTL o *Eam* (Franckowiak et al., 2003; Franckowiak 2004), algunos de los cuales son sinónimos de los *eps*, aunque otros lo son de los genes de respuesta al fotoperiodo.

Las causas de la variación en la fecha de floración por causas distintas al fotoperiodo o la vernalización han sido objeto de diferentes estudios. Roberts et al. (1988) propusieron la relación de esta variación con la duración del periodo pre-inductivo que sigue a la nascencia, en el cual se produce crecimiento y aumento del número de hojas pero no se produce la inducción de la floración. Sin embargo, la duración de este periodo varía muy poco entre genotipos, y su correlación con el número de hojas del tallo principal es baja, con lo que las diferencias entre genotipos serían debidas a diferencias en la tasa de desarrollo (Flood y Halloran, 1984), que estaría asociada a diferencias genéticas en la respuesta a la temperatura, lo cual fue confirmado por Slafer y Rawson (1995). Además, estos autores habían propuesto que existe una variación en la precocidad, independientemente de la precocidad atribuida a variaciones en el fotoperiodo o la vernalización, y que estaba correlacionada con el número de hojas del tallo principal (Slafer y Rawson, 1994). La duración del efecto provocado por este carácter no era constante ni en días ni en integral térmica, sino que las diferencias entre genotipos eran menores a bajas temperaturas, aumentando hasta los 19°C sin cambiar el orden, pudiendo éste revertirse a temperaturas superiores. Estos autores concluyeron que las interacciones genotipo por temperatura actuaban en las diferentes fases de desarrollo fenológico afectando a la tasa de desarrollo y, por tanto, a la fecha de floración.

Hay y Ellis (1998), a modo de consenso, propusieron que la variación en el carácter de precocidad intrínseca era debida a una combinación del número de hojas iniciadas en el tallo principal (directamente relacionado con la duración del periodo pre-inductivo propuesto por Roberts et al., 1988) y diferencias en la tasa de desarrollo, la cual era un carácter intrínseco de los genotipos controlado por genes reguladores de la tasa de desarrollo, que a su vez estaban influenciados por la temperatura.

Otros autores parecen haber encontrado evidencias de que la regulación de los genes implicados en la precocidad intrínseca puede ser también diferente en condiciones de fotoperiodo corto o largo (Kato et al., 2002), con lo que el control genético de la respuesta a todos los factores ambientales que influyen en la fecha de floración aparecerían así interrelacionados.



### 7.2.9. Otros efectos

Existe otra serie de factores, de menor efecto en comparación con los descritos, que afectan también a la fecha de espigado. Entre ellos se pueden citar el estrés hídrico en el suelo (Aspinall, 1961), los niveles de nutrientes (Halse y Weir, 1970), la fotosíntesis y la disponibilidad de asimilados (Dale y Wilson, 1979), y la radiación global (Thompson y Mathews, 1981).

### 7.2.10. Control genético de la fecha de floración en condiciones españolas

Después de estos planteamientos y estudios teóricos, lo que los mejoradores necesitan para hacer su trabajo de modo más eficiente es conocer cuáles de todos estos factores fisiológicos, genes y QTL son los responsables de la variación en la fecha de floración en condiciones españolas. Nos planteamos buscar estos QTL de dos maneras distintas. Por un lado con una población de mapeo, compuesta por 120 líneas de haploides duplicados (DHs) del cruzamiento Beka x Mogador. Este cruzamiento de un genotipo de primavera por otro de invierno produjo una extraordinaria variación en la fechas de espigado (Cuesta-Marcos y col, 2008b). Ambas variedades han sido ampliamente cultivadas en España, por lo que esperamos que el cruzamiento estuviera bien adaptado a nuestras condiciones.

Pese a su utilidad, ese estudio presentaba el inconveniente habitual de los trabajos con un material de base genética estrecha. Para superar esta limitación, y conseguir resultados extrapolables al material que se emplea en el programa nacional de mejora de cebada, se realizó un estudio de validación de los principales QTL de fecha de espigado en un conjunto de germoplasma de amplia base genética. Este conjunto se componía de 17 pequeñas poblaciones de DHs de cebada en las que intervenían como parentales, habitualmente en más de una población, catorce variedades comúnmente utilizadas en el programa español de mejora de la cebada.

En cuanto a los genes de respuesta al fotoperiodo, tanto en la población Beka x Mogador como en el conjunto de pequeñas poblaciones de DHs, la región del gen *Ppd-H2* fue una de las principales responsables de la determinación de la fecha de espigado. En ambos casos, aquellas plantas que presentaron en esta región los alelos presentes en los cultivares de invierno (ausencia del gen *HvFT3*) fueron las más retrasadas. Esta región es además responsable de una considerable parte de la interacción genotipo por ambiente del rendimiento en la población Beka x Mogador.

Respecto al gen *Ppd-H1*, al no ser polimórfico en la población Beka x Mogador, su inclusión en el ensayo de validación en las poblaciones de DHs se debió a su importancia descrita en otros estudios (Laurie et al. 1994, 1995; Turner et al., 2005). Este gen resultó ser el más determinante para la fecha de espigado en condiciones de siembra invernal para este conjunto de materiales. Sin embargo, en las condiciones de siembra otoñal, que son las mayoritarias en los secanos del norte de España, este gen parece no tener un efecto destacable. Una posible explicación vendría dada por el hecho de que la mayor parte del desarrollo vegetativo del cultivo se produce bajo fotoperiodos inferiores a los que este gen necesita para que comience a expresarse su efecto, que son alrededor de 13 horas (Turner et al, 2005). En caso de siembras invernales y primaverales, éste sería uno de los genes principales a tener en cuenta. Además de tener un marcador diagnóstico dentro del propio gen, también existen una serie de marcadores en sus inmediaciones que podrían ser de gran ayuda en una estrategia de selección basada en marcadores flanqueantes.

En el estudio de Beka x Mogador, se puso de manifiesto el papel preponderante de un QTL en la región del gen *Eam6* en la determinación de la fecha de espigado en ensayos de campo sembrados en distintas fechas, y también bajo las diferentes condiciones de los ensayos de invernadero. Este efecto fue confirmado en las 17 poblaciones de DHs, por lo que se puede generalizar su papel como un gen mayor para la fecha de espigado en condiciones mediterráneas. El efecto en estas 17 poblaciones fue similar al detectado en Beka x Mogador y se demostró su independencia de *Ppd-H1* (se sitúan en el mismo cromosoma), en parte porque el desequilibrio de ligamiento que puede impedir la individualización de los efectos causados por QTL que están próximos en poblaciones de cruzamientos simples, se deshace después de unos pocos centimorgan en el análisis conjunto de las 17 pequeñas poblaciones de DHs. Recientemente se ha identificado el gen *HvFT4* en esta región del cromosoma 2H (Faure et al., 2007), que se ha propuesto como candidato.

Los genes de vernalización apenas mostraron efecto sobre la fecha de floración en condiciones de siembra otoñal. Por el contrario, su efecto fue muy grande tanto en siembras de campo invernales como en ensayos en condiciones controladas en ausencia de vernalización.

Por último, otro QTL que mostró un efecto grande y consistente en los dos estudios se encontró en la región del gen *eam7*, en el cromosoma 6H. Finalmente se detectaron otros QTL de efecto menor, o detectados sólo en uno de los ensayos, algunos de los cuales fueron comunes entre los dos estudios. Su lista detallada se proporciona en los trabajos citados (Cuesta-Marcos, 2008 a y b).

Estos trabajos han permitido comprobar la precisión de una serie de marcadores diagnóstico de diversos genes para predecir el comportamiento fenotípico. En otros casos, permitieron definir marcadores flanqueantes también utilizables en mejora para el seguimiento de segmentos cromosómicos concretos.

En la actualidad, los mejoradores de trigo y cebada tienen a su disposición marcadores moleculares perfectos para todos los genes mayores que controlan el requerimiento de vernalización y la respuesta al fotoperiodo. Con estos útiles, es posible predecir la segregación que existirá en una población antes de realizar el cruzamiento y, hasta cierto punto, el rango de valores que se puede esperar para el carácter fecha de floración.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen al Ministerio de Educación y Ciencia la financiación de los estudios cuyos resultados se presentan en este trabajo, concretamente de los proyectos AGF95-1008, AGF98-0251, AGL2001-2289, AGL2004-05311 y AGL2007-63625.

## REFERENCIAS

- Aspinall, D. (1961). The control of tillering in the barley plant. *Aust. J. Biol. Sci.* 14: 917-925.
- Beales, J., Laurie, D. and Devos, K.M. (2005). Allelic variation at the linked AP1 and PhyC loci in hexaploid wheat is associated but not perfectly correlated with vernalization response. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1099-1107.
- Bell, G.D.H. (1939). A study on the date of ear emergence in barley. *J. Agric. Sci.* 29: 175-228.
- Bernier, G., Kinet, J.M. and Sachs R.M. (1981). *The Physiology of Flowering*. Vol. I Chapt. 9. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, USA.
- Boyd, W.J.R., Li, C.D., Grime, C.R., Cakir, M., Potipibool, S., Kaveeta, L., Men, S., Kamali, M.R.J., Barr, A.R., Moody, D.B., Lance, R.C.M., Logue, S.J., Raman, H. and Rea B.J. (2003). Conventional and molecular genetic analysis of factors contributing to variation in the timing of heading among spring barley (*Hordeum vulgare* L) genotypes grown over a mild winter growing season. *Aust. J. Agric. Res.* 54: 1277-1301.
- Burn, J., Dennis, L. and Peacock J. (1994). The mysteries of flowering. pp 26-31. In: *Today's Life Science 6*, Thomson Publications Australia Vol. II. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, USA.
- Caicedo, A.L., Stinchcombe, J.R., Olsen, K.M., Schmitt J. and Purugganan, M.D. (2004). Epistatic interaction between Arabidopsis FRI and FLC flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:15670-15675.
- Cockram, J., Jones, H., Leigh, F.J., O'Sullivan, D., Powell, W., Laurie, D.A. and Greenland, A.J. (2007a). Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable production. *J. Exp. Bot.* 58:1231-1244.
- Cockram, J., Chiapparino, E., Taylor, S.A., Stamati, K., Donini, P., Laurie, D.A. and O'Sullivan, D.M. (2007b). Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel VRN-H1 alleles and a predominant winter VRN-H1/VRN-H2 multi-locus haplotype. *Theor. Appl. Genet.*, 115:993-1001.
- Columela, L.J.M. (ca. 50) *De Re Rustica (Doce Libros de Agricultura)*. Ed. Iberia, Barcelona, 1959. 2 vol.
- Cuesta-Marcos, A., Casas, A.M., Yahiaoui, S., Gracia, M.P., Lasa, J.M. and Igartua, E. (2008a). Joint analysis for heading date QTL in small interconnected barley populations. *Mol. Breed.* 21: 383-399.
- Cuesta-Marcos, A., Igartua, E., Ciudad, F.J., Codesal, P., Russell, J.R., Molina-Cano, J.L., Moralejo, M.A., Szucs, P., Gracia, M.P., Lasa, J.M. and Casas, A.M. (2008b) Heading date QTL in a spring ? winter barley cross evaluated in Mediterranean environments. *Mol Breed.* 21: 455-471.
- Cuesta-Marcos, A., Casas, A.M., Hayes, P.M., Gracia, M.P., Lasa, J.M., Ciudad, F.J., Codesal, P., Molina-Cano, J.L. and Igartua, E. (2008c). Yield QTL affected by heading date in barley grown under Mediterranean conditions. *Plant Breed.* (en prensa).
- Dale, J.E. and Wilson, R.G. (1979). The effects of photoperiod and mineral nutrient supply on growth and primordial production at the stem apex of barley seedlings. *Ann. Bot.* 44: 537-546.
- Dubcovsky, J., Lijavetzky, D., Appendino, L. and Tranquilli, G. (1998). Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theor. Appl. Genet.* 97: 968-975.

- Dubcovsky, J., Chen, C., Khan, I.A. and Yan, L. (2005). Molecular characterization of the allelic variation at the VRN-H2 vernalization locus in barley. *Mol. Breed.* 15: 395–407.
- Ehrenreich, I.M. and Purugganan, M.D. (2006). The molecular genetic basis of plant adaptation. *Amer. J. Bot.*, 93:953–962.
- Ellis, R.H., Roberts, E.H., Summerfield, R.J. and Cooper, J.P. (1988). Environmental control of flowering in barley (*Hordeum vulgare* L.). II. Rate of development as a function of temperature and photoperiod and its modification by low-temperature vernalization. *Ann. Bot.* 62: 145-158.
- Evans, L.T. (1987). Short day induction of inflorescence initiation in some winter wheat varieties. *Aust. J. Plant Physiol.* 14: 277-286.
- Evans, L.T. (1993). Adaptation and the ecology of yield. En: *Crop Evolution, Adaptation and Yield*. Cambridge University Press, New York, NY. 116 pp.
- Faure, S., Higgins, J., Turner, A. and Laurie, D.A. (2007). The flowering locus T-like gene family in barley (*Hordeum vulgare*). *Genetics*, 176: 599-609.
- Feldman, M. (2001). Origin of cultivated wheat. pp. 3-56, in *The world wheat book*. Bonjean A.P. and Angus W.J. (eds.). Paris, France: Lavoisier, 3–56.
- Flood, R.G. and Halloran, G.M. (1984). Temperature as a component of the expression of developmental responses in wheat. *Euphytica* 33: 91–98.
- Fowler, D.B., Breton, G., Limin, A.E., Mahfoozi, S. and Sarhan, F. (2001). Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiol.* 127: 1676–1681.
- Francia, E., Rizza, F., Cattivelli, L., Stanca, A.M., Galiba, G., Tóth, B., Hayes, P.M., Skinner, J.S. and Pecchioni, N. (2004). Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) x 'Tremois' (spring) barley map. *Theor. Appl. Genet.* 108: 670-680.
- Franckowiak, J.D. (1997). Revised linkage maps for morphological markers in barley, *Hordeum vulgare*. *Barley Genet. Newsl.* 26: 9-21.
- Franckowiak, J.D. (2007). Revised linkage maps for morphological markers in barley, *Hordeum vulgare*. *Barley Genet. Newsl.* 37: 226-227.
- Franckowiak, J.D., Yu, G. and Krasheninnik, N. (2003). Genetic control of photoperiod responses in spring barley. p. 98, in *Proc. 3rd Canadian Barley Symposium*, 19 and 20 June, 2003, Red Deer, Alberta, Canada.
- Franckowiak, J.D., Krasheninnik, N.N. and Yu, G.T. (2004). Identifying Genes Controlling Heading Date in Spring Barley. pp. 44, in J. Spunar and J. Janikova (eds.), *Barley Genetics IX. Book of Abstracts, Proc. Ninth Int. Barley Genet. Symp.*, Brno, Czech Republic, June 20-26, 2004. *Czech J. Genetics Plant Breed.* 40:44.
- Fu, D., Szucs P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J., Hayes, P. and Dubcovsky, J. (2005). Large deletions in the first intron of the VRN-1 vernalization gene are associated with spring growth habit in barley and polyploid wheat. *Mol. Gen. Genomics* 273: 54–65.
- Gallagher, L.W., Soliman, K.M. and Vivar, H. (1991). Interactions among loci conferring photoperiod insensitivity for heading time in spring barley. *Crop. Sci.* 31: 256-261.

- García del Moral, L.F., Miralles, D.J. and Slafer, G.A. (2002). Initiation and appearance of vegetative and reproductive structures throughout barley development. pp. 243-268, in Slafer, G.A., Molina-Cano, J.L., Savin, R., Araus, J.L. and Romagosa, I. (Eds.). *Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality*. The Harworth Press Inc., New York, USA.
- Garner, W.W. and Allard, H.A. (1920). Effects of relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.* 18: 553-572.
- Goldringer, I., Prouin, C., Rousset, M., Galic, N. and Bonnin, I. (2006). Rapid differentiation of experimental populations of wheat for heading time in response to local climatic conditions. *Ann. Bot.* 98: 805-817.
- Halse, N.J. and Weir, R.N. (1970). Effect of vernalization, photoperiod and temperature on phenological development and spikelet number of Australian wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 21: 383-393.
- Haun, J.R. (1973). Visual quantification of wheat development. *Agron. J.* 65: 116-119.
- Hay, R.K.M. and Ellis, R.P. (1998). The control of flowering in wheat and barley: what recent advances in molecular genetics can reveal. *Ann. Bot.* 82: 541-554.
- Hayes, P.M., Ceroni, J., Witsenboer, H., Kuiper, M., Zabeau, M., Sato, K., Kleinhofs, A., Kudrna, D., Kilian, A., Saghai Maroof M., and Hoffman D. (1997). North American Barley Genome Mapping Project. Characterizing and exploiting genetic diversity and quantitative traits in barley (*Hordeum vulgare*) using AFLP markers. *J QTL* vol 3, art 2. <http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/jqtl>.
- Hoogendoorn, J. (1985). The physiology of variation in the time of ear emergence among wheat varieties from different regions of the world. *Euphytica* 34: 559-571.
- Igartua, E., Austin, R.B., Casas, A.M., Ciudad, F.J., Gracia, M.P., Moraleja, M.A., Rharrabti, Y., Voltas, J., Lafarga, A., Romagosa, I., Montoya, J.L., Lasa, J.M. and Molina-Cano, J.L. (2002). Barley adaptation patterns in Northern Spain. pp. 357-362, in *Proceedings of the 4th International Triticeae Symposium*, Cordoba (España).
- Izawa, T. (2007). Adaptation of flowering-time by natural and artificial selection in Arabidopsis and rice. *J. Exp. Bot.* 58:3091-3097.
- Jabben, M. and Deitzer, G.E. (1979). Effects of the herbicide SAN-9789 on phytomorphogenic responses. *Plant Physiol.* 63: 481-485.
- Jackson, S. and Thomas, B. (1997). Photoreceptors and signals in the photoperiodic control of development. *Plant Cell Environ.* 20: 790-795.
- Johnson, L.P.V. and Taylor, A.R. (1958). Note on the effect of photoperiod and temperature on the development of spike primordia in barley. *Can. J. Plant Sci.* 39: 122-123.
- Karsai, I., Mészáros, K., Szucs, P., Hayes, P.M., Láng, L. and Bedő, Z. (1999). Effects of loci determining photoperiod sensitivity (*Phd-H1*) and vernalization response (*Sh2*) on agronomic traits in the 'Dicktoo' ? 'Morex' barley mapping population. *Plant Breed.* 118: 399-403.
- Karsai, I., Mészáros, K., Láng, L., Hayes, P.M. and Bedő, Z. (2001). Multivariate analysis of traits determining adaptation in cultivated barley. *Plant Breed.* 120: 217-222.
- Karsai, I., Szucs, P., Mészáros, K., Filichkina, T., Hayes, P.M., Skinner, J.S., Láng, L. and Bedő, Z. (2005). The *Vrn-H2* locus is a major determinant of flowering time in a facultative x winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L) mapping population. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1458-1466.

- Kato, K., Tanizoe, C., Beiles, A. and Nevo, E. (1998). Geographical variation in heading traits in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. II. Variation in heading date and adaptation to diverse eco-geographical conditions. *Hereditas* 128: 33-39.
- Kato, K., Miura, H. and Sawada, S. (2002). Characterization of QEet.ocs-5A.1, a quantitative trait locus for ear emergence time on wheat chromosome 5AL. *Plant Breed.* 121: 389-393.
- Kirby, E.J.M., Appleyard, M. and Fellowes, G. (1985). Variation in development of wheat and barley in response to sowing date and variety. *J. Agric. Sci.* 104: 383-396.
- Kirby, E.J.M. and Appleyard, M. (1986). *Cereal Development Guide*. 2nd ed. Arable Unit, National Agric. Centre, England.
- Klepper, B., Rickman, R.W. and Peterson, C.M. (1982). Quantitative characterization of vegetative development in small cereal grains. *Agron. J.* 74: 789-792.
- Komatsuda, T., Pourkheirandish, M., He, C., Azhaguvel, P., Kanamori, H., Perovic, D., Stein, N., Graner, A., Wicker, T., Tagiri, A., Lundqvist, U., Fujimura, T., Matsuoka, M., Matsumoto, T. and Yano, M. (2006). Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 1424-1429.
- Large, E.C. (1954). Growth stages in cereals. Illustrations of the Feekes scale. *Plant Pathol.* 3: 128-129.
- Laurie, D.A., Pratchett, N., Bezant, J.H. and Snape, J.W. (1994). Genetic analysis of a photoperiod response gene on the short arm of chromosome 2 (2H) of *Hordeum vulgare*. *Heredity* 72: 619-627.
- Laurie, D.A., Pratchett N., Bezant J.H., Snape J.W. (1995). RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L) cross. *Genome* 38: 575-585.
- Law, C.N., Dean, C. and Coupland, G. (1993). Genes controlling flowering and strategies for their isolation and characterization. pp 47-68, in *The Molecular Biology of Flowering*. B.R. Jordan (ed). CAB International, Oxford, UK.
- Limin, A.E. and Fowler, D.B. (2002). Developmental traits affecting low-temperature tolerance response in near-isogenic lines for the vernalization locus *Vrn-A1* in wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). *Ann. Bot.* 89: 579-585.
- Lundqvist, U., Franckowiak, J.D. and Konishi T. (1997). New and revised descriptions of barley genes. *Barley Genet. Newsl.* 26: 22-516.
- Major, D.J. (1980) Photoperiod response characteristics controlling flowering of nine crop species. *Can. J. Plant Sci.* 60: 777-784.
- Molina-Cano, J.L. (1989). *La Cebada*. Coedición ediciones Mundi-Prensa y Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; Servicio de Extensión Agraria. Madrid.
- Nilan, R.A. (1964). *The cytology and genetics of barley. 1951-1962*. Washington State University Press, Pullman. Pag 149-153.
- Rhoné, B., Remoué, C., Galic, N., Goldringer, I. and Bonnin I. (2008). Insight into the genetic bases of climatic adaptation in experimentally evolving wheat populations *Mol. Ecol.* 17: 930-943.
- Roberts, E.H., Summerfield, R.J., Cooper, J.P. and Ellis, R.H. (1988). Environmental control of flowering in barley (*Hordeum vulgare* L). I Photoperiod limits to long-day responses, photoperiod-insensitive phases and effects of low temperature and short-day vernalization. *Ann. Bot.* 62: 127-144.



- Salisbury, F.B. (1963). *The flowering process*. Pergamon Press London.
- Skinner, J.S., Szucs, P., von Zitzewitz, J., Marquez-Cedillo, L., Filichkin, T., Thomashow, M.F., Stockinger, E.J., Chen, T.H.H. and Hayes P.M. (2006). Mapping of barley homologs to genes that regulate low temperature tolerance in *Arabidopsis*. *Theor. Appl. Genet.* 112: 832-842.
- Slafer, G.A. and Rawson, H.M. (1994). Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: a reexamination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 393-426.
- Smith, H. and Whitelam, G.C. (1990). Phytochrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles. *Plant Cell. Environ.* 13: 695-707.
- Stracke, S. and Börner, A. (1998). Molecular mapping of the photoperiod response gene *ea7* in barley. *Theor. Appl. Genet.* 97: 797-800.
- Sung, S. and Amasino R.M. (2004). Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:4-10.
- Szucs, P., Skinner, J.S., Karsai, I., Cuesta-Marcos, A., Haggard, K.G., Corey, A.E., Chen, T.H.H. and Hayes P.M. (2007). Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. *Mol. Genet Genom.* 277: 249-261.
- Takahashi, R., Hayashi, H., Yasuda, S. and Hiura U. (1963). Characteristics of the wild and cultivated barleys from Afghanistan and its neighboring regions. *Ber. Ohara inst. Landwirtsch. Biol* 12: 1-23.
- Takahashi, R., Hayashi, H., Hiura, U. and Yasuda S. (1968). A study of cultivated barleys from Nepal Himalaya and North India, with special reference to their phylogenetic differentiation. *Ber. Ohara inst. Landwirtsch. Biol.*, 14:85-122.
- Takahashi, R. and Yasuda, S. (1971). Genetics of earliness and growth habit in barley. pp 388-408, in: *Barley Genetics II*. R.A. Nilan (ed). Washington State University Press.
- Thomas, W.T.B. (2003). Prospects for molecular breeding of barley. *Ann. Appl. Biol.* 142:1-12.
- Thomas, B. and Vince-Prue, D. (1997). *Photoperiodism in plants*. Academic Press, New York, NY. 244 pp.
- Thompson, W.J. and Mathews, S. (1981). The effect of daylength and sowing on ear development in barley cultivars. Pp 518-526, in *Barley Genetics IV. Proceedings of the 4th International Barley Genetics Symposium*. Edinburgh, UK.
- Tranquilli, G.E. and Dubcovsky J. (2000). Epistatic interactions between vernalization genes *Vrn-A<sup>m</sup> 1* and *Vrn-A<sup>m</sup> 2* in diploid wheat. *J. Hered.* 91:304-306.
- Trevaskis, B., Hemming, M.N., Peacock, W.J. and Dennis E.S. (2006). *HvVRN2* Responds to day-length, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiol.* 140: 1397-1405.
- Trione, E.J. and Metzger R.J. (1970). Wheat and barley vernalization in a precise temperature gradient. *Crop Sci.* 10: 390-392.
- Turner A., Beales J., Faure S., Dunford R.P., Laurie D.A. (2005). The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310: 1031-1034.
- van Oosterom E.J. and Acevedo E. (1992). Adaptation of barley (*Hordeum vulgare* L) to harsh Mediterranean environments. III. Plant ideotype and grain yield. *Euphytica* 62: 29-38.

- von Bothmer, R., Sato, K., Komatsuda, T., Yasuda, S. and Fischbeck, G. (2003). The domestication of cultivated barley. pp. 9-27, in R von Bothmer, T van Hintum, H Knüppfer, K Sato (eds). *Diversity in Barley (Hordeum vulgare)*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- von Zitzewitz, J., Szucs, P., Dubcovsky, J., Yan, L., Pecchioni, N., Francia, E., Casas, A.M., Chen, T.H.H., Hayes, P.M. and Skinner J.S. (2005). Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant Mol. Biol.* 59: 449-467.
- Worland, A.J. (1996). The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. *Euphytica* 89: 49-57.
- Worland, A.J., Borner, A., Korzun, V., Li, W.M., Petrovic, S. and Sayers E.J. (1998). The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheat. *Euphytica* 100: 385-394.
- Yahiaoui, S. (2006). Diversidad genética en la colección nuclear de cebadas españolas. Tesis doctoral, Escuela Universitaria Politécnica de Ingeniería Agraria, Universidad de Lleida (Tesis doctoral).
- Yahiaoui, S., Igartua, E., Moralejo, M.A., Ramsay, L., Molina-Cano, J.L., Ciudad, F.J., Lasa, J.M., Gracia, M.P. and Casas A.M. (2008). Patterns of genetic and eco-geographical diversity in Spanish barleys. *Theor. Appl. Genet.* 116:271-282.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T. and Dubcovsky J. (2003). Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 6263-6268.
- Yan, L., Loukoianov, A., Blech, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMiguel, P., Bennetzen, J.L., Echenique, V. and Dubcovsky J. (2004). The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303: 1640-1644.
- Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S. and Dubcovsky J. (2006). The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 19581-19586.
- Yasuda, S. (1981). The physiology of earliness in barley. pp 507-517. In: Asher, MJC, Ellis, R.P., Hayter, A.M. and Whitehouse, R.N.H. (eds) *Barley genetics IV*. Proc 4th Int Barley Genet Symp, Edinburgh University Press. Edinburgh., UK
- Young, K.J. and Elliott, G.A. (1994). An evaluation of barley accessions for adaptation to the cereal growing regions of Western Australia, based on time to ear emergence. *Aust. J. Agric. Res.* 45: 75-92.



CAPÍTULO 8

---

**RESISTENCIA AL  
ENCAMADO**

*José María Carrillo Becerril*



## RESISTENCIA AL ENCAMADO

---

*José María Carrillo Becerril*

**Departamento de Biotecnología. Unidad de Genética y Mejora  
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos  
Universidad Politécnica de Madrid  
Ciudad Universitaria, Madrid-28040  
E-mail: josem.carrillo@upm.es**

---

### 8.1. INTRODUCCIÓN

Se conoce como encamado el proceso por el que los tallos de las plantas son desplazados de una manera permanente de su posición vertical. Puede culminar en que las plantas se queden dobladas o tumbadas sobre el suelo, y a veces puede llevar rotura de los tallos. Los tallos pueden permanecer rectos en su encamado o adoptar formas curvas.

El encamado a menudo no se distribuye uniformemente en el campo afectado, puede afectar solo a ciertas secciones del campo. El grado de encamado, es decir, el grado en que los tallos se desplazan de la perpendicular puede también variar en diferentes lugares dentro del campo. La permanencia, junto con el grado, determina la severidad del encamado.

Este proceso afecta principalmente a cultivos pertenecientes a las familias de cereales y leguminosas. Normalmente ocurre después de que las inflorescencias, es decir, espigas, panículas, etc. hayan emergido. Se ha observado que los cereales pueden encamar en cualquier tiempo desde la emergencia de su espiga hasta que los granos han madurado. Y las plantas son más propensas al encamado conforme avanzan en el desarrollo y llegan a la maduración.

El encamado puede reducir la producción hasta casi anularla, y causa además diferentes daños en el cultivo, como disminuir la calidad, e incrementa los gastos de la cosecha.

El encamado es un fenómeno complejo que está influenciado por muchos factores ambientales, incluyendo el viento, la lluvia, la topografía, el tipo de suelo, las enfermedades e incluso el cultivo previo. Frecuentemente está asociado con condiciones que promueven el crecimiento de la planta como puede ser un abundante abonado.

## 8.2. TIPOS Y CAUSAS DEL ENCAMADO

### 8.2.1. Tipos de encamado

Hay dos tipos básicos de encamado que pueden ser causados por factores abióticos o bióticos: el encamado de raíz y el encamado del tallo. El encamado de raíz se refiere a que los tallos se tumban rectos e intactos desde la corona de la base de la planta debido a algún fallo en el anclaje del sistema radicular al suelo. El encamado del tallo se refiere al doblamiento o rotura de alguno de los entrenudos más bajos del tallo.

Si la parte superior del suelo se reblandece por la lluvia o el riego, el anclaje de las plantas se debilita, y a veces un ligero viento puede ejercer suficiente fuerza para inducir el encamado. La lluvia o el riego por aspersión puede promover el encamado al humedecer las plantas e incrementar su peso, produciendo el encamado de raíz.

El encamado del tallo es causado principalmente por agentes ambientales como las tormentas, el granizo o la lluvia acompañada de viento. El encamado debido a rotura de los tallos se da principalmente en plantas senescentes después de la madurez de las inflorescencias.

Enfermedades del suelo y plagas de insectos pueden destruir las raíces o dañar los tallos de la planta, causando que la planta se doble a nivel de la raíz o que el tallo se encame.

### 8.2.2. Causas del encamado

El encamado está influenciado por características morfológico-estructurales de la planta y por condiciones ambientales. Frecuentemente es el resultado de efectos combinados de un establecimiento inadecuado del cultivo y de condiciones climáticas adversas, como la lluvia y/o el viento. Plantas que inicialmente son resistentes al encamado pueden permanecer erectas durante condiciones favorables, pero estas plantas pueden caer cuando excepcionalmente prevalece el mal tiempo.

#### 8.2.2.1. Aspectos mecánicos del encamado

Las plantas son capaces de soportar su propio peso mientras no estén afectadas por fuerzas externas. Sin embargo, si la planta está sometida al viento, lluvia o granizo, que ejercen fuerzas operando perpendicularmente a los tallos, entonces se induce una torsión que causa el doblamiento. Una vez que el tallo ha sido separado de su posición vertical, el peso de la inflorescencia opera como una fuerza que incrementa la torsión. Mas aún, esta fuerza se incrementará conforme aumenta el doblamiento.

Los factores externos, especialmente el viento, actuarán predominantemente sobre la espiga de la planta. Sin embargo, la torsión afectará a todo el tallo y se incrementará gradualmente desde la parte superior hacia la parte basal, cerca del suelo, donde se alcanzará el mayor valor de torsión. Consecuentemente, las propiedades de la región basal del tallo son decisivas para el encamado. Puesto que los nudos son demasiados rígidos para permitir el doblamiento, este ocurrirá en los entrenudos, que permitirán un mayor encamado cuanto mayor longitud tengan.

La resistencia a la torsión dependerá también del anclaje del tallo al suelo y de la oposición que presenten los entrenudos basales. La interrelación de suelo, parte de la planta enterrada y parte en la superficie, y sus respuestas individuales y combinadas a las fuerzas externas constituye un sistema complejo del que depende la mayor o menor susceptibilidad al encamado.

El doblamiento de la planta es reversible hasta un cierto límite, y la planta recuperará su posición vertical tan pronto como cesen las fuerzas que inducen el doblamiento. La propiedad de la planta para recuperar su posición original después del doblamiento se conoce como elasticidad.

Los tallos del cereal que todavía no han completado su alargamiento de los entrenudos se pueden recuperar del encamado debido a la actividad de los meristemos intercalares basales. La recuperación del encamado puede a veces contribuir a la prevención del encamado posterior.

### 8.2.2.2. Características de la planta asociadas con el encamado

La longitud o **altura del tallo** está claramente asociada con el encamado, aunque no siempre en variedades no-semienanas se ha encontrado correlación entre dichos caracteres.

La tendencia de un cultivo a encamar depende de la longitud del tallo y particularmente de la longitud del pedúnculo, de la distancia desde el último nudo a la base de la espiga. Algunos de los factores que incrementan la longitud y susceptibilidad del tallo al encamado incluyen el potencial genético del cultivar, un alto nivel de abonado especialmente de nitrógeno, la baja radiación solar durante el desarrollo, y el diámetro del tallo y espesor de su pared, particularmente de los entrenudos basales.

Plantas altas tienen una mayor tendencia a encamar que plantas bajas. Un pequeño cambio en la altura de las plantas puede tener una fuerte influencia en el encamado.

La resistencia de un cultivo al encamado depende en gran parte de la resistencia de los **entrenudos más bajos** del tallo. Esto es porque los entrenudos más bajos tienen que resistir los mayores movimientos de fuerza. El peso de los entrenudos más altos de los tallos más las hojas y las espigas afectará a la resistencia del cultivo al encamado. Cuanto más pesadas sean las partes más altas del tallo y mayor sea la distancia de la base del tallo al centro de gravedad, mayor será el movimiento de las fuerzas que actúan sobre los entrenudos más bajos de las raíces. Su rigidez depende en gran medida del diámetro y del grosor de su pared.

Las calidades del **sistema radicular** afectan al anclaje de la planta en el suelo y son de gran importancia en determinar la resistencia al encamado de raíz. Hay una clara relación entre la resistencia al encamado y un vigoroso sistema radicular bien extendido, que puede comprender el número de raíces de la corona, el diámetro de dichas raíces y su dispersión, expresadas como el ángulo respecto a la perpendicular en el que esas raíces penetran en el suelo.

### 8.2.2.3. Factores ambientales y agronómicos que afectan al encamado

El encamado es afectado de una manera muy importante por las condiciones ambientales. Estas condiciones afectan sobre todo a la resistencia de los entrenudos basales y a la altura de la planta.

La **intensidad de la luz** es un factor decisivo para el alargamiento del entrenudo. Controla también el equilibrio entre desarrollo longitudinal y transversal de los tejidos vasculares. Intensidades altas bloquean la acción natural de las giberelinas que promueven la división y alargamiento de las células. Por tanto, intensidad baja de luz promueve alargamiento del entrenudo y reduce el grosor de las paredes del tallo. Reducirá también la asimilación de hidratos de carbono, que pueden interferir con el desarrollo de las paredes de las células y la lignificación. Más aún, el crecimiento de las raíces puede también reducirse por una baja intensidad de luz.

La tendencia al encamado debido a un abundante **aporte de nitrógeno** ha sido establecido en muchos estudios con diferentes cultivos. Altos niveles de nitrógeno producen encamado incluso en variedades semienanas. El efecto del nitrógeno sobre el encamado se debe principalmente a su efecto sobre los entrenudos basales del tallo. Incrementa la longitud de los entrenudos basales.

Las plantas deficientes en **fósforo y potasio**, pueden sufrir un pobre desarrollo de las paredes del tallo y de las raíces. Un aumento en el aporte de fósforo promueve a veces el encamado del trigo. Un aumento en el aporte de potasio disminuye a veces el encamado debido a que reduce el alargamiento de los entrenudos más bajos de la caña e incrementa su diámetro, aumentando la rigidez de la caña.

Un aporte abundante de **humedad** puede conducir a encamado debido a que promueve el alargamiento del tallo, puede también debilitar el anclaje del sistema radicular e incrementar la incidencia de enfermedades. Por otro lado, la sequedad de la superficie del suelo puede restringir el desarrollo del sistema radicular y promover el encamado.

### 8.2.2.4. Encamado causado por el mal de pie o enfermedades de la raíz

Las enfermedades de la raíz y el mal de pie debilitan el anclaje de las plantas y afectan a los entrenudos más bajos del tallo promoviendo el encamado. El encamado de plantas infectadas se caracteriza por los tallos doblándose en desorden, mientras que el encamado de raíz o de tallo ocurre en una dirección uniforme en el campo.

La principal enfermedad de raíz que puede inducir encamado de los cereales está causada por *Ophiobolus graminis*. Sin embargo, la enfermedad más importante resultando en encamado es el mal de pie causado por *Cercospora herpotrichoides*. En las plantas infectadas por este hongo se desarrollan lesiones elípticas marrones en las hojas más bajas y en los entrenudos inferiores del tallo. El hongo puede penetrar profundamente dentro de los tallos, y las lesiones pueden rodearlos cerca del nivel del suelo.

La infección por mal de pie proviene de residuos infectados de la cosecha previa y se incrementa su presencia con la frecuencia de siembra de estos cereales en el mismo campo. La difusión de la enfermedad y su severidad se promueven bajo condiciones de alta humedad y a un rango de temperatura de 5-10° C. Tiempo frío y húmedo durante el periodo de alargamiento del tallo es favorable para la enfermedad, y por tanto suele ser más frecuente en trigo de invierno en el noroeste de Europa.

### 8.2.2.5. Encamado causado por insectos

El encamado inducido por insectos raramente afecta grandes áreas de un campo, pero ocurre frecuentemente a plantas individuales distribuidas a través del campo.

En trigo (*Triticum aestivum* L.) es causado principalmente por *Mayetiola destructor* y por *Cephus cinatus* Nort. y *Cephus pygmaeus* L. Las pupas de *Mayetiola* rodean las bases de los tallos rasgando las vainas de las hojas y los entrenudos, mientras las larvas de *Cephus* taladran dentro de la caña, tronchando la espiga.

Tanto *Ostrinia nubilalis* como especies de *Sesamia* son plagas que afectan al maíz (*Zea mays* L.), que completan su fase larvaria en el interior de las cañas taladrando o excavando galerías de alimentación, debilitan la resistencia de los tallos y favorecen el encamado.

## 8.3. EFECTOS PRINCIPALES DEL ENCAMADO EN EL CULTIVO

Los efectos producidos en el cultivo por el encamado se suelen juntar a los efectos que sobre el mismo cultivo ejercen los factores que causan el encamado.

El efecto del encamado sobre **la producción del grano** depende de su severidad y del tiempo de ocurrencia. Un encamado temprano, durante el periodo de alargamiento intensivo del tallo, puede no afectar gravemente a la producción del grano debido a la recuperación rápida, que restaurará la posición vertical de la planta antes del espigado. La rotura del tallo en este estado no se espera bajo condiciones naturales de campo. El encamado cercano a la maduración puede no afectar directamente a la producción de grano, pero puede causar pérdidas debido a su interferencia con la recolección de la cosecha.

El encamado durante el espigado o en el desarrollo temprano del grano son obviamente los estados más cruciales y que pueden causar mayores pérdidas en la producción de grano. El encamado en el espigado afecta al número de granos por espiga y al peso individual del grano. El encamado que ocurre posteriormente afecta sobre todo al peso del grano. Se han referido reducciones de producción por este tipo de encamado en trigo de un 31% (Weibel y Pendleton, 1964) de un 80% (Easson et al., 1993), en cebada (*Hordeum vulgare* L.) de un 28 a 65% (Stanca et al., 1979; Jedel y Helm, 1991) y en avena (*Avena sativa* L.) de un 37% (Pendleton, 1954).

El efecto más obvio del encamado en los procesos fisiológicos de la planta es la interferencia con la asimilación de hidratos de carbono. Se debe a que parte de las hojas y otras partes fotosintetizadoras están ocultadas por las plantas que caen sobre ellas. Las espigas de las plantas que están más cerca del suelo en un cultivo encamado pueden estar a veces completamente vacías, mientras las de las plantas superiores pueden tener un desarrollo normal del grano. La asimilación reducida de hidratos de carbono afectará primariamente a su acumulación en los granos, pero dependiendo del tiempo de encamado, puede afectar a cualquier proceso o parte de la planta que solicite hidratos de carbono durante ese tiempo.

La proteína en el grano del cereal se origina primariamente a partir del nitrógeno que se ha acumulado en las hojas antes del espigado. Por tanto, su cantidad absoluta en los granos no es afectada por el encamado que ocurre en el espigado o posterior. El porcentaje de nitrógeno, o proteína, en el grano de las plantas encamadas puede aumentar debido a un descenso en la acumulación de hidratos de carbono.

El encamado con ruptura del tallo interferirá en la acumulación de hidratos de carbono y minerales. En este caso el contenido absoluto de nitrógeno y otros minerales en el grano puede también reducirse si el encamado ocurre durante el espigado o en un desarrollo temprano del grano.

El encamado puede afectar a la **calidad del grano**, puede causar asurado en el grano y reducir su peso hectolítrico. En el trigo tiene efectos sobre la calidad panadera. El encamado puede promover la producción de alfa amilasa debido a que los granos se mantienen a mayor humedad al encontrarse cerca del suelo. Esta temprana degradación del almidón disminuye la calidad panadera. En la cebada, el encamado puede también incrementar la producción de alfa amilasa (Mabuchi, 1993), y por tanto reducir la cantidad de malta que puede ser extraída en el proceso de producción de cerveza.

El encamado puede afectar también a la calidad por la producción de granos pequeños y de bajo peso específico (Weibel y Pendleton, 1964; Stanca et al., 1979).

La humedad que puede rodear al cultivo encamado incrementa también la probabilidad de infecciones de hongos que contaminan al grano con micotoxinas producidas por especies de *Fusarium* (Langseth y Stabbetorph, 1996).

La germinación en espiga puede también ocurrir con más frecuencia en el cultivo encamado.

#### 8.4. PREVENCIÓN DEL ENCAMADO

El encamado se puede prevenir mediante adecuadas prácticas culturales. Los principales promotores culturales del encamado son aportes abundantes de humedad y de nitrógeno, siembra densa y temperatura alta. Estos factores sin embargo son también favorables para alta producción de grano. Por tanto, las medidas culturales para el control del encamado deben buscar un equilibrio entre promoción de la producción y prevención del encamado. Factores que afecten a la incidencia de enfermedades, principalmente el mal de pie, deberían también ser considerados.

La búsqueda de una **fecha de siembra** adecuada puede reducir la probabilidad del encamado disminuyendo la probabilidad de que las plantas tengan un determinado estado de crecimiento susceptible al encamado durante un periodo de alta frecuencia de factores que lo induzcan. Una siembra temprana en otoño del trigo de invierno prolongará el periodo de ahijamiento, e incrementará la probabilidad de encamado, presumiblemente porque favorece un crecimiento vegetativo profuso. Una siembra tardía reduce el encamado también porque disminuye la incidencia de mal de pie. Por otro lado, una siembra temprana podría desarrollar un sistema radicular más desarrollado que dificultaría el encamado. El riesgo de encamado en el trigo se reduce casi siempre retrasando la siembra (Stapper y Fischer, 1990).

Las siembras tempranas pueden dar como resultado un mayor número de entrenudos (Stapper y Fischer, 1990), y tallos más largos proporcionan una mayor base para el encamado. Las siembras tempranas también proporcionan un mayor número de hijuelos (Green et al., 1985) proporcionando una mayor base para el encamado. Cuando el número de hijuelos es grande, los tallos son más débiles debido a que son más estrechos y sus paredes son más delgadas (Berry et al., 2000).

La adopción de una fecha apropiada de siembra puede contribuir a la prevención del encamado. Por supuesto habrá que tener en cuenta que la fecha de siembra no tenga un efecto negativo sobre la producción de grano.



La **profundidad de siembra** incrementa la profundidad a la que la corona radicular está situada y también su longitud. Esto puede fortalecer el anclaje de las plantas en el suelo e incrementar la resistencia al encamado. Sin embargo, la profundidad de siembra puede perjudicar o impedir un adecuado desarrollo de la planta. Parece que dentro del rango de variaciones posibles en la profundidad de siembra, una siembra más profunda puede incrementar la resistencia al encamado (Kirby, 1993). La siembra en surcos en una dirección paralela a la de los previsible vientos fuertes puede reducir la incidencia del encamado del tallo.

El encamado puede ser prevenido o reducido por una disminución de la **densidad de plantas** acompañada de una disminución de la tasa de siembra. A una determinada densidad de siembra, la densidad de plantas se compensará por el ahijamiento. En esta situación, la resistencia al ahijamiento se beneficiará de la baja tasa de siembra debida a la promoción, a través del ahijamiento, de la formación de la corona radicular. La reducción del número de plantas puede causar una reducción en el riesgo del encamado (Webster y Jackson, 1993), disminuyendo el número de plantas en los surcos o utilizando mayor espacio entre surcos.

La prevención del encamado a través de una menor tasa de siembra debe, sin embargo, restringirse a aquellos niveles donde no se espere una reducción en la producción de grano.

Un incremento en el **aporte de nitrógeno** ha sido referido frecuentemente que aumenta el encamado en cereales (White, 1991; Chalmers et al., 1998). El mayor incremento en el encamado se suele observar en respuesta a aplicaciones tempranas de nitrógeno, antes del alargamiento del tallo (Miller y Anderson, 1963). Las aplicaciones después de la antesis parece que no tiene efecto sobre el encamado (Webster y Jackson, 1993). Un mayor aporte de nitrógeno casi siempre disminuye el peso seco por unidad de longitud de los entrenudos basales del trigo (Crook y Ennos, 1994), de la cebada (White, 1991), y de los cereales en general (Mulder, 1954), reduciendo el diámetro del tallo y la anchura de su pared.

El uso restringido de **roturación** para preparación del campo de siembra se ha demostrado que reduce el encamado en comparación con los métodos más tradicionales.

La siembra directa o mínimo laboreo incrementa la fuerza, la compactación del suelo (Berry et al., 2000) ayudando al anclaje radicular de las plantas.

**Los reguladores de crecimiento de plantas** (RCP) son componentes sintéticos que se utilizan para reducir la longitud de los tallos de las plantas. Actúan reduciendo el alargamiento de las células, y también disminuyendo el ritmo de división celular. Los RCP se pueden clasificar en dos grupos principales: inhibidores de la biosíntesis de ácido giberélico y componentes que difunden etileno. En los cereales, los RCP se utilizan para reducir el encamado. Son utilizados con más frecuencia para este propósito en países del Norte y Oeste de Europa, y en Canadá y USA.

En trigo (*Triticum aestivum* L.) la aplicación de un regulador de crecimiento controló el encamado reduciendo la altura de planta, pero también disminuyó la producción asociada a una reducción significativa del número de granos por espiga (Tripathy et al., 2004). En arroz (*Oryza sativa* L.) se han utilizado reguladores de crecimiento que reducen la altura del tallo entre un 4-14% respecto al control y previenen el encamado (Fukazawa y Shirakawa, 2001). También en cebada se han utilizado con éxito los reguladores de crecimiento (Ramburan y Greenfield, 2007).

Los RCP aplicados después de la emergencia de la espiga redujeron el encamado en casi todos los experimentos publicados.

## **8.5. MEJORA GENÉTICA DE LA RESISTENCIA AL ENCAMADO**

### **8.5.1. Evaluación de la resistencia al encamado**

La resistencia al encamado, al contrario que la resistencia a enfermedades, es semejante a la producción del grano, un carácter de la población de plantas más que de una única planta. Más aún, está afectada de una manera muy importante por las condiciones ambientales. Por tanto, su evaluación es bastante complicada y los mejoradores de plantas han utilizado diversos índices de encamado como criterios de selección.

La evaluación directa en el campo es complicada. El encamado puede a veces no ocurrir, o de una manera muy débil, de tal manera que ninguna de las líneas ensayadas sea afectada. Por otro lado, bajo condiciones extremadamente favorables al encamado, todas las líneas pueden encamarse, lo cual no permite ninguna distinción. Por otro lado el encamado está muy influenciado por los efectos de la interacción variedad por ambiente. Consecuentemente, una única localidad no puede dar información válida para la selección, esta tiene que realizarse sobre la base de la evaluación en un amplio rango de condiciones ambientales.

Se han utilizado métodos auxiliares para evaluar la resistencia al encamado. La utilización de túneles de viento ha sido un método bastante empleado. En trigo, el empleo de inducir artificialmente el encamado en el campo mediante el paso por el campo de un aparato pesado ha resultado eficaz para identificar genotipos tolerantes al encamado (Kelbert et al., 2004). Se han desarrollado modelos teóricos de resistencia al encamado comparando características morfológicas de la planta y diferentes situaciones ambientales de viento y lluvia (Baker et al., 1998).

El reconocimiento de que la resistencia al encamado no puede atribuirse a un único carácter de la planta ha llevado a confeccionar índices de encamado que combinan varios caracteres de la planta. Pero es complicado desarrollar un índice morfológico fiable para selección en campo en un programa de mejora. Se han desarrollado ideotipos de trigo resistentes al encamado con determinadas características morfológicas, como plantas de una determinada altura (0,7 m), la pared del entrenudo basal de 0,65mm y un índice de cosecha de 0,42 (Berry et al., 2006a).

### **8.5.2. Herencia y selección de caracteres asociados a la resistencia al encamado**

La herencia de la mayoría de los caracteres de raíz y tallo asociados con la resistencia al encamado es bastante compleja, y de carácter cuantitativo.

La selección de aquellos caracteres asociados con la resistencia al encamado se ha aplicado en la evaluación de material inicial de mejora a partir de colecciones de variedades. Se ha sugerido mejorar para diversas características anatómicas del tallo y en particular para los entrenudos basales.

Los mayores éxitos para la resistencia al encamado por medio de la mejora de un único carácter se han conseguido por medio de la reducción de la altura de la planta. Las variedades semienanas han sido un éxito en la mejora del encamado. En el caso de los cereales, durante los años 1960 y 1970 se realizaron grandes avances para reducir el riesgo del abonado con la introducción de las variedades semienanas que producían más que las variedades tradicionales por dos razones principalmente. Se reducía el crecimiento del tallo durante el desarrollo de la espiga dando como resultado plantas con un mayor número de flores y más granos por unidad de superficie,

y además respondían con una mayor producción a mayores cantidades de fertilizantes porque eran menos susceptibles al encamado. En los últimos cuarenta años, la reducción de altura en trigo ha sido el factor más importante para reducir el encamado y para aumentar la producción (Brancourt-Hulmel et al., 2003). En las variedades de arroz *indica*, el gen *sd1* ha contribuido a desarrollar variedades de talla corta y de alta producción, que son más resistentes al encamado que las variedades anteriores (Murai et al., 2004).

La mejora de variedades de talla corta ha contribuido considerablemente a la resistencia al encamado, pero no ha eliminado el problema. Además, el incremento de la resistencia al encamado a través de una mayor reducción de altura de la planta introduciendo más genes de enanismo tiene un límite, debido a que se disminuye la producción (Miralles y Slafer, 1995).

Además de la altura de la planta, se han identificado otras características morfológicas que se correlacionan significativamente con resistencia al encamado, cuya selección puede contribuir a la mejora de la resistencia al encamado en varias especies. En trigo panadero, Zeller et al., 1999 encontraron que un mayor grosor de las paredes de los tallos era el carácter morfológico más asociado a una mejor resistencia al encamado (Zeller et al., 1999). En lenteja (*Lens culinaris L.*), los genotipos con diámetro del tallo más pequeño eran los más resistentes al encamado, aunque se reducía su producción (Ball et al., 2006). En guisante (*Pisum sativum L.*), las plantas con mayor contenido en lignina y fibra en los tallos eran los más resistentes al encamado (Banizza et al., 2005). En cebada, el diámetro de los entrenudos situados en el medio del tallo tenía el mayor efecto en el riesgo de encamado del tallo (Berry et al., 2006b). En soja (*Glycine max (L.) Merrill*), un menor número de entrenudos puede contribuir a mejorar la resistencia al encamado (Okabe, 2006). En arroz se ha encontrado un locus que mejora la resistencia al encamado por medio del retraso en la senescencia de la hoja que permite una acumulación de hidratos de carbono en el tallo después del llenado del grano (Kashiwagi et al., 2006). En trigo, el mayor avance en prevenir el riesgo de encamado sería a través del fortalecimiento de la base del tallo y del sistema de anclaje radicular (Berry et col. 2004).

Para una mayor eficacia en la selección del complicado carácter de resistencia al encamado, se ha intensificado la búsqueda de QTLs asociados a la resistencia al encamado y se han usado como indicadores moleculares para programas de mejora. En trigo se han analizado QTLs para resistencia al encamado (Keller et al., 1999). Se detectaron QTLs que explicaban el 63% de la varianza fenotípica. Siete de esos QTLs coincidían con QTLs para caracteres morfológicos. La manera más eficiente para mejorar la resistencia sería selección indirecta de menor altura de planta y dureza del tallo y selección de los otros dos QTLs que no coincidían con los morfológicos. Verma et al. (2005) también en trigo harinero identificaron y caracterizaron QTLs asociados a la resistencia al encamado en trigo. Encontraron QTL asociados en 8 cromosomas.

En guisante, Tar'an et al. (2003) identificaron dos marcadores moleculares para resistencia a encamado que explicaba el 58% de la variación fenotípica total en el ambiente medio de 11 localidades. Se han buscado en soja QTLs asociados al encamado (Lee et al., 1996). Se encontraron ocho marcadores RFLP asociados al encamado, pero sólo uno era consistente en 4 localidades. Guzman et al. (2007) y Panthee (2007) también han analizado y encontrado QTLs asociados al encamado y a la producción.

Para la resistencia al encamado, teniendo en cuenta la diversidad de cultivos a los que puede afectar, no parece que se pueda señalar un único carácter o un grupo de caracteres como universalmente fiables. Con la introducción de variedades de talla más corta se mejoró considerablemente la resistencia al encamado, pero no se eliminó el problema del encamado. Parece que se puede mejorar la resistencia combinando diferentes caracteres morfológicos, como son, además de una menor altura, un tallo o caña con paredes más gruesas, entrenudos basales más cortos con un mayor diámetro y grosor de pared celular, y un sistema radicular de raíces extendidas. Variedades resistentes a enfermedades y plagas que afectan a raíces y tallo incrementarán también su resistencia al encamado. Sin duda que la selección ayudada por marcadores moleculares asociados a una menor susceptibilidad al encamado contribuirá de una manera significativa a la obtención de variedades más resistentes.

Una mejora de la resistencia al encamado capacita a las nuevas variedades para beneficiarse de altos niveles de fertilidad del suelo, y por tanto aproximarse a su potencial de producción. El proceso continuo de mejora de la producción, en los cultivos a los que puede afectar el encamado, siempre tendrá que llevar asociado que las plantas resistan el desplazamiento de su verticalidad.

## REFERENCIAS

- Baker, C.J., Berry, P.M., Spink, J.H., Sylvestr-Bradley, R., Griffin, J.M., Scott, R.K. and Clare, R.W. (1998). A Method for the assessment of the risk of wheat lodging. *J. Theor. Biol.* 194: 587-603.
- Ball, R.A., Hanlan, T.G. and Vanderberg, A. (2006). Stem and canopy attributes that affect lodging resistance in lentil. *Can. J. Plant Sci.* 86: 71-81.
- Banizza, S., Hashemi, P., Warkentin, T.D., Vandenberg, A. and Davis, A.R. (2005). The relationships among lodging, stem anatomy, degree of lignification, and resistance to *mycosphaerella* blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Can. J. Bot.* 83: 954-967.
- Berry, P.M., Griffin, J.M., Sylvester-Bradley, R., Scott, R.K., Spink, J.H., Baker, C.J. and Clare, R.W. (2000). Controlling plant from through husbandry to minimize lodging in wheat. *Field Crops Res.* 67: 59-81.
- Berry, P.M., Sterling, M., Spink, J.H., Baker, C.J., Sylvester-Bradley, R., Mooney, S.J., Tams, A.R. and Ennos, A.R. (2004). Understanding and reducing lodging in cereals. *Adv. Agron.* 84: 217-271.
- Berry, P.M., Sylvester-Bradley, R. and Berry, S. (2006a). Ideotype design for lodging-resistant wheat. *Euphytica* 154: 165-179.
- Berry, P.M., Sterling, M. and Mooney, S.J. (2006b). Development of a model of lodging for barley. *J. Agron. Crop Sci.* 192: 151-158.
- Bingham, I.J. and Bengough, A.G. (2003). Morphological plasticity of wheat and barley roots in response to spatial variation in soil strength. *Plant Soil* 250: 273-282.
- Brancourt-Hulmel, M., Doussinault, G., Lecomte, C., Berard, P., Le Buanec, B. and Trottet, M. (2003). Genetic improvement of agronomic traits of winter wheat cultivars released in France from 1946 to 1992. *Crop Sci.* 43: 37-45.
- Chalmers, A.G., Dyer, C.J. and Sylvester-Bradley, R. (1998). Effects of nitrogen fertilizer on the grain yield and quality of winter oats. *J. Agri. Sci. Cambridge* 131, 395-407

- Crook, M.J. and Ennos, A.R. (1994). Stem and root characteristics associated with lodging resistance in four winter wheat cultivars. *J. Agric. Sci. Cambridge* 123: 167-174.
- Easson, D.L., White, E.M. and Pickles, S.J. (1993). The effects of weather, seed rate and cultivar on lodging and yield in winter wheat. *J. Agric. Sci. Cambridge* 121: 145-156.
- Fukazawa, M. and Shirakawa, N. (2001). Effects of inabenfide 4' chloro 2' (a-hydroxybenzyl)-isonicotinilide on growth, lodging, and yield components of rice. *Plant Prod. Sci.* 4: 118-125.
- Green, C.F., Paulson, G.A. and Ivins, J.D. (1985). Time of sowing and development of winter wheat. *J. Agric. Sci. Cambridge* 105: 217-221.
- Guzman, P.S., Diers, B.W., Neece, D.J., St. Martin, S.K., LeRoy, A.R., Grau, C.R., Hughes, T.J. and Nelson, R.L. (2007). QTL associated with yield in three backcross-derived populations of soybean. *Crop Sci.* 47: 111-122.
- Jedel, P.E. and Helm, J.H. (1991). Lodging effects on a semidwarf and two standard barley cultivars. *Agron. J.* 83: 158-161.
- Kashiwagi, T., Madoka, Y., Hirotsu, N. and Ishimaru, K. (2006). Locus *prl5* improves lodging resistance of rice by delaying senescence and increasing carbohydrate reaccumulation. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 152-157.
- Kelbert, A.J., Spaner, D., Briggs, K.G. and King, J.R. (2004). Screening for lodging resistance in spring wheat breeding programmes. *Plant Breed.* 123: 349-354.
- Keller, M., Karutz, C., Schmid, J.E., Stamp, P., Winzeler, M., Keller, B. and Messmer, M.M. (1999). Quantitative trait loci for lodging resistance in a segregating wheat x spelt population. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1171-1182.
- Kirby, E.J.M. (1993). Effect of sowing depth on seedling emergence, growth and development in barley and wheat. *Field Crop Res.* 35 101-111.
- Langseth, W. and Stabbetorph, H. (1996). The effect of lodging and time of harvest on deoxynivalenol contamination in barley and oats. *J. Phytopathol.* 144: 241-245.
- Lee, S.H., Bailey, M.A., Mian, M.A.R., Carter, T.E., Ashley, D.A., Hussey, R.S., Parrott, W.A. and Boerma, H.R. (1996). Molecular markers associated with soybean plant height, lodging, and maturity across locations. *Crop Sci.* 36: 728-735.
- Mabuchi, T. (1993). Studies on the dormancy-awakening and dormancy-breaking in the 2-rowed barley seed. 3. The dormancy-awakening of seeds obtained from plants affected by flooding and lodging during the ripening period. *Japan. J. Crop Sci.* 62: 496-501.
- Miller, F.L. and Anderson, L. (1963). Relationships in winter wheat between lodging physical properties of stems and fertilizer treatments. *Crop Sci.* 3: 468-471.
- Miralles, D.J. and Slafer, G.A. (1995). Individual grain weight responses to genetic reductions in culm length in wheat as affected by source-sink manipulations. *Field Crops Res.* 3: 468-471.
- Mulder, E.G. (1954). Effect of mineral nutrition on lodging in cereals. *Plant Soil*, 5: 246-306.
- Murai, M., Komazaki, T. and Sato, S. (2004). Effects of *sd1* and *Ur1* (*Undulate rachis -1*) on lodging resistance and related traits in rice. *Breed. Sci.* 54: 333-340.

- Okabe, A., Kikuchi, A. and Saruta, M. (2006). Comparison of past and recently developed soybean cultivars in western region of Japan. *Japan. J. Crop Sci.* 75: 327-334.
- Panthee, D.R., Pantalone, V.R., Saxton, A.M., West, D.R. and Sams, C.E. (2007). Quantitative trait loci for agronomic traits in soybean. *Plant Breed.* 126: 51-57.
- Pendleton, J.W. (1954). The effect of lodging on spring oat yields and test weights. *Agron. J.* 46: 265-267.
- Ramburan, S. and Greenfield, P.L. (2007). Use of ethephon and chlormequat chloride to manage plant height and lodging of irrigated barley (cv. Puma) when high rates of N-fertiliser are applied. *South African J. Plant Soil* 24: 181-187.
- Setter, T.L., Laureles, E.V. and Mazaredo, A.M. (1997). Lodging reduces the yield of rice by self-shading and reductions in canopy photosynthesis. *Field Crops Res.* 49: 95-106.
- Stanca, A.M., Jenkins, G. and Hanson, P.R. (1979). Varietal responses in spring barley to natural and artificial lodging and to a growth regulator. *J. Agric. Sci. Cambridge* 93: 449-456.
- Stapper, M. and Fischer, R.A. (1990). Genotype, sowing date and plant spacing influence on high-yielding irrigated wheat in Southern New South Wales. II. Growth, yield and nitrogen use. *Aust. J. Agric. Res.* 41: 1021-1041.
- Tar'an, B., Warkentin, T., Somers, D.J., Miranda, D., Vandenberg, A., Blade, S., Woods, S., Bing, D., Xue, A., DeKoeyer, D. and Penner, G. (2003). Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to mycosphaerella blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 1482-1491.
- Tripathy, S.C., Sayre, K.D., Kaul, J.N. and Narang, R.S. (2004). Lodging behavior and yield potential of spring wheat (*Triticum aestivum* L.): effects of ethephon and genotypes. *Field Crops Res.* 87: 207-220.
- Verma, V., Worland, A.J., Sayers, E.J., Fish, L., Caligari, P.D.S. and Snape, J.W. (2005). Identification and characterization of quantitative trait loci related to lodging resistance and associated traits in bread wheat. *Plant Breed.* 124: 234-241.
- Webster, J.R. and Jackson, L.F. (1993). Management practices to reduce lodging and maximise grain yield and protein content of fall-sown irrigated hard red spring wheat. *Field Crops Res.* 33: 240-259.
- Weibel, R.O. and Pendleton, J.W. (1964). Effect of artificial lodging on winter wheat grain yield and quality. *Agron. J.* 56: 487-488.
- White, E.M. (1991). Response of winter barley cultivars to nitrogen and a plant growth regulator in relation to lodging. *J. Agric. Sci. Cambridge* 116: 191-200.
- Zeller, U., Winzeler, H., Messmer, M.M., Keller, M., Keller, B., Schmid, J.E. and Stamp, P. (1999). Morphological traits associated with lodging resistance of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agron. Crop Sci.* 182: 17-24.

CAPÍTULO **9**

---

**BASES MOLECULARES  
DE LA RESISTENCIA A  
ESTRESSES ABIÓTICOS**

*Eduardo O. Leidi*

*José M. Pardo*





## **BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS**

---

*Eduardo O. Leidi y José M. Pardo*

**Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla**

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

**Avda. Reina Mercedes, 10. Sevilla**

**Autor para correspondencia: Eduardo O. Leidi, (leidi@irnase.csic.es).**

---

### **9.1. INTRODUCCIÓN**

Los tipos de estrés abiótico más comunes, como salinidad, sequía o temperaturas extremas, pueden reducir el rendimiento o hacer fracasar la producción de un cultivo. En las regiones semiáridas y áridas del mundo, principalmente, la salinidad del suelo, la sequía y la escasez de agua de riego, o su baja calidad, determinan pérdidas económicas importantes, como consecuencia de fallos de nascencia, disminución de los rendimientos o reducción de la calidad del producto. Se ha estimado que la combinación de estos factores ambientales adversos causan unas pérdidas medias de más del 50% respecto a la producción teórica máxima de las principales cosechas en condiciones óptimas (Bray et al., 2000.) Por tanto, el interés por mejorar la tolerancia de los cultivos al estrés abiótico ha crecido extraordinariamente en los últimos años y se han seguido distintas estrategias biotecnológicas para conseguirlo, entre las que destacan la identificación de caracteres relacionados con tolerancia empleando marcadores moleculares, la utilización de genes procedentes de parentales silvestres tolerantes, la domesticación de plantas silvestres o bien la transformación de plantas con genes cuya expresión modifica mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en la tolerancia (Ashraf, 1994; Shannon, 1997; Yeo, 1998; Shinozaki et al., 2003; Bartels y Sunkar, 2005). En esta sección presentamos una revisión sintética y actualizada de los mecanismos moleculares que se ponen en marcha en las plantas como respuesta a condiciones de diferentes tipos de estrés ambiental, con un especial énfasis en aquellos genes y procesos cuya funcionalidad o manipulación modifican sustancialmente la capacidad adaptativa de la planta. El conocimiento de las bases de la tolerancia a estrés, aún fragmentado e incompleto, tiene un interés biotecnológico obvio, que permitirá en un futuro alcanzar los objetivos de mejorar el rendimiento de los cultivos en condiciones desfavorables.

## 9.2. PERCEPCIÓN Y TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL DE ESTRÉS

Tanto el estrés hídrico como el salino, al menos en su fase inicial, son percibidos por la planta como una deshidratación (Munns, 2002). La salinidad del suelo reduce la capacidad de la planta para captar agua y esto se traduce en una drástica y rápida reducción del crecimiento junto con la activación de una cascada de señalización molecular y de cambios metabólicos que tienen mucho en común con los producidos durante el estrés hídrico. Esta rápida respuesta inicial se debe probablemente a una señal hormonal generada en las raíces (Davies et al., 2005). Los efectos iónicos, específicos al estrés salino, se producen más tarde una vez que las sales arrastradas con la corriente de evapotranspiración se acumulan hasta alcanzar niveles tóxicos especialmente en las hojas fotosintéticamente activas. El estrés por altas temperaturas o por frío, especialmente si este último produce una congelación, también tienen un componente de deshidratación al reducir la cantidad de agua libre en los tejidos. Estas similitudes son fácilmente observables a nivel celular y molecular, con la acumulación de compuestos osmóticamente activos (osmolitos) y proteínas específicas relacionadas con tolerancia a estrés hídrico. En condiciones de estrés se activan o se reprimen una serie de genes que pueden tener importancia en la respuesta adaptativa de la planta (Shinozaki et al., 2003; Bartels y Sunkar, 2005; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). El análisis de *microarrays* de ADN en varias especies vegetales para estudiar los perfiles de expresión génica en respuesta a distintos tipos de estrés abiótico ha permitido observar que, si bien algunas respuestas son específicas a cada estrés en particular, la mayoría son comunes (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Como ejemplo, de los 73 genes inducidos por estrés en arroz, más del 98% eran los mismos en sequía y salinidad, pero sólo el 40% era común con el estrés por frío (Rabbani et al., 2003). En *Arabidopsis* se han obtenido resultados similares a los obtenidos en arroz (Shinozaki et al., 2003) y en un estudio comparativo del transcriptoma en estrés hídrico entre distintas especies (*Arabidopsis*, maíz, cebada, arroz), existía una alta coincidencia en los genes inducidos por estrés (Gorantla et al., 2007). Los productos génicos de esa respuesta al estrés se pueden clasificar en dos grupos (Shinozaki et al., 2003). En un primer grupo son proteínas que funcionan probablemente en tolerancia a estrés abiótico, como chaperonas, proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*), osmotina, anticongelantes, de unión al ARN mensajero, enzimas de síntesis de osmolitos, acuaporinas, transportadores de azúcar y prolina, enzimas detoxificantes y varias proteasas. En otro grupo se pueden agrupar proteínas reguladoras, que están relacionadas a la transducción de señales y a la regulación de la misma expresión génica, tales como factores de transcripción, fosfatasa, quinasas, enzimas de metabolismo fosfolipídico, o moléculas señalizadoras como las proteínas que se unen a calmodulina.

La célula vegetal expuesta a un medio con un bajo potencial hídrico equilibra su potencial hídrico perdiendo agua, lo que produce la disminución de sus potenciales osmóticos y de turgencia. Esta situación genera señales químicas y hormonales que desencadenan respuestas adaptativas posteriores (Hasegawa et al., 2000; Zhang et al., 2006). La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y el aumento de ácido abscísico (ABA) son dos de los efectores más importantes en el inicio de la respuesta al estrés abiótico en el órgano sensor (normalmente raíces) y su comunicación al resto de la planta (ABA). En el procesamiento posterior de la percepción de la señal de estrés y su transmisión para la activación de la transcripción génica, se encuentran elementos que regulan el nivel de transcripción génica (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Varios elementos reguladores actúan sobre el promotor (*cis-acting elements*) de los genes que se inducen en respuesta al estrés hídrico (DRE, por *drought responsive element*) o con hormonas como el ácido abscísico (ABA) (ABRE, por *ABA responsive element*). Estos elementos en el promotor permiten regular la transcripción en la intrínca red de actividades génicas inducidas en respuesta al estrés abiótico. El elemento DRE está

en los promotores de una serie de genes que se activan por deshidratación y por frío y que funcionan en las primeras etapas de la señalización, antes que la acumulación de ABA tenga lugar e induzcan los factores de transcripción correspondientes (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005).

El complejo de proteínas G (heterotrímero compuesto por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) transforman las señales extracelulares desde las proteínas receptoras acopladas (GPCRs) y es intermediario de procesos celulares críticos como la respuesta del crecimiento a la sequía, hormonas, luz o patógenos (Perfus-Barbeoch et al., 2004). Este sistema se modula a través de unos reguladores denominados RGS (*regulator of G-protein signaling*), que actúan reduciendo la sensibilidad al estímulo a través de la desactivación de la subunidad  $\alpha$ . En *Arabidopsis* se ha aislado AtRGS1, cuya estructura es distinta a otras RGS conocidas, y podría estar involucrada en la división celular pero su función real aún se desconoce. Cuando AtRGS1 se sobreexpresa en *Arabidopsis* produce hipersensibilidad a ABA, y lo que resulta más interesante, un fenotipo de tolerancia a estrés hídrico, asociado posiblemente a la menor densidad de estomas, menor conductancia y menor consumo de agua (Chen et al., 2006).

Los estímulos físico-químicos alcanzan distintos compartimentos celulares por medio de diferentes mensajeros secundarios, con los que se produce la concatenación de reacciones desde la percepción del estímulo a la generación de respuesta. Entre estos mensajeros están los nucleótidos monofosfato cíclicos (cNMP), muy conocidos y estudiados en mamíferos pero poco en plantas (Maathuis, 2006a; Kaplan et al., 2007). En condiciones de estrés salino u osmótico, se produce un rápido aumento de 3',5'-guanil monofosfato cíclico (cGMP) (Donaldson et al., 2004), que modula la actividad de componentes que vienen a continuación en las distintas reacciones del organismo a las condiciones de estrés. Los receptores específicos del cGMP, a los que éste mensajero se une o afecta a través de otros componentes señalizadores, aún se desconocen en plantas (Maathuis, 2006a). Hay evidencias de que ciertas proteína quinasas se activan por nucleótidos cíclicos en las plantas (Newton y Smith, 2004), pero no hay todavía una identificación molecular de esas quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos (Maathuis, 2006a). En el genoma de *Arabidopsis* se han encontrado secuencias que codifican proteínas con dominio quinasa y un posible sitio de unión a nucleótidos cíclicos, pero hasta la fecha, no se ha demostrado su función como quinasas dependientes de cNMP (Kaplan et al., 2007). Muchos de las posibles proteínas que contienen un dominio de unión a cNMP son transportadores iónicos, principalmente los canales catiónicos (monovalentes) pertenecientes a las familias de los activados por nucleótidos cíclicos CNGC (por *cyclic nucleotide gated channel*), los canales selectivos de K tipo *Shaker*, y algunos antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  del tipo NHX (Maathuis, 2006a). El papel de estos cNMP en el control de la homeostasis iónica se ha ido perfilando a través de los estudios en los que se ha encontrado que estimulan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kurosaki y Nishi, 1993; Volotovski et al., 1998). Estos trabajos son consistentes con los resultados que demuestran que los cNMP (cAMP y cGMP) mejoran la tolerancia al estrés salino (Maathuis y Sanders, 2001).

Las proteína quinasas MAPK (*mitogen activated protein kinase*) interconectan los estímulos externos con la respuesta fisiológica y son importantes en la adaptación del organismo a las condiciones de estrés en cuanto a que controlan la expresión génica. Estas quinasas pueden activar promotores de genes de estrés, como RD29A y RD29B, inducidos por salinidad, sequía y ABA (Hua et al., 2006). La sobreexpresión de quinasas tipo CIPK (por *calcineurin B-like interacting protein kinases*), también relacionadas con la respuesta a estrés, aumentan significativamente la tolerancia a salinidad, sequía y frío en arroz (Xiang et al., 2007). Por ejemplo, las quinasas CIPK03 y CIPK12 mejoraban la tolerancia a frío y desecación del arroz y este efecto se podía relacionar

con el aumento de la acumulación de prolina y azúcares solubles, compuestos relacionados con la protección y ajuste osmótico del citosol. Sin embargo los transgénicos con la quinasa CIPK15 resultaban tolerantes al estrés salino pero no acumulaban solutos orgánicos ni tampoco presentaban diferencias significativas en la homeostasis iónica con el control (Xiang et al., 2007). Con la pérdida de función de la quinasa CIPK23, las plantas de *Arabidopsis* toleran condiciones de estrés hídrico *in vitro*, con un fenotipo de menor transpiración, mayor sensibilidad al ABA y una menor eficiencia en la absorción de  $K^+$  (Cheong et al., 2007). Esta quinasa, regulada por dos proteínas sensoras de  $Ca^{2+}$  (CBL1 y CBL9, por *calcineurin B-like protein*) se expresa en diferentes tipos celulares, incluyendo estomas y pelos radicales, se relacionó con la nutrición de  $K^+$  ya que las mutaciones correspondientes afectaban a la absorción del nutriente (Cheong et al., 2007). La implicación de esta quinasa en la respuesta a estrés se demostró con los mutantes *cpk23* que, aparentemente a través de mecanismos que afectaban, como en el caso anterior, la homeostasis de  $K^+$ , el comportamiento estomático y la economía de agua, mejoraban la tolerancia al estrés mientras que en los transgénicos se agudizaba la sensibilidad a estrés (Ma y Wu, 2007). Otra quinasa estimulable por estrés abiótico, CIPK9, también produce un fenotipo marcado de sensibilidad a bajo  $K^+$  en los mutantes *cpk9* pero no afecta particularmente la absorción de  $K^+$  como en los ejemplos anteriores (Pandey et al., 2007). Estos trabajos nos permiten vislumbrar la interrelación de distintos tipos de estrés y la importancia crucial de algunos nutrientes, desde tiempo atrás fisiológicamente relacionados con la capacidad de absorción y la economía de agua en los cultivos.

La señal de ABA también induce la síntesis de proteínas ASR (por ABA, *stress, ripening*) de bajo peso molecular e hidrofílicas, localizadas en el núcleo y función asociada al desarrollo, en maduración y senescencia. Cuando se expresa *LLA23* (gen que codifica una proteína ASR de *Lilium* sp.) en *Arabidopsis*, que no tiene proteínas homólogas a ASR, se altera la expresión de otros genes relacionados a ABA y estrés, en concreto el factor de transcripción RD29b y la quinasa KIN2. Este efecto, que involucraría a esta proteína en la vía de señalización, produce además una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos (menor sensibilidad a ABA, estomas abiertos en estrés) que se traducen en aumento de la tolerancia al estrés abiótico (Yang et al., 2005), que se atribuye al papel protector de la proteína LLA23 con su capacidad de retener agua, y a la inducción de otros genes relacionados a estrés (*RD29b* y *KIN2*).

La interferencia con uno de los principales efectores del estrés, el ABA, ha permitido un mayor conocimiento de la compleja respuesta de la planta durante el proceso de adaptación a estrés. Cuando se emplearon plantas mutantes de inserción de un enzima relacionada con la síntesis de ABA, estas no aumentaban los niveles de ABA en respuesta al choque osmótico y la germinación era notablemente más tolerante a la presencia de sal, aunque sólo en fases iniciales del estrés. Además, el crecimiento se afectaba seriamente con la falta de agua, debido básicamente a que los estomas no se cerraban y las hojas seguían perdiendo agua desecándose hasta alcanzar una marchitez permanente (Ruggiero et al., 2004). En este sentido, la sobreexpresión de *LeNCED1* que codifica el enzima 9-cis-epoxi carotenoide dioxigenasa, que controla un paso limitante de la síntesis de ABA, aumenta la concentración de esta hormona en tomate con el consiguiente cierre estomático y mejora de la eficiencia transpiratoria (Thompson et al., 2007). Otro ejemplo de la interferencia de los niveles de ABA se consigue con la sobreexpresión del gen *XERICO*, el cual aumenta la proteína reguladora RING-H2 con un dominio *dedo de zinc*, que se traduce en un aumento de la expresión del gen *NCD3* y la consiguiente síntesis de ABA y otros cambios en la expresión de genes relacionados con la síntesis de hormonas (Ko et al., 2006). El resultado es un aumento de la sensibilidad al estrés osmótico de la germinación pero una mayor tolerancia al déficit hídrico en planta adulta (Ko et al., 2006).

Otro sistema importante de percepción de estrés y la subsecuente señalización lo constituyen las especies de oxígeno reactivas (ROS), que se producen en respuesta a estrés y se convierten en señales moleculares al alterar el estado redox de sensores intracelulares (proteínas, enzimas, receptores específicos) y modulan distintas vías metabólicas y de defensa (Mittler et al., 2004). En la membrana celular, las oxidasas dependientes de NADPH estarían entre los principales generadores de ROS en respuesta a estrés, y el aumento de estos radicales induce a su vez los sistemas de defensa (superóxido dismutasas, catalasa, peroxidasas, etc.). La relación establecida entre los ROS y la proteína SOS1, a través de la estabilización del ARN mensajero de SOS1, un antiportador de gran importancia en la tolerancia a salinidad puede constituir un paso clave en la cadena de señalización (Chung et al., 2008). En situaciones de estrés, el control de los ROS producidos en exceso por el metabolismo oxidativo es otro tema de gran futuro en biotecnología y se trata más adelante.

En los sistemas de señalización del estrés también participaría el óxido nítrico (NO), que se produce por sequía o ABA (Lamattina et al., 2003). Esta molécula puede modular los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos y cambiar la actividad de algunos canales iónicos. El NO se ha relacionado con el aumento de la tolerancia a sequía, a través de un control de la apertura estomática (García-Mata y Lamattina, 2001). Empleando cultivos celulares de *Phragmites communis*, las diferencias de NO producido bajo estrés salino entre líneas con distinta tolerancia podrían inducir de un modo diferencial la expresión de la  $\text{H}^+$ -ATPasa del plasmalema y con efecto en la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  y explicar las diferencias de sensibilidad (Zhao et al., 2004).

La complejidad del sistema de regulación de la respuesta al estrés abiótico se puede ejemplificar con el efecto de la proteína nuclear RD26, inducida por estrés hídrico y ABA, que modifica la sensibilidad al ABA y afecta la expresión de otros genes de respuesta a estrés (Fujita et al., 2004). La expresión ectópica de genes también revela interacciones inesperadas. Como ejemplo, la sobreexpresión en arroz del factor de transcripción CBF3 inducido por frío en *Arabidopsis* aumenta la tolerancia al estrés hídrico y salino pero no modifica significativamente su tolerancia al frío (Oh et al., 2005). Los autores de ese trabajo señalan, como posible explicación que no modifique la respuesta al frío en arroz, al menor número de genes modificados por CBF3 en esta especie. También relacionado con el control de la transcripción y la respuesta al estrés salino se encuentra la proteína AtSAP18 (Song y Galbraith, 2006), que se asocia con factores de respuesta de unión a etileno (ERF, por *ethylene response factor*) para configurar un complejo represor multimérico. Cuando se emplean mutantes donde se pierde la actividad de AtSAP18 se produce un aumento de la sensibilidad a la salinidad visible como una inhibición de la síntesis de clorofila.

Finalmente, es importante comentar el hallazgo de nuevas 'capas' de regulación tanto génica como bioquímica que están siendo diseccionadas pero cuyos mecanismos de funcionamiento son todavía desconocidos en gran medida. Como ejemplo de estos sistemas regulatorios emergentes podemos citar el procesamiento de ARNm inducidos por estrés de una manera dependiente de ABA (Hugouvieux et al., 2002) o de ROS (Chung et al., 2008), la exportación nuclear de transcritos (Dong et al., 2006a), la degradación selectiva y regulada de proteínas de estrés (Dong et al., 2006b), la síntesis de componentes de la pared celular (Chen et al., 2005; Sánchez-Aguayo et al., 2004) y la regulación de la expresión génica por micro-ARNs (Borsani et al., 2005; Sunkar et al., 2007).

### 9.3. LA FALTA DE AGUA

La sequía produce una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas, como cierre estomático, disminución de la expansión foliar, de la actividad fotosintética, y en definitiva del crecimiento y la producción del cultivo. La menor disponibilidad de agua produce una reducción de la conductividad hidráulica de las raíces, que prepara a la planta para las condiciones deficitarias aumentando la resistencia al flujo de agua con objeto de reducir las pérdidas por evaporación. Durante el ajuste osmótico celular a consecuencia de la caída del potencial hídrico en el medio, los flujos hídricos adquieren gran importancia, por lo que también las acuaporinas jugarían un papel relevante entre los mecanismos de adaptación al estrés (Maurel y Chrispeels, 2001). Actualmente, se considera que condiciones como la salinidad, la hipoxia o las bajas temperaturas regulan la actividad de las acuaporinas por la medio de un control transcripcional a través de ROS o acidosis (Luu y Maurel, 2005). En las raíces de *Arabidopsis*, el estrés salino reduce la expresión de genes que codifican las acuaporinas de la membrana plasmática (PIP) y del tonoplasto (TIP) e inducen la relocalización subcelular de algunos de estos canales (Boursiac et al., 2005). Algunos trabajos previos habían señalado la inducción de la expresión de algunas acuaporinas de plasmalema por sequía o salinidad (Yamaguchi et al., 1992; Yamada et al., 1997). En *Arabidopsis*, el estrés salino activa un gen que codifica una proteína homóloga a la acuaporina de tonoplasto (Pih et al., 1999), y en maíz, se inducen acuaporinas específicas del plasmalema cuando la raíz comienza a rehidratarse 24 horas después de un choque salino (100 mM NaCl) (Zhu et al., 2005). Sin embargo, cuando se sobreexpresan acuaporinas de la membrana plasmática en arroz aumenta su sensibilidad al estrés salino (Katsuhara et al., 2003) y algo similar ocurre en tabaco (Aharon et al., 2003). En una especie muy tolerante a estrés como *Mesembryanthemum*, el estrés osmótico induce un aumento de la acuaporina de tonoplasto MtTIP1;2 y su redistribución hacia compartimentos endosomales (Vera-Estrella et al., 2004). Considerando que la pérdida (salida) de agua celular puede ocurrir sólo en situaciones de choque osmótico, y no de ajuste paulatino, en situaciones de adaptación a bajos potenciales hídricos se produce la reducción de los flujos hídricos, consistente con inhibición de la conductividad hidráulica y menor actividad de los canales de agua. No es de extrañar, por tanto, los resultados contradictorios, y que la sobreexpresión de canales de agua, si bien puede aumentar el vigor de las plantas en ausencia de estrés puede tener efectos nocivos ante la falta de agua (Aharon et al., 2003; Jang et al., 2007). Aún falta un mayor conocimiento del papel fisiológico de las acuaporinas y su función en condiciones de estrés es aún materia de especulación (Luu y Maurel, 2005) de modo que resulta difícil aventurar una posible estrategia involucrando la acuaporinas en la mejora de la tolerancia de las plantas al estrés abiótico.

### 9.4. EL EXCESO DE SALES

La salinidad afecta el crecimiento y producción de los cultivos al reducir el potencial hídrico de la solución del suelo, disminuyendo así la disponibilidad de agua, y al crear un desequilibrio nutritivo dada la elevada concentración de elementos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular. En consecuencia, los diversos efectos observados a distinta escala, desde reducción de turgencia y crecimiento hasta la pérdida de la estructura celular por desorganización de membranas y profundas alteraciones metabólicas, son el producto combinado de estrés hídrico, toxicidad iónica y desequilibrio nutricional.

Para conseguir la adaptación a las condiciones salinas, en la planta se deben activar múltiples mecanismos para aumentar la capacidad de obtener y/o retener agua, y restituir la homeostasis iónica. Estos mecanismos de adaptación se reflejan macroscópicamente como reducción de la



expansión foliar y del crecimiento, cambio en la relación parte aérea/raíz, e incluso aumento de la precocidad, y son consecuencia de cambios bioquímicos (síntesis de ABA y solutos osmoprotectores) y fisiológicos (alteración de la permeabilidad de las membranas a los iones y al agua, cierre estomático, disminución de transpiración y fotosíntesis, etc.). Esta respuesta adaptativa está gobernada por señales moleculares que regulan la relación con el medio externo (p.e. cambios en la actividad de canales y transportadores de membranas) y por la activación y transcripción de genes entre cuyos efectos está la modificación de rutas biosintéticas que resultan en ajuste osmótico y la protección de las estructuras celulares.

## 9.5. HOMEOSTASIS IÓNICA

Mientras el efecto primario del estrés hídrico o salino resulta en la menor disponibilidad de agua y la consiguiente necesidad de reducir las pérdidas para evitar la deshidratación (Munns, 2005), el efecto posterior inmediato es la necesidad de mantener la homeostasis iónica, esto es, el equilibrio iónico celular que permite un metabolismo *normal*, controlando la entrada de iones tóxicos y secuestrándolos para evitar su toxicidad mediante la compartimentación en vacuolas. En un suelo salino, la elevada concentración de iones tóxicos, fundamentalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (o  $\text{SO}_4^{2-}$ ), produce una interferencia en la absorción de nutrientes ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) y un excesivo aumento de iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), que pueden alcanzar niveles citosólicos perjudiciales para el metabolismo celular. El mantenimiento de la homeostasis depende de las proteínas de membrana que regulan el flujo de iones, como las bombas de protones (ATPasas y pirofosfatasa), transportadores secundarios y canales iónicos (Niu et al., 1995; Maathuis y Amtmann, 1999; Maathuis, 2006b). Uno de los factores determinantes de la tolerancia celular a la salinidad reside en la capacidad de mantener una alta relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en el citosol. De hecho, una de las principales diferencias entre *Arabidopsis* y *Thellungiella halophila*, una especie muy relacionada a aquella y tolerante a salinidad, está en la mayor selectividad  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en los sistemas de transporte iónico (Volkov et al., 2003).

El principal desafío para mantener la homeostasis iónica celular en un ambiente salino procede del  $\text{Na}^+$ , cuya entrada se ve favorecida por el gradiente de potencial electroquímico entre el exterior y el interior celular (aproximadamente -180 mV). La entrada de este ión tóxico en la célula se puede producir a través de transportadores y canales iónicos del plasmalema. Los transportadores de  $\text{K}^+$  de tipo KUP-HAK pueden llegar a ser muy selectivos y tener una gran afinidad para este ión ( $K_m$  de 10-50  $\mu\text{M}$ ), pero también pueden transportar  $\text{Na}^+$  con baja afinidad (Maathuis y Amtmann, 1999; Santa-María et al., 1997; Rodríguez-Navarro, 2000). Por el contrario, los transportadores de tipo HKT manifiestan una alta afinidad por  $\text{Na}^+$  y en sistemas heterólogos se comportan como simportes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  o uniportes de  $\text{Na}^+$  (Wang et al., 1998; Rubio et al., 1995; Horie et al., 2001; Haro et al., 2005). Estas diferencias de transporte pueden atribuirse a las variaciones en la secuencia aminoacídica de estos transportadores que permite diferenciarlos en 2 grupos (Platten et al., 2006). Su función fisiológica es incierta pero la evidencia genética indica que la proteína HKT1 es una vía sustancial de entrada de  $\text{Na}^+$  en raíces de *Arabidopsis*, trigo y cebada (Rus et al., 2001; Laurie et al., 2002; Haro et al., 2005). Otros datos, sin embargo apuntan a que las proteínas de tipo HKT están muy relacionadas con el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia y su reparto entre parte aérea y raíces. En *Arabidopsis*, la expresión del gen de copia única *HKT1* es predominante en el tejido vascular de raíces y hojas de *Arabidopsis* (Mäser et al., 2002; Berthomieu et al., 2003). Algunos autores localizaron HKT1 en elementos del floema y propusieron una función en la recirculación de  $\text{Na}^+$  hacia la raíz (Berthomieu et al., 2003). Sin embargo, trabajos más recientes ubican al transportador HKT1 en la membrana de células parenquimáticas acompañantes del xilema que descargarían  $\text{Na}^+$  del xilema evitando su transporte a la parte aérea

de la planta (Sunarpi et al., 2005; Davenport et al., 2007). A su vez, el análisis genético también ha producido resultados contradictorios ya que mientras que en trigo una menor expresión del transportador HKT1 por interferencia génica aumentaría la tolerancia a NaCl (Laurie et al., 2002), en *Arabidopsis* una mutación *kht1* produce tolerancia a Na<sup>+</sup> a corto plazo pero sensibilidad a largo plazo; la sobreexpresión en plantas transgénicas aporta mayor sensibilidad en cualquier estadio (Rus et al., 2001; Mäser et al. 2002; Rus et al., 2004). La disrupción de *HKT1* en *Arabidopsis* provoca el incremento del contenido de Na<sup>+</sup> en la savia del xilema y su reducción en el floema, mientras que los contenidos de K<sup>+</sup> siguen un patrón opuesto (Sunarpi et al., 2005). Por otro lado, el análisis combinado de la variación natural del contenido de Na<sup>+</sup> en la parte aérea y de la expresión génica global de distintos ecotipos de *Arabidopsis*, identificó a *HKT1* como un gen mayor en el control de la translocación de Na<sup>+</sup> desde la raíz hasta el tallo (Rus et al., 2006). Los ecotipos con mayor translocación de Na<sup>+</sup> portaban una delección en la zona promotora del gen *HKT1* que reducía su expresión y comprometía la capacidad de capturar Na<sup>+</sup> de la corriente xilemática. Considerando todos estos datos en conjunto, ahora es generalmente aceptado que la función primordial de la proteína HKT1 de *Arabidopsis* es la de retirar Na<sup>+</sup> de la corriente de evapotranspiración para restringir su acumulación en los tejidos fotosintéticos.

Estudios fisiológicos previos en trigo habían relacionado la tolerancia salina con la discriminación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> y la reducción de la concentración de Na<sup>+</sup> en la lámina foliar (Gorham et al., 1990). Recientemente se han identificado los genes responsables de aquel fenotipo tolerante, *Nax1*, *Nax2* y *Kna1* que son homólogos a transportadores HKT (Huang et al., 2006; Byrt et al., 2007). Del mismo modo, se ha comprobado que en cultivares de arroz con distinta tolerancia al estrés salino, se modifica la expresión de los transportadores HKT (*OsHKT1* y *OsHKT2*) en condiciones de estrés, dando como resultado fenotipos más o menos eficientes en su capacidad de mantener la homeostasis iónica (Kader et al., 2006). El locus *SKC1* identificado por genética cuantitativa como un gen mayor asociado al mantenimiento de un alto contenido de K<sup>+</sup> en variedades de arroz más tolerantes al estrés salino ha sido recientemente identificado a nivel molecular como un miembro de la familia *HKT* (*OsHKT8*; Ren et al., 2005). *SKC1/HKT8* se expresa también en las células del parénquima que rodean a los vasos del xilema y el análisis electrofisiológico ha demostrado que se comporta como un transportador de entrada de Na<sup>+</sup> altamente selectivo (Ren et al., 2005). Los polimorfismos de *SKC1/HKT8* entre variedades de arroz con distinta halotolerancia se traducen en la presencia de una isoforma más activa de la proteína en la variedad tolerante que permite una mayor restricción de transporte a larga distancia de Na<sup>+</sup> mediante la reabsorción selectiva del Na<sup>+</sup> presente en el xilema. Por otro lado, también se ha descrito que el transportador *OsHKT1* (también llamado *HKT2;1*) de arroz, cuya expresión se reduce en bajas concentraciones de NaCl, podría ser responsable de la entrada de Na<sup>+</sup> de alta afinidad que ocurre en ausencia de K<sup>+</sup> (Horie et al., 2007).

Los canales iónicos constituyen otro sistema de transporte que permite la disipación rápida de un gradiente iónico establecido a través del plasmalema (Maathuis y Amtmann, 1999). En la actualidad se conocen tres tipos de canales que pueden mediar en la entrada o salida de iones como K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> a través del plasmalema (Maathuis y Amtmann, 1999; Rodríguez-Navarro, 2000), y se les denomina canales rectificadores de entrada de K<sup>+</sup> (KIRC), canales rectificadores de salida de K<sup>+</sup> (KORC), y canales independientes del voltaje (VIC). La selectividad K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> de estos canales iónicos varía ampliamente. Los canales KIRC y KORC son altamente selectivos para K<sup>+</sup> en condiciones fisiológicas de crecimiento. Sin embargo, los canales de tipo KIRC pueden permitir una entrada significativa de Na<sup>+</sup> a largo plazo en un medio salino debido a que, a pesar de su escasa



permeabilidad relativa para  $\text{Na}^+$ , en esas condiciones presentan una conductividad iónica máxima y el gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  es muy elevado (Amtmann y Sanders, 1999). Por el contrario, aunque los canales de tipo VIC representan una pequeña fracción de la conductividad total de la membrana, no discriminan entre  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , por lo también podría contribuir a la entrada de  $\text{Na}^+$  (Amtmann y Sanders, 1999). Considerando en su conjunto la abundancia y características funcionales de los distintos canales iónicos, se ha estimado que los VIC constituyen la vía principal de entrada de  $\text{Na}^+$  en las células vegetales (Amtmann y Sanders, 1999). La actividad de los VIC parece modulada por nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP) como se mencionaba anteriormente, por lo que podrían ser equivalentes a los canales de tipo CNCG (cyclic nucleotide-gated channels) caracterizados originalmente en células animales y que también están presentes en las células vegetales (Maathuis y Sanders, 2001). La entrada de  $\text{Na}^+$  en *Arabidopsis* se relaciona a distintos tipos de canales no selectivos, algunos sensibles a los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (Essah et al., 2003).

Un sistema importante para conseguir la reducción del  $\text{Na}^+$  citosólico es la expulsión al medio extracelular. La extrusión de  $\text{Na}^+$  se produce en hongos y algunas especies de algas marinas por bombas (ATPasas) transportadoras de  $\text{Na}^+$  (Haro et al., 1993; Gimmler, 2000), mientras que en la mayoría de las algas y en plantas superiores está mediada por antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  del plasmalema (Blumwald et al., 2000; Shi et al., 2000). La actividad de antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en el plasmalema, que expulsan  $\text{Na}^+$  al exterior de la célula en un intercambio por  $\text{H}^+$ , requiere un gasto energético ya que debe efectuarse en contra de un gradiente de potencial electroquímico. La inducción en tomate de una ATPasa transportadora de  $\text{H}^+$  de plasmalema por el estrés salino podría responder a la necesidad de generar el gradiente de protones requerido por el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Kalampanayil y Wimmers, 2001). Se ha sugerido que la extrusión de  $\text{Na}^+$  podría constituir a largo plazo un serio problema en las células de algunos tejidos, como las hojas, ya que la acumulación extracelular de  $\text{Na}^+$  podría ser aún más dañina que su inclusión al generar un déficit hídrico extremo (Yeo, 1998). Un factor determinante del daño celular en arroz es la deshidratación producida por la acumulación de sales en el espacio extracelular (Flowers et al., 1991) de la que podría no ser ajena la actividad de ese antiporte. Sin embargo, el balance neto de la actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en el plasmalema deber ser positivo para la planta ya que los mutantes *sos1* de *Arabidopsis*, carentes de dicha actividad, son extremadamente sensibles a NaCl (Wu et al., 1996; Qiu et al., 2002). Además de reducir el contenido celular de  $\text{Na}^+$ , SOS1 también media en el transporte de  $\text{Na}^+$  desde la raíz al mesófilo foliar y es esencial para la redistribución del  $\text{Na}^+$  entre los tejidos vegetales (Shi et al., 2002), probablemente en coordinación con HKT1 cuya actividad sería opuesta a la de SOS1 (Pardo et al., 2006). La importancia de SOS1 en el control de la tolerancia al estrés salino viene demostrada por una especie halofita, *Thellungiella halophila*, que se vuelve sensible a salinidad cuando se reduce la expresión del transportador (Oh et al., 2007). En efecto, una de las diferencias importantes entre *Thellungiella* y *Arabidopsis* que puede estar relacionada con la mayor tolerancia a salinidad de la primera es su mayor expresión constitutiva de SOS1 en raíces (Kant et al., 2006). Con importancia para la tolerancia al estrés, las proteínas reguladoras de SOS1 que son la quinasa SOS2 y la proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$  SOS3, modulan la expresión y actividad bioquímica de SOS1 (Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002). Los mutantes *sos2* y *sos3* son también sensibles a salinidad (Zhu, 2000). Recientemente se ha descrito que SCaBP8/CBL10, una proteína similar a SOS3, interactúa y regula positivamente a SOS2 afectando la homeostasis iónica y la tolerancia a la sal (Quan et al., 2007; Kim et al., 2007). Una de las dianas del complejo SOS2/CBL10 es SOS1 en células de la parte aérea (Quan et al., 2007), aunque también se ha propuesto un papel en la compartimentación intracelular de  $\text{Na}^+$  (Kim et al., 2007).

La sobreexpresión de *SOS1* aumenta la tolerancia salina de plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Shi et al., 2003). Esas plantas acumulaban menos  $\text{Na}^+$  en el xilema y en la parte aérea; callos derivados de esas plantas también mostraron una reducción significativa del contenido de  $\text{Na}^+$  y una mayor halotolerancia. Por otro lado, la expresión ectópica en *Arabidopsis* y en arroz de *SOD2*, un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  del plasmalema de *Schyzosaccharomyces pombe*, aumenta la tolerancia de estas especies a la salinidad reduciendo la concentración de  $\text{Na}^+$  en raíces y parte aérea y aumentando la concentración de  $\text{K}^+$  en ambos órganos (Gao et al., 2003; Zhao et al., 2006). En arroz, se pudo comprobar que la sobreexpresión de *SOD2* incrementaba la actividad ATPasa del plasmalema y disminuía el contenido citosólico de  $\text{Na}^+$ , al tiempo mejoraba la fotosíntesis y se reducía la producción de ROS (Zhao et al., 2006). Estos resultados son evidencia adicional de que el aumento de la actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática puede, de hecho, ser un mecanismo eficiente para aumentar la tolerancia salina de las plantas.

Cuando se produce una entrada importante de  $\text{Na}^+$  en el citosol, la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  fisiológica se debe restablecer para evitar el efecto tóxico del  $\text{Na}^+$ . Esto se consigue en algunas especies con un sistema de transporte localizado en la membrana vacuolar (tonoplasto), que permite acumular  $\text{Na}^+$  en la vacuola de manera activa, en contra del gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$  (Blumwald, 2000; Pardo et al., 2006; Apse et al., 2007). Este sistema consiste en un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (denominado NHX) que acopla la entrada de  $\text{Na}^+$  a la salida de  $\text{H}^+$ . Este transporte puede realizarse por el gradiente de  $\text{H}^+$  entre vacuola y citosol establecido por las ATPasas vacuolares (V-ATPasas) y las pirofosfatasas (PPasas) (Blumwald, 1987). La presencia de una actividad antiportadora  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se detectó primero en tonoplasto de especies tolerantes a salinidad como remolacha y cebada, donde se inducía por la presencia de  $\text{NaCl}$  en el medio (Blumwald y Poole, 1985; Barkla y Pantoja, 1996). AtNHX1, la primera proteína con esa actividad, se identificó en plantas de *Arabidopsis* (Apse et al., 1999; Gaxiola et al., 1999; Quintero et al., 2000), pero la evidencia molecular disponible indica que estas proteínas son ubicuas en las plantas. En los genomas de arroz y *Arabidopsis*, ya secuenciados, se reconocen hasta 5 y 6 isoformas respectivamente diferentes de genes *NHX* (Pardo et al., 2006). La mayor homología de las distintas formas de NHX se encuentra en la parte N-terminal, que forma el poro en el tonoplasto, y las diferencias se hallan en el C-terminal, con actividad reguladora (Pardo et al., 2006). La compartimentación del  $\text{Na}^+$  en la vacuola, al tiempo que libera al citosol del exceso de  $\text{Na}^+$ , contribuye a disminuir el potencial osmótico y ajustar el potencial hídrico celular para permitir la absorción de agua durante el estrés salino (Glenn et al., 1999). Además, la proteína NHX1 de *Arabidopsis* tiene la capacidad de transportar tanto  $\text{Na}^+$  como  $\text{K}^+$ , pudiendo contribuir al balance osmótico celular y tisular en cualquier condición de crecimiento de la planta (Venema et al., 2002). En la actualidad, estos antiportadores se clasifican en dos clases, con distinta localización subcelular. Los antiportadores de Clase I se localizan en tonoplastos, y transportan  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  con similar afinidad, mientras que los de Clase II, se encuentran en membranas endosomales y tienen mayor afinidad por  $\text{K}^+$  (Pardo et al., 2006). La sobreexpresión de este antiportador AtNHX1 en *Arabidopsis*, tomate y nabo producía un aumento espectacular de la tolerancia al estrés salino (Apse et al. 1999; Zhang y Blumwald, 2001; Zhang et al., 2001). Sin embargo, este mismo gen en otras especies no tiene efectos tan sobresalientes (Xue et al., 2004; He et al., 2005; Yang et al., 2005) al igual que la sobreexpresión de genes homólogos procedentes de arroz, trigo o halofitas (como *Suaeda salsa* y *Atriplex gmelini*) (Ohta et al., 2002; Zhao et al., 2006; Chen et al., 2007; Li et al., 2007). Con el objeto de aumentar la actividad de antiportadores vacuolares con el gradiente de  $\text{H}^+$  y asegurar la compartimentación de iones  $\text{Na}^+$  se han transformado con PPasas vacuolares especies como *Arabidopsis* y tabaco (Gaxiola et al., 2001; Gao et al., 2006) con un aumento en la tolerancia al estrés.

La sobreexpresión de la proteína AtRAB17, relacionada al tráfico intracelular de vesículas (Mazel et al., 2004) produce un aumento de la tolerancia al estrés salino por medio de un aumento de la capacidad de retención de Na<sup>+</sup> en vacuolas y una menor generación intracelular de ROS.

El papel del Ca<sup>2+</sup> en la respuesta a la salinidad es complejo, ya que tiene una función estructural en la membrana, afecta la actividad de algunos transportadores iónicos y además actúa como intermediario en la cascada de señales que conducen a la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta adaptativa (Rengel, 1992; Bressan et al., 1998; Pardo et al., 1998; Trewavas y Malhó, 1998; Gao et al., 2004; Shabala et al., 2006). La señal de estrés, que cursa en parte con un aumento de Ca<sup>2+</sup> citosólico, debe tamponarse mediante la reentrada del Ca<sup>2+</sup> en los compartimentos de reserva (vacuolas, retículo endoplasmático) una vez producido su efecto. Esta función corre a cargo de antiportadores Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> (CAX1, Hirschi et al., 1996) y de Ca<sup>2+</sup>-ATPasas (Geisler et al., 2000). La salinidad incrementa el nivel de transcriptos de una Ca<sup>2+</sup>-ATPasa (ACA4) presente en vacuolas pequeñas de protoplastos de *Arabidopsis* (Geisler et al., 2000). Algo similar ocurre con otras Ca<sup>2+</sup>-ATPasas de retículo endoplasmático de tomate y tabaco (Wimmers et al., 1992; Perez-Prat et al., 1992). La presencia de Ca<sup>2+</sup> puede reducir la magnitud del efecto negativo de la salinidad en el crecimiento, fenómeno que se ha atribuido al efecto estabilizador de la membrana y al mantenimiento de su capacidad selectiva (Rengel, 1992). El Ca<sup>2+</sup> extracelular también puede reducir la pérdida de K<sup>+</sup> inhibiendo los canales de salida de tipo KORC, NSCC o DAPC (Murata et al., 2000; Shabala et al., 2006), y disminuir la entrada de Na<sup>+</sup> mediante la inhibición de canales KIRC y sobre todo VIC (Maathuis y Amtmann, 1999). Por otra parte, el Ca<sup>2+</sup> intracelular tendría un papel no menos importante en la absorción de K<sup>+</sup> y la selectividad K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en condiciones salinas mediante la modulación de otros transportadores iónicos como el sistema compuesto por SOS1, SOS2 y SOS3 (Liu y Zhu, 1997; Zhu, 2000; Quintero et al., 2002). El complejo proteína quinasa SOS2/SOS3 (también llamado CIPK24/CBL4) pertenece a una intrincada red regulatoria compuesta por las proteínas quinasas CIPK/PKS y sus subunidades dependientes de Ca<sup>2+</sup> CBL/SCaBP. En los genomas secuenciados de *Arabidopsis* y arroz se han identificado 10 genes de tipo CBL/SCaBP en ambas especies y 25 ó 30 genes, respectivamente, que codifican proteínas quinasa CIPK/PKS (Kolukisaoglu et al., 2004). Entre las dianas identificadas que están reguladas por este entramado de proteínas regulatorias están SOS1 para los complejos SOS2/SOS3 y SOS2/CBL10, el canal de K<sup>+</sup> AKT1 para los complejos CIPK23 con CBL1 o CBL9 (Xu et al., 2006), y la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática AHA para el complejo PKS5/SCaBP1 (Fuglsang et al., 2007). El módulo regulatorio AKT1/CIPK23/CBL1-CBL9 puede ser particularmente relevante en la tolerancia al estrés salino porque asegura la activación del principal canal de K<sup>+</sup> en raíces en condiciones limitantes de este nutriente.

La sobreexpresión del gen de levadura *HAL1* en cultivos como tomate mejora los niveles de K<sup>+</sup> y de retención de agua en las plantas bajo estrés e incrementa en cierta medida la tolerancia al estrés salino (Gisbert et al., 2000; Rus et al., 2001). Este gen codifica una proteína con actividad reguladora que, en levaduras, actúa tanto sobre los transportadores de salida de Na<sup>+</sup> (proteínas ENA) como sobre un sistema de salida de K<sup>+</sup> sin identificar. En plantas, el fenotipo tolerante resultante de la expresión de *HAL1* se ha atribuido a una mejora de la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> bajo condiciones de estrés (Gisbert et al., 2000; Rus et al., 2001)

## 9.6. ESTRÉS POR COMPUESTOS OXIDANTES (ROS)

Las especies de oxígeno reactivas (ROS) se producen en el metabolismo normal y se controlan con un eficiente sistema enzimático de catalasa, peroxidasas y superóxido dismutasas localizados en organelas específicas (peroxisomas, glioxisomas, cloroplastos, mitocondrias) acoplado a las reacciones donde los ROS son compuestos secundarios del metabolismo. Como se había comentado previamente, en las etapas iniciales del estrés, se considera a los ROS en uno de los sistemas de señalización que conducen a la respuesta adaptativa (Mittler et al., 2004). Las consecuencias de la reorganización metabólica en respuesta al estrés produce un aumento considerable de ROS, que si no son convenientemente neutralizados tienen un gran potencial fitotóxico. En esto se han basado los intentos de mejorar la capacidad de las plantas de dar cuenta de estos componentes dañinos a través de la sobreexpresión de enzimas como las superóxido dismutasas (SOD) (Badawi et al., 2004). Las plantas de tabaco transgénicas tenían mayor actividad SOD en los cloroplastos y mostraban mayor actividad fotosintética bajo salinidad (300 mM NaCl). Con resultados similares, la sobreexpresión de la isoenzima MnSOD mejoraba el comportamiento de *Arabidopsis* en salinidad (150 mM NaCl) (Wang et al., 2004), como consecuencia de la inducción de otros sistemas antioxidantes (Cu/Zn-, Fe-SOD y catalasa). También relacionado con sistemas de protección a la oxidación por radicales libres, la expresión ectópica de una aldehído deshidrogenasa de soja (*GmTP55*) en *Arabidopsis* y tabaco mejora la germinación en salinidad y la capacidad de tolerar déficit de agua manteniendo mayor turgencia en las plantas transgénicas (Rodrigues et al., 2006). Cuando se expresaron simultáneamente los genes que codifican para la glutatión transferasa y la catalasa procedentes de *Suaeda salsa* en el cultivo de arroz, éste aumentaba notablemente su tolerancia al estrés salino (hasta 200 mM NaCl en invernadero) y al estrés oxidativo producido por el herbicida paraquat (Zhao y Zhang, 2006). Aparentemente, la coexpresión mejoraba los sistemas antioxidantes (con un aumento incluso de actividad superóxido dismutasa) y una reducción de los marcadores de daño oxidativo celular, como malondialdehído o la integridad de la membrana. El incremento de actividad peroxidasa como consecuencia de la sobreexpresión del gen *TPX2* de peroxidasa de pared celular de tomate en plantas de tabaco, mejora la germinación de sus semillas en salinidad o estrés osmótico (manitol) aparentemente por una mejora en la capacidad de absorber y retener agua (Amaya et al., 1999).

La producción de ROS está también íntimamente ligada a la respuesta de las plantas al ataque por patógenos. El factor de transcripción *RAV1* inducido por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en pimiento es capaz de aumentar la tolerancia al ataque de otros patógenos y al estrés salino en *Arabidopsis* (Sohn et al., 2006). Por otro lado, plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan genes para la producción de quitinasas antifúngicas también manifestaron un aumento de la tolerancia al estrés abiótico (Dana et al., 2006). También la mayor expresión de peroxidasas mitocondriales puede ser uno de los sistemas que permite a la especie de tomate silvestre *Lycopersicon pennellii* ser más tolerante al estrés salino que el tomate cultivado (Mittova et al., 2004). En este caso, la inducción de una elevada actividad peroxidasa, y otras respuestas generales a estrés, además de respuesta específica a la patogénesis, pueden haber determinado la mayor tolerancia de las plantas transgénicas a la salinidad.

Resultados similares se han encontrado cuando se han manipulado los niveles de hormonas relacionadas principalmente con estrés biótico. El ácido jasmónico y el metil jasmonato (JA, MeJA) son reguladores del crecimiento importantes para el desarrollo y actúan regulando la expresión de genes relacionados con heridas y patógenos, pero también en condiciones de sequía. Un factor de transcripción que responde al JA (y al etileno), denominado JERF3, activa una secuencia de genes relacionados con respuesta a patogénesis que también mejoran la tolerancia a sal en las

plantas de tabaco (Wang et al., 2004). Cuando se sobreexpresa el enzima de nabo productora de metil jasmonato NTR1 (ácido jasmónico carboxi-metil-transferasa) en soja, se incrementa la concentración de MeJA y la tolerancia al déficit hídrico mediante de un aumento en la capacidad de retención de agua en los tejidos (Xue et al., 2007). Del mismo modo la alteración en la señalización de estrés por brasinosteroides en los mutantes de arroz *gsk1* modificaba la expresión de otros genes relacionados a estrés abiótico y aumentaba la tolerancia a la desecación medida por fluorescencia de clorofilas y porcentaje de plantas marchitas (Koh et al., 2007).

### 9.7. AJUSTE OSMÓTICO Y COMPUESTOS DE PROTECCIÓN CELULAR

Uno de los cambios bioquímicos importantes en el proceso de adaptación al estrés abiótico es la acumulación de compuestos orgánicos con actividad osmótica o protectora y que suponen un considerable gasto energético para el metabolismo. En este sentido, por la relación coste/beneficio, son varios los autores que, desde un punto de vista fisiológico, señalan que la acumulación de osmolitos orgánicos no mejoraría la capacidad del cultivo a tolerar condiciones de estrés hídrico si su función fuera exclusivamente la de contribuir al ajuste osmótico celular (Serraj y Sinclair, 2002; Turner et al., 2007). Desde el punto de vista de economía energética, el  $K^+$  es uno de los principales solutos empleados para el ajuste osmótico en células vacuoladas o poco vacuoladas (Greenway y Munns, 1980; Wyn Jones y Gorham, 1983). Cuando la disponibilidad de  $K^+$  está comprometida, como ocurre en situaciones de estrés abiótico, la disminución del potencial osmótico celular se consigue con los iones disponibles que deben acumularse en vacuolas (p.e.  $Na^+$ ) o con compuestos orgánicos sintetizados *de novo* (prolina, glicín betaína) o sustraídos al metabolismo general (azúcares). Si embargo, son significativos los resultados de un estudio con genotipos de cebada con distinta tolerancia al estrés salino, en el que los cultivares sensibles acumulaban más solutos compatibles (prolina, glicín betaína) y menos  $K^+$  que los tolerantes (Chen et al., 2007).

La síntesis de una gran variedad de compuestos aumenta en respuesta al estrés (prolina, polioles, betaínas, etc) y en conjunto se denominan solutos compatibles porque su acumulación no inhibe el metabolismo celular pero generan el potencial osmótico necesario para permitir la absorción de agua en condiciones de menor potencial hídrico. En algunos casos no tienen actividad propiamente osmótica sino que su función es protectora y/o estabilizante de membranas y enzimas (Bohnert y Shen, 1999; Hasegawa et al., 2000). Algunos de estos compuestos actuarían en realidad como protectores físico-químicos reemplazando parcialmente el agua de superficies proteicas y membranas por su naturaleza hidrofílica (Rhodes y Hanson, 1993), mientras que otros podrían tener una función de protección química desactivando radicales libres (Smirnov y Cumbes, 1989). En el caso de las poliaminas, cuyos niveles también se incrementan bajo condiciones de estrés (Bagni et al., 2006), su posible papel puede estar relacionado a una actividad antioxidante (Papadakis et al., 2005). La posible participación de estos compuestos en la tolerancia al estrés procede de experimentos *in vitro*, donde algunas poliaminas aparecen conjugadas a la membrana y se asocian a la tolerancia al estrés osmótico (Liu et al., 2005) o cuando añadidas al medio de ensayo protegen la actividad ATPasa de membranas (Zhao y Qin, 2004; Roy et al., 2005). Son más concluyentes los resultados *in vivo*, por ejemplo, cuando se modifica la síntesis de poliaminas en arroz con la expresión del gen *ADC* (arginina decarboxilasa) (Capell et al., 2004). En este caso, la mayor síntesis de putrescina en los transgénicos permitía aumentar los niveles de espermidina y espermina endógenos, y reducir los síntomas de senescencia en las hojas después de someter las plantas a sequía (Capell et al., 2004). En otro trabajo, se comprobó el efecto protector de las poliaminas con el uso de mutantes incapaces de producir espermina, que manifestaban una alteración en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  y resultan más sensibles al estrés salino (Yamaguchi et al., 2006).



El incremento en la síntesis de compuestos osmoprotectores en plantas transgénicas a través de la sobreexpresión de enzimas de sus correspondientes vías metabólicas ha tenido un éxito relativo (Bohnert y Shen, 1999). A través de transgénesis, se ha conseguido sintetizar metabolitos como glicín betaína o trehalosa en plantas que no los producían con el resultado de obtener cierta tolerancia pero a veces con fuertes efectos pleiotrópicos indeseables (Serrano et al., 1999). Las bajas concentraciones que se alcanzaban en la planta transgénica hacían suponer un papel protector sobre el metabolismo más que osmótico en sí y los márgenes de mejora no suponían un aumento significativo por lo que su interés biotecnológico es relativo (Bohnert y Shen, 1999). Aumentar los niveles de prolina permitía mejorar la tolerancia al estrés abiótico en tabaco y arroz (Kavi Kishor et al., 1995; Zhu et al., 1998) a pesar que las concentraciones alcanzadas no eran suficientes para un ajuste osmótico. En patata se ha conseguido obtener mayor concentración de prolina que en los casos anteriores (Hmida-Sayari et al., 2005), y una mejora del rendimiento en estrés salino pero una reducción en ausencia de estrés. En el caso de la trehalosa, un disacárido de reserva en levaduras y hongos, la inducción de su síntesis en arroz transformado con los genes *otsA* y *otsB* de *Escherichia coli* (Garg et al., 2002), permitía alcanzar valores de sólo 1 mg/g de peso fresco pero aún así tenía un efecto positivo en la fotosíntesis, reduciendo los daños oxidativos y determinando mayor crecimiento en condiciones de estrés por sal, suspensión de riego o bajas temperaturas. Con la expresión del gen *mt1D* de *Escherichia coli* para la síntesis de manitol en trigo ocurría algo similar, en cuanto a que las cantidades de manitol no alcanzaban concentraciones para tener un efecto osmótico, con un máximo de 2  $\mu$ moles por g de peso fresco, pero conseguían aumentar significativamente la tolerancia al estrés salino o hídrico en condiciones controladas (Abebe et al., 2003).

La síntesis de glicín betaína, un compuesto de amonio cuaternario muy soluble, es otro de los sistemas estudiados a través de transgénesis empleando genes que regulan el paso de colina a glicín betaína (Sakamoto y Murata, 2000, 2002). Son diferentes los mecanismos de protección propuestos, pero la glicín betaína puede aumentar la tolerancia de las plantas transgénicas a salinidad o temperaturas extremas, reduciendo los efectos dañinos sobre la rubisco y el fotosistema II en cloroplastos y las membranas celulares (Sakamoto y Murata, 2002). Un trabajo reciente demuestra el papel protector en estrés salino de la glicín betaína aun a bajas concentraciones (5  $\mu$ moles g peso fresco<sup>-1</sup>) sobre algunas enzimas del ciclo de Calvin permitiendo mayores tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> (Yang et al., 2008). Aumentos de tolerancia al estrés salino relacionados con el incremento de la concentración de glicín betaína también se han conseguido en maíz (Wu et al., 2008). Si bien las concentraciones del compuesto eran bajas respecto a otras especies, se aumentaba en 20 veces en relación al control no transgénico y el efecto positivo sobre los transgénicos en salinidad era manifiesto.

Las proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*) se acumulan en semillas hacia el final del proceso de maduración y desaparecen durante la germinación. Son proteínas muy hidrofílicas, con la expresión dependiente de ABA y también aparecen en órganos vegetativos de las plantas cuando se someten a sequía, salinidad o frío (Ingram y Bartels, 1996; Thomashow, 1999). Por las características estructurales y el modelo de expresión, las proteínas LEA tienen fundamentalmente una función protectora (Ingram y Bartels, 1996). Así, se han descrito proteínas LEA que protegen de la desecación a los sistemas enzimáticos mitocondriales (Grelet et al., 2005). Se ha podido correlacionar la acumulación de transcritos de estas proteínas con la tolerancia a la sequía en líneas de girasol tolerante y sensible a ese estrés (Cellier et al., 1998). También cuando se emplearon distintos cultivares de trigo se pudo observar que la mayor expresión de proteínas tipo

LEA se relacionaba con una menor susceptibilidad a la sequía (López et al., 2003) por lo que se proponían como un posible carácter de mejora para la tolerancia a la sequía. Cuando se sobreexpresan en arroz proteínas HVA1 del grupo LEA, caracterizada en los granos de aleurona de cebada, se registran menores síntomas de marchitamiento y una mejora significativa de la recuperación después de un tratamiento de sequía o salinidad (Xu et al., 1996). La mejora del potencial productivo en salinidad de una transgénica de avena que sobreexpresa la misma proteína de cebada (HVA1) (Oraby et al., 2005) también se podría explicar, como en el caso anterior, por el efecto protector de estas proteínas altamente hidrofílicas.

Las proteínas ASR (inducidas por ABA, estrés y maduración) pertenecen al grupo de las hidrofílicas como las proteínas LEA específicas de semillas. Tienen bajo peso molecular, son muy hidrofílicas y resistentes a la desnaturalización por calor. La proteína ASR1 localizada en el citosol y en el núcleo de tomate, maíz o arroz, aumenta su expresión cuando estos cultivos se exponen a estrés salino u osmótico (PEG) (Kalifa et al., 2004). Aún se desconoce la función de ASR1, que podría ser una proteína reguladora porque *in vitro* y en presencia de  $Zn^{2+}$  se asocia a secuencias específicas de ADN. La sobreexpresión en tabaco de ASR1 reducía significativamente la pérdida foliar de agua y la concentración de  $Na^+$  y prolina con un aumento importante de la tolerancia al choque salino (Kalifa et al., 2004). La proteína ASR1 de *Lilium longiflorum* (LLA23) expresada en *Arabidopsis* mejora su comportamiento en salinidad y sequía, posiblemente por el efecto protector de estas proteínas, pero además es posible que actúen como reguladoras a nivel molecular, induciendo cambios en la expresión de otros genes relacionados estrés (Yang et al., 2005).

## 9.8. TEMPERATURAS EXTREMAS

La respuesta al choque de calor está muy conservada en distintos organismos y se caracteriza por la formación de proteínas HSP (*heat-shock proteins*), que actúan *acompañando* proteínas (actividad *chaperona*) y su función es la protección de los sistemas proteicos celulares ante a la subida de temperatura. Las HSP se han clasificado en familias según el peso molecular, y las plantas tienen de particular el gran número de HSP de bajo peso molecular (Jakob y Buchner, 1994). La respuesta al estrés térmico también involucra a otros agentes, como ABA,  $Ca^{2+}$ , etileno y ácido salicílico (Larkindale y Knight, 2002), ya que el empleo de mutantes afectados en la síntesis o en la respuesta a etileno (*nahG* y *etr1* respectivamente) o aquellos insensibles al ABA (*abi1*) son más afectados por las altas temperaturas.

Las quinasas MAP, involucradas en el proceso de señalización de varios tipos de estrés abiótico, también pueden actuar en la respuesta a los choques térmicos por frío o calor (Sangwan y Dhindsa, 2002). En cultivos celulares de tabaco, una quinasa activada específicamente por tratamiento térmico (2 min, 37°C) y en presencia de  $Ca^{2+}$  precede a la síntesis de proteínas de choque térmico como HSP70 (Suri y Dhindsa, 2008). También se hipotetiza sobre una posible relación entre algunos HSPs y los ROS, donde los HSF (*heat-shock factors*) podrían sensar la producción de ROS y actuar en consecuencia controlando la expresión de genes activados por el estrés oxidativo (Miller y Mittler, 2006). La sobreexpresión del factor de transcripción HSF A9, específico de semillas de girasol, incrementa de forma muy significativa la tolerancia a la desecación de plántulas de tabaco, aparentemente a través de la acumulación de proteínas de bajo peso molecular de respuesta al calor (HSPs) y no por acumulación proteínas LEA o azúcares (Prieto-Dapena et al., 2008).

Entre los factores más importantes relacionados con la aclimatación al frío y los daños por heladas están los mecanismos que permiten estabilizar las membranas y evitar así los daños consecuencia de las bajas temperaturas. Los principales daños se producen por el proceso de deshidratación asociado a la congelación. Entre los genes cuya actividad preserva la integridad de las membranas celulares se puede señalar a *FAD8* de *Arabidopsis*, que modifica la composición lipídica codificando una desaturasa de ácido graso, o genes que codifican proteínas chaperonas como HSP70 o HSP90. Existen otros sistemas también inducidos por frío, como por ejemplo los relacionados a los genes *COR* (por *cold regulated*) de *Arabidopsis*, como *COR15a*, responsable de la síntesis de un polipéptido muy hidrofílico que se localiza en el estroma cloroplastídico, o el gen de trigo *wcs120* que codifica una proteína del grupo LEA II. En espinaca, los genes *CAP* (por *cold acclimation protein*) se inducen por déficit hídrico y ABA, y codifican también proteínas muy hidrofílicas, localizadas en el citoplasma o en orgánulos como las mitocondrias (Guy et al., 1992). En respuesta al frío, también se inducen genes que codifican proteínas relacionadas con la señalización o la regulación, como las quinasas MAP, las proteínas relacionadas con calmodulina y las proteínas 14-3-3 (para referencias, ver Thomashow, 1999). En los estudios realizados para comprobar la función génica y la regulación de la respuesta al frío son interesantes los resultados obtenidos en *Arabidopsis* con la sobre-expresión del activador transcripcional *CBF1* (por *C-repeat binding factor/dehydration-responsive element binding protein 1*) y *COR15a*, con los que se aumenta significativamente la tolerancia al frío y la desecación (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Zhang et al., 2004). Curiosamente, la *disrupción* de otro factor de transcripción relacionado, *CBF2*, también aumenta la resistencia de la planta de *Arabidopsis* a la congelación, la desecación y el estrés salino (Novillo et al., 2004). Ese fenotipo del mutante *cbf2* correlaciona con la mayor expresión del conjunto de genes *COR* regulados positivamente por los factores de transcripción *CBF1* y *CBF3*, incluidos ellos mismos. Parece pues que mientras que *CBF1* y *CBF3* son reguladores positivos de la respuesta a frío de *Arabidopsis*, *CBF2* es un represor de esa misma respuesta (Novillo et al., 2007). Por otro lado, el factor de transcripción de tipo bHLH (por *basic helix-loop-helix*) *ICE1*, no relacionado estructuralmente con los *CBF*, se une específicamente al promotor del gen *CBF3* y activa su expresión por frío (Chinnusamy et al., 2003). Igualmente, el factor de transcripción *MYB15* controla la expresión del factor *CBF1* (Agarwal et al., 2006). En el caso de *MYB15*, su mutación aumenta la tolerancia a frío mientras que su sobreexpresión tiene un efecto contrario, por lo que también actúa como represor general del regulón *COR*. Existe una vía independiente a los factores de transcripción *CBF* que también participa en la respuesta a bajas temperaturas, como el gen *HOS9* (Zhu et al., 2004), regulando genes diferentes a los regulados por *CBF*. Las plantas mutantes *hos9* que son más pequeñas y tardan más tiempo en florecer; son además más sensibles a frío. En estudios con mutantes se han identificados otros genes que participan en la tolerancia a frío, como los *SFR* (*sensitive to freezing*) o *ESK1* (*eskimo 1*) aunque su función no está debidamente aclarada (Thomashow, 1999).

Aparte de los sistemas de protección descritos, la adaptación al frío requiere de la acumulación de azúcares solubles, que contribuirían con un efecto osmótico, y en esta acción se enmarca la actividad del gen *SEX1* (*starch excess 1*) que codifica una quinasa que regularía la degradación de almidón en los plástidos mediante su fosforilación (Yano et al., 2005). La crucífera *Thellungiella halophila*, ya propuesta como planta modelo para estudios comparativos con *Arabidopsis* de tolerancia a salinidad (Inan et al., 2004) también lo ha sido recientemente para el conocimiento de los mecanismos de tolerancia a frío (Griffith et al., 2007). En *Thellungiella* también se activan el factor de transcripción *CBF1* y los genes *COR15a* y *COR47* como en *Arabidopsis*, pero esta especie es mucho más tolerante a la congelación. La búsqueda de los mecanismos donde se asientan



estas diferencias de sensibilidad entre plantas modelo puede dar resultados prometedores. En cualquier caso, y de cara a la mejora clásica, existe variación natural para la tolerancia a las bajas temperaturas en algunos cultivos, como demuestran los recientes análisis por genética cuantitativa que ha identificado varios loci mayores en arroz (Andaya y Tai, 2007; Fujino et al., 2004). Este tipo de estudios, combinados con la disponibilidad de la secuencia genómica, deberían permitir una rápida identificación de los genes responsables de esos caracteres.

### 9.9. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Como atestigua la amplísima literatura científica sobre este tema, la respuesta adaptativa de las plantas al estrés ambiental es ciertamente compleja a juzgar por la miriada de cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares que se han identificado. Es por tanto previsible, y así lo confirma la investigación realizada hasta ahora, que no hay un 'gen milagroso' capaz de conferir una gran tolerancia a la falta de agua, la salinidad del suelo o las temperaturas extremas. Sin embargo, sí que se han identificado genes y procesos que tienen un impacto sustancial sobre la capacidad de las plantas para sobreponerse a situaciones de estrés subletales (Zhang et al., 2004). Además, parece que existe la suficiente variabilidad genética natural en algunos cultivos como para poder identificar alelos que impartan una ventaja adaptativa en situaciones de estrés, como ha sido recientemente demostrado con los genes de tipo *HKT* en arroz, trigo y *Arabidopsis* (Ren et al., 2005; Byrt et al., 2007; Rus et al., 2006). La transición, siempre deseable y a veces necesaria, del cartografiado genético de QTLs a la identificación molecular de los loci responsables de los rasgos seleccionados estará en gran medida facilitada por la secuenciación de los genomas de plantas ya disponibles o en fase de obtención.

Como alternativa al uso de la mejora genética asistida por marcadores, especialmente allá donde no se encuentre suficiente variabilidad genética, tendremos la modificación genética. El empleo de plantas transgénicas en los cultivos es tan polémico hoy como inevitable el día de mañana. La mayoría de los cultivos transgénicos desarrollados hasta la fecha con fines comerciales incorporan resistencias a herbicidas y/o insectos, o modificaciones metabólicas simples como la alteración de la relación amilosa/amilopectina del almidón. El desafío es cómo trasladar la información obtenida mediante investigación básica a la producción de nuevas variedades vegetales mejor adaptadas a las variables ambientales (Zhang et al., 2004). Un aspecto importante a considerar es la correlación negativa que existe frecuentemente entre el crecimiento de las plantas, y su productividad en el caso de los cultivos, y la tolerancia intrínseca a situaciones de estrés. Las plantas, como todos los organismos vivos, cuentan con sistemas homeostáticos que monitorizan y responden a factores ambientales. Cuando las condiciones no son las adecuadas, las plantas ralentizan e incluso detienen su crecimiento. Es importante señalar que el análisis genético demuestra que esta parada de crecimiento es una respuesta activa, integrada en la respuesta adaptativa, y no una mera incapacidad para continuar creciendo. De hecho, ambos fenómenos (estrés y crecimiento) son dissociables como demuestran los mutantes insensibles a ABA, que siguen creciendo en situaciones en las que las plantas silvestres detienen su crecimiento como consecuencia de la acumulación de ABA (Beaudoin et al., 2000). También, se ha demostrado que el estrés salino potencia los mecanismos de represión del crecimiento dependientes del sistema DELLA (Achard et al., 2006). El sistema DELLA está compuesto por proteínas nucleares que restringen la proliferación y expansión celular necesarias para el crecimiento de las plantas. La estabilización de las proteínas DELLA retrasa el crecimiento y alarga la fase vegetativa durante los episodios de estrés. Esta represión directa del crecimiento es diferente de la dificultad para el mismo atribuible a la perturbación de los procesos metabólicos como consecuencia derivada del estrés

salino. No es por tanto sorprendente, que la sobreexpresión de un buen número de genes de estrés, además de aumentar la tolerancia de las plantas reduzcan también su crecimiento (y productividad) en situaciones favorables. Se ha demostrado que la utilización de un bucle de retroalimentación positiva que disparara la expresión del transgen sólo durante un episodio de estrés, esto es, de manera contextual, consigue aumentar la tolerancia al estrés ambiental sin afectar negativamente el crecimiento en ausencia de estrés (Kasuga et al., 1999).

A pesar de las dificultades descritas, la producción de plantas más tolerantes y productivas en condiciones de los tipos de estreses ambientales más frecuentes y económicamente importantes (sequía, frío y salinidad) se vislumbra ya en el horizonte. La multinacional Monsanto, en colaboración con BASF, ha anunciado que tiene en fase III de producción líneas transgénicas de maíz que incorporan un 'drought gene', cuya identidad no ha revelado (<http://www.monsanto.com/drought-tolerantcorn/default.asp>). Los ensayos de campo que se han realizado desde 2004 indican una ganancia del 8-10% de producción respecto a las plantas control en diversas situaciones de limitación de agua. Se espera concluir esta fase en 2011 y solicitar los permisos necesarios necesarios para su comercialización. Plantas de algodón resistentes a la desecación están también en fase de producción. Sin duda, habrá otras líneas de producción de plantas tolerantes a la salinidad o al frío que no estén tan avanzadas, pero sí en fases preliminares de desarrollo.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2006-06968) y de la Junta de Andalucía (BIO-148)

## REFERENCIAS

- Abebe, T., Guenzi, A.C., Martin, B. and Cushman, J.C. (2003). Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 131: 1748-1755.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J. and Harberd, N.P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91-94.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.D., Fujii, H., Zheng, X. and Zhu, J.K. (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J. Biol. Chem.* 281: 37636-37645.
- Aharon, R., Shahak, Y., Wininger, S., Bendov, R., Kapulnik, Y. and Galili, G. (2003). Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15: 439-447.
- Amaya, I., Botella, M.A., de la Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A. and Valpuesta, V. (1999). Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.* 457: 80-84.
- Amtmann, A. and Sanders, D. (1999). Mechanisms of Na<sup>+</sup> uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29: 75-113.
- Andaya, V. and Tai, T. (2006). Fine mapping of the qCTS12 locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 113: 467-475.

- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A. and Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by over-expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Ashraf, M., (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 17-42.
- Badawi, G.H., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kawano, N., Tanaka, K. and Tanaka, K. (2004). Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Sci.* 166: 919-928.
- Bagni, N., Ruiz-Carrasco, K., Franceschetti, M., Fornalè, S., Fornasiero, R.B. and Tassoni A (2006). Polyamine metabolism and biosynthetic gene expression in *Arabidopsis thaliana* under salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 776-786.
- Barkla, B.J. and Pantoja, O. (1996). Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 47: 159-184.
- Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Maldonado-Gama, M. and Pantoja, O. (1999). Abscisic acid induction of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Mesembryanthemum crystallinum* is developmentally regulated. *Plant Physiol.* 120: 811-819.
- Bartels, D. and Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24: 23-58.
- Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F. and Giraudat, J. (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103-1116.
- Berthomieu, P., Conejero, G., Nublat, A., Brackenbury, W.J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah, P.A., Tester, M., Very, A.A., Sentenac, H., Casse, F. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22: 2004-2014.
- Blumwald, E. (1987). Tonoplast vesicles as a tool in the study of ion transport at the plant vacuole. *Physiol. Plant.* 69: 731-734.
- Blumwald, E., Aharon, G.S. and Apse, M.P. (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 140-151.
- Blumwald, E. and Poole, R.J. (1985). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 78: 163-167.
- Bohnert, H.J., Gong, Q., Li, P. and Ma, S. (2006). Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms-getting genomics going. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 180-188.
- Bohnert, H.J. and Shen, B. (1999). Transformation and compatible solutes. *Sci. Hort.* 78: 237-260.
- Borsani, O., Zhu, J.H., Verslues, P.E., Sunkar, R. and Zhu, J.K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123: 1279-1291.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.T., Sorieul, M., van den Dries, N., and Maurel, C. (2005). Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol.* 139: 790-805.
- Bray, E.A., Biley-Serres, J. and Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. pp. 1158-1203, in *Biochemistry y Molecular Biology of Plants*. W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones (eds).

- Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Pardo, J.M. (1998). Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends Plant Sci.* 3: 411-412.
- Byrt, C.S., Platten, J.D., Spielmeyer, W., James, R.A., Lagudah, E.S., Dennis, E.S., Tester, M. and Munns, R. (2007). HKT1;5-like cation transporters linked to Na<sup>+</sup> exclusion loci in wheat, Nax2 y Kna1. *Plant Physiol.* 143: 1918-1928.
- Capell, T., Bassie, L. and Christou P (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9909-9914.
- Cellier, F., Conejero G, Breitler JC, Casse F (1998). Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. *Plant Physiol.* 116: 319-328.
- Cellier, F., Conejero, G., Ricaud, L., Luu, D.T., Lepetit, M., Gosti, F. and Casse F (2004). Characterization of AtCHX17, a member of the cation/ H<sup>+</sup> exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Plant J.* 39: 834-846.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J. and Luan, S. (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant J.* 52: 223-239.
- Chen, H., An, R., Tang, J.H., Cui, X.H., Hao, F.S., Chen, J. and Wang, X.C. (2007). Over-expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. *Mol. Breed.* 19: 215-225.
- Chen, Z.Z., Hong, X.H., Zhang, H.R., Wang, Y.Q., Li, X., Zhu, J.K. and Gong, Z.Z. (2005). Disruption of the cellulose synthase gene, AtCesA8/IRX1, enhances drought and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 43: 273-283.
- Chen, Y., Ji, F., Xie, H. and Liang, J. (2006). Overexpression of the regulator of G-protein signalling protein enhances ABA-mediated inhibition of root elongation and drought tolerance in *Arabidopsis*. *J. Exp. Botany* 57: 2101-2110.
- Chen, Z., Cuin, T.A., Zhou, M., Twomey, A., Naidu, B.P. and Shabala, S. (2007). Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 4245-4255.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.H., Hong, X., Agarwal, M., and Zhu, J.K. (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 17: 1043-1054.
- Chung, J.S., Zhu, J.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Shi, H. (2008). Reactive oxygen species mediate Na<sup>+</sup>-induced SOS1 mRNA stability in *Arabidopsis*. *Plant J.* 53: 554-565.
- Dana, M.M., Pintor-Toro, J.A. and Cubero, B. (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol.* 142: 722-730.
- Davenport, R.J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A. and Tester, M. (2007). The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 30: 497-507.
- Davies, W.J., Kudoyarova, G. and Hartung, W. (2005). Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *J. Plant Growth Reg.* 24: 285-295.
- Donaldson, L., Ludidi, N., Knight, M.R., Gehring, C. and Denby, K. (2004). Salt and osmotic stress cause rapid increases in *Arabidopsis thaliana* cGMP levels. *FEBS Lett.* 569: 317-320.

- Dong, C.H., Hu, X.Y., Tang, W.P., Zheng, X.W., Kim, Y.S., Lee, B.H. and Zhu, J.K. (2006a) A putative *Arabidopsis* nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress. *Mol. Cell Biol.* 26: 9533-9543.
- Dong, C.H., Agarwal, M., Zhang, Y.Y., Xie, Q. and Zhu, J.K. (2006b). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 103: 8281-8286.
- Essah, P.A., Davenport, R. and Tester, M. (2003). Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 307-318.
- Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A. and Yeo, A.R. (1991). Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant Cell Environ.* 14: 319-325.
- Fuchs, I., Stölzle, S., Ivashikina, N., and Hedrich, R. (2005). Rice K<sup>+</sup> uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress. *Planta* 221: 212-221.
- Fujino, K., Sekiguchi, H., Sato, T., Kiuchi, H., Nonoue, Y., Takeuchi, Y., Ando, T., Lin, S-Y. and Yano, M. (2004). Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 108: 794-799.
- Fuglsang, A.T., Guo, Y., Cuin, T.A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K.A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K.S., Palmgren, M.G. and Zhu, J.K. (2007.) *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* 19: 1617-1634.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Phan Tran, L.S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki K. (2004). A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J.* 39: 863-876.
- Gao, D., Knight, M.R., Trewavas, A.J., Sattelmacher, B. and Plieth, C. (2004). Self-reporting *Arabidopsis* expressing pH and [Ca<sup>2+</sup>] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiol.*, 134: 898-908.
- Gao, F., Gao, Q., Duan, X.G., Yue, G.D., Yang, A.F. and Zhang, J.R. (2006). Cloning of an H<sup>+</sup>-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 57: 3259-3270.
- Gao, X., Ren, Z., Zhao, Y. and Zhang, H. (2003.) Overexpression of SOD2 increases salt tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133: 1873-1881.
- García-Mata, C.G. and Lamattina, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol.* 126: 1196-1204.
- Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V. and Wu, R.J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15898-15903.
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S.L. and Fink, G.R. (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1480-1485.
- Gaxiola, R.A., Li, J.S., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L. and Fink GR (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11444-11449.

- Geisler, M., Frangne, N., Gomès, Martinoia, E. and Palmgren, M.G. (2000). The ACA4 gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast. *Plant Physiol.* 124: 1814-1827.
- Gimmler, H. (2000). Primary sodium plasma membrane ATPases in salt-tolerant algae: facts and fictions. *J. Exp. Bot.* 51: 1171-1178.
- Gisbert, C., Rus, A.M., Bolarín, M.C., López-Coronado, J.M., Arrillaga, I., Montesinos, C., Caro, M., Serrano, R. and Moreno, V. (2000). The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiol.* 123: 393-402.
- Glenn, E.P., Brown, J.J. and Blumwald, E. (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 227-255.
- Golldack, D., Quigley, F., Michalowski, C.B., Kamasani, U.R. and Bohnert, H.J. (2003). Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. *Plant Mol. Biol.* 51: 71-81.
- Gorantla, M., Babum P.R., Reddy Lachagari, V.B., Reddy, A.M.M., Wusirika, R., Bennetzen, J.L. and Reddy, A.R. (2007). Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *J. Exp. Bot.* 58: 253-265.
- Gorham, J., Wyn Jones, R.G. and Bristol, A. (1990). Partial characterization of the trait for enhanced K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> discrimination in the D genome of wheat. *Planta* 180: 590-597.
- Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.H., Grunwald, D. and Macherel, D. (2005). Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.* 137: 157-167.
- Greenway, H. and Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.
- Griffith, M., Timonin, M., Wong, A.C.E., Gray, G.R., Akhter, S.R., Saldanha, M., Rogers, M.A., Weretilnyk, E.A. and Moffatt, B. (2007). *Thellungiella*: an *Arabidopsis*-related model plant adapted to cold temperatures. *Plant Cell Environ.* 30: 529-538.
- Guy, C.L., Haskell, D., Neven, L., Klein, P. and Smelser, C. (1992). Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. *Planta* 188: 265-270.
- Haro, R., Bañuelos, M.A., Quintero, F.J., Rubio, F. and Rodríguez-Navarro, A. (1993). Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol. Plant.* 89: 868-874.
- Haro, R., Bañuelos, M.A., Senn, M.E., Barrero-Gil, J. and Rodríguez-Navarro, A. (2005). HKT1 mediates sodium uniport in roots. Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol.* 139: 1495-1506.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. and Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular y molecular responses to high salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- He, C., Yan, J., Shen, G., Fu, L., Holaday, A.S., Auld, D., Blumwald, E. and Zhang, H. (2005). Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.* 46: 1848-1854.
- Hirschi, K.D., Zhen, R-G., Cunningham, K.W., Rea, P.A. and Fink, G.R. (1996). CAX1, an H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8782-8786.



- Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S. and Shinmyo, A. (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* 27: 129-138.
- Horie, T., Costa, A., Kim, T.H., Han, M.J., Horie, R., Leung, H.Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G. and Schroeder, J.I. (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth. *EMBO J.* 26: 3003-3014.
- Hmida-Sayari, A., Gargouri-Bouزيد, R., Bidani, A., Jaoua, L., Savouré, A. and Jaoua, S. (2005). Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Sci.* 169: 746-752.
- Hua, Z.M., Yang, X. and Fromm, M.E. (2006). Activation of the NaCl- and drought-induced RD29A and RD29B promoters by constitutively active *Arabidopsis* MAPKK or MAPK proteins. *Plant Cell Environ.* 29: 1761-1770.
- Huang, S., Spielmeier, W., Lagudah, E.S., James, R.A., Platten, J.D., Dennis, E.S. and Munns, R. (2006). A sodium transporter (HKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiol.* 142: 1718-1727.
- Hugouvieux, V., Kwak, J.M. and Schroeder, J.I. (2001). An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell* 106: 477-487.
- Inan, G., Zhang, Q., Li, P., Wang, Z., Cao, Z., Zhang, H., Zhang, C., Quist, T.M., Goodwin, S.M., Zhu, J., Shi, H., Damsz, B., Charbaji, T., Gong, Q., Ma, S., Fredricksen, M., Galbraith, D.W., Jenks, M.A., Rhodes, D., Hasegawa, P.M., Bohnert, H.J., Joly, R.J., Bressan, R.A., Zhu, J.K. (2004). Salt Cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiol.* 135: 1718-1737.
- Ingram, J. and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiol., Plant Mol. Biol.* 47: 377-403.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Shabenberger, O. and Thomashow, M.F. (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106.
- Jakob, U. and Buchner, J. (1994). Assisting spontaneity: the role of HSP90 and smHSPs as molecular chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 19: 205-211.
- Jang, J.Y., Lee, S.H., Rhee, J.Y., Chung, G.C., Ahn, S.J. and Kang, H. (2007). Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. *Plant Mol. Biol.* 64: 621-632.
- Kader, M.A., Seidel, T., Gollmack, D. and Lindberg, S. (2006). Expressions of OsHKT1, OsHKT2, y OsVHA are differentially regulated under NaCl stress in salt-sensitive and salt-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J. Exp. Bot.* 57: 4257-4268.
- Kalampanayil, B.D. and Wimmers, L.E. (2001). Identification and characterization of salt-stress-induced plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in tomato. *Plant Cell Environ.* 24: 999-1005.
- Kalifa, Y., Perlsonm E., Gilad, A., Konrad, Z., Scolnik, P.A. and Bar-Zvi, D. (2004). Over-expression of the water and salt stress-regulated Asr1 gene confers an increased salt tolerance. *Plant Cell Environ.* 27: 1459-1468.
- Kant, S., Kant, P., Raveh, E. and Barak, S. (2006). Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na<sup>+</sup> uptake in *T. halophila*. *Plant Cell Environ.* 29: 1220-1234.

- Kaplan, B., Sherman, T. and Fromm, H. (2007). Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Lett.* 581: 2237-2246.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech.* 17: 287-291.
- Katsuhara, M., Koshio, K., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T. and Kasamo, K. (2003). Overexpression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol.* 44:1378–1383.
- Kavi Kishor, P.B., Hong, Z., Miao, C.H., Hu, C.A.A. and Verma, D.P.S. (1995). Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108: 1387-1394.
- Kim, B.G., Waadt, R., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Dominguez-Solis, J.R., Schültke, S., Lee, S.C., Kudla, J. and Luan, S. (2007). The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 52: 473-484.
- Ko, J.H., Yang, S.H. and Han, K.H. (2006). Upregulation of an *Arabidopsis* *RING-H2* gene, *XERICO*, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *Plant J.* 47: 343-355.
- Koh, S., Lee, S.C., Kim, M.K., Koh, J.H., Lee, S., An, G., Choe, S. and Kim, S.R. (2007). T-DNA tagged knockout mutation of rice *OsGSK1*, an orthologue of *Arabidopsis* *BIN2*, with enhanced tolerance to various abiotic stresses. *Plant Mol. Biol.* 65: 453-466.
- Kolukisaoglu, U., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O. and Kudla, J. (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol.* 134: 43-58.
- Kurosaki, F. and Nishi, A. (1993). Stimulation of calcium influx and calcium cascade by cyclic AMP in cultured carrot cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 302: 144-151.
- Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M. and Pagnussat, G. (2003). Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Ann. Rev. Plant Biol.* 54: 109-136.
- Larkindale, J. and Knight, M.R. (2002). Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol.* 128: 682-695.
- Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J.M., Heard, P.J., Brown, S.J. and Leigh, R.A. (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.* 32: 139-149.
- Li, J., Jiang, G., Huang, P., Ma, J. and Zhang, F. (2007). Overexpression of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene from *Suaeda salsa* confers cold and salt tolerance to transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 90: 41-48.
- Liu, H.P., Yu, B.J., Zhang, W.H. and Liu, Y.L. (2005). Effect of osmotic stress on the activity of  $\text{H}^+$ -ATPase and the levels of covalently and noncovalently conjugated polyamines in plasma membrane preparation from wheat seedling roots. *Plant Sci.* 168: 1599-1607.
- Liu, J. and Zhu, J.K. (1997). An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14960-14964.
- López, C.G., Banowetz, G.M., Peterson, C.J. and Kronstad, W.E. (2003). Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *Crop Sci.* 43: 577-582.



- Luu, D.T. and Maurel, C. (2005). Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ.* 28: 85-96.
- Ma, S.Y. and Wu, W.H. (2007). AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses. *Plant Mol. Biol.* 65: 511-518.
- Maathuis, F.J.M. (2006a). cGMP modulates gene transcription and cation transport in *Arabidopsis* roots. *Plant J.*, 45: 700-711.
- Maathuis, F.J.M. (2006b). The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *J. Exp. Botany* 57: 1137-1147.
- Maathuis, F.J.M. and Amtmann, A. (1999). K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. *Ann. Bot.* 84: 123-133.
- Maathuis, F.J.M. and Sanders, D. (2001). Sodium uptake in *Arabidopsis thaliana* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol.* 127: 1617-1625.
- Mäser, P., Eckelmana, B., Vaidyanathana, R., Horie, T., Fairbairnb, D.J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimura, M., Uozumi, N., Robertson, W., Sussman, M.R. and Schroeder, J.I. (2002). Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter *AtHKT1*. *FEBS Lett.* 531: 157-161.
- Maurel, C. and Chrispeels, M.J. (2001). Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.* 125: 135-138.
- Mazel, A., Leshem, Y., Tiwari, B.S. and Levine, A. (2004). Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol.* 134: 118-128.
- Miller, G. and Mittler, R. (2006). Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann. Bot.* 98: 279-288.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants *Trends Plant Sci.* 9: 490-498.
- Mittova, V., Theodoulou, F.L., Kiddle, G., Volokita, M., Tal, M., Foyer, C.H. and Guy, M. (2004). Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt-tolerant relative, *L. pennellii* – a role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. *Plant Cell Environ.* 27: 237-250.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167: 645-663.
- Murata, Y., Katsura, S., Obi, I. and Kakutani, T. (2000). Alterations in Ca<sup>2+</sup>-binding on plasma membrane after adaptation to salt stress of tobacco cells in suspension. *Plant Cell Physiol.* 41: 1286-1292.
- Newton, R.P. and Smith, C.J. (2004). Cyclic nucleotides. *Phytochem.* 65: 2423-2437.
- Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Salinas, J. (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3985-3990.
- Novillo, F., Medina, J. and Salinas, J. (2007). *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 21002-21007.

- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Pardo, J.M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.*, 109: 735-742.
- Obata, T., Kitamoto, H.K., Nakamura, A., Fukuda, A. and Tanaka, Y. (2007). Rice Shaker potassium channel OsKAT1 confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells. *Plant Physiol.*, 144: 1978-1985.
- Oh, D.H., Gong, Q., Ulanov, A., Zhang, Q., Li, Y., Ma, W., Yun, D.J., Bressan, R.A. and Bohnert, H.J. (2007). Sodium stress in the halophyte *Thellungiella halophila* and transcriptional changes in a *thsos1*-RNA interference line. *J. Integr. Plant Biol.* 49: 1484-1496.
- Oh, S.J., Song, S.I., Kim, Y.S., Jang, H.J., Kim, S.Y., Kim, M., Kim, Y.K., Nahm, B.H., Kim, J.K. (2005). *Arabidopsis* CBF3/DREB1A y ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.* 138: 341-351.
- Ohta, M., Hayashia, Y., Nakashima, A., Hamada, A., Tanakaa, A., Nakamura, T. and Hayakawa, T. (2002). Introduction of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett.* 532: 279-282.
- Oraby, H.F., Ransom, C.B., Kravchenko, A.N. and Sticklen, M.B. (2005). Barley HVA1 gene confers salt tolerance in R3 transgenic oat. *Crop Sci.* 45: 2218-2227.
- Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Kim, B.G., Grant, J.J., Li, L. and Luan, S. (2007). CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis*. *Cell Res.* 17: 411-421.
- Papadakis, A.K. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (2005). Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta* 220: 826-837.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O. and Quintero, F.J. (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 57: 1181-1199.
- Pardo, J.M., Reddy, M.P., Yang, S., Maggio, A., Huh, G.H., Matsumoto, T., Coca, M.A., Paino-D'Urzo, M., Koiwa, H., Yun, D.J., Watad, A.A., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1998). Stress signaling through Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9681-9686.
- Perez-Prat, E., Narashimhan, M.L., Binzel, M.L., Botella, M.A., Chen, Z., Valpuesta, V., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1992). Induction of a putative Ca<sup>2+</sup>-ATPase mRNA in NaCl adapted cells. *Plant Physiol.* 100: 1471-1478.
- Perfus-Barbeoch, L., Jones, A.M. and Assmann, A.M. (2004). Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 719-731.
- Pih, K.T., Kabilan, V., Lim, J.H., Kang, S.G., Piao, H.L., Jin, J.B. and Hwang, I. (1999). Characterization of two new channel protein genes in *Arabidopsis*. *Mol. Cells* 9: 84-90.
- Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Cherel, I. and Sentenac, H. (2003). Regulated expression of *Arabidopsis* Shaker K<sup>+</sup> channel genes involved in K<sup>+</sup> uptake and distribution in the plant. *Plant Mol. Biol.* 51:773-787.
- Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R.J., Fairbairn, D.J., Horie, T., Leigh, R.A., Lin, H.X. and Luan, S. (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* 11: 372-374.

- Prieto-Dapena, P., Castaño, R., Almoguera, C. and Jordano, J. (2008). The ectopic overexpression of a seed-specific transcription factor, HaHSFA9, confers tolerance to severe dehydration in vegetative organs. *Plant J.* 54:1004-1014.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J.M. and Guoa, Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *Plant Cell* 19: 1415-1431.
- Quintero, F.J., Blatt, M.R. and Pardo, J.M. (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *FEBS Lett.* 471: 224-228.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.K. and Pardo, J.M. (2002). Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9061-9066.
- Qiu, Q.S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S. and Zhu, J.K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8436-8441.
- Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of rice (*Oryza sativa* L.) genes under cold, drought and high-salinity stresses, and ABA application using both cDNA microarray and RNA gel blot analyses. *Plant Physiol.* 133: 1755-1767.
- Ren, Z-H., Gao, J-P., Li, L-G., Cai, X-L., Huang, W., Chao, D-Y., Zhu, M-Z., Wang, Z-Y., Luan, S. and Lin, H-X. (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet* 37: 1141-1146.
- Rengel, Z.(1992). The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ.*, 15: 625-632.
- Rhodes, D. and Hanson, A.D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384.
- Rodrigues, S.M., Andrade, M.O., Soares Gomes, A.P., DaMatta, F.M., Baracat-Pereira, M.C. and Fontes, E.P.B. (2006). *Arabidopsis* and tobacco plants ectopically expressing the soybean anti-quitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 57: 1909-1918.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1469: 1-30.
- Roy, P., Niyogi, K., SenGupta, D.N. and Ghosh, B. (2005). Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress-induced damage of plasma membrane and PM-bound H<sup>+</sup>-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Sci.* 168: 583-591.
- Rubio, F., Gassmann, W. and Schroeder, J.I. (1995). Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* 270:1660-1663.
- Ruggiero, B., Koiwa, H., Manabe, Y., Quist, T.M., Inan, G., Saccardo, F., Joly, R.J., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. and Maggio, A. (2004). Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136: 3134-3147.
- Rus, A.M., Estañ, M.T., Gisbert, C., García-Sogo, B., Serrano, R., Caro, M., Moreno, V. and Bolarín, M.C. (2001). Expressing the yeast *HAL1* gene in tomato increases fruit yield and enhances K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selectivity under salt stress. *Plant Cell Environ.* 24: 875-880.

- Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B.H., Matsumoto, T.K., Koiwa, H., Zhu, J.K., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (2001). AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>+</sup> entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14150-14155.
- Rus, A., Lee, B.H., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (2004). AtHKT1 facilitates Na<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup> nutrition in planta. *Plant Physiol.* 136: 2500-2511.
- Rus, A., Baxter, I., Muthukumar, B., Gustin, J., Lahner, B., Yakubova, E., Salt, D.E. (2006). Natural Variants of AtHKT1 enhance Na<sup>+</sup> accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 2: 1964-1973.
- Sakamoto, A. and Murata, N. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 51: 81-88.
- Sakamoto, A., Murata, N. (2002). The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 25: 163-171.
- Sanchez-Aguayo, I., Rodriguez-Galan, J.M., Garcia, R., Torreblanca, J. and Pardo, J.M. (2004). Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta* 220: 278-285.
- Sangwan, V. and Dhindsa, R.S. (2002). In vivo and in vitro activation of temperature-responsive plant MAP Kinases. *FEBS Lett.*, 531: 561-564.
- Santa-María, G., Rubio, F., Dubcovsky, J. and Rodríguez-Navarro, A. (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell* 9: 2281-2289.
- Serrano, R., Culiañz, F.A. and Moreno, V. (1999). Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Sci. Hort.* 78: 261-269.
- Serraj, R. and Sinclair, T.R. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25: 333-341.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T.A., Smith, S.J., Miller, A.J., Davies, J.M. and Newman, I.A. (2006). Extracellular Ca<sup>2+</sup> ameliorates NaCl-induced K<sup>+</sup> loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K<sup>+</sup>-permeable channels. *Plant Physiol.* 141: 1653-1665.
- Shannon, M.C. (1997). Adaptation of plants to salinity. *Adv. Agron.* 60: 75-120.
- Shi, H.Z., Ishitani, M., Kim, C.S. and Zhu, J.K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6896-6901.
- Shi, H.Z., Quintero, F.J., Pardo, J.M. and Zhu, J.K. (2002). The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. *Plant Cell* 14: 465-477.
- Shi, H.Z., Lee, B.H., Wu, S.J. and Zhu, J.K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotech.* 21: 81-85.
- Shinozaki, K., Dennis, E.S. and Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 410-417.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Botany* 58: 221-227.
- Smirnoff, N. and Cumbes, Q.J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057-1060.

- Song, C.P. and Galbraith, D.W. (2006). AtSAP18, an orthologue of human SAP18, is involved in the regulation of salt stress and mediates transcriptional repression in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 60:241-257.
- Sohn, K.H., Lee, S.C., Jung, H.W., Hong, J.K. and Hwang, B.K. (2006). Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* 61: 897-915.
- Su, H., Golladack, D., Zhao, C.S. and Bohnert, H.J. (2002). The expression of HAK-type K<sup>+</sup> transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. *Plant Physiol.*, 129: 1482-1493.
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W.Y., Leung, H.Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J.I. and Uozumi, N. (2005). Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* 44: 928-938.
- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J.K. (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci.* 12: 301-309.
- Suri, S.S. and Dhindsa, R.S. (2008). A heat-activated MAP kinase (HAMK) as a mediator of heat shock response in tobacco cells. *Plant Cell Environ.* 31: 218-226.
- Thompson, A.J., Andrews, J., Mulholland, B.J., McKee, J.M.T., Hilton, H.W., Horridge, J.S., Farquhar, G.D., Smeeton, R.C., Smillie, I.R.A., Black, C.R. and Taylor, I.B. (2007). Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiol.* 143: 1905-1917.
- Thomashow, M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599.
- Trewavas, A.J. and Malhó, R. (1998). Ca<sup>2+</sup> signalling in plants cells: the big network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 428-433.
- Turner, N.C., Abbo, S., Berger, J.D., Chaturvedi, S.K., French, R.J., Ludwig, C., Mannur, D.M., Singh, S.J., Yadava, H.S. (2007). Osmotic adjustment in chickpea (*Cicer arietinum* L.) results in no yield benefit under terminal drought. *J. Exp. Botany* 58: 187-194.
- Venema, K., Quintero, F.J., Pardo, J.M. and Donaire, J.P. (2002). The *Arabidopsis* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.* 277: 2413-2418.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J. and Pantoja, O. (2004). Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol.* 135: 2318-2329.
- Volkov, V., Wang, B., Dominy, P. J., Fricke, W. and Amtmann, A. (2003). *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, possesses effective mechanisms to discriminate between potassium and sodium. *Plant Cell Environ.* 27: 1-14.
- Volotovskii, I.D., Sokolovsky, S.G., Molchan, O.V. and Knight, M.R. (1998). Second messengers mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* 117: 1023-1030.
- Wang, T.B., Gassmann, W., Rubio, F., Schroeder, J.I. and Glass, A.D.M. (1998). Rapid upregulation of HKT1, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiol.* 118: 651-659.
- Wang, H., Huang, Z., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Wu, Y., Huang, D. and Huang, R. (2004). Ectopic overexpression of tomato *JERF3* in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Mol. Biol.* 55: 183-192.

- Wang, Y., Ying, Y., Chen, J. and Wang, X. (2004). Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Sci.* 167: 671-677.
- Wimmers, L.E., Ewing, N.N. and Bennett, A.B. (1992). Higher plant Ca<sup>2+</sup>-ATPase: primary structure and regulation of mRNA abundance by salt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9205-9209.
- Wu, W., Su, Q., Xia, X.Y., Wang, Y., Luan, Y.S. and An, L.J. (2008). The *Suaeda liaotungensis* kitag betaine aldehyde dehydrogenase gene improves salt tolerance of transgenic maize mediated with minimum linear length of DNA fragment. *Euphytica* 159:17-25.
- Wu, S.J., Ding, L. and Zhu, J.K. (1996). SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8: 617-627.
- Wyn Jones, R.G. and Gorham, J. (1983). Osmoregulation. pp. 35-58, in O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, and H. Ziegler (eds). *Encyclopedia of Plant Physiology, vol. 12C. Physiological Plant Ecology III*. Springer-Verlag, Berlin.
- Xiang, Y., Huang, Y. and Xiong, L. (2007). Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiol.* 144: 1416-1428.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.H.D. and Wu, R. (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* 110: 249-257.
- Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L. and Wu, W.H. (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* 125: 1347-1360.
- Xue, Z.Y., Zhi, D.Y., Xue, G.P., Zhang, H., Zhao, Y.X. and Xia, G.M. (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Sci.* 167: 849-859.
- Xue, R.G., Zhang, B., and Xie, H.F. (2007). Overexpression of a NTR1 in transgenic soybean confers tolerance to water stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 89:177-183.
- Yamada, S., Komory, T., Myers, P.M., Kuwata, S. and Imaseki, H. (1997). Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol.* 38: 1226-1231.
- Yamaguchi, K., Koizumi, M., Urao, S. and Shinozaki, K. (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA clone encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* 33: 217-224.
- Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Miyazaki, A., Takahashi, T., Michael, A. and Kusano, T. (2006). The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 580: 6783-6788.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10: 88-94.
- Yang, A.F., Duan, X.G., Gu, X.F., Gao, F. and Zhang, J.R. (2005). Efficient transformation of beet (*Beta vulgaris*) and production of plants with improved salt-tolerance. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 83: 259-270.



- Yang, C.Y., Chen, Y.C., Jauh, G.Y. and Wang, C.S. (2005). A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139: 836-846.
- Yang, X., Liang, Z., Wen, X., Lu, C. (2008). Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 66: 73-86.
- Yano, R., Nakamura, M., Yoneyama, T. and Nishida, I. (2005). Starch-related  $\alpha$ -glucan/water dikinase is involved in the cold-induced development of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138: 837-846.
- Yeo, A.R. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49: 915-929.
- Zhang, H.X. and Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotech.* 19: 765-768.
- Zhang, H.X., Hodson, J.N., Williams, J.P. and Blumwald, E. (2001). Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12832-12836.
- Zhang, J.Z., Creelman, R.A. and Zhu, J.K. (2004). From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol.* 135: 615-621.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J. and Ismail, A.M. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Res.* 97: 111-119.
- Zhao, F., Guo, S., Zhang, H. and Zhao, Y. (2006). Expression of yeast SOD2 in transgenic rice results in increased salt tolerance. *Plant Sci.* 170: 216-224.
- Zhao, F. and Zhang, H. (2006). Salt and paraquat stress tolerance results from co-expression of the *Suaeda salsa* glutathione S-transferase and catalase in transgenic rice. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 86: 349-358.
- Zhao, F.G. and Qin, P. (2004). Protective effect of exogenous polyamines on root tonoplast function against salt stress in barley seedlings. *Plant Growth Reg.* 42: 97-103.
- Zhao, F., Wang, Z., Zhang, Q., Zhao, Y. and Zhang, H. (2006). Analysis of the physiological mechanism of salt-tolerant transgenic rice carrying a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene from *Suaeda salsa*. *J. Plant Res.* 119: 95-104.
- Zhao, F.Y., Zhang, X.J., Li, P.H., Zhao, Y.X. and Zhang, H. (2006). Co-expression of the *Suaeda salsa* SsNHX1 and *Arabidopsis* AVP1 confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single SsNHX1. *Mol. Breed.* 17: 341-353.
- Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Y., Li, B. and Zhang, L. (2004). Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol.* 134: 849-857.
- Zhu, B.C., Su, J., Chang, M., Verma, D.P.S., Fan, Y.L. and Wu, R. (1998). Overexpression of a  $\Delta$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. *Plant Sci.* 139: 41-48.
- Zhu, C., Schraut, D., Hartung, W. and Schäffner, A.R. (2005). Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *J. Exp. Bot.* 56: 2971-2981.

Zhu, J.K. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 941-948.

Zhu, J., Shi, H., Lee, B.H., Damsz, B., Cheng, S., Stirm, V., Zhu, J.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (2004). An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, HOS9, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9873-9878.



CAPÍTULO **10**

---

**TOLERANCIA A LA  
SALINIDAD**

*Jesús Cuartero  
M<sup>a</sup> Carmen Bolarín  
Vicente Moreno  
Benito Pineda*



## TOLERANCIA A LA SALINIDAD

---

Jesús Cuartero<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Carmen Bolarín<sup>2</sup>, Vicente Moreno<sup>3</sup> y Benito Pineda<sup>3</sup>

**1 Estación Experimental La Mayora, CSIC, Algarrobo-Costa, Málaga,  
cuartero@eelm.csic.es**

**2 CEBAS, CSIC, Campus de Espinardo, Murcia.**

**3 IBMCP, CSIC-UPV, Avenida los Naranjos, Valencia.**

---

### 10.1. INTRODUCCIÓN

La salinidad limita la producción de los cultivos en muchas partes del mundo. Sus efectos sobre la planta comienzan al disminuir el potencial hídrico en la rizosfera, dificultando la absorción de agua y nutrientes; una vez dentro de la planta, los iones salinos deshidratan células e inhiben enzimas. La planta reacciona a estos efectos acumulando iones y solutos osmóticamente compatibles (con menor y mayor coste energético respectivamente), almacenando los iones salinos en la vacuola y reexportándolos desde las hojas a la raíz, para restaurar la homeostasis osmótica e iónica. En paralelo también se sintetizan proteínas que protegen los enzimas celulares y enzimas que eliminan los radicales de oxígeno.

Existe variabilidad genética para la tolerancia a la salinidad y para los mecanismos que la regulan. Los caracteres relacionados con la tolerancia son poligénicos y su expresión depende del estado de desarrollo de la planta y de la concentración salina en el medio; están además muy influidos por otros parámetros ambientales y exhiben baja heredabilidad lo que dificulta su selección. La búsqueda de QTL y genes relacionados con la tolerancia en poblaciones de RIL, y la utilización de marcadores moleculares muy ligados a los genes-QTLs para seleccionar en generaciones segregantes que se acerquen despacio hacia la homocigosis, se dan como recomendaciones de trabajo futuro.

Mediante transformación genética se han transferido genes estructurales que codifican para proteínas LEA, chaperonas, relacionadas con canales de agua, transportadoras de iones, enzimas implicadas en la eliminación de radicales hidroxilo y en la síntesis de osmolitos con poco éxito práctico; actualmente se están buscando factores de transcripción mediante genómica funcional. Para conseguir genotipos tolerantes mediante transformación se recomienda tener en cuenta que los genes deben probar su potencial de tolerancia en la especie que se desea mejorar, no en una especie modelo, que la tolerancia se debe medir en TG3, no en generaciones anteriores y que las plantas transformadas deben ser tolerantes en condiciones de cultivo salino reales durante todo su ciclo, no en cortos experimentos de laboratorio. El empleo de la genómica funcional para buscar genes y elementos reguladores, en formas o especies cercanas a la especie cultivada se sugiere como trabajo de futuro.

## 10.2. LA SALINIZACIÓN DE LOS SUELOS

La salinidad no es un problema nuevo para la humanidad. El repaso de lo que ha ocurrido en los últimos 6000 años indica que la civilización en un determinado lugar nunca ha progresado más allá de los 800-2000 años (Carter y Dale, 1974), y una de las principales razones ha sido la destrucción de los recursos básicos de la zona, como ocurrió en Mesopotamia entre 2400 y 1700 AC (Gelburd, 1985). Pero en periodos más cortos también la salinización de los suelos ha sido notable. Así, en California, donde los regadíos llevan establecidos poco más de 100 años, al menos la mitad de la superficie regada estaba afectada por salinidad hace más de 20 años (Lewis, 1984).

La salinidad está considerada en la actualidad como uno de los principales factores limitantes de la producción vegetal, ya que la alta concentración de sales en el suelo causa una importante disminución del rendimiento en la mayoría de los cultivos. Alrededor de 800 millones de hectáreas de suelos están afectadas por la sal, bien por salinidad (397 millones ha) o por condiciones asociadas a sodicidad (434 millones ha), ocupando aproximadamente el 6% de toda el área de la tierra (Munns, 2005).

El agua de riego para la agricultura representa casi un 70% de toda el agua dulce empleada cada año para el uso humano y, por tanto, hay una gran competencia por la disponibilidad de agua, sobre todo en las regiones áridas con un elevado índice de crecimiento demográfico y expectativas de desarrollo. Aunque la superficie bajo riego es solo el 15% de la superficie total cultivada, tiene una productividad al menos dos veces mayor y produce un tercio de los alimentos que se consumen a nivel mundial. Pero de los actuales 230 millones de hectáreas de la superficie bajo riego, 45 millones de ha (20%) están afectadas por la salinidad (FAO, 2005). Parece por tanto razonable pensar que la salinidad es una amenaza para el suministro de alimentos. Si tenemos en cuenta que la población mundial se estima que será de 9,3 billones de personas en 2050, el aumento de la tolerancia a la salinidad de las especies de mayor interés agronómico es un objetivo prioritario si se quiere asegurar el suministro de alimentos en las próximas décadas.

## 10.3. MECANISMOS DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD

El primer problema ocasionado por la salinidad tiene lugar fuera de la planta, es decir antes de que los iones salinos sean absorbidos por las raíces. Las sales disueltas disminuyen el potencial hídrico del medio, lo que reduce la capacidad de la planta para absorber agua y nutrientes por la raíz, produciendo un efecto similar al provocado por el estrés hídrico. El segundo efecto es el provocado por la sal en el interior de la planta: los iones salinos transportados en la cadena de transpiración hasta las hojas pueden llegar a acumularse en los espacios intercelulares y deshidratar la célula, o en el citoplasma e inhibir la mayoría de los enzimas, llegando a producir la muerte de las hojas. Como consecuencia de los dos efectos provocados por la salinidad, se ha propuesto que la respuesta a la salinidad tiene dos fases: La primera sería la fase osmótica y la segunda vendría determinada por el daño provocado por la acumulación de los iones salinos (Munns, 2002). El tiempo requerido para detectar diferencias entre genotipos puede depender del grado de tolerancia a la sal del genotipo y del nivel de estrés aplicado (Perez-Alfocea et al., 1993). Así, la segunda fase empezará a manifestarse antes en las plantas que tengan baja capacidad de exclusión de iones salinos y/o cuando se apliquen altos niveles de estrés, aunque es posible que los efectos osmóticos persistan durante la segunda fase y que la toxicidad iónica tenga lugar durante la primera (De Costa et al., 2007).

### 10.3.1. Respuesta al estrés osmótico inducido por la salinidad

La planta necesita acumular solutos (ajuste osmótico) para mantener el volumen celular y la turgencia, es decir necesita mantener la actividad fisiológica al disminuir el potencial hídrico de la hoja (Zhu, 2002). Esto causa reducciones en el crecimiento, además de una serie de cambios metabólicos similares a los provocados por el estrés hídrico. En una revisión sobre la fisiología de los estreses hídrico y salino, Munns (2002) indicaba que todos los procesos, excepto los efectos específicos provocados por la acumulación de iones salinos son similares en ambos estreses.

Los solutos que contribuyen al ajuste osmótico son los solutos inorgánicos procedentes del sustrato, que son absorbidos y transportados a la parte aérea, y los solutos orgánicos sintetizados por la planta (Alarcón et al., 1993). La ventaja de estos últimos es que, incluso a elevadas concentraciones, no dañan ni a los enzimas ni a otras estructuras celulares, razón por la que se denominan osmolitos o solutos compatibles. Los principales solutos orgánicos en la mayor parte de las plantas glicofitas son los ácidos orgánicos y los azúcares, principalmente fructosa y glucosa, aunque existen numerosos compuestos que a bajas concentraciones también se les ha asignado el papel de osmolitos, tales como prolina, glicinabetaina, inositol, etc. Pero además de contribuir al mantenimiento del balance osmótico, ya sea permitiendo la entrada de agua en la célula o reduciendo su salida (Yokoi et al., 2002), conviene resaltar que los osmolitos protegen a la célula contra el efecto tóxico de ciertos iones, además de eliminar los radicales de oxígeno reactivo que se producen bajo condiciones de estrés osmótico e iónico y, por tanto, no está claro que la tolerancia inducida por la acumulación de osmolitos se deba, como en principio cabría esperar, a un mejor ajuste osmótico, sino quizás a una acción de tipo osmoprotector. Los recientes avances en genética molecular y transformación genética abren nuevas vías en el conocimiento de las implicaciones metabólicas que conlleva la acumulación de osmolitos en plantas (Sickler et al., 2007).

Respecto al coste energético que implica la utilización de un tipo u otro de solutos para realizar el ajuste osmótico, la acumulación de iones salinos (el de exclusión de la sal, de compartimentación intracelular, de excreción por medio de glándulas salinas) requiere un coste energético relativamente pequeño en relación al que se necesita para sintetizar solutos orgánicos (Yeo, 1983; Ravens, 1985). Según Munns (2002), el número de moles de ATP necesarios para usar un mol de NaCl como osmolito es aproximadamente cuatro en las células de la raíz y siete en las de las hojas, mientras que el número de moles requerido para sintetizar un compuesto orgánico es significativamente mayor. Ravens (1985) establecía 3,5 moles de ATP para  $\text{Na}^+$ , 34 para manitol, 41 para prolina, 50 para glicinabetaina y alrededor de 52 para sacarosa. Por tanto, desde el punto de vista de desarrollo de la planta, es mucho más rentable utilizar solutos inorgánicos que orgánicos para mantener el balance osmótico.

### 10.3.2. Respuesta al estrés iónico inducido por salinidad

La acumulación de los iones salinos, especialmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , provoca un estrés iónico en la planta, alterando la homeostasis no solo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , sino también de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{+2}$  (Hasegawa et al., 2000; Rodríguez-Navarro, 2000), de manera que la supervivencia de la planta y el desarrollo dependerá de la capacidad para restablecer la homeostasis iónica después de la imposición del estrés, y adaptar el metabolismo para mantener las condiciones homeostáticas que le permitan reanudar el crecimiento y completar el ciclo vegetativo en el nuevo medio (Verslues et al., 2006). Las raíces deben excluir la mayoría del  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  disueltos en la solución del suelo, puesto que si no es así la sal se irá acumulando gradualmente en la parte aérea hasta alcanzar niveles tóxicos,

ya que las plantas transpiran unas 50 veces más agua que la que retienen en sus hojas. Si una planta absorbe solo 1/50 de la sal en la solución del suelo (i.e. excluye el 98%), la concentración de sal en la parte aérea nunca incrementará más que la del suelo, y la planta podrá sobrevivir indefinidamente en medio salino (Munns, 2005).

El control de la absorción de iones salinos y su distribución dentro de la planta incluye diferentes procesos, tales como la absorción por la raíz, la carga en el xilema, la recuperación desde el xilema antes de que alcance la parte aérea, la recirculación en el floema, la localización en algunas partes concretas de la parte aérea, como hojas adultas, la secreción por la hoja, etc (Tester y Davenport, 2003). La maquinaria citosólica y organular de las glicofitas y halofitas es igual de sensible a los iones salinos (Yokoi et al., 2002) y, por tanto, lo que parece diferenciar las especies sensibles de las tolerantes es la capacidad de compartimentación de iones tóxicos en la vacuola para minimizar la citotoxicidad, puesto que si la capacidad de compartimentación de iones no es suficiente y la hoja continúa transpirando, los iones salinos se acumularán en el citoplasma, con la subsiguiente inactivación de enzimas (Amtmann y Sanders, 1999), o en las paredes celulares con la subsiguiente deshidratación (Flowers et al., 1991). Según Munns et al. (2003), el  $\text{Na}^+$  empieza a inhibir la mayoría de los enzimas a una concentración superior a 100 mM. El  $\text{Na}^+$  puede inhibir la función de los enzimas tanto por enlazarse directamente a los sitios de inhibición, como de una manera indirecta por desplazar al  $\text{K}^+$  de los lugares de activación (Serrano, 1996). En ambos casos, la competitividad entre  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  debe ser crítica y por consiguiente, la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en el citosol es probablemente un factor más crítico para determinar la toxicidad de  $\text{Na}^+$  que la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  per se (Cuin et al., 2003).

Inmediatamente después del estrés salino se produce una alteración del gradiente electroquímico de protones. El transporte de protones por la bomba de protones de la membrana plasmática ( $\text{H}^+$ -ATPasa) y del tonoplasto ( $\text{H}^+$ -ATPasa y  $\text{H}^+$ -pirofosfatasa) genera gradientes de pH y diferencias de potencial eléctrico a través de las membranas celular y vacuolar. Los iones  $\text{Na}^+$  entran a la célula y pueden ser translocados fuera de la célula o a la vacuola por la acción del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática (SOS1) o vacuolar (AtNHX1), los cuales parecen transportar  $\text{Na}^+$  en una u otra dirección dependiendo de las condiciones (Shi et al., 2002, 2003). El antiportador vacuolar AtNHX1 parece contribuir también a secuestrar  $\text{K}^+$  en la vacuola (Pardo et al., 2006). Los transportadores HKT son probablemente muy importantes en la regulación del transporte de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  desde la raíz a la parte aérea (Laurie et al., 2002; Garciadeblas et al., 2003). Así, un mutante en el que no funcionaba AtHKT1 incrementaba claramente la sensibilidad a la sal (Rus et al., 2004), lo que demuestra la importancia de la función de HKT1 en el control del transporte de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ . Otra clase de transportadores de  $\text{K}^+$  es la familia KUP/HAK/KT (Martinez-Cordero et al., 2004).

En comparación con los canales de cationes, se conoce poco sobre los canales vacuolares de aniones (Munns, 2005). En cualquier caso, se sabe que el transporte de  $\text{Cl}^-$  a través del tonoplasto se produce simultáneamente con la entrada de protones. Un potencial de membrana de +50 mV podría ser suficiente para facilitar la entrada de una elevada concentración de  $\text{Cl}^-$  en la vacuola a través de un canal permeable de aniones (Czempinski et al., 1999). Pei et al. (1996) identificaron un canal vacuolar de  $\text{Cl}^-$  (VCL) en células guarda de *Vicia faba* L. que se activa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP. También se ha propuesto un antiporte  $\text{H}^+/\text{anión}$  a través de un transporte activo secundario (Sze et al., 1999).

La exportación desde las hojas al floema también podría ayudar a mantener bajas concentraciones en las hojas. Medidas de iones en la savia del floema han indicado que las especies más tolerantes excluyen  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  por el floema en mayor medida que las menos tolerantes (Munns, 2005). Perez-Alfocea et al. (2000) observaban una mayor recirculación de  $\text{Na}^+$  en el floema de la especie silvestre tolerante a la sal *Solanum pennellii* Correll que en el tomate cultivado, y Matsuchita y Matoh (1991) encontraban mucha mayor recuperación de  $^{22}\text{Na}^+$  desde la parte aérea de *Phragmites communis* Trin. que desde arroz (*Oryza sativa* L.). Por tanto, aunque pueda ser relativamente baja la retranslocación de sal desde las hojas, en relación al transportado en la cadena de transpiración, la salida de  $\text{Na}^+$  de las hojas vía floema puede ser importante en la tolerancia de las plantas a la salinidad (Tester y Davenport, 2003).

### 10.3.3. Respuesta al estrés oxidativo inducido por la salinidad

Otro de los efectos producidos por la salinidad es la generación de especies de oxígeno activas (EOA), como el superóxido, peróxido de hidrógeno o radicales hidróxilo. El cierre estomático, que tiene lugar como una de las respuestas primarias a la salinidad del medio, disminuye la relación  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  en las hojas e inhibe la fijación de  $\text{CO}_2$ , lo que incrementa la formación de EOA a través de la fuga de electrones hacia el oxígeno. La generación de EOA provoca daño celular y puede ocasionar la muerte de la planta debido principalmente al daño producido en los centros de reacción del fotosistema II o en los lípidos de membrana, produciéndose peroxidación lipídica y dañando la integridad de la membrana, así como por alteraciones en las proteínas o los ácidos nucleicos (Hernandez et al., 2001).

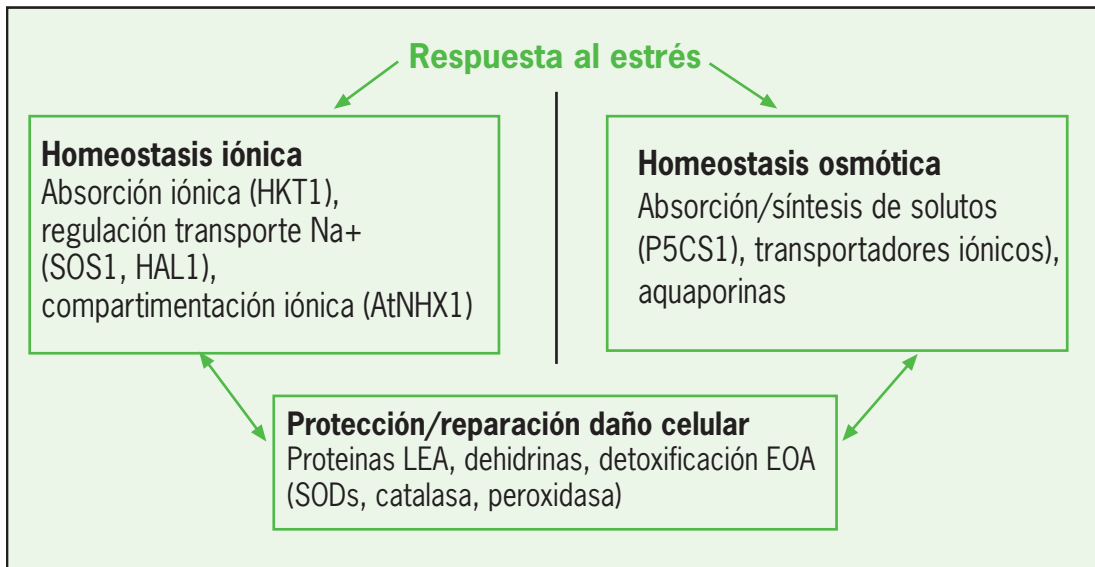
Para protegerse de los posibles efectos citotóxicos, las plantas deben desarrollar diferentes mecanismos para destruir estas especies reactivas, por ejemplo incrementando la actividad y/o la expresión de los sistemas antioxidantes (Hernández et al., 2000; Mittova et al., 2002). Los sistemas que previenen contra la oxidación en las plantas consisten en enzimas que pueden eliminar los radicales oxígeno, tales como superóxido dismutasa (SODs), peroxidasas, catalasas y glutatión reductasa. Las SODs son componentes esenciales de los sistemas de protección oxidativa de la mayor parte de las plantas y catalizan la dismutación de dos radicales superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Cuando las SODs eliminan los radicales superóxido, el peróxido que se genera es eliminado por las peroxidasas y catalasas (Hong et al., 2007).

Algunos autores han sugerido que la función de azúcares, polioles, glicinabetaína y posiblemente prolina podría ser la protección celular contra radicales hidroxilo (Molinari et al., 2007). Los mejores resultados se han obtenido con polioles lineales tales como el manitol, polioles metilados, el aminoácido ectoína y la glicinabetaína (Sickler et al., 2007). Aunque estos metabolitos son efectivos contra radicales de oxígeno, lo que no parece estar muy claro es su modo de acción. Los mayores avances en este aspecto se están consiguiendo por ingeniería genética, obteniendo plantas que acumulan compuestos orgánicos osmóticamente activos (Bartels y Sunkar, 2005).

### 10.3.4. Homeostasis y protección o reparación del daño provocado por la salinidad

La respuesta a la salinidad es frecuentemente discutida en términos de homeostasis o reparación del daño (Zhu, 2001). Estos mecanismos homeostáticos incluyen homeostasis iónica, la cual es el factor dominante en la tolerancia a salinidad, y homeostasis osmótica, similar a los mecanismos para evitar la deshidratación celular. Los mecanismos de homeostasis iónica y osmótica intentan restaurar el contenido iónico celular o el contenido de agua a niveles similares a aquellos

que presenta la célula sin estrés. Los mecanismos de protección y reparación del daño intentan prevenir o reparar el daño celular causado por los contenidos iónicos o hídricos alterados por el estrés. En el siguiente esquema se resumen los mecanismos de respuesta al estrés, mostrando con flechas la interacción entre ellos, y se muestran (entre paréntesis) algunos ejemplos de genes involucrados en cada clase de respuesta al estrés.



Un ejemplo de la complejidad del estrés salino queda de manifiesto en el papel del transportador de Na<sup>+</sup> de membrana plasmática SOS1, cuya función parece ser diferente en función del nivel de estrés. A niveles moderados de estrés, SOS1 parece funcionar en la carga de Na<sup>+</sup> del xilema para transportar Na<sup>+</sup> a la parte aérea y almacenarlo en las células del mesófilo, las cuales tienen suficiente capacidad de compartimentación, lo que facilitaría el ajuste osmótico y desarrollo de la planta (Shi et al., 2002). A altos niveles de estrés, este transportador parece funcionar restringiendo la absorción en raíz y recuperando Na<sup>+</sup> desde el xilema en la raíz adulta, ayudando ambos procesos a limitar la rápida acumulación de Na<sup>+</sup> en la parte aérea, ya que las plantas que sobre expresaban SOS1 acumulaban menos Na<sup>+</sup> en el xilema y en la parte aérea (Shi et al., 2003).

Entre los genes candidatos para regular el transporte de Na<sup>+</sup>, se ha comprobado que la expresión del gen de levadura HAL1 en plantas transgénicas de melón (Bordas et al., 1997), sandía (Ellul et al., 1999) y tomate (Gisbert et al., 2000) conduce a un aumento de la tolerancia a la salinidad, tanto a nivel celular como a nivel de planta. Además, en tomate se observó que la sobre expresión del gen induce una mayor tolerancia en base al rendimiento en fruto (Rus et al., 2001), el parámetro más importante desde un punto de vista agronómico. Es interesante resaltar la capacidad de las plantas que expresan HAL1 para mantener la homeostasis iónica a lo largo del ciclo vegetativo, reduciendo significativamente la acumulación de Na<sup>+</sup> en hojas (Muñoz-Mayor et al., 2008). Sin embargo, y haciendo hincapié en la complejidad del estrés salino, también se observó que la mayor capacidad de exclusión de Na<sup>+</sup> de una línea homocigota con alto nivel de expresión de HAL1 causaba otro tipo de problema que se reflejaba negativamente en la tolerancia. Así, la alta exclusión de Na<sup>+</sup> en las hojas inducía una mayor síntesis y acumulación de solutos orgánicos (azúcares y ácidos orgánicos) para mantener el balance osmótico, lo cual es energéticamente mucho más costoso (Muñoz-Mayor et al., 2008). Estos resultados demuestran la importancia de considerar la componente osmótica del estrés salino.



En este sentido, se ha encontrado generalmente correlación entre la exclusión de sales y la tolerancia a la sal en la mayoría de las especies (Tester y Davenport, 2003), incluido el tomate (Cano et al., 1991; Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999), de manera que se ha utilizado el carácter “exclusión de Na<sup>+</sup>” para la mejora genética de diferentes especies de interés agronómico (Munns et al., 2003; Flowers, 2004). Sin embargo, el carácter “exclusión de Na<sup>+</sup>” no siempre conduce a un mayor rendimiento en medio salino (Husain et al., 2003). En resumen, el efecto osmótico de la sal fuera de las raíces puede tener un mayor efecto sobre el desarrollo y rendimiento que la componente del efecto específico de la sal, y por tanto no solo el carácter exclusión de Na<sup>+</sup> debería ser tenido en cuenta para mejorar el rendimiento de los cultivos, sino que en función del nivel de estrés podría ser conveniente que la planta adoptara una u otra estrategia, tal como se ha comprobado al utilizar portainjertos de tomate con diferente capacidad de absorción y transporte de sales a la parte aérea (Estañ et al., 2005; Martínez-Rodríguez et al., 2008). Esta parece ser la estrategia utilizada por las especies silvestres de tomate tolerantes a la salinidad (Santa-Cruz et al., 1999). En este sentido, Tester y Davenport (2003) indicaban que las halofitas son mucho más eficaces para controlar la absorción y transporte de Na<sup>+</sup>, ya que a bajas concentraciones de sal la acumulación de NaCl es generalmente mayor que en glicofitas, sin embargo a altos niveles de salinidad se reduce, es decir la absorción de iones salinos no es proporcional al nivel salino del medio.

Los objetivos prioritarios en investigación se están dirigiendo hacia la identificación de los principales genes implicados en la tolerancia mediante el análisis funcional de genes (Cuartero et al. 2006; Vij y Tyagi, 2007). Además, el uso de las nuevas herramientas ‘ómicas’ que están emergiendo en los últimos años, como transcriptómica, proteómica, metabolómica y ionómica permitirá de una manera integrada lograr avances significativos en la tolerancia de las plantas superiores a la salinidad (Sha Valli Khan et al., 2007; Sanchez et al., 2008).

#### 10.4. MEJORA GENÉTICA PARA TOLERANCIA A LA SALINIDAD

El aprovechamiento agrícola de los suelos salinos lleva consigo que o bien se desaliniza el suelo para que las variedades de las especies cultivadas actuales puedan ser cultivadas o bien se buscan genotipos capaces de crecer y dar cosecha en ese medio salino. La primera cuestión que se plantea es si es posible conseguir esos genotipos. La evolución natural ha producido especies y ecotipos que viven en condiciones salinas, por tanto mediante selección genética el hombre podría obtener genotipos tolerantes a la salinidad. Pero esos genotipos no sólo deben ser capaces de crecer y dejar descendencia en condiciones salinas (tolerancia biológica) sino que deben producir una cosecha suficiente como para cultivarlos con beneficio económico (tolerancia agronómica).

##### 10.4.1. Variabilidad fenotípica y objetivo de mejora

La primera premisa para conseguir genotipos tolerantes a la salinidad es que exista variabilidad genética para ese carácter sobre la que la selección pudiese actuar. En todas las especies cultivadas en las que se ha buscado esa variabilidad se ha encontrado bien dentro de la misma especie, bien en especies cercanas que pueden ser empleadas en mejora. A modo de ejemplo, se ha demostrado amplia variabilidad intraespecífica en especies tan distantes como sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Igartua y Gracia, 1999), trébol fresa (*Trifolium fragiferum* L.) (Rumbaugh et al., 1993), arroz (*Oryza sativa* L.) (Alia et al., 2006), algodón (*Gossypium hirsutum* L. y *G. barbadense* L.) (Ashraf, 2002), lenteja (*Lens culinaris* Medic.) (Ashraf y Waheed, 1990), etc; y variabilidad interespecífica en especies cercanas a la cultivada en tomate (*Solanum lycopersicon* L.) (Bolarin et al., 1990), trigo duro (*Triticum turgidum* L. ssp *durum* (Desf.) (Munns et al., 2000), eucalipto (*Eucalyptus* spp) (Niknam y McComb, 2000), etc.

En las especies que muestren poca variabilidad para tolerancia a la salinidad y que no se puedan cruzar con otras cercanas que sean tolerantes, las perspectivas de obtener cultivares tolerantes son muy escasas ya que en el proceso de selección se perdería muy probablemente la escasa variabilidad existente. Se podría recurrir a provocar variabilidad vía mutagénesis pero esta posibilidad es realista cuando se quieren modificar caracteres monogénicos, no poligénicos. Mediante cultivo *in vitro* se pone de manifiesto variabilidad no mostrada en el campo y se consiguen genotipos que expresan resistencia a la salinidad cuando crecen en cultivo *in vitro* (Hasegawa et al., 1989), pero no en condiciones de campo (Dracup, 1993).

Si se cuenta con variabilidad el segundo paso sería marcar el objetivo de la mejora: qué nivel de tolerancia se quiere conseguir. Si se pretende obtener genotipos que toleren una salinidad muy alta, cercana a la del agua del mar, una solución podría ser la domesticación de especies halofitas, aunque la introducción de nuevas especies es un proceso muy largo y de un cierto éxito quizá en las plantas industriales o de alimento para el ganado, pero sin buenas perspectivas en las plantas que sirven como alimento al hombre por la dificultad de modificar la dieta acostumbrada. Una segunda alternativa podría ser el cruzamiento entre una especie cultivada y otra silvestre con muy elevada tolerancia a la salinidad. En este caso se seguiría la estela de los múltiples éxitos que ha habido introduciendo caracteres de resistencia a algún patógeno. Pero siendo la tolerancia a la salinidad un carácter compuesto por multitud de caracteres que a su vez son poligénicos, si la especie silvestre está muy alejada genéticamente de la cultivada, la probabilidad de retener la tolerancia de la especie donante y de eliminar los caracteres deletéreos que aportaría es muy baja.

La tolerancia a salinidades moderadas, equivalentes a 100-150 mM NaCl, es un objetivo de mejora acorde con la concentración salina que se suele encontrar en tierras de cultivo salinizadas y acorde también con la variabilidad existente en muchas especies. También aquí se plantea la posibilidad de partir de un donante con elevada tolerancia a la salinidad pero alejado de las formas cultivadas actuales y de nuevo hay que remarcar que las posibilidades de eliminar los caracteres agrónomicamente desfavorables del donante manteniendo un adecuado nivel de tolerancia son pequeñas. Partir de donantes que no mostrasen tolerancia extrema pero que fuesen genéticamente próximos podría ser una buena alternativa (Cuartero et al., 1992).

La salinidad afecta a todos o casi todos los procesos fisiológicos de la planta, Por tanto, para mejorar la tolerancia a la salinidad en un cultivo habría que mejorar muchos caracteres, entre ellos también caracteres fisiológicos que unidos, darían como resultado un cultivar con mayor cosecha en condiciones salinas, un cultivar tolerante a la salinidad (Flowers y Yeo, 1995; Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999). De nuevo, el primer paso para emplear caracteres fisiológicos en programas de mejora es demostrar la existencia de variabilidad para esos caracteres en la especie a mejorar o en especies genéticamente cercanas. Aunque no son muchos los trabajos que han buscado esa variabilidad, los que lo han hecho la han demostrado. El carácter fisiológico más estudiado ha sido el ajuste osmótico porque afecta tanto al estrés salino como al hídrico y para él se ha demostrado variabilidad en trigo (Morgan, 1992), cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Blum, 1989), arroz (Lilley y Ludlow, 1996), sorgo (Basnayake et al., 1993), maíz (*Zea mays* L.) (Bolaños et al., 1993), etc. Para transporte de Na<sup>+</sup> desde la solución nutritiva a la parte aérea de la planta se ha demostrado variabilidad en arroz (Yeo, 1992) y tomate (Cuartero et al., 2002) quienes también demostraron variabilidad en tomate, para la relación entre [Na<sup>+</sup>] y la reducción del área de la hoja, para la capacidad de acumular Na<sup>+</sup> en las hojas viejas preservando las jóvenes y para la relación [K<sup>+</sup>]/[Na<sup>+</sup>] en la hoja.

#### 10.4.2. Expresión de los caracteres relacionados con la tolerancia a la salinidad

Al afectar la salinidad a tantos caracteres se ha intentado en numerosas ocasiones relacionar la tolerancia en estado adulto con la tolerancia en los primeros estadios de desarrollo de la planta. La selección más sencilla para tolerancia a la salinidad es la que se hace durante la germinación porque se puede hacer en laboratorio, con muchos genotipos a la vez y en similares condiciones ambientales. Sin embargo esta selección se ha probado sin relación con la tolerancia en planta adulta en sorgo (Krishnamurthy et al., 2007), en lenteja (Ashraf y Waheed 1990), en trébol fresa (Rumbaugh et al., 1993), en tomate (Foolad y Lin, 1997), etc. También se ha demostrado falta de relación entre la tolerancia mostrada en distintos estados vegetativos y la cosecha al analizar caracteres fenotípicos (Greenways y Munns, 1980; Shannon et al., 1987; Caro et al., 1991). La tolerancia a la salinidad en un estadio de desarrollo de la planta parece independiente de esa misma tolerancia en otros estadios, lo cual complica la selección indirecta y la comparación de resultados procedentes de diferentes experimentos e investigadores.

La selección de los genotipos tolerantes en tierras salinas no suele ser recomendable porque la salinidad varía en el suelo espacial y temporalmente y no se puede conocer en qué concentración salina vive cada planta. Para evitar esa variabilidad se cultivan las plantas en sustratos inertes a los que se les añade una solución nutritiva salinizada con NaCl. Para algún carácter como la tolerancia a la salinidad medida por la germinación, se suele mantener la ordenación de genotipos por tolerancia a la salinidad en diferentes concentraciones salinas (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999; Foolad, 2004), pero para otros caracteres no es así. Lee et al. (2004) encontraron una correlación genotípica de sólo 0,55 cuando midieron la tolerancia a la salinidad en el campo y en el invernadero. Cruz (1990) señala que los cultivares que se mostraron más tolerantes a 5-7 dS m<sup>-1</sup> no lo fueron a 13 dS m<sup>-1</sup>. Parámetros como la heredabilidad varían significativamente cuando se estiman en diferentes condiciones salinas (Cuartero et al., 2006; Villalta et al., 2007). Es necesario marcar unas condiciones salinas a las cuales debe ir dirigida la selección y en las cuales se lleven a cabo los experimentos y selecciones necesarias, de otro modo habría que cultivar las plantas en varias concentraciones salinas, lo que complicaría notablemente los experimentos.

Además del estado de desarrollo de las plantas y de la concentración salina en el medio de cultivo, los caracteres relacionados con la tolerancia a la salinidad son también influidos por otras variables ambientales y esa influencia se deja notar en que las heredabilidades estimadas suelen ser medias a bajas. Cuartero et al. (2006) señalan en tomate heredabilidades de 0,50 para eficiencia en el uso del agua, 0,40 para transporte de Na<sup>+</sup> a la parte aérea y entre 0,22 y 0,33 para [Na<sup>+</sup>], [K<sup>+</sup>] y [K<sup>+</sup>]/[Na<sup>+</sup>] en hoja. El ajuste osmótico depende del nivel de estrés impuesto (Zhang et al., 1999), y sus heredabilidades, cuando se han estimado, suelen ser medias a bajas. Otros caracteres no fisiológicos pero relacionados con la tolerancia a la salinidad en tomate como diámetro del tallo, número de flores/racimo, retraso en la floración, peso medio del fruto, número de frutos y cosecha, muestran heredabilidades en sentido amplio que varían entre 0,2 y 0,8 siendo las más de las veces inferiores a 0,5, y además, en muchos casos, esa heredabilidad varía según se haga la estima en cultivo sin salinidad o con ella y también según en la población en la que se estime (Villalta et al., 2007).

Con el advenimiento de las técnicas moleculares, como paso previo a determinar los genes que controlan los caracteres cuantitativos, en este caso los caracteres cuantitativos relacionados con la tolerancia a la salinidad, se han buscado los loci en los que reside el control de al menos una parte de ese carácter cuantitativo (QTL, de quantitative trait loci). Los primeros QTL para

tolerancia a salinidad en tomate se describieron ya en 1994 (Breto et al., 1994). Posteriormente se demostró que los QTL detectados en tomate dependían de las condiciones en que las plantas se cultivaban, como los caracteres relacionados con la tolerancia a la salinidad comentados más arriba; sólo algunos QTL se expresaban en todas las condiciones salinas y otros sólo lo hacían en condiciones salinas (Foolad y Chen, 1999; Monforte et al., 1997) y lo mismo ocurrió en arroz (Gong et al., 1999 y 2001) y en cítricos (Tozlu et al., 1999). Que los genes sean activados en determinadas condiciones ambientales es conocido de antiguo (Gupta y Lewontin, 1982), por tanto no debería extrañar que los QTL también respondieran así al ambiente, aunque sin duda esta respuesta complica la selección artificial. Es pertinente recordar además que los QTL detectados en una población segregante no siempre coinciden con los detectados en otras poblaciones (Villalta et al., 2005).

#### **10.4.3. Complejidad genética de los caracteres relacionados con la tolerancia a la salinidad**

La complejidad genética de cada uno de los caracteres afectados por la salinidad aumenta conforme se va investigando más en el carácter. Uno de los caracteres más estudiados ha sido el peso fresco de tomates producidos por la planta, la cosecha, en cultivos a los que no se les había impuesto estreses, habiéndose descrito ya 28 QTL en 1999 (Grandillo et al., 1999) y ese número se multiplicará cuando se cultiven las plantas en condiciones de estrés. Parecida regulación genética cabe esperar de otros caracteres cuantitativos y la detección de esa amplísima base genética sólo se puede hacer con poblaciones que puedan ser reproducidas y evaluadas en múltiples experimentos.

Las técnicas actuales de la genómica están añadiendo mucha información genética. En arroz con un microarray de 1700 ADNc independientes se detectaron 57 genes inducidos por salinidad (Rabhani et al., 2003). En *Arabidopsis* con un microarray de 7000 ADNc independientes se detectaron 194 genes que incrementaron su transcrito más de 5 veces (Seki et al., 2002), y en una halofita, el manglar *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lamk., Miyama y Hanagata (2007) con un microarray de 7029 clones detectaron 287 genes que se expresaban con una diferencia de al menos 5 veces al pasar de cultivo sin sal a cultivo salino. Esta ingente información genética es imposible de manejar en un programa genético. Es necesario conocer la importancia que tiene cada uno de esos genes o buscar elementos comunes a todos ellos, cosa que se está haciendo buscando grupos de genes o identificando genes que regulen señales que afecten a varios o muchos de ellos Gao et al., 2007).

#### **10.4.4. ¿Cómo mejorar la tolerancia a la salinidad?**

La tolerancia a la salinidad aparece como un carácter particularmente complejo ya que esta compuesto por muchos caracteres, que son poligénicos, muy influidos por el ambiente lo que se traduce en baja heredabilidad, que cambian su importancia según el estado de desarrollo de la planta y que muestran distinta expresión según la concentración salina en la que se cultiven las plantas. Todo esto ayuda a entender la falta de éxito en la obtención de genotipos tolerantes al aplicar programas de selección tradicionales y que sólo unos cuantos genotipos parcialmente tolerantes hayan sido desarrollados, y esos en especies forrajeras (Al-Doss y Smith, 1998; Dierig et al., 2001; Steiner y Banuelos, 2003).

Utilizar una selección indirecta basada en marcadores moleculares ligados fuertemente a genes o QTL relacionados con la tolerancia a la salinidad podría ser una alternativa válida ya que se podrían manejar varios caracteres poligénicos a la vez y esos marcadores no son influidos por el ambiente. Pero sí hay que tener en cuenta que la demostrada interacción QTL x ambiente (QTLxE) es especialmente importante en la selección para tolerancia a la salinidad y que esa interacción llevaría a que cada QTL se comportaría como un carácter distinto en distintos ambientes dificultando la selección. Otras dificultades adicionales vienen de otra interacción, la interacción QTLxQTL que puede llegar a ser mayor que muchos QTL individuales (Junger et al., 2005) y de los efectos pleiotrópicos de los genes y QTL (Villalta et al., 2007).

Para tener éxito en un programa de mejora para tolerancia a la salinidad es necesario tener un profundo conocimiento del comportamiento de la planta como un todo en diferentes niveles salinos. Pero el análisis de muchos caracteres a la vez y en diferentes condiciones salinas sólo se puede abordar si se dispone de poblaciones de dobles haploides o de líneas puras recombinantes (RILs). La principal ventaja de estas poblaciones es que pueden ser reproducidas continuamente y continuamente evaluadas para sucesivos QTL y marcadores en diferentes ambientes acumulando toda esa información. Además, al tener réplicas de cada genotipo, la variación ambiental se minimiza aumentando a la par la heredabilidad de los QTL (Cuartero et al., 2006). Un inconveniente de las RIL frente a generaciones  $F_2$  es que los genes y QTLs que muestren dominancia y heterosis no se detectan a no ser que en las QTL quede algo de heterocigosis, lo cual, más que una ventaja, supone una notable complicación en el análisis. En tomate se han obtenido algunas familias de RILs y se han buscado QTL relacionados con la tolerancia a la salinidad (Villalta et al., 2005 y 2007), habiéndose detectado todos los grados de interacción QTLxE, desde QTL que sólo se expresaban en salinidad y otros que sólo se detectaban en cultivo sin sal (máxima interacción QTLxE) a QTL que aparecían en las dos condiciones ambientales con similar peso; y por si fuera poco, también se han detectado efectos pleiotrópicos en los QTL.

Una vez identificados los principales QTL y genes relacionados con la tolerancia a la salinidad quedaría la tarea de pasarlos a los genotipos actuales y que esos genotipos mejorados diesen la cosecha y la calidad de cosecha que los agricultores necesitan. Aún ayudados de excelentes marcadores moleculares codominantes para esa ingente masa de genes y QTL, se tendrían que diseñar programas que llevasen lentamente hacia la homocigosis para que el mejorador tuviese la posibilidad de seleccionar; Cuartero y Fernández-Muñoz (1999) han desarrollado esta idea y dado un ejemplo de programa.

Los cultivares actuales son el resultado de muchos años de selección y de incorporación de las características que tanto agricultores como mercado consumidor han demandado. Es altamente probable que el delicado equilibrio de productividad, calidad, resistencias a enfermedades y otras características agronómicas de los cultivares actuales se viese notablemente alterado al introducir un número sustancial de genes como el que se requiere para conseguir tolerancia a la salinidad, por lo que la competitividad de ese futuro cultivar tolerante a la salinidad podría ser dudosa. Una solución parcial al problema sería mejorar la tolerancia a la salinidad en la raíz e injertar sobre ella la parte aérea de los cultivares actuales (Cuartero et al., 2006). Esta solución no es general pero sí cabría en frutales y muchas especies hortícolas.

Finalmente apuntar que la salinidad aumenta constantemente en los suelos agrícolas por el agua de riego empleada y por un manejo inadecuado del riego. Y puede aumentar notablemente en los más de 10 años que tardaría en obtenerse un nuevo cultivar con tolerancia a la salinidad, por eso la mejora no puede dar solución completa a largo plazo al cultivo en suelos salinos, sino que debe ser una pieza más de un paquete que debe incluir medidas técnicas (manejo del riego y del drenaje) y métodos culturales para estabilizar el nivel salino (Flowers y Yeo, 1995).

## 10.5. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Las investigaciones encaminadas al aumento de la tolerancia a la salinidad en especies de interés agronómico mediante métodos clásicos de mejora o algunas aproximaciones biotecnológicas (p.ej., selección *in vitro*) han dado escasos resultados (Flowers, 2004; Yamaguchi y Blumwald, 2005) y ello explica las expectativas que se generaron en torno al empleo de una aproximación basada en la transformación. Los numerosos trabajos publicados en los últimos años muestran la posibilidad de conseguir un aumento de la tolerancia a la salinidad a través de la sobreexpresión de genes endógenos o, más habitualmente, mediante la expresión heteróloga de genes que supuestamente actúan en diferentes mecanismos relacionados con el carácter. Los genes que se han transferido a plantas transgénicas pertenecen, básicamente, a dos categorías: genes estructurales y reguladores. El primer grupo incluye genes que codifican proteínas funcionales que, de una u otra forma, confieren una cierta tolerancia, entre las que se encuentran las proteínas LEA, chaperonas y proteínas ligadas al ARNm (revisado por Wang et al. 2003; Zhang et al., 2007), proteínas relacionadas con canales de agua (revisado por Forrest y Bhave, 2007), transportadores de iones (revisado por Yamaguchi y Blumwald, 2005; Chinnusamy et al., 2005), enzimas implicados en la eliminación de radicales hidroxilo (revisado por Apel y Hirt, 2004) y enzimas implicados en la síntesis de osmolitos (revisado por Chen y Murata, 2002; Penna, 2003; Kavi Kishor et al., 2005). El segundo grupo está compuesto por genes que codifican factores de transcripción y proteínas implicadas en la regulación de la transducción o recepción de señales (revisado por Kaur y Gupta, 2005; Agarwal et al., 2006).

Según Flowers (2004), en el periodo comprendido entre 1993 y 2003, los trabajos se centraron principalmente en la transferencia de genes implicados en la biosíntesis de osmolitos. Sin embargo, el panorama ha cambiado en los últimos 3-4 años, siendo los factores de transcripción las principales diana. En un buen número de trabajos, los autores señalan que la sobreexpresión de genes que codifican factores de transcripción induce la expresión de genes implicados en diferentes procesos, incluyendo no sólo los relacionados con la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés abiótico, sino también genes implicados en la respuesta de defensa frente a estrés biótico, distintos procesos fisiológicos, rutas de señalización hormonal y otros aspectos relacionados con el desarrollo (Agarwal et al., 2006; Ham et al., 2006; Sohn et al., 2006; Seong et al., 2007; Ogawa et al., 2007; Liu et al., 2007; Dai et al., 2007; Nakashima et al., 2007; Liu et al., 2007).

La estrategia basada en la utilización de antiportadores ha generado también grandes expectativas en estos últimos años. En los primeros trabajos, se describía una elevada tolerancia a la salinidad en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (Apse et al., 1999), tomate - *Solanum lycopersicum* L. - (Zhang y Blumwald, 2001) y colza - *Brassica napus* - (Zhang et al., 2001) que sobreexpresaban el antiportador vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de *Arabidopsis thaliana* (*AtNHX1*), atribuyéndose la mayor tolerancia a una compartimentación de sodio en las vacuolas. Posteriormente, el gen *AtNHX1* se ha sobreexpresado en plantas transgénicas de trigo - *Triticum aestivum* L. - (Xue et al., 2004), maíz - *Zea*



mays L. - (Yin et al., 2004), remolacha - *Beta vulgaris* L. - (Yang et al., 2005), algodón - *Gossypium hirsutum* L. - (He et al., 2005) y festuca - *Festuca aundinacea* Schreb. - (Tian et al., 2006; Zhao et al., 2007) y en todos los casos los autores describen incrementos de tolerancia a la salinidad. Asimismo, se han identificado y caracterizado nuevos genes *AtNHX* (Yokoi et al., 2002; Aharon et al., 2003; Wang et al., 2007) y se han realizado considerables esfuerzos para identificar sus homólogos en diferentes especies y estudiar sus funciones en condiciones de estrés mediante la sobreexpresión en plantas transgénicas (*AgNHX1* de *Atriplex gmelini*: Ohta et al., 2002; *BnNHX1* de *Brassica napus*: Wang et al., 2004; *GhNHX1* de *Gossypium hirsutum*: Wu et al., 2004; *OsNHX1* de *Oryza sativa* L (arroz): Fukuda et al., 2004; Wu et al., 2005; Chen et al., 2007; *HbNHX1* de *Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link: Lu et al., 2005; *GmNHX1* de *Glycine max* L. (soja): Sun et al., 2006; Li et al. 2006 *SsNHX1* de *Suaeda salsa* (L) Pall.: Zhao et al., 2006a; b; Li et al., 2007; *PgNHX1* de *Pennisetum glaucum* (mijo): Verma et al., 2007; Rajagopal et al., 2007; *TNHX1* de *Triticum aestivum*: Brini et al., 2007 y *AeNHX1* de *Agropirum elongatum* L. (agropiro): Quiao et al., 2007). En este mismo contexto, se ha publicado que la sobreexpresión de una H<sup>+</sup>-pirofosfatasa (*AVP1*) de *Arabidopsis thaliana* aumenta la tolerancia a la salinidad en esta misma especie (Gaxiola et al., 2001). Se han descrito resultados similares sobreexpresando sus homólogos de *Thellungiella halophila* (*TsVP*; Gao et al., 2006), *Suaeda salsa* (*SsVP*; Guo et al., 2006) y *Triticum aestivum* (*TVP1*; Brini et al., 2007). Asimismo, se ha conseguido mayor tolerancia mediante la sobreexpresión de genes que codifican antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de la membrana plasmática aislados a partir de diferentes organismos: *AtSOS1* de *Arabidopsis thaliana* (Shi et al., 2003), *SOD2* de *Schizosaccharomyces pombe* (Gao et al., 2003; Zhao et al., 2006c), *nhaA* de *Escherichia coli* (Wu et al., 2005) y *OsSOS1* de *Oryza sativa* (Martínez-Atienza et al., 2007)

Se han publicado también muchos artículos en los que la mayor tolerancia se ha logrado con genes implicados en otros mecanismos. Por ejemplo, la estrategia más utilizada en los últimos años para inducir tolerancia a través de acumulación de osmolitos se ha centrado en la biosíntesis de glicinabetaina, a través la expresión de genes aislados de diferentes fuentes (Su et al., 2006; Shirasawa et al., 2006; Zhou et al., 2007; Waditee et al., 2007; Park et al., 2007). Conviene resaltar el trabajo de Park et al. (2007), en el que se pone de manifiesto que la acumulación de glicinabetaina en plantas transgénicas de tomate es más efectiva en los cloroplastos que en el citosol, de forma similar a lo observado previamente en trabajos similares con el arroz (Sakamoto et al., 1998). Asimismo, Kumar et al (2004) señalan que la acumulación de glicinabetaina en plantas transplásticas de zanahoria conduce a niveles de tolerancia de hasta 400 mM de ClNa.

Por otro lado, cada vez existen más publicaciones relacionadas con la expresión heteróloga de genes implicados en la eliminación de intermediarios de oxígeno reactivo. En este apartado, se ha publicado que la co-expresión de más de un gen implicado en estrés oxidativo, tanto en cloroplastos como en el citosol, da lugar a plantas con mayor nivel de tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (Zhao y Zang, 2006; Tseng et al., 2007; Lee et al., 2007).

Recientemente, se ha reportado la posible implicación de ciertos genes que codifican sensores de calcio (Cheong et al., 2003) o incluso ADN helicasas (Sanan-Mishra et al., 2005) y ARN helicasas (Gong et al., 2005; Owtrim, 2006) en la tolerancia la salinidad. Asimismo, se está estudiando el papel que desempeñan ARNs de cadena corta (Sunkar y Zhu, 2004; Borsani et al., 2005; Jun y Kang, 2007), así como rutas relacionadas con el metabolismo ADN/ARN o la señalización de las proteínas G (Tuteja, 2007), en el grado de tolerancia.

### 10.5.1. Cómo emplear la transformación genética en Mejora

En los últimos años se han publicado muchos artículos que describen el efecto de genes que actúan sobre alguno de los mecanismos implicados en el proceso tal como se ha descrito más arriba. Considerados en conjunto, estos trabajos ponen de manifiesto que mediante esta vía es factible conseguir un cierto aumento de la tolerancia. Sin embargo, no se puede concluir que se hayan obtenido cultivares verdaderamente halotolerantes (i.e., con un nivel de tolerancia suficiente desde un punto de vista agronómico). Es más, como indica Flowers (2004), quizá convendría evitar el exceso de optimismo cuando se extraen conclusiones sobre la situación en este campo de trabajo, ya que habría que tener en cuenta otras consideraciones, tales como las especies que habitualmente se utilizan en los experimentos de transformación, la evaluación de las plantas transgénicas y la complejidad del carácter.

Por lo que respecta al primer punto, conviene resaltar que la mayor parte de los experimentos de transformación se han realizado en dos especies modelo, *Arabidopsis* y tabaco (Vij y Tyagi, 2007), lo que obliga a ser cautos a la hora de extraer conclusiones. Convendría transferir a plantas de interés agronómico algunos de los genes que tan esperanzadores resultados han proporcionado en plantas modelo (Grover et al., 2003; Yamaguchi y Blumwald, 2005), ya que no está claro que dichos resultados se puedan extrapolar a otras especies (Flowers, 2004, Cuartero et al., 2006).

Otro aspecto clave es el que se refiere a la evaluación de la tolerancia en las plantas transgénicas. Los resultados de tipo descriptivo o los que se sustentan en meras evidencias fotográficas son muy cuestionables (Flowers, 2004). Lo mismo puede decirse cuando la evaluación se realiza con un número limitado de plantas, con ensayos a muy corto plazo, usando tratamientos de choque, en etapas del crecimiento muy específicas (Yamaguchi y Blumwald, 2005) o empleando los típicos ensayos de germinación de semillas que suelen dar resultados diferentes a los que se obtienen en estadios más avanzados del desarrollo (Foolad y Lin, 1997; Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999). Para llegar a conclusiones fiables la evaluación se debería realizar de forma rigurosa, con ensayos a largo plazo y estimando la producción en condiciones de salinidad (Cuartero et al., 2006)

Otro aspecto importante a la hora de estimar la tolerancia es el material vegetal empleado. El uso de transformantes primarios (TG1) puede conducir a conclusiones erróneas debido a los cambios epigenéticos que usualmente exhiben las plantas regeneradas *in vitro*. La evaluación en TG2 solventa el problema anterior, pero hay que tener en cuenta que se trata de una progenie segregante. En general, lo mejor es llevar a cabo la evaluación con líneas homocigóticas y acigóticas (obtenidas en TG3) y líneas hemicigóticas (obtenidas a partir del cruce entre líneas homocigóticas y acigóticas). De esa forma, las líneas homocigóticas y hemicigóticas pueden ser comparadas con dos controles: el cultivar original y la correspondiente línea acigótica sin el transgén.

Por lo que se refiere a la complejidad del carácter, teniendo en cuenta la diversidad de mecanismos implicados (Tuteja, 2007), la pregunta que surge es si se podrán obtener plantas halotolerantes transfiriendo un solo gen, o si por el contrario se precisará la introducción de varios (Bohnert et al., 1996). Desde luego, no cabe descartar que la expresión de un gen regulador (p.ej., que codifique un factor de transcripción) provoque un efecto en cascada sobre la expresión de otros muchos genes, generando un cambio fenotípico importante. Alternativamente, un gen relacionado con la compartimentación de iones tóxicos en vacuolas podría aliviar la toxicidad generada por el ión. Con todo, no parece probable que un simple gen sea capaz de solventar el problema. Lo más probable es que se precise la transferencia y expresión coordinada de diversos genes implicados en los mecanismos principales del proceso de tolerancia. El problema es que todavía no tenemos una idea clara de cuáles son los genes que debemos transferir.



En los trabajos de transformación dirigidos al aumento de la tolerancia a la salinidad, la mayor parte de los genes que se han clonado y transferido provienen de especies modelo o de especies muy alejadas. La experiencia de muchos años en el campo de la mejora indica, no obstante, que lo mejor sería clonar los genes a partir de la misma especie o de especies silvestres relacionadas con la especie cultivada. En las especies y formas silvestres existe una amplia diversidad genética que todavía está por explotar (Bohnert et al., 2006; Cuartero et al., 2006). En el caso del tomate, por ejemplo, se sabe desde hace tiempo que en algunas de las especies silvestres relacionadas (*Solanum pennellii* Correll, *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg, *S. pimpinellifolium* L.) hay entradas que exhiben un alto grado de tolerancia. Sin embargo, en la actualidad seguimos sin conocer qué genes determinan la tolerancia a la salinidad en estas entradas silvestres. Sorprendentemente, no se ha hecho casi nada en esta dirección. Por ello, nosotros estamos intentando identificar alguno de los genes que determinan la halotolerancia en dos entradas de una especie silvestre (*Solanum pennellii*) relacionada con el tomate.

### 10.6. NUEVOS GENES RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD

El uso de aproximaciones de genómica funcional podría ayudar a conocer nuevos genes implicados en la regulación de la tolerancia a la salinidad. Las aproximaciones de tipo transcriptómico están permitiendo determinar qué genes se expresan o se activan en respuesta a estrés salino u otros tipos de estrés abiótico en diferentes especies (Cuartero et al., 2006 y referencias de este artículo). Con todo, estas aproximaciones tienen algunas limitaciones (p.ej., sobreestimación del número de genes supuestamente involucrados, perfiles de expresión limitados al tipo de tejido utilizado o al momento y estadio de desarrollo en el que se aplique el estrés) que previsiblemente podrán solventarse en un futuro próximo. En cualquier caso, más que aplicar estas aproximaciones en especies modelo, lo que interesaría es hacerlo en especies cultivadas y especies silvestres relacionadas para, por comparación, tratar de llegar a identificar los genes responsables de la tolerancia (Bohnert et al., 2006; Cuartero et al., 2006).

Los programas de genómica basados en la anulación de función de ciertos genes mediante silenciamiento génico post-transcripcional suponen una interesante alternativa (Cherian et al., 2006). En particular, el empleo de esta estrategia a gran escala en entradas halotolerantes podría dar una información muy valiosa.

El análisis funcional de genes candidato en especies de interés agronómico puede ayudar también a la selección de genes. Por ejemplo, en los laboratorios de los autores se ha realizado el análisis funcional de 15 genes en plantas transgénicas de tomate. La evaluación, tanto en condiciones normales como de salinidad, se ha realizado en dos ambientes (Valencia y Murcia) y con distintos sistemas de cultivo hidropónico. En ambos casos, se han realizado ensayos a medio y largo plazo (estimando la producción de forma cuantitativa) y con diversas líneas homocigóticas, hemicigóticas y acigóticas para cada transgén. Los resultados han mostrado que algunos de los genes promueven un alto grado de tolerancia a la salinidad y/o estrés hídrico en el cultivar p73 (Pineda, 2005; Muñoz-Mayor, 2006). La respuesta no se restringe a este cultivar, ya que algunos de estos genes promueven también un alto nivel de tolerancia en otro cultivar de tomate (UC82), así como en plantas transgénicas de melón y sandía. Se ha comprobado que hay diferentes grados de expresión en distintas líneas transgénicas para un gen dado, indicando la necesidad de seleccionar aquellas que exhiben el mayor nivel de expresión del carácter. Por último, los resultados indican que, en lugar de usar promotores constitutivos (p.ej., 35S), lo mejor sería utilizar promotores inducibles o específicos.

## 10.7. ELEMENTOS DE REGULACIÓN DE LOS GENES DE TOLERANCIA A LA SALINIDAD

El tema de los elementos de regulación es, de hecho, un aspecto fundamental (Yamaguchi y Blumwald, 2005; Cherian et al., 2006; Cuartero et al., 2006). Hasta ahora, la investigación en el campo de la transformación se ha basado en el uso de promotores constitutivos (p.ej.,: 35S, ubiquitina1 o actina1) pero el panorama debería cambiar en un futuro próximo. La expresión constitutiva de un gen en el órgano y momento inadecuados no va a proporcionar ninguna ventaja a nivel agronómico. En lugar de ello, lo normal es que genere un coste energético que redunde de forma negativa en la producción (Rus et al., 2001; Grover et al., 2003; Muñoz-Mayor et al., 2008) o efectos pleiotrópicos que enmascaren o anulen los efectos positivos del transgén (p.ej.,: Romero et al., 1997; Kasuga et al., 1999). De hecho, estudios recientes han mostrado las ventajas del uso de promotores específicos o inducibles (Kasuga et al., 1999; Garg et al., 2002; Rohila et al., 2002; Lee et al., 2003; Su y Wu, 2004; Nakashima et al., 2007). Además, el uso de promotores inducibles o específicos va a ser esencial cuando se aborde la transferencia y expresión conjunta de varios genes porque, aparte de los temas relacionados con el coste energético y los efectos pleiotrópicos, el uso de transgenes con los mismos elementos de regulación suele generar problemas de silenciamiento génico.

Por fortuna, ahora disponemos de aproximaciones genómicas para la identificación y etiquetado de elementos de regulación, por ejemplo las que se basan en el empleo de trampas génicas. Hay tres clases de trampas (intensificadores, promotores y genes) que funcionan de forma diferente (Springer, 2000), lo que permite seleccionar la más adecuada en función del objetivo perseguido. En un proyecto conjunto, en el que participan grupos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura y de la Universidad de Almería, se ha generado una colección de más de 2000 líneas T-DNA de tomate con una trampa de intensificadores (cedida por el Dr. Jack) y en el momento actual se está abordando la identificación de mutantes de inserción hipersensibles y de elementos de regulación de genes de tomate que se expresan en respuesta a estrés salino. La ventaja de este método es que no sólo permite identificar genes de respuesta a estrés, sino también estudiar su patrón de expresión espacio-temporal, lo que va a dar una información muy valiosa a la hora de seleccionar los elementos de regulación más adecuados. Por si fuera poco, la colección de líneas T-DNA sirve igualmente para identificar y etiquetar una amplia variedad de genes implicados en otros caracteres, tales como los relacionados con diversos procesos del desarrollo vegetativo y reproductivo. Teniendo en cuenta que la colección de líneas T-DNA va a ir aumentando progresivamente, es de esperar que a medio o largo plazo el esfuerzo realizado permita la identificación de algún gen clave implicado en el proceso de la tolerancia a la salinidad.

## 10.8. CONCLUSIONES

Se ha trabajado mucho en los últimos años para conocer los efectos que la salinidad produce en las plantas y para entender las respuestas fisiológicas de las plantas ante el estrés salino. Con las nuevas herramientas “ómicas”, ionómica, proteómica y metabolómica se avanzará más en la comprensión de los mecanismos de tolerancia en cuanto a la regulación de la homeostasis osmótica y iónica y a la protección/repación del daño celular. Sin embargo toda esta información fisiológica no ha podido ser bien explotada en programas de mejora tendentes a conseguir genotipos tolerantes porque la medida de los caracteres fisiológicos relacionados con la tolerancia no era compatible con las poblaciones manejadas por mejoradores. Para evitar esto, mejoradores y fisiólogos deberían trabajar conjuntamente.

La tolerancia a la salinidad es un carácter particularmente complicado ya que está compuesta por muchos caracteres, que son poligénicos, muy influidos por el ambiente, que cambia su importancia según el estado de desarrollo de la planta y que muestran distinta expresión según la concentración salina en la que se cultiven las plantas. Nuevos genes/QTL relacionados con la tolerancia a la salinidad serán detectados con el empleo de la genómica funcional (las trampas de intensificadores particularmente) y a través de poblaciones adecuadas (RILs y dobles haploides), que darán información también sobre sus interacciones con otros genes/QTL y con el ambiente. Quedaría después el paso de introducir esos genes/QTL a los genotipos actuales mediante selección indirecta por marcadores moleculares muy ligados a los genes/QTL responsables de la tolerancia, en programas que se acercasen lentamente a la homocigosis, y que esos genotipos “mejorados” diesen la calidad y la cosecha que los consumidores y agricultores y requieren. También se podría utilizar la transformación de un cultivar actual con varios genes de tolerancia o con genes reguladores de otros genes. Por si todo esto fuese poco, la salinidad en los suelos agrícolas suele aumentar y bien podría darse el caso que cuando se consiguiese el objetivo de mejora propuesto la salinidad de la zona hubiese aumentado y el nuevo cultivar adoleciese de falta de adaptación a esas condiciones. De ahí que la mejora genética necesite de otras técnicas para estabilizar la salinidad en los suelos y de métodos de cultivo como el manejo del abonado y del silicio o como el injerto sobre patrones tolerantes, para llevar al campo con éxito cultivares tolerantes a salinidad.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado con los proyectos AGL 2006-15290 y AGL 2006-12494.

## REFERENCIAS

- Agarwal, P.K., Agarwal, P., Reddy, M.K. and Sopory, S.K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* 25: 1263-1274.
- Aharon, G.S., Apse, M.P., Duan, S., Hua, X. and Blumwald, E. (2003). Characterization of a family of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* 253: 245-256.
- Alarcon, J.J., Sanchez-Blanco, M.J., Bolarin, M.C. and Torrecillas, A. (1993). Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* during short-term salt exposure and recovery. *Physiol. Plant.* 89: 441-447.
- Alia, A.J., Xua, J.L., Ismaila, A.M., Fua, B.Y., Vijaykumara, C.H.M., Gaoa, Y.M., Domingo, J., Maghiranga, R., Yua, S.B., Gregorioa, G., Yanaghiharaa, S., Cohena, M., Carmena, B., Mackilla D. and Li., Z.K. (2006). Hidden diversity for abiotic and biotic stress tolerances in the primary gene pool of rice revealed by a large backcross breeding program. *Field Crops Res.* 97: 66-76.
- Al-Doss, A.A. and Smith, S.E. (1998). Registration of AZ-97MEC and AZ-97MEC-ST very nondormant alfalfa germplasm pools with increased shoot weight and differential response to saline irrigation. *Crop Sci.* 38: 568-568.
- Amtmann, A. and Sanders, D. (1999). Mechanisms of Na<sup>+</sup> uptake by plant cells. *Adv. Bot. Res.* 29: 75-112.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.

- Apse, M.P., Blumwald, E., Aharon, G.S., Snedden and W.A. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 285: 1256-1258.
- Ashraf, M. (2002). Salt tolerance of cotton: Some new advances. *Crit. Rev. Plant Sci*. 21: 1-30.
- Ashraf, M. and Waheed, A. (1990). Screening of local/exotic accessions of lentil (*Lens culinaris* Medic.) for salt tolerance at two growth stages. *Plant Soil* 128: 167-176.
- Bartels, D. and Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci*. 24: 23–58.
- Basnayake J., Ludlow, M.M., Cooper, M. and Henzell, R.G. (1993). Genotypic variation among adjustment and desiccation tolerance in contrasting sorghum inbred lines. *Field Crops Res*. 35: 51-62.
- Blum, A. (1989). Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. *Crop Sci*. 29: 230-233.
- Bohner, H.J., Gollack, D., Ishitani, M., Kamasani, U.R., Rammesmayer, G., Shen, B., Sheleva, E. and Jensen, KJ. (1996). Salt tolerance engineering requires multiple gene transfer. pp 115-125, in Collins GB, and Shepherd RJ. (Eds.). *Engineering plants for commercial products and application*. Ann. New York Acad. Sci. New York, U.S.A.
- Bohnert, H.J., Gong, Q., Li, P. and Ma, S. (2006). Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms - getting genomics going. *Curr. Opin. Plant Biol*. 9:180-188.
- Bolaños, J., Edmeades, G.O., and Martinez, L. (1993). Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. III. Responses in drought-adaptive physiological and morphological traits. *Field Crops Res*. 31: 269-286.
- Bolarín, M.C., Fernández, F.G., Cruz, V. and Cuartero, J. (1990). Salinity tolerance in four wild tomato species using vegetative yield-salinity responses curves. *J. Am. Soc. Hort. Sci*. 116: 286-290.
- Bordas, M., Montesinos, C., Dabauza, M., Salvador, A., Roig, LA., Serrano, R. and Moreno, V. (1997). Transfer of the yeast salt tolerance gene *hal1* to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance. *Transgenic Res*. 5: 1-10.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., and Zhu, J.K. (2005). Endogenous iRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123: 1279-1291.
- Breto, M.P., Asins, M.J., and Carbonell, E.A. (1994). Salt tolerance in *Lycopersicon* species 3. Detection of quantitative trait loci by means of molecular markers, *Theor. Appl. Genet*. 88: 395–401.
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G.A. and Masmoudi, K. (2007). Overexpression of wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *TNHX1* and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase *TVP1* improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J. Exp. Bot*. 58 (2): 301-308.
- Cano, E.A., Bolarin, M.C., Perez-Alfocea, F. and Caro, M. (1991). Effect of NaCl priming on increased salt tolerance in tomato. *J. Hort. Sci*. 66: 621-628.
- Caro, M. Cruz, V. Cuartero, J. Estan, M.T. and Bolarín, M.C. (1991). Salinity tolerance of normal-fruited and cherry tomato cultivars. *Plant Soil* 136: 249–255.
- Carter, V.G. and Dale, T. (1974). *Topsoil and civilization*. Univ Oklahoma Press, Norman.

- Chen, H., An, R., Tang, J.H., Cui, X.H., Hao, F.S., Chen, J. and Wang, X.C. (2007). Over-expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in upland rice. *Mol. Breed.* 19: 215-225.
- Chen, T.H.H. and Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 250-257.
- Cheong, Y.H., Kim, K.N., Pandey, G.K., Gupta, R., Grant, J.J. and Luan, S. (2003). CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1833-1845.
- Cherian, S., Reddy, M.P. and Ferreira, R.B. (2006). Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: progress and future prospects. *Biol. Plant.* 50 (4): 481-495.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. and Zhu, J.K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45:437-448.
- Cruz, V. (1990). Tolerancia a la salinidad y criterios de selección en *Lycopersicon* Mill. spp. Tesis doctoral. Universidad de Málaga, 484 p.
- Cuartero, J. and Fernández-Muñoz, R. (1999). Tomato and salinity. *Sci Hort.* 78: 83-125.
- Cuartero, J., Romero-Aranda, R., Yeo, A.R. and Flowers, T.J. (2002). Variability for some physiological characters affecting salt tolerance in tomato. *Acta Hort.* 573: 435-441.
- Cuartero, J., Yeo, A.R. and Flowers, T.J. (1992). Selection of donors for salt tolerance in tomato using physiological traits. *New Phytol.* 121: 63-69.
- Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A. and Leigh, R.A. (2003). Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *J. Exp. Bot.* 54: 657-661.
- Czempinski, K., Gaedeke, N., Zimmermann, S. and Müller-Röber B. (1999). Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *J. Exp. Bot.* 50: 955-966.
- Dai, X., Xu, Y., Ma, Q., Xu, W., Wang, T., Xue, Y. and Chong, K. (2007). Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 1739-1751.
- De Costa, W., Zorb, C., Hartung, W. and Schubert, S. (2007). Salt resistance is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiol. Plant.* 131: 311-321
- Dierig, D.A., Shannon, M.C. and Grive, C.M. (2001). Registration of WCL-SL1 salt tolerant *Lesquerella fendleri* germplasm. *Crop Sci.* 41: 604-605.
- Dracup, M. (1993). Why does in vitro cell selection not improve the salt tolerance of plants? pp 137-142, in P.J. Randall, E.D. Delhaize, R.A. Richards and R. Munns (eds). *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition.*, Kluwer, Dordrecht. The Netherlands.
- Ellul, P., Rios, A., Atares, A., Roig, L.A., Serrano, R. and Moreno, V. (2003). The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [(*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun. & Nakai.) *Theor. Appl. Genet.* 107: 462-469.

Estañ, M.T., Martínez-Rodríguez, M.M., Pérez-Alfocea, F., Flowers, T.J. and Bolarin, M.C. (2005). Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. *J. Exp. Bot.* 56: 703-712.

Flowers, T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.

Flowers, T.J., Flowers, S.A., Hajibagheri, M.A. and Yeo, A.R. (1991). Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant Cell Environ.* 14: 319-325.

Flowers, T.J. and Yeo, A.R. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next? *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 875-884.

Foolad, M.R. (2004). Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76: 101-119.

Foolad, M.R. and Lin, G.Y. (1997). Absence of a genetic relationship between salt tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato. *Plant Breed.* 116: 363-367.

Foolad, M.R. and Chen, F.Q. (1999). RFLP mapping of QTLs conferring salt tolerance during the vegetative stage in tomato, *Theor. Appl. Genet.* 99: 235-243.

Forrest, K.L. and Bhave, M. (2007). Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Funct. Integr. Genom.* 7:263-289.

Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H. and Tanaka, Y. (2004). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. *Plant Cell Physiol.* 45 (2): 146-159.

Gao, F., Gao, Q., Duan, X.G., Yue, G.D., Yang, A. and Zhang, J. (2006). Cloning of an H<sup>+</sup>-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 57 (12): 3259-3270.

Gao, J.P., Chao, D.Y. and Lin, H.X. (2007). Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: Recent studies on stress response in rice. *J Integ. Biol.*, 49: 742-750.

Gao, X.H., Ren, Z.H., Zhao, Y.X. and Zhang, H. (2003). Overexpression of SOD2 increases salt tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133 (4): 1873-1881.

Garciadeblas, B., Senn, M.E., Bañuelos, M.A. and Rodríguez-Navarro, A. (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* 34: 788-801.

Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V. and Wu, R.J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (25): 15898-15903.

Gaxiola, R.A., Li, J.L., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L. and Fink, G.R. (2001). Drought and salt tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup> pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (20): 11444-11449.

Gelburd, D.F. (1985). Managing salinity-lessons from the past. *J. Soil Water Conserv.* 40: 329-331.



- Gisbert, C., Rus, A.M., Bolarin, M.C., Lopez-Coronado, J.M., Arrillaga, I., Montesinos, C., Caro, M., Serrano, R. and Moreno, V. (2000). The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiol.* 123: 393-402.
- Gong, Z., Dong, CH., Lee, H., Zhu, J., Xiong, L., Gong, D., Stevenson, B. and Zhu, J.K. (2005) A DEAD box RNA helicase is essential for RNA export and important for development and stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 256-267.
- Grandillo, S., Ku, H.M. and Tanksley, S.D. (1999). Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 99: 978-987.
- Greenway, H. and Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 31: 149-190.
- Grover, A., Agarwal, P.K., Kapoor, A., Katiyar-Agarwal, S., Agarwal, M. and Chandramouli, A. (2003). Addressing abiotic stresses in agriculture through transgenic technology. *Curr. Sci.* 84 (3): 355-367.
- Gong, J.M., He, P., Qian, Q.A., Shen, L.S., Zhu L.H. and Chen, S.Y. (1999). Identification of salt-tolerance QTL in rice (*Oryza sativa* L.), *Chin. Sci. Bull.* 44: 68–71.
- Gong, J.M., Zheng, X.W., Du, B.X., Qian, Q., Chen, S.Y., Zhu L.H. and He, P. (2001). Comparative study of QTLs for agronomic traits of rice (*Oryza sativa* L.) between salt stress and nonstress environment, *Sci. China Ser. C-Life Sci.* 44: 73–82.
- Guo, S., Yin, H., Zhang, X., Zhao, F., Li, P., Chen, S., Zhao, Y. and Zhang, H. (2006). Molecular cloning and characterization of a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene, SsVP, from the halophyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 60: 41-50.
- Gupta, A.P. and Lewontin, R.C. (1982). A study of reaction norms in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution* 36: 934-948.
- Ham, B.K., Park, J.M., Lee, S.B., Kim, M.J., Lee, I.J., Kim, K.J., Kwon, C.S. and Paek, K.H. (2006). Tobacco Tsp1, a DnaJ-Type Zn finger protein, is recruited to and potentiates Tsi1-mediated transcriptional activation. *Plant Cell* 18: 2005-2020.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Nelson, D.E., Samaras, Y. and Rhodes, D. (1994). Tissue culture in the improvement of salt tolerance in plants. pp 83-125, in A.R. Yeo and T.J. Flowers (eds). *Soil Mineral Stresses: Approaches to Crop Improvement*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. and Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- He, C.X., Yan, J.Q., Shen, G.X., Fu, L.H., Holaday, A.S., Auld, D., Blumwald, E. and Zhang, H. (2005). Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.* 46 (11): 1848-1854.
- Hernandez, J.A., Jimenez, A., Mullineaux, P. and Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23: 853-862.

- Hernandez, J.A., Ferrer, MA., Jimenez, A., Barcelo, A.R. and Sevilla, F. (2001). Antioxidant systems and O<sub>2</sub>(-)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* 127: 817-831.
- Hong, C., Hsu, Y.T., Tsai, Y.H. and Kao, C.H. (2007). Expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. *J. Exp. Bot.* 58:3273–3283.
- Husain, S., Munns, R. and Condon, A.G. (2003). Effect of sodium exclusion trait on chlorophyll retention and growth of durum wheat in saline soil. *Aust. J. Agr. Res.* 54: 589-597.
- Igartua, E. and Gracia, P. (1999). Divergent selection for salinity tolerance at germination-emergence stage in grain sorghum. *Maydica* 43: 161-168.
- Jung, H.J. and Kang, H. (2007). Expression and functional analyses of microRNA417 in *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. *Plant Physiol. Bioch.* 45: 805-811.
- Junger, T.E., Sen, S., Stowe, K.A. and Simms, E.L. (2005). Epistasis and genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* 123: 87-105.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* 17: 287-291.
- Kaur, N. and Gupta, A.K. (2005). Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Curr. Sci.* 88 (11): 1771-1780.
- Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Sri Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P. and Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci.* 88 (3): 424-438.
- Krishnamurthy, L., Serraj R., Hash, C.T, Dakheel, A.J. and Reddy, B.V.S. (2007). Screening sorghum genotypes for salinity tolerant biomass production. *Euphytica* 156: 15-24.
- Kumar, S., Dhingra, A. and Daniell, H. (2004). Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol.* 136 (1): 2843-2854.
- Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J.M., Heard, P.J., Brown, S.J. and Leigh, R.A. (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant J.* 32: 139-149.
- Lee, J.T., Prasad, V., Yang, P.T., Wu, J.F., Ho, T.H.D., Charng, YY. and Chan, MT. (2003). Expression of *Arabidopsis* CBF1 regulated by an ABA/stress inducible promoter in transgenic tomato confers stress tolerance without affecting yield. *Plant Cell Environ.* 26 (7): 1181-1190.
- Lee, Y.P., Kim, S.H., Bang, J.W., Lee, H.S., Kwak, S.S. and Kwon, S.Y. (2007). Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Rep.* 26:591-598.
- Lewis, IN. (1984). A vital resource in danger. *Calif. Agric.* 38: 2.



- Li, J., Jiang, G., Huang, P., Ma, J. and Zhang, F. (2007). Overexpression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Suaeda salsa* confers cold and salt tolerance to transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 90: 41-48.
- Li, W.Y.F., Wong, F.L., Tsai, S.N., Phang, T.H., Shao, G. and Lam, H.M. (2006). Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells. *Plant Cell Environ.* 29: 1122-1137.
- Lilley, J.M. and Ludlow, M.M. (1996). Expression of osmotic adjustment and dehydration tolerance in diverse rice lines. *Field Crops Res.* 48: 185-197.
- Liu, K., Wang, L., Xu, Y., Chen, N., Ma, Q., Li, F. and Chong, K. (2007). Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. *Planta* 226: 1007-1016.
- Liu, N., Zhong, N.Q., Wang, G.L., Li, L.J., Liu, X.L., He, Y.K. and Xia, G.X. (2007). Cloning and functional characterization of PpDBF1 gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*. *Planta* 226: 827-838.
- Lu, S.Y., Jing, Y.X., Shen, S.H., Zhao, H.Y., Ma, L.Q., Zhou, X.J., Ren, Q. and Li, Y.F. (2005). Antiporter gene from *Hordum brevisubulatum* (Trin.) Link and its overexpression in transgenic tobaccos. *J. Integr. Plant Biol.* 47 (3): 343-349.
- Martínez-Atienza, J., Jiang, X., Garcíadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.K., Pardo, J.M. and Quintero, F.J. (2007). Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiol.* 143: 1001-1012.
- Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V. and Rubio, F. (2004). Cloning and functional characterization of the high-affinity K<sup>+</sup> transporter HAK1 of pepper. *Plant Mol. Biol.* 56: 413-421.
- Martínez-Rodríguez, M.M., Estañ, M.T., Moyano, E., García-Abellán, J.O., Flores, F.B., Campos, J.F., Al-Azzawi, M.J., Flowers, T.J. and Bolarin, M.C. (2008). The effectiveness of grafting to improve salt tolerance in tomato when an 'excluder' genotype is used as scion. *Environ. Exp. Bot.* 63 : 392-401.
- Matsushita, N. and Matoh, T. (1991). Characterization of Na<sup>+</sup> exclusion mechanisms of salt-tolerant reed plants in comparison with salt-sensitive rice plants. *Physiol. Plant.* 83: 170-176.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. and Guy, M. (2002). Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol. Plant.* 115: 393-400.
- Miyama, M., Hanagata, N. (2007). Microarray analysis of 7029 gene expression patterns in burma mangrove under high-salinity stress. *Plant Sci.* 172: 948-957.
- Monforte, A.J., Asins, M.J. and Carbonell, E.A. (1997). Salt tolerance in *Lycopersicon* species 6. Genotype-by-salinity interaction in quantitative trait loci detection: constitutive and response QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 95: 706-713.
- Morgan, J.M. (1992). Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat. *Aus. J. Plant Physiol.* 19: 67-76.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167: 645-663.

- Munns, R., Hare, R.A., James, R.A. and Rebetzke, G.J. (2000). Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 51: 69-74.
- Munns, R., Rebetzke, G.J., Husain, S., James, R.A. and Hare, R.A. (2003). Genetic control of sodium exclusion in durum wheat. *Aust. J. Agr. Res.* 54: 627-635.
- Muñoz-Mayor, A. (2006). Respuesta de plantas transgénicas de tomate al estrés hídrico and salinidad. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, pp 1-273.
- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., Garcia-Abellán, J.O., Garcia-Sogo, B., Moyano, E., Atares, A., Vicente-Agulló, F., Serrano, R., Moreno, V. and Bolarin M.C. (2008). The HAL1 function on Na<sup>+</sup> homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but the high reduction of Na<sup>+</sup> in leaf is not associated with salt tolerance. *Physiol. Plant.* 133: 288-297.
- Nakashima, K., Tran, L.S.P., Nguyen, D.V., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J.* 51: 617-630.
- Niknam, S.R. and McComb J. (2000). Salt tolerance screening of selected Australian woody species – a review. *Forest Ecol Manag.* 139: 1–19.
- Ogawa, D., Yamaguchi, K. and Nishiuchi, T. (2007). High-level overexpression of the *Arabidopsis* HsfA2 gene confers not only increased themotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *J. Exp. Bot.* 58 (12): 3373-3383.
- Ohtaa, M., Hayashia, Y., Nakashimaa, A., Hamadaa, A., Tanakaa, A., Nakamurab, T. and Hayakawa, T. (2002). Introduction of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett.* 532: 279-282.
- Owtrim, G.W. (2006). RNA helicase and abiotic stress. *Nucleic Acids Res.* 34: 3220-3230.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O. and Quintero, F.J. (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 57: 1181-1199.
- Park, E.J., Jeknic, Z., Pino, M.T., Murata, N. and Chen, T.H. (2007). Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 30: 994-1005.
- Pei, Z.M., Ward, J.M., Harper, J.F. and Schroeder, J.I. (1996). A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *EMBO J.* 15: 6564-6574.
- Penna, S. (2003). Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci.* 8 (8): 355-357.
- Perez-Alfocea, F., Balibrea, M.E., Alarcon, J.J. and Bolarin, M.C. (2000). Composition of xylem and phloem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *J. Plant Physiol.* 156: 367-374.
- Perez-Alfocea, F., Estañ, M.T., Caro, M. and Bolarin, M.C. (1993). Response of tomato cultivars to salinity. *Plant Soil*, 150: 203-211.

- Pineda, B. (2005). Análisis funcional de diversos genes relacionados con la tolerancia a la salinidad en el estrés hídrico en plantas transgénicas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, pp. 1-270.
- Qiao, W.H., Zhao, X.Y., Li, W., Luo, Y. and Zhang, S.X. (2007). Overexpression of AeNHX1, a root-specific vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Agropyron elongatum*, confers salt tolerance to *Arabidopsis* and *Festuca* plants. *Plant Cell Rep.* 26:1663-1672.
- Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol.* 133: 1755–1767.
- Rajagopal, D., Agarwal, P., Tyagi, W., Singla-Pareek, S.L., Reddy, M.K. and Sopory, S.K. (2007). *Pennisetum glaucum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter confers high level of salinity tolerance in transgenic *Brassica juncea*. *Mol. Breed.* 19: 137-151.
- Ravens, J.A. (1985). Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants - a cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytol.* 101: 25-77.
- Rodriguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1469: 1-30.
- Rohila, J.S., Jainb, R.K. and Wu, R. (2002). Genetic improvement of Basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley Hva1 cDNA. *Plant Sci.* 163 (3): 525-532.
- Romero, C., Bellés, J.M., Vayá, J.L., Serrano, R. and Culiáñez Maciá F.A. (1997). Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta.* 201 (3): 293-297.
- Rumbaugh, M.D., Pendery, B.M. and James, D.W. (1993). Variation in the salinity tolerance of strawberry clover (*Trifolium fragiferum* L.). *Plant Soil* 153: 265-271.
- Rus, A.M., Estañ, M.T., Gisbert, C., Garcia-Sogo, B., Serrano, R., Caro, M., Moreno, V. and Bolarin, M.C. (2001). Expressing the yeast HAL1 gene in tomato increases fruit yield and enhances K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selectivity under salt stress. *Plant Cell Environ.* 24: 875-880.
- Rus, AM., Lee, B.H., Munoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.K., Bressan, RA. and Hasegawa, P.M. (2004). AtHKT1 facilitates Na<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup> nutrition in planta. *Plant Physiol.* 136: 2500-2511.
- Sakamoto, A., Murata, A. and Murata, N. (1998). Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol. Biol.* 38: 1011-1019.
- Sanan-Mishra, N., Phan, X.H., Sopory, S.K. and Tuteja, N. (2005). Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 509-514.
- Sanchez, D.H., Siahpoosh, M.R., Roessner, U., Udvardi, M. and Kopka J. (2008). Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. *Physiol. Plant.* 132: 209-219.

- Santa-Cruz, A., Acosta, M., Rus, A. and Bolarin, M.C. (1999). Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 65-71.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31: 279–292.
- Seong, E.S., Cho, H.S., Choi, D., Joung, Y.H., Lim, C.K., Hur, J.H. and Wang, M.H. (2007). Tomato plants overexpressing CaKR1 enhanced tolerance to salt and oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363: 983-988.
- Serrano, R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: Toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 165: 1-52.
- Sha Valli Khan, P.S., Hoffmann, L., Renaut, R. and Hausman, F. (2007). Current initiatives in proteomics for the analysis of plant sal tolerance. *Curr. Sci.* 93: 807-817.
- Shannon, MC. Gronwald, J.W. and Tal, M. (1987). Effects of salinity on growth and accumulation of inorganic ions in cultivated and wild tomato species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 416–423
- Shi, H.Z., Lee, B.H., Wu, S.J. and Zhu, J.K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21: 81-85.
- Shi, H.Z., Xiong, L.M., Stevenson, B., Lu, T.G. and Zhu, J.K. (2002). The *Arabidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance. *Plant Cell* 14: 575-588.
- Sickler, C.M., Edwards, G.E., Kiirats, O., Gao, Z. and Loescher, W. (2007). Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Funct. Plant Biol.* 34:382–391.
- Shirasawa, K., Takabe, T., Takabe, T. and Kishitani, S. (2006). Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. *Ann. Bot.* 98: 565-571.
- Sohn, K.H., Lee, S.C., Jung, H.W., Hong, J.K. and Hwang, B.K. (2006). Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* 61: 897-915.
- Springer, P.S. (2000). Gene traps: tools for plant development and genomics. *Plant Cell* 12: 1007-1020.
- Steiner, J.J. and Banuelos, G.S. (2003). Registration of ARS NLT-SALT and ARS-NLT-SALT/B saline tolerant narrow-leaf trefoil germplasm. *Crop Sci.* 43: 1888-1889.
- Su, J. and Wu, R. (2004). Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Sci.* 166 (4): 941-948.
- Su, J., Hirji, R., Zhang, L., He, C., Selvaraj, G. and Wu, R. (2006). Evaluation of the stress-inducible production of choline oxidase in transgenic rice as a strategy for producing the stress-protectant glycine betaine. *J. Exp. Bot.* 57 (5): 1129-1135.

- Sun, Y.X., Wang, D., Bai, Y.L., Wang, N.N. and Wang, Y. (2006). Studies on the overexpression of the soybean GmNHX1 in *Lotus corniculatus*: The reduced Na<sup>+</sup> level is the basis of the increased salt tolerance. *Chinese Sci. Bull.* 51 (11): 1306-1315.
- Sunkar, R. and Zhu, J.K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2001-2019.
- Sze, H., Li, X.H. and Palmgren, M.G. (1999). Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11: 677-689
- Tester, M. and Davenport, R. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91: 503-527.
- Tian, L., Huang, C., Yu, R., Liang, R., Li, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, X. and Wu, Z. (2006). Overexpression AtNHX1 confers salt-tolerance of transgenic tall fescue. *African J. Biotechnol.* 5 (11): 1041-1044.
- Tozlu, I., Guy, C.L. and Moore, G.A. (1999). QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC1 progeny of Citrus and Poncirus under saline and non-saline environments, *Genome* 42: 1020-1029.
- Tseng, M.J., Liu, C.W. and Yiu, J.C. (2007). Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 822-833.
- Tuteja, N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymol.* 428: 419-438.
- Verma, D., Singla-Pareek, S.L., Rajagopal, D., Reddy, M.K. and Sopory, S.K. (2007). Functional validation of a novel isoform of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from *Pennisetum glaucum* for enhancing salinity tolerance in rice. *J. Biosci.* 32 (3): 621-628.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. and Zhu, J.K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45:523-539.
- Vij, S. and Tyagi, A.K. (2007). Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotech. J.* 3: 361-380.
- Villalta, I., Bernet, G.P., Carbonell, E.A. and Asins, M.J. (2007). Comparative QTL analysis of salinity tolerance in terms of fruit yield using two solanum populations of F<sub>7</sub> lines. *Theor. Appl. Genet.* 114: 1001-1017.
- Villalta, I., Reina-Sanchez, A., Cuartero, J., Carbonell, E.A. and Asins, M.J. (2005). Comparative microsatellite linkage analysis and genetic structure of two populations of E-6 lines derived from *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. cheesmanii*. *Theor. Appl. Genet.* 110: 881-894.
- Waditee, R., Bhuiyan, N.H., Hirata, E., Hibino, T., Tanaka, Y., Shikata, M. and Takabe, T. (2007). Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants. *J. Biol. Chem.* 282 (47): 34185-34193
- Wang, J., Zuo, K., Wu, W., Song, J., Sun, X., Lin, J., Li, X. and Tang, K. (2004). Expression of a novel antiporter gene from *Brassica napus* resulted in enhanced salt tolerance in transgenic tobacco plants. *Biol. Plant.* 48 (4): 509-515.

- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Wang, W.Q., Li, Y., Zhang, Y.Y., Yang, C.P., Zheng, N.Y. and Xie, Q. (2007). Comparative expression analysis of three genes from the *Arabidopsis* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (AtNHX) family in relation to abiotic stresses. *Chinese Sci. Bull.* 52 (13): 1754-1763.
- Wu, C.A., Yang, G.D., Meng, Q.W. and Zheng, C. (2004). The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol.* 45(5): 600-607.
- Wu, Y.Y., Chen, Q.J., Chen, M., Chen, J. and Wang, X.C. (2005). Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene. *Plant Sci.* 169 (1): 65-73.
- Xuea, Z.Y., Zhi, D.Y., Xue, G.P., Zhang, H., Zhao, Y.X. and Xia, G.M. (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Sci.* 167: 849–859.
- Yamaguchi, T. and Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci.* 10 (12): 615-620.
- Yang, A.F., Duan, X.G., Gu, X.F., Gao, F. and Zhang, J.R. (2005). Efficient transformation of beet (*Beta vulgaris*) and production of plants with improved salt-tolerance. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 83 (3): 259-270.
- Yeo, A.R. (1983). Salinity resistance: physiologies and prices. *Physiol. Plant.* 58: 214-222.
- Yeo, A.R. (1992). Variation and inheritance of sodium transport in rice. *Plant Soil* 146: 109-116.
- Yin, X.Y., Yang, A.F., Zhang, K.W. and Zhang, J.R. (2004). Production and analysis of transgenic maize with improved salt tolerance by the introduction of AtNHX1 gene. *Acta Bot. Sin.* 46 (7): 854-861.
- Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Pardo, J.M. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant J.* 30: 529-539.
- Zhang, H.X. and Blumwald, E. (2001). Transgenic salt tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19: 765-768.
- Zhang, H.X., Hodson, J.N., Williams, J.P. and Blumwald, E. (2001). Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (22): 12832-12836.
- Zhang, J., Nguyen, H.T. and Blum, A. (1999). Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J. Exp. Bot.* 50: 291-332.
- Zhang, Y., Wang, Z., Xu, J. (2007). Molecular mechanism of dehydrin in response to environmental stress in plant. *Progress Natural Sci.* 17 (3): 237-246.
- Zhao, F., Guo, S., Zhang, H. and Zhao, Y. (2006c). Expression of yeast SOD2 in transgenic rice results in increased salt tolerance. *Plant Sci.* 170: 216–224.

---

Zhao, F., Wang, Z., Zhang, Q., Zhao, Y. and Zhang, H. (2006a). Analysis of the physiological mechanism of salt-tolerant transgenic rice carrying a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Suaeda salsa*. J. Plant Res. 119: 95-104.

Zhao, F., Zhang, X.J., Li, P.H., Zhao, Y.X. and Zhang, H. (2006b). Co-expression of the *Suaeda salsa* SsNHX1 and *Arabidopsis* AVP1 confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single SsNHX1. Mol. Breed. 17 (4): 341-353.

Zhao, F. and Zhang, H. (2006). Salt and paraquat stress tolerance results from co-expression of the *Suaeda salsa* glutathione S-transferase and catalase in transgenic rice. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 86:349-358.

Zhao, J., Zhi, D., Xue, Z., Liu, H. and Xia, G. (2007). Enhanced salt tolerance of transgenic progeny of tall fescue (*Festuca arundinacea*) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Arabidopsis*. J. Plant Physiol. 164: 1377-1383.

Zhou, S.F., Chen, X.Y., Xue, X.N., Zhang, X.G. and Li, Y.X. (2007). Physiological and growth responses of tomato progenies harboring the betaine aldehyde dehydrogenase gene to salt stress. J. Integr. Plant Biol. 49 (5): 628-637.

Zhu, J.K. (2001). Plant salt tolerance. Trends Plant Sci. 6: 66-71.

Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 53: 247-273.





CAPÍTULO **11**

---

**RENDIMIENTO Y  
RESISTENCIA A  
SEQUÍA EN MAÍZ**

*José Luis Araus*

*Greg O. Edmeades*

*Ciro Sánchez*

*María D. Serret*



## RENDIMIENTO Y RESISTENCIA A SEQUÍA EN MAÍZ

---

José L. Araus<sup>1</sup>, Greg O. Edmeades<sup>2</sup>, Ciro Sánchez<sup>1</sup> y María D. Serret<sup>3</sup>

**1 Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), Méjico.**

*jaraus@cgiar.org, jaraus@ub.edu*

**2 Cambridge, Nueva Zelanda**

**3 Unitat de Fisiologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,  
Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, España**

---

### 11.1. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) se cultiva prácticamente en todos los países del mundo, con una producción total de cerca de 637 millones de megagramos (Mg, equivalente a toneladas) y un rendimiento promedio de 3,4 Mg por hectárea (ha); aunque muy variable entre países, desde 0.12 Mg ha<sup>-1</sup> en Botswana hasta valores por encima de 12 Mg ha<sup>-1</sup> en Chile (fuente FAO para 2002-2003). EE.UU. y China son los dos principales productores, con cerca del 60% de la producción mundial, con unos 250 y 100 millones de Mg, respectivamente.

Los rendimientos medios en las regiones tropicales y subtropicales son mucho más bajos que en las templadas, con el África subsahariana en una medida muy inferior, con rendimientos promedio por países de alrededor de 1 Mg ha<sup>-1</sup>. Esto es a pesar de que el maíz es uno de los principales cultivos en dichas regiones, donde el previsible efecto del cambio climático, aumentando la temperatura y evapotranspiración a la vez que disminuyendo precipitaciones, se espera que sea particularmente negativo (The World Bank, 2007). Los factores para esta modesta productividad son diversos: germoplasma poco mejorado, ausencia de técnicas agronómicas, y estreses bióticos y abióticos; entre los últimos la sequía.

Las posibilidades de mitigación de la sequía son limitadas. La competición por los recursos hídricos y los costes asociados a la introducción de nuevas estrategias de manejo de cultivo hacen estas vías poco prácticas, especialmente entre los agricultores de bajos recursos de los países en desarrollo. La introducción de genotipos de maíz mejor adaptados a la sequía continúa siendo la mejor alternativa. Sin embargo la mejora genética del maíz tiene diversas limitaciones metodológicas que obstaculizan su avance. Entre estas limitaciones caracterizar adecuadamente el comportamiento de los genotipos que se están evaluando, es decir realizar un correcto fenotipado, es quizás una de las más evidentes hoy en día. Por el contrario tecnologías novedosas como por ejemplo la mejora asistida por marcadores moleculares, el empleo de organismos modificados genéticamente (popularmente conocidos por transgénicos) y las distintas “ómicas” (transcriptómica, proteómica, metabolómica, etc.) concitaban todo el interés, incluso a costa de detraer financiación para la mejora convencional. Sin embargo esas nuevas tecnologías hasta el momento no han permitido incrementar el rendimiento potencial del maíz y su resistencia/tolerancia a estreses abióticos como la sequía ya que

se tratan de caracteres complejos regulados por muchos genes, todo y que por ejemplo para el caso de maíz transformado genéticamente hay alguna publicación reciente que parece abrir esperanzas (ver revisión en Bänziger y Araus 2007; Araus et al., 2008b). La identificación de los principales procesos fisiológicos relacionados con la mejora del rendimiento y la determinación de las asociaciones gen-fenotipo pueden potencialmente aumentar la eficiencia de la mejora, ya sea a través de métodos tradicionales o moleculares (Araus et al. 2003; Tollenaar y Lee, 2006). Es decir para que la mejora avance más rápidamente es necesario un enfoque multidisciplinario (Varshney et al., 2005). En este sentido un adecuado fenotipeado es necesario tanto en mejora convencional como en las diferentes alternativas potenciales que ofrece la mejora “molecular”, desde mejora asistida por marcadores hasta incluso para determinar por ejemplo que caracteres son susceptibles de transformar y como se evalúa el comportamiento de las plantas transgénicas.

## 11.2. REQUISITOS PARA UN EFICIENTE FENOTIPEADO

Un eficiente fenotipeado requiere de dos requisitos. En primer lugar, un adecuado manejo del estrés en las condiciones agronómicas en las que se evalúan los genotipos (incluida la gestión de riego y el registro agroclimático) con el fin de simular en la medida de lo posible la intensidad del estrés y su frecuencia en las condiciones más usuales a las que se enfrentara la planta. El segundo requisito es fenotipear los caracteres adecuados de la mejor forma posible (Fig. 11.1).



**Figura 11.1.** Existe una amplia diversidad genética respecto al comportamiento del maíz en condiciones de sequía: imagen de líneas puras con diferente grado de enrollamiento foliar frente a unas condiciones de sequía similares.

Los principios básicos del manejo de la sequía en programas de mejora de maíz tropical han sido descritos por Bänziger et al. (2000) y su traducción con éxito a la mejora viene ilustrado en un reciente estudio (Bänziger et al. 2006). En este capítulo trata sobre el segundo requisito, pues es dependiente de las características del cultivo que se trate. Por otra parte no se ha de olvidar que frecuentemente las condiciones de cultivo en una estación experimental (con una gestión óptima del agua y otras condiciones agronómicas) son muy diferentes de las condiciones que prevalecen en los campos de los agricultores. Para superar esta limitación en los últimos años se ha puesto énfasis en la “mejora participativa”, donde los agricultores intervienen en la selección de las variedades y por lo tanto hay implícito un fenotipeado. (Bänziger et al. 2000 y Sawkins et al. 2006)

### 11.2.1. ¿Mejora empírica versus mejora analítica: por qué fenotipar por caracteres secundarios?

El rendimiento de grano y su respuesta al estrés son rasgos muy complejos que implican una interacción a largo plazo (durante el ciclo de cultivo) de diferentes escalas de complejidad de la planta (desde el nivel molecular hasta el de dosel vegetal). La denominada mejora empírica, que se basa en la selección directamente por el rendimiento, ha tenido un éxito limitado para condiciones de sequía, debido a las interacciones genotipo x ambiente de diferente naturaleza que provoca una baja heredabilidad del rendimiento (ver Cap. 5 en este libro). Como alternativa la denominada mejora analítica consiste en el uso de caracteres secundarios que permitan ya sea complementar la selección fenotípica o eventualmente reemplazar la selección basada en el rendimiento como único rasgo fenotípico. La mejora analítica puede aumentar la respuesta de la selección ya que la heredabilidad de algunos caracteres secundarios es mayor que la del rendimiento, además de que exhiben suficiente variabilidad genética y están genéticamente correlacionados con el rendimiento (Tabla 11.1). En la práctica muchos mejoradores emplean en su selección caracteres secundarios junto con el del rendimiento. De hecho el concepto de “ideotipo”, o planta ideal que se debería de seleccionar, manejado tradicionalmente por los mejoradores integra de facto caracteres secundarios. En un esquema de mejora puramente analítico el concepto de ideotipo sería sustituido por un índice de selección formulado sobre la base de ajustar la importancia de los diferentes caracteres secundarios fenotipados (basada en su contribución al rendimiento o la adaptación genotípica. Sin embargo el índice de selección aún tiene un importante sesgo empírico relacionado con el peso asignado a cada uno de los rasgos fenotípicos. La evolución de este concepto consistiría en integrar los diferentes datos fenotípicos en un modelo de simulación de cultivo. Los modelos pueden ayudar a una gestión más eficiente del fenotipado. Sin embargo los modelos disponibles en la actualidad no están todavía lo suficientemente desarrollados para predecir de manera fiable las diferencias en rendimiento entre genotipos.

**Tabla 11.1.** Heredabilidad en sentido amplio para diferentes caracteres morfofisiológicos (o secundarios) y correlaciones genéticas entre rendimiento de grano y estos caracteres secundarios medidos bajo estrés hídrico severo en progenies S1 de diferentes poblaciones de maíz. Como punto de comparación la heredabilidad de rendimiento de grano fue  $0.43 \pm 0.10$  y los rendimientos de grano en las condiciones del los ensayos promediaron un 14% de los rendimientos alcanzados en condiciones de ausencia de estrés hídrico. Modificado de Bolaños y Edmeades (1996) y Edmeades *et al.* (2000a, b). † Carácter observado bajo buenas condiciones de riego ‡ medido en progenies S<sub>2</sub> o S<sub>3</sub> bajo condiciones de estrés severo.

	Nº trials	Heritability under stress	Genotypic correlation
Ears/plant	9	0,54±0,08	0,90 ± 0,14
Kernels/ear	8	0,39 ± 0,13	0,71 ± 0,22
Kernels/plant	8	0,47 ± 0,08	0,86 ± 0,15
kernel/weight	9	0,43 ± 0,14	0,14 ± 0,17
Days to anthesis	9	0,72 ± 0,08	-0,58 ± 0,12
ASI	8	0,51 ± 0,12	-0,60 ± 0,24
Leaf rolling score	9	0,52 ± 0,09	-0,03 ± 0,15
Leaf erectness score	1	0,74 ± 0,07	-0,28 ± 0,19
Leaf senescence score	9	0,54 ± 0,08	0,14 ± 0,15
Canopy temperature	4	0,25 ± 0,05	-0,20 ± 0,15
Tassel branch number	1	0,82 ± 0,04+	0,15+

### 11.3. ¿QUÉ CARACTERES SON IMPORTANTES PARA FENOTIPEAR?

Existen dos vías para evaluar cuáles son los rasgos fenotípicos que pueden aumentar la eficiencia de la mejora genética (Araus *et al.* 2002). El primero consiste en estudios retrospectivos, mientras que el segundo enfoque implica la formulación de rendimiento como la combinación de distintos procesos, como por ejemplo componentes del rendimiento agronómicos o fisiológicos, que (en teoría) son independientes entre ellos.

#### 11.3.1. Estudios retrospectivos

Las contribuciones a la mejora del rendimiento de grano en maíz atribuibles a la mejora se pueden inferir a partir de estudios en los que se comparan bajo las mismas condiciones de cultivo híbridos y variedades de polinización abierta producidos en diferentes épocas (Tollenaar y Lee 2006). El rendimiento de grano en los EE.UU. ha aumentado alrededor de 100 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> durante los 70 años que han transcurrido desde el inicio de la adopción a gran escala de híbridos a fines de la década de los 30 del siglo XX hasta el presente. Alrededor del 75% de este aumento en el rendimiento se ha atribuido a la mejora genética y el resto a la mejora de las prácticas agronómicas. La ganancia genética no estaba asociada con un aumento en la heterosis o vigor híbrido, sino más bien con una mayor tolerancia a los estreses (Duvick 1999; Tollenaar *et al.* 2000). Dos procesos fisiológicos parecen estar involucrados: (i) mantener la fotosíntesis de la hoja durante el llenado de los granos, lo cual contribuye al aumento en la acumulación de materia seca, (ii) un aumento en el número de granos, debido a una mayor aporte de asimilados a la inflorescencia femenina durante el período en que se determina este componente del rendimiento. Como consecuencia la ganancia genética no está asociada con un cambio en el índice de cosecha, porque el aumento en el número de granos y en la acumulación de materia seca durante el período de llenado del grano son proporcionales (Tollemar y Lee 2006). La mayor acumulación de biomasa en los híbridos más recientes comparados con los más antiguos parece ser debido, en parte, a una mayor duración del período de llenado del grano en los recientes (Tollenaar y Lee 2006).

Por otra parte hay evidencias de que los nuevos híbridos de maíz toleran mejor una baja disponibilidad de recursos como agua y fertilizantes, lo que parece estar relacionado con el hecho de que estos genotipos se han seleccionado para tolerar una alta densidad de plantas condiciones en las cuales es más fácil que se produzca déficit de agua (Tollenaar y Wu, 1999; Tollemar y Lee 2006). En condiciones de sequía el intervalo entre la floración masculina y femenina (expresado en inglés con el acrónimo ASI, de las siglas anthesis-to-silking interval<sup>1</sup>) ha disminuido en los híbridos modernos, mientras que la selección posiblemente ha comportado un aumento en el crecimiento de las espiguillas de la inflorescencia femenina o futura mazorca, aunque su número final haya disminuido (Bänziger *et al.* 2000). Además la reducción de la tasa de senescencia de hojas durante el llenado del grano (fenómeno denominado “stay-green” en inglés) ha sido uno de los rasgos visibles que más diferencian los híbridos modernos de los antiguos (Duvick *et al.* 2004). Cambios en rasgos constitutivos como la fenología de planta parece que también juegan un papel en la diferente respuesta de híbridos modernos y antiguos a la limitación de recursos. Así los híbridos más antiguos sufrían una mayor pérdida de rendimiento a elevadas densidades de siembra porque habían extraído la mayor parte de agua disponible para la planta antes de entrar al período crítico de floración (Nissanka *et al.* 1997; Campos *et al.* 2004).

---

<sup>1</sup> o intervalo entre la antesis o floración masculina, caracterizada por la producción de polen e las anteras de la inflorescencia masculina y la aparición de los estilos que marca el inicio de la floración femenina en la mazorca en formación.

En híbridos de maíz templado también se ha producido una reducción significativa en el tamaño de la inflorescencia masculina o panícula (Duvick y Cassman 1999). Sin embargo en el maíz tropical la selección por un mayor rendimiento de grano no ha llevado aparejada una reducción importante en la panícula. Esto puede afectar negativamente al desarrollo de la mazorca y de sus estilos cuando la disponibilidad de fotoasimilados está limitada por la sequía (Ribaut *et al.* 2004; Sawkins *et al.* 2006).

Resumiendo los estudios retrospectivos muestran una elevada interacción híbrido x ambiente (Gx E) entendido este último como cambios en la densidad de siembra. Esta interacción GxE podría ser la consecuencia de que los nuevos híbridos poseen (i) mayor potencial genético de rendimiento (ii) más capacidad tolerar una baja disponibilidad de recursos, y (iii) mayor tolerancia a los estreses (Tollemar y Lee 2006 ).

Sin embargo la producción de híbridos en los pasados 70 años se ha basado en el empleo de unas pocas líneas puras y por ejemplo menos del 5% del germoplasma de maíz disponible a nivel mundial ha sido utilizado por los mejoradores de EE.UU (Taba *et al.* 2004). Aunque la base genética de los híbridos de maíz está aumentando de forma acelerada en los últimos años con la introgresión de germoplasma exótico (Goodman 1998), esta estrecha base genética sugiere que existe una amplia variabilidad genética por explorar y que es necesario a este respecto disponer de las herramientas de genotipado y en particular fenotipado adecuadas junto a un conocimiento mas profundo de los mecanismos fisiológicos y moleculares asociados tanto al rendimiento potencial como a la adaptación a la sequía.

### 11.3.2. Determinantes primarios del rendimiento de grano y de la adaptación a la sequía

El rendimiento de grano se puede expresar como la respuesta integrada de los diferentes procesos de la planta a una limitación de los recursos, como por ejemplo el agua o la radiación. Dos son los pasos principales que determinan el rendimiento: (i) la producción de fotoasimilados, que depende de la captación del recurso limitante (ej. radiación, agua, nitrógeno, etc.) y de la eficiencia con la que lo emplea la planta y (ii) la ulterior transformación de estos fotoasimilados en la fracción del cultivo que se cosecha (es decir que tiene un interés económico). Un factor adicional a considerar es la etapa fenológica de la planta cuando la limitación de recursos tiene lugar. A continuación se exponen diferentes ejemplos con la radiación o el agua como elementos limitantes del rendimiento. En paréntesis se muestran valores típicos para maíz.

#### 11.3.2.1. Rendimiento limitado por la radiación

Rendimiento de grano (GY, del inglés "grain yield") puede considerarse el producto de la identidad:

$$GY = RAD * \%RI * GLD * RUE * HI \quad [1]$$

donde:

RAD = radiación incidente diaria (por ejemplo, 20 MJ m<sup>-2</sup>)

%RI= porcentaje de la radiación incidente interceptada a lo largo del ciclo del cultivo (ej., 50%)

GLD= duración del área verde ("green leaf duration") de la hoja (ej. 100 días)

RUE = eficiencia en el empleo de la radiación (“radiation use efficiency”), (ej. 1.5 g MJ<sup>-1</sup>)

HI = índice de cosecha (“harvest index”) o cociente entre la parte cosechada (los granos en el caso del maíz) y el peso de toda la parte aérea, tomado como 0.45 (el valor medio para el rango normal en buenas condiciones de riego entre 0.4 -0.55).

Así GY = [20 \* 0.5 \* 120 \* 1.5] \* 0.45 = 810 g m<sup>2</sup> o 8.1 Mg ha<sup>-1</sup>

La tasa de acumulación de biomasa (o materia seca) por el cultivo es la resultante de la intercepción y la utilización de la radiación solar incidente. Una mayor acumulación de materia seca puede ser debidas a un aumento de la intercepción de luz a causa de (i) que el cultivo alcance un índice de área foliar<sup>2</sup> máximo más elevado o (ii) que las hojas envejeczan más lentamente (atributo “stay green”) durante llenado de los granos. El aumento de materia seca también puede deberse a mayor eficiencia en el empleo de la radiación interceptada por el dosel debido a (iii) que las hojas están dispuestas de manera mas vertical por lo que la luz se reparte de manera mas uniforme a lo largo del dosel vegetal y (iv) que una menor senescencia permite que las hojas mantengan mayores tasas fotosintéticas durante el llenado de los grano (Tollenaar y Lee 2006).

El rendimiento de grano puede reducirse por los efectos de la sequía en cada uno de los componentes de la identidad (Andrade *et al.*, 1996, 2002). La sequía durante el establecimiento de plantas puede reducir la germinación, mientras que el estrés hídrico durante la expansión de las hojas reduce el área foliar y por consiguiente la intercepción de radiación (% RI). Más adelante en el ciclo de la planta la sequía puede acortar la duración activa del área foliar (GLD) a causa de una senescencia acelerada a la vez que disminuir la eficiencia en el uso de la radiación (RUE) por un efecto directo en la fotosíntesis (Dwyer *et al.*, 1992). Además la sequía puede tener efectos directos sobre el índice de cosecha (HI) al inducir esterilidad de flores, aborto de granos o un llenado del grano deficiente.

### 11.3.2.2. Rendimiento limitado por el agua

Passioura (1977) propuso considerar el rendimiento de grano en condiciones de agua limitante como:

$$GY = W * WUE * HI \quad [2]$$

Donde:

W = agua (“water”) transpirada por el cultivo (ej. 400 mm)

WUE = eficiencia en el uso del agua (“water use efficiency”), biomasa por unidad de agua transpirada (ej. 4.5 g m<sup>-2</sup> mm<sup>-1</sup>)

Así: GY = [400 \* 4.5] \* 0.45 = 810 g m<sup>2</sup>, o 8.1 Mg ha<sup>-1</sup>

En el mismo sentido Blum (2006) resumió los cuatro factores principales responsables de que un cultivar adaptado a condiciones de sequía funcione mejor:

---

<sup>2</sup> LAI en inglés, acrónimo de “leaf area index”, el cociente entre la superficie foliar de las plantas y la del suelo donde crecen.



- Captura más agua del suelo. Si existe humedad en capas profundas del suelo, los cultivos con sistema radicular más profundo tendrán ventaja (Lorens *et al.*, 1987).
- Economiza el uso del agua
- Mantiene las células hidratadas
- Utiliza las reservas de asimilados del tallo para el llenado de los granos bajo condiciones de estrés (aunque esta característica es tal vez menos aplicable al maíz que a otros cereales como trigo, cebada, etc.).

Como se ha apuntado arriba la sequía puede tener un efecto directo sobre el índice de cosecha (HI). Esto es especialmente importante en maíz; más incluso que en otros cereales como trigo, cebada o incluso arroz, debido a su carácter de planta alógama. En este sentido el maíz es particularmente sensible al estrés hídrico durante el periodo de floración y frecuentemente el número de granos producidos por planta, más que el peso del grano, es el principal componente agronómico afectado por la sequía. Este aspecto se desarrolla más adelante en el capítulo.

#### **11.3.2.3. Establecimiento de las plántulas y crecimiento anterior a la floración**

Un requisito para un elevado rendimiento es que el cultivo presente una densidad de plantas adecuada. Si la sequía reduce severamente la densidad de plantas al inicio del cultivo los agricultores pueden sembrar con variedades de ciclo más corto, o con un cultivo diferente, aunque siempre a expensas de un coste adicional. Sin embargo no parece que la mejora pueda proporcionar una alternativa clara. Por ejemplo selección recurrente en plántulas sometidas a estrés hídrico en campo sólo obtuvo aumentos modestos en las tasas de supervivencia (Bänziger *et al.*, 1997). Si el estrés tiene lugar durante el periodo de alargamiento del tallo anterior a la floración, la planta sufre una reducción significativa en su altura, en el área foliar por planta y en el rendimiento de grano, aunque el índice de cosecha aumenta en varios puntos porcentuales (Moser *et al.*, 2006). Por otra parte un estrés prefloración también puede afectar el número potencial de granos de la mazorca, lo que causa una disminución en el número de granos por planta. Sin embargo los genotipos que muestran tolerancia a la sequía durante la floración no son necesariamente los más tolerantes a las fases anteriores a la floración. Por otro lado un vigor temprano (es decir plántulas con un mayor crecimiento), una expresión general de la heterosis, es beneficioso por razones que pueden estar relacionados con la reducción de la evaporación en favor de la transpiración, por lo tanto con una mayor eficiencia en el uso del agua.

#### **11.3.2.4. Floración**

Si la sequía ocurre cuando ya no es posible la resiembra puede causar una pérdida total del cultivo. Así el rendimiento de maíz se reduce del doble al triple cuando el déficit de agua coincide con la floración, en comparación con otros estados de desarrollo (Shaw, 1977; Grant *et al.*, 1989). El maíz se considera más susceptible que otros cultivos a la sequía debido a (i) que desarrolla de manera casi sincrónica sus flores, por lo general en una sola inflorescencia femenina (la futura mazorca) por planta, y (ii) a que la separación física de sus flores masculinas y femeninas en planta, unido frecuentemente a una separación temporal de las floraciones, hace que tanto el polen como las sedas (forma común de referirse a los estilos) estén más expuestos a las condiciones ambientales adversas. Las espiguillas que crecen rápidamente es más fácil que produzcan semilla; un indicador de ello es la rápida extrusión de los estilos. Puesto que la fecha en que se

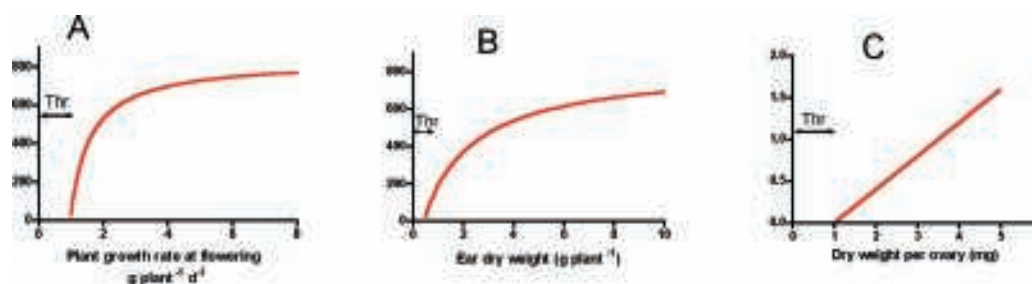
produce la antesis (o floración masculina) está poco afectada por la sequía, pero no así la floración femenina, un crecimiento lento de los estilos de las inflorescencias femeninas comporta un largo ASI; rasgo que es fácilmente evaluable por los mejoradores y que además está caracterizado por poseer una elevada heredabilidad, normalmente superior a la del rendimiento, y una correlación genética con el rendimiento también elevada (Tabla 11.1). Un largo ASI es un indicador externo de una menor partición de asimilados hacia la inflorescencia femenina en formación (asociada a la sequía u otro estrés) lo que resulta en una lenta tasa de crecimiento de las espiguillas (Edmeades *et al.*, 2000b; Monneveux *et al.*, 2006). Plantas con un ASI elevado en condiciones de sequía son a menudo estériles, o tienen pocos granos por mazorca (Fig. 11.2). El rendimiento en grano de maíz sometido a un estrés hídrico severo durante la floración está altamente correlacionado con el número de granos por planta y también bastante fuertemente con ASI (Tabla 11.1; Bolaños y Edmeades, 1996). El número de granos por planta en condiciones de déficit hídrico parece que depende directamente de flujo de fotoasimilados producidos durante un periodo de dos semanas alrededor de la floración (Schussler y Westgate, 1995; Westgate 2000). Aparentemente las reservas de asimilados acumulados antes de la floración no son atraídas por la inflorescencia femenina en formación; una causa podría radicar en una inhibición del metabolismo de los carbohidratos en los ovarios causado por el estrés hídrico, lo que debilitaría la “fuerza” de la inflorescencia femenina como sumidero o receptor de asimilados (Zinselmeier *et al.*, 1995; Westgate, 1997; Saini y Lalonde, 1998). Cuando el flujo de asimilados por planta se reduce por manipulación (ej. eliminación de hojas) parece que el crecimiento de la inflorescencia masculina (o panícula) se ve favorecido sobre el de la femenina (Edmeades *et al.* 2000a) y lo mismo parece ocurrir en condiciones de sequía (Bolaños y Edmeades 1993) con el resultado de aumentar el ASI. Como resultado la etapa crítica en la determinación de HI parece tener lugar durante los 10-15 d anteriores y posteriores a la floración.



**Figura 11.2.** Dos líneas puras con diferente cuajado de grano bajo condiciones de estrés. La sequía durante el periodo previo a la floración afecta negativamente al cuajado de los granos y por lo tanto al número final de granos por mazorca y planta. Existe una amplia variabilidad genética para este carácter, aunque de manera general las líneas son mucho más sensibles que los híbridos.

Una emergencia acelerada y un corto ASI parecen ser manifestaciones de una partición acelerada de asimilados a la espiga en desarrollo y una mayor tasa de crecimiento de la misma. Los umbrales pueden ser importantes. Si el flujo de asimilados hacia la espiga disminuye por debajo de un límite (Fig. 11.3a), la pauta normal de la floración femenina se altera y la espiga abortará

completamente o producirá 30 a 50 granos distribuidos aleatoriamente sobre el raquis (Edmeades et al., 2000b). Otro umbral puede ser el del peso seco de la espiga necesario para generar crecimiento de los estilos (Fig. 11.3b). También existe la posibilidad de que exista un umbral de peso seco o de tasa de crecimiento de cada ovario que se ha de alcanzar antes de que el crecimiento de los estilos se inicie (Fig. 11.3c). Los métodos morfométricos no destructivos para estimar estos umbrales de crecimiento reproductor versus la tasa de crecimiento de la planta y los umbrales del cuajado de los granos respecto al crecimiento de la espiga han sido descritos para maíz por Vega et al. (2001a, b) y se encuentran resumidos con cierto detalle en Araus et al. (2008a).



**Figura 11.3.** Umbral teórico para el crecimiento de la espiga: A: número de granos versus tasa de crecimiento de la planta; B: número de estilos (silks) respecto al peso seco de la espiga; C: peso seco de los estilos respecto al peso seco de los ovarios.

#### 11.3.2.5. Llenado del grano y senescencia retrasada (Stay-Green)

A diferencia de lo que ocurre alrededor de la floración, una vez que los granos entran en una fase lineal de acumulación de biomasa, ellos son capaces de desarrollar suficiente “fuerza” como sumidero para removilizar las reservas de carbono de la planta. Esta fuerza como sumidero junto a una actividad fotosintética mantenida durante el llenado del grano determina el peso final del grano.

En este sentido el mantenimiento de un dosel fotosintéticamente funcional durante el llenado del grano junto con la capacidad para removilizar los carbohidratos almacenados en el tallo y en las glumas (denominadas “husk” en inglés) contribuyen a que el rendimiento se mantenga elevado aun en condiciones de sequía terminal (es decir, aquella que ocurre al final del ciclo de la planta). Sin embargo la relación entre una senescencia foliar retrasada (comúnmente denominada en inglés “staygreen”) y el rendimiento a menudo son débiles (Bolaños y Edmeades, 1996). Las razones para ello hay que buscarlas en el balance de N del cultivo en esa etapa de crecimiento. La selección para producir más granos por planta probablemente aumentará la demanda interna de N, y dado que la absorción de N de un suelo seco es baja, esto puede resultar en que el nitrógeno para los granos tenga que provenir de las hojas (proceso que aceleraría la senescencia de las mismas y que por otra parte se podría ver dificultado por la naturaleza “stay green” de la planta). Resumiendo, la insuficiente disponibilidad de nitrógeno durante el llenado del grano podría contrarrestar las mejoras asociadas a una selección por senescencia retrasada (Chapman y Edmeades, 1999). Así pues, tanto el “stay green” como el número total de semillas por planta están afectados por las eficiencias en la absorción y uso del nitrógeno por la planta (Gallais y Hirel, 2004).

En este sentido en el transcurso de los últimos 50 años de mejora en el “Cinturón de Maíz” (Corn Belt) norteamericano el carácter de senescencia retrasada se ha hecho mucho más evidente para cultivos en ausencia de estrés que para los sometidos a condiciones de sequía terminal (Duvick 2005). Sin embargo, se ha identificado un QTL (“quantitative trait loci”) en el sorgo que permite seleccionar por una senescencia retrasada en sequía (Harris *et al.*, 2007), lo que permite albergar esperanzas de que también se pueden identificar QTL para maíz en condiciones de sequía moderada. Además en condiciones de sequía, el retraso de la senescencia durante postanthesis a veces pueden ir acompañado por un mejor estado hídrico de la hojas, como es el caso del sorgo con senescencia retrasada (Xu *et al.*, 2000). Sin embargo tal como se señala arriba en maíz, el carácter “stay green” parece estar más asociado con un mayor rendimiento (Ma y Dwyer, 1998), probablemente debido a factores relacionados con el uso del nitrógeno más que a causa de un efecto en el estado hídrico de la planta (Blum 2006).

El factor metabólico que más influye en la eficiencia del uso de nitrógeno es la glutamina sintetasa (Hirel *et al.*, 2007). Otros factores que pueden afectar el “stay-green” son los reguladores de crecimiento. Así, el aumento de la cantidad de citoquininas endógenas (Ori *et al.*, 1999) o la reducción en la producción de etileno conducen a un retraso en la senescencia (John *et al.*, 1995). El etileno parece reducir el número de granos, al menos en trigo (Hays *et al.* 2007).

#### 11.4. REQUISITOS QUE HAN DE CUMPLIR LOS CARACTERES DE SELECCIÓN

Para que un carácter de selección secundario pueda ser útil en un programa de mejora de cultivos tiene que cumplir una serie de requisitos (Araus *et al.*, 2002; Lafitte *et al.*, 2003):

- 1. Estar correlacionado genéticamente con el rendimiento de grano en las condiciones agroecológicas para donde se esté seleccionado el genotipo.
- 2. Debería de estar menos afectado por el ambiente que el rendimiento de grano. Es decir debería de tener una mayor heredabilidad que el rendimiento y por lo tanto menor interacción G x E.
- 3. Debe existir suficiente variabilidad genética para el carácter a seleccionar.
- 4. En el caso de caracteres para mejora en ambientes con estrés, este carácter no debe limitar el rendimiento potencial (es decir el alcanzado en ausencia de estrés).
- 5. Debe ser posible medir el carácter de manera rápida y fiable a la vez que más económica que el rendimiento.
- 6. Tiene que ser posible evaluarlo en plantas individuales o en parcelas muy pequeñas, preferiblemente de manera no destructiva.

La mayoría de los rasgos o caracteres que se han incorporado con éxito en programas de mejora son “integradores”, ya sea en el tiempo (reflejando las actividades fisiológicas de la planta a través del ciclo de cultivo), o en el nivel de organización (es decir a nivel de planta entera, o incluso mejor del dosel o comunidad vegetal), o en ambas (Araus *et al.*, 2002). En esa categoría podemos incluir caracteres fenológicos (ya sean constitutivos o inducidos por el estrés) que afectan el índice de cosecha (como la fechas de floración masculina o femenina y el ASI) o la absorción de energía (por ejemplo el “stay-green”), así como otros rasgos relacionados con el estado hídrico de la planta (por ejemplo la transpiración y la conductancia estomática).

## 11.5. CARACTERES DE SELECCIÓN Y METODOLOGÍAS DISPONIBLES

### 11.5.1. Índice de cosecha

#### 11.5.1.1. ASI breve

Bolaños y Edmeades (1996) encontraron que caracteres reproductivos relacionados con el índice de cosecha, como el "ASI" explicaban mucho más de la variación de rendimiento que los caracteres relacionados con el estado hídrico, el agua usada y su eficiencia como por ejemplo la tasa de expansión foliar, la temperatura de la hoja o del dosel, el enrollamiento (Fig. 11.1) y el grado de senescencia de la hoja. De hecho el ASI es uno de los pocos ejemplos de carácter secundario (es decir diferente que el rendimiento el cual es por definición el carácter primario) ampliamente utilizado para la selección de maíz en sequía. Este criterio de selección fue desarrollado por el CIMMYT (Bolaños *et al.* 1993; Bolaños y Edmeades, 1996). ASI es un excelente carácter secundario, ya que suele estar correlacionado negativamente con el rendimiento de grano y tiene una heredabilidad relativamente alta, además de otros requisitos indicados más arriba (Tabla 11.1). Sin embargo un ASI corto ya ha sido incorporado en el acervo genético de las nuevas variedades, lo que significa que el fenotipeado para otros caracteres cada vez adquiere más importancia.

Por otra parte el empleo del ASI en la selección tiene otras limitaciones. Por ejemplo el ASI alcanza su mayor valor para la selección cuando es superior a 3 días, mientras valores de ASI entre 5-8 días no tienen mejores heredabilidades que ASIs más cortos, de 3 días. (Bolaños y Edmeades, 1996). Por otra parte el ASI es tedioso de medir en el campo. Es probablemente más económico registrar el nivel de esterilidad de la mazorca al momento de la cosecha, siempre que el estrés en la floración haya sido lo suficientemente severo como para inducir esterilidad en alrededor del 20% de las plantas. Sin embargo medir el ASI tiene la ventaja de poder predecir el rendimiento con suficiente antelación para poder programar cruza y polinizaciones.

#### 11.5.1.2. Caracteres fotosintéticos que afectan el peso de los granos

Además de medir directamente el rendimiento y sus componentes agronómicos (mazorcas por planta, granos por mazorca y peso de 100 granos), se pueden medir otros caracteres indirectos que proporcionan información de la actividad de la fuente (los órganos fotosintéticos) o de las actividades de almacenamiento de asimilados en el sumidero.

**"Staygreen"**. Se suele evaluar sobre una escala de 0-9, donde cada unidad se refiere al 10% del área foliar evaluada visualmente que es verde (o marrón) en ese momento. Las puntuaciones se suelen asignar generalmente por parcela a partir de que se aprecian diferencias en senescencia foliar de 2-3 unidades entre las parcelas. Por lo general se repite las mediciones cada 7-10 días hasta que las hojas de alrededor del 10% de los genotipos están totalmente senescentes.

Removilización de las reservas del tallo. El llenado de los granos podría continuar en ausencia de hojas verdes si los asimilados almacenados en el tallo y las glumas se pudiesen removilizar a la mazorca en desarrollo. El maíz pierde una cantidad significativa de peso seco de estos dos órganos durante llenado de grano. Evaluar cuan estable permanece el peso de los granos en plantas sometidas a defoliación es la manera más económica de estimar la capacidad de compensar a través de removilización una menor fotosíntesis durante el llenado del grano. Sin embargo variedades de maíz más altas con volúmenes mayores de tallo no fueron más efectivas en mantener el peso de los granos que sus homólogas más cortas en condiciones de defoliación durante el llenado del grano (Edmeades y Lafitte, 1993).

Existe una lista de otros potenciales caracteres que pueden servir para seleccionar por un mejor cuajado y posterior llenado de los granos, y por tanto una mayor estabilidad del rendimiento. Por ejemplo el número de estilos que emergen de la mazorca en formación en condiciones de estrés respecto a condiciones de no estrés o la tasa de aborto de granos en los primeros 5 días después de la polinización. Sin embargo esos parámetros son tediosos de medir por lo que es importante considerar el coste/ beneficio antes de acometer su medida.

### 11.5.1.3. Estatus hídrico

El estado hídrico del cultivo se puede evaluar a través de su transpiración foliar (que es el agua utilizada por la hoja) o de la planta entera. La razón es muy simple: cuanto mejor es el estado hídrico de la planta más transpirará la planta. Existen diferentes metodologías que permiten evaluar indirectamente la transpiración. La transpiración se puede descomponer en dos componentes. Uno de ellos es la conductancia foliar (en su mayor parte determinada por el grado de abertura de los estomas -la conductancia estomática-  $g_s$ ) la cual depende esencialmente del estado hídrico de la planta. El segundo componente es la demanda evapotranspirativa (que depende de variables ambientales tales como la temperatura, humedad relativa y viento). Así la  $g_s$  se puede utilizar para la detección del estado hídrico en el maíz (Sanguineti *et al.* 1999). En la actualidad existe en el mercado porómetros de costo relativamente bajo (menos de 3000 euros) y fáciles de manejar como el "Decagon Leaf Porometer SC-1" o el "Delta-T AP4". Estos porómetros foliares permiten medir de manera rápida (20-30 s) la conductancia estomática (Fig. 11.4). Aún así a menos que se utilicen varios porómetros simultáneamente esta metodología es poco práctica para la evaluación a gran escala.

Por otra parte la transpiración lleva aparejado un descenso de temperatura. Así pues el dosel vegetal si transpira puede estar siempre a menor temperatura que el aire circundante, mientras que si hay sequía al no poder transpirar puede estar a mayor temperatura que el aire circundante. Las mediciones se pueden llevar a cabo a distancia (sin necesidad de tocar las hojas) utilizando termómetros de infrarrojos (Fig. 11.4), que son dispositivos baratos (unos pocos cientos de euros). Son de uso frecuente en los cultivos con cubiertas homogéneas, siempre que cubran completamente el suelo (Reynolds *et al.* 2001), las condiciones atmosféricas sean adecuadas (días soleados, sin viento y con una elevada demanda evapotranspirativa). En maíz también se ha medido la temperatura del dosel (Sadler *et al.* 2000; Wanjura y Upchurch 2000). Sin embargo las características de la planta la hacen poco práctica para medir la temperatura en el dosel; mientras es relativamente fácil hacerlo en hojas individuales (Sanguineti *et al.*, 1999; O'Neill *et al.* 2006), siempre que estén expuestas al sol con un ángulo similar.





**Figura 11.4.** Diferentes equipos portátiles que permiten evaluar de manera relativamente rápida, sencilla y económica el crecimiento, fenología y estado hídrico de la planta: espectroradiómetro con sensor activo que mide NDVI (arriba izquierda), medidor foliar de contenido en clorofila (arriba derecha), porómetro, para medir conductancia estomática de la hoja (abajo izquierda) y “pistola” de infrarrojos (abajo-derecha) para medir la temperatura de la cubierta vegetal.

*Composición isotópica de oxígeno* La composición de isótopos estables ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) medidos en planta se ha utilizado como criterio de selección para condiciones de sequía en trigo y otras plantas con metabolismo fotosintético C3. Sin embargo en maíz, su metabolismo C4 impide la utilización de  $\delta^{13}\text{C}$  como herramienta de cribado (Monneveux et al. 2008). La composición de isótopos estables ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) de oxígeno ( $\delta^{18}\text{O}$ ) en la materia orgánica de la planta puede ser una alternativa. Como la materia orgánica de la planta “registra” en su  $\delta^{18}\text{O}$  las condiciones de evaporación en la hoja, la medición del enriquecimiento de  $^{18}\text{O}$  de dicha materia vegetal en comparación con la fuente de agua puede proporcionar una herramienta de gran alcance para los mejoradores de plantas (Barbour 2007). Barbour et al., (2000) han demostrado para trigo en condiciones de campo que el  $\delta^{18}\text{O}$  tanto de la materia seca de la hoja como de la celulosa presenta una fuerte correlación negativa tanto con el valor medio a lo largo del cultivo de  $g_s$  y con el rendimiento de grano de trigo. Sorprendentemente no existen trabajos publicados en maíz, aunque si en otros cultivos. “Sin embargo, y más allá de algunos resultados contradictorios (Sheshshayee et al. 2005), que todavía tienen que ser aclarados, aspectos prácticos como el elevado coste de los análisis son los responsables de que esta metodología no esté adaptada como herramienta de fenotipado. En este contexto se pueden utilizar otros sustitutos que permiten reflejar de manera integrada (en el tiempo) la transpiración, como por ejemplo el contenido total de minerales acumulado en los órganos transpiradores. Para cultivos como el trigo y la cebada existe una fuerte correlación positiva entre el contenido de cenizas y el rendimiento (Araus et al., 1998; Voltas et al. 1998).

### 11.5.2. Crecimiento de la planta, senescencia y otras características: técnicas espectroradiométricas

El fenotipado extensivo de diferentes caracteres en ensayos de campo de grandes dimensiones puede resultar muy caro. En este sentido las técnicas espectroradiométricas permiten la evaluación rápida y no destructiva de diferentes características de la plantas, lo que las hacen adecuadas para evaluación en gran escala de genotipos de maíz en ensayos multilocales en campo (Aparicio *et al.* 2000; Araus *et al.* 2001; Babar *et al.* 2006). El uso más común de estos índices es para la evaluación del contenido de clorofila y características relacionadas (como el contenido de nitrógeno, y la cantidad superficie verde de la planta). Estas estimaciones se basan en los cambio de la luz absorbida en el visible (400-700 nm de longitud de onda, donde absorben los pigmentos fotosintéticos como la clorofila y los carotenoides) frente a las banda de infrarrojo cercano (700-1000 nm) del espectro. El mismo principio técnico se usa para evaluar las plantas a diferentes niveles de organización (Fig. 11.4): de la hoja (utilizando por ejemplo el "SPAD" un medidor portátil de clorofila que trabaja utilizando los cambios en el espectro de la luz transmitida a través de la hoja) pasando por el dosel vegetal (mediante el empleo espectroradiómetros portátiles para trabajar en campo) que miden los cambios en el espectro de la luz reflejada respecto a la incidente (lo que permite calcular índices de vegetación). Uno de los índices de vegetación más comunes es el índice normalizado de diferencia de vegetación (de las siglas en inglés "Normalized Difference Vegetation Index o NDVI") que miden los cambios relativos en el espectro del rojo e infrarrojos cercanos debidos a la presencia del dosel vegetal. Este (y otros índices similares como el Cociente Simple, o SR de las siglas en inglés Single Ratio) se emplearon inicialmente en cultivos para el manejo de la fertilización nitrogenada. Sin embargo también se pueden emplear en mejora ya que permiten evaluar características de los cultivos como el vigor temprano o el "stay green" en maíz. Otras aplicaciones de los índices de vegetación puede ser su empleo como "covariable" a la hora de analizar el rendimiento en los ensayos de mejora, ya que permitiría disminuir el error asociados a un deficiente manejo agronómico de los ensayos, por ejemplo, diferencias en biomasa asociadas a una emergencia de la planta deficiente (Bänziger, comunicación personal). Además de los índices de vegetación, existen otros índices espectrales que permiten evaluar rasgos relacionados con la eficiencia fotosintética y el contenido hídrico de los tejidos de la planta. Los principales índices de reflectancia espectral de posible utilidad en programas de mejoramiento están resumidos en Araus *et al.* (2001). Además el reciente desarrollo de nuevos índices como las nuevas formulaciones de Índice Hídrico (del inglés "Water Index, WI") pueden abrir prometedoras perspectivas para su uso fenotipando en condiciones de sequía (Babar *et al.* 2006).

Los sensores de los espectroradiómetros que miden la luz reflejada por el dosel se agrupan en dos categorías. Los sensores activos (equipados con su propia fuente de radiación) que están menos afectados por las condiciones ambientales (ej. nubosidad, hora del día) pero que pueden medir pocas longitudes de onda (Teal *et al.* 2006; Marti *et al.* 2007). El ejemplo más conocido de espectroradiómetro para dosel vegetal de estas características es el "GreenSeeker" (Fig. 11.4). Por otra parte están los sensores pasivos (que emplean la radiación solar) que pueden ver afectada su lectura por las condiciones ambientales, pero permiten medir un amplio rango espectral con una alta resolución (con ancho de banda de aproximadamente 2 nm) (Araus *et al.* 2001; Osborne *et al.* 2002; Babar *et al.* 2006). Los sensores activos son mucho más baratos (alrededor de una cuarta parte) que los espectroradiómetros y son más adecuados por su fácil manejo y rapidez de medida para el fenotipado a gran escala. Sin embargo estos últimos por el momento solo evalúan NDVI (y SR) ya que miden pocas longitudes de onda y tienen una baja resolución espectral; por lo tanto no son adecuados para evaluar otros rasgos fisiológicos mas complejos mediante índices otros que los de vegetación.



Existen otras técnicas más novedosas de fenotipado que aun están en fase experimental. Caben destacar la evaluación remota a nivel de dosel de la fluorescencia de la clorofila (Chaerle *et al.* 2007), la fotografía digital térmica para evaluar estado hídrico (Chaerle *et al.* 2007, Grant *et al.* 2007; Möller *et al.* 2007), el empleo de la fotografía digital convencional para evaluar biomasa (Casadesus *et al.* 2007), o incluso el uso de espectroradiómetros que cubren las regiones espectrales del infrarrojo lejano (longitudes de onda entre 2-3  $\mu\text{m}$  e incluso mayores) y que permiten una evaluación directa del contenido hídrico en los tejidos vegetales de longitud de onda. Sin embargo estas técnicas, si exceptuamos el empleo de fotografía digital convencional, aunque prometedoras requieren unos equipos muy caros por lo que aún se encuentran en una fase de desarrollo tecnológico previo a su aplicación rutinaria en campo.

### 11.6. RECOMENDACIONES Y CONCLUSIONES

Cuando la sequía se produce en torno a la floración, el número de granos y, en consecuencia, el rendimiento se ven afectados notablemente. Por el contrario, las pérdidas por la sequía durante el establecimiento del cultivo son relativamente bajas y en cierta medida puede compensarse con la resiembra. Por lo tanto la investigación sobre los rasgos que afectan a la inflorescencia y formación de grano son y continuarán siendo una prioridad en la agenda de investigación para el mejoramiento del maíz tropical en el CIMMYT (Edmeades *et al.*, 2000b; Bänziger *et al.* 2006). En ese contexto, es fundamental continuar con el estudio de los parámetros fisiológicos (y sus técnicas de evaluación) que permitan el aumento de la productividad durante la floración y el llenado de granos (ver Araus *et al.* 2008a). El ASI ha sido un carácter de selección muy exitoso en mejora, pero ya ha estado incorporado en buena medida en los programas de mejora, por lo que es necesario encontrar nuevos criterios. El segundo periodo crítico del cultivo donde la sequía puede afectar el rendimiento del maíz tropical es durante el llenado del grano. En los casos donde la sequía "terminal" es la principal limitación, la búsqueda de caracteres que afecten positivamente el llenado del grano (por ejemplo, su actividad fotosintética y el "stay-green") tendrá prioridad en agenda de investigación (Monneveux y Ribaut 2006). La introgresión de estos caracteres deseables mediante retrocruzamiento parece la alternativa más razonable para su empleo en los programas de mejora.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado en parte gracias al Proyecto Drought Tolerant Maize for Africa (DTMA) de la Bill and Melinda Gates Foundation.

### REFERENCIAS

- Andrade, F., A. Cirilo, S. Uhart, and M. Otegui (1996). *Ecofisiología del Cultivo de Maíz*. Argentina: DeKalb Press, 292 pp.
- Andrade, F.H., L. Echarte, R. Rizalli, A. Della Maggiora, and M. Casanovas (2002). Kernel number prediction in maize under nitrogen or water stress. *Crop. Sci* 42:1173-1179.
- Aparicio, N., D. Villegas, J. Casadesus, J.L. Araus, and C. Royo (2000). Spectral reflectance indices for assessing durum wheat biomass, green area, and yield under Mediterranean conditions. *Agron. J.* 92: 83-91.
- Araus, J.L., T. Amaro, J. Casadesus, A. Asbati, and M.M. Nachit (1998). Relationships between ash content, carbon isotope discrimination and yield in durum wheat. *Austr. J. Plant Physiol.* 25: 835-842.

- Araus, J.L., G.A. Slafer, M.P. Reynolds, and C. Royo (2002). Plant breeding and water stress in C<sub>3</sub> cereals: what to breed for? *Ann. Bot.* 89: 925-940.
- Araus, J.L., J. Bort, P. Steduto, D. Villegas, and C. Royo (2003). Breeding cereals for Mediterranean conditions: ecophysiological clues for biotechnology application. *Ann. Appl. Biol.* 142: 129-141
- Araus, J.L., Sanchez, C., and Edmeades, G.O. 2008a. Tropical maize and water stress: what to breed for? GCP special publication on phenotyping. The Global Challenge Program, Mexico (en prensa).
- Araus, J.L., Slafer G.A., Royo C., Serret M.D. 2008b. Breeding for yield potential and stress adaptation. *Crit. Rev. Plant Sci.* (en prensa).
- Araus J.L, J. Casades\_s, and J. Bort 2001. Recent tools for the screening of physiological traits determining yield. pp. 59-77. In M.P. Reynolds, J.I. Ortiz-Monasterio and A. McNab A. (eds). *Application of Physiology in Wheat Breeding*, CIMMYT, Mexico, D.F.
- Babar, M.A., M. van Ginkel, A. R. Klatt, B. Prasad and M. P. Reynolds (2006). The potential of using spectral reflectance indices to estimate yield in wheat grown under reduced irrigation. *Euphytica* 150: 155-172.
- Bänziger, M., and Araus, J.L. 2007. Recent advances in breeding maize for drought and salinity stress tolerance. Pp. 587-601. In: Jenks, M.A., Hasegawa, P.M., and Jain, S.M. (Eds.) *Molecular breeding towards salinity and drought tolerance*. Springer, Dordrecht.
- Bänziger, M., G.O. Edmeades, and S. Quarrie (1997). Drought stress at seedling stage - are there genetic solutions? In G.O. Edmeades, M. Bänziger, H.R. Mickelson and C.B. Peña-Valdivia (eds.). *Developing Drought and Low-N Tolerant Maize*. El Batán, Mexico: CIMMYT, pp. 348-354.
- Bänziger, M., G.O. Edmeades, D. Beck, and M. Bellon (2000). *Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: From theory to practice*. CIMMYT, Mexico DF. 68 pp.
- Bänziger, M., P. Setimela, D. Hodson, and B. Vivek (2006). Breeding for improved abiotic stress tolerance in maize adapted to southern Africa. *Agric. Water Manag.* 80: 212-224.
- Barbour, M.M. (2007). Stable oxygen isotope composition of plant tissue: a review. *Func. Plant Biol.* 34: 83-94
- Barbour, M.M., R.A. Fischer, K.D. Sayre and G.D. Farquhar (2000). Oxygen isotope ratio of leaf and grain material correlates with stomatal conductance and grain yield in irrigated wheat. *Austr. J. Plant Physiol.* 27: 625-637.
- Blum, A. 2006. Drought adaptation in cereal crops: a prologue. pp. 3-15. In: J.M. Ribaut (ed.). *Drought adaptation in cereals* The Harworth Press, Inc., pp. 3-15.
- Bolaños, J. and G.O. Edmeades (1993). Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. II. Responses in reproductive behavior. *Field Crops Res.* 31: 253-268.
- Bolaños., J. and G.O. Edmeades (1996). The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crop Res.* 48: 65-80.

- Bolaños, J., G.O. Edmeades, and L. Martinez (1993). Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. III. Responses in drought—adaptive physiological and morphological traits. *Field Crop Res.* 31:269-286.
- Campos, H., M. Cooper, J.E. Habben, G.O. Edmeades, and J.R. Schussler (2004). Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crop Res.* 90:19-34.
- Casadesus, J., Y. Kaya, J. Bort, M.M. Nachit, J.L. Araus, S. Amor, G. Ferrazzano, F. Maalouf, M. Maccaferri, V. Martos, H. Ouabbou, and D. Villegas (2007). Using vegetation indices derived from conventional digital cameras as selection criteria for wheat breeding in water-limited environments. *Ann. Appl. Biol.* 150: 1-10.
- Chaerle, L., I. Leinonen, H.G. Jones, and D. Van Der Straeten (2007). Monitoring and screening plant populations with 19 combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *J. Exp. Bot.* 58: 773-784.
- Chapman, S.C. and G.O. Edmeades (1999). Selection improves tolerance to mid/late season drought in tropical maize populations. II. Direct and correlated responses among secondary traits. *Crop. Sci* 39:1315-1324.
- Duvick D.N. (1999). Heterosis: feeding people and protecting resources. pp. 19-29. In: J.G. Coors, S. Pandey (Eds.). *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. ASSA/CSSA/ SSA, Madison, WI., U.S.A.
- Duvick, D.N. (2005). The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). *Adv. Agron.* 86: 83-145.
- Duvick, D.N., and Cassman, K.G. (1999). Post-green revolution trend in yield potential of temperate maize in the North-Central United States. *Crop. Sci* 39: 1622-1630.
- Duvick, D.N., J.C.S. Smith, and M. Cooper (2004). Long-term selection in a commercial hybrid maize breeding program. *Plant Breed. Rev.* 24: 109-151.
- Dwyer, L.M., D.W. Stewart, and M. Tollenaar (1992). Analysis of maize leaf photosynthesis under drought stress. *Can. J. Plant Sci.* 72: 477-481.
- Edmeades, G.O. and H.R. Lafitte (1993). The effects of defoliation and high plant density stress on tropical maize selected for reduced plant height. *Agron. J.* 85:850-857.
- Edmeades, G.O., M. Bänziger, and J.-M. Ribaut (2000a). Maize improvement for drought-limited environments. pp. 75-111. In M.E. Otegui, and G.A. Slafer (eds). *Physiological Bases for Maize Improvement*. New York: Howarth Press, U.S.A.
- Edmeades, G.O., J. Bolaños, A. Elings, J.-M. Ribaut, M. Bänziger, and M.E. Westgate (2000b). The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. pp. 43-73. In M.E. Westgate and K.J. Boote (eds). *Physiology and Modeling Kernel Set in Maize*. CSSA Special Publication No. 29. Madison, WI: CSSA.
- Farquhar, G.D., L.A. Cernusak, and B. Barnes (2007). Update on transpiration and isotopes. heavy water fractionation during transpiration. *Plant Physiol.* 143: 11-18.
- Gallais, A., and B. Hirel (2004). An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *J. Exp. Bot.* 55: 295-305.

- Goodman, M.M. (1998). Research policies thwart potential payoff of exotic germplasm. *Diversity* 14: 30-35.
- Grant, R.F., B.S. Jackson, J.R. Kiniry, and G.F. Arkin (1989). Water deficit timing effects on yield components in maize. *Agron. J.* 81: 61-65.
- Grant O.M., L. Tronina, H.G. Jones, and M. M. Chaves (2007). Exploring thermal imaging variables for the detection of stress responses in grapevine under different irrigation regimes. *J. Exp. Bot.* 58:815-825; doi:10.1093/jxb/erl153
- Harris, K., P.K. Suybudhi, A. Borrell, D. Jordan, D. Rosenow, H. Nguyen, P. Klein, R. Klein, and J. Mullet. (2007). Sorghum stay-green QTL individually reduce post-flowering drought-induced leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 58: 327-338.
- Hays, D.B., J.H. Do, R.E. Mason, G. Morgan, and S.A. Finlayson (2007). Heat stress induced ethylene production in developing wheat grains induces kernel abortion and increased maturation in a susceptible cultivar. *Plant Sci.* 172: 1113-1123
- Hirel, B., J. Le Gouis, B. Ney, A. Gallais (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics with integrated approaches. *J. Exp. Bot.* 58: 2369-2387
- John, I., R. Drake, A. Farrell, W. Cooper, P. Lee, P. Horton, and D. Grierson (1995). Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: Molecular and physiological analysis. *Plant J.* 7: 483-490.
- Lafitte R., A. Blum, and G. Atlin 2003. pp. 14-22. In Fischer K.S., R. Lafitte, S., Fukai S., G. Atlin and B. Hardy (eds). *Breeding Rice for Drought-Prone Environments*. Los Baños: The International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Filipinas.
- Lorens, G.F., J.M. Bennett, and L.B. Loggale (1987). Differences in drought resistance between two corn hybrids. I. Water relations and root length density. *Agron. J.* 79: 802-807.
- Lu, Z.M., J.W. Radin, E.L. Turcotte, R. Percy, and E. Zeiger (1994). High yields in advanced lines of Pima cotton are associated with higher stomatal conductance, reduced leaf area and lower leaf temperature. *Physiol. Plant.* 92: 266-272. doi: 10.1111/j.1399-3054.1994.tb05336.x
- Ma, B.L., and M.L. Dwyer (1998). Nitrogen uptake and use in two contrasting maize hybrids differing in leaf senescence. *Plant Soil* 199: 283-291.
- Marti, J., J. Bort, G. Slafer, and J.L. Araus (2007). Can wheat yield be assessed by early measurements of NDVI? *Ann. Appl. Biol.* 150: 253-257.
- Möller, M., V. Alchanatis, Y. Cohen, M. Meron, J. Tsipris, A. Naor, V. Ostrovsky, M. Sprintsin, and S. Cohen (2007). Use of thermal and visible imagery for estimating crop water status of irrigated grapevine. *J. Exp. Bot.* 58: 827-838; doi:10.1093/jxb/erl115
- Monneveux, P., and J.M. Ribaut (2006). Secondary traits for drought tolerance improvement in cereals. pp. 97-143. In J.M. Ribaut (ed.). *Drought adaptation in cereals*. The Harworth Press, Inc.

- Monneveux, P., C. Sanchez, D. Beck, and G.O. Edmeades (2006). Drought tolerance improvement in tropical maize source populations: evidence of progress. *Crop. Sci* 46: 180-191.
- Monneveux P., M. S. Sheshshayee, J. Akhter, J.M., Ribaut (2007). Using carbon isotope discrimination to select maize (*Zea mays* L.) inbred lines and hybrids for drought tolerance. *Plant Sci.* 173: 390-396
- Moser, S.B., B. Feil, S. Jampatong, and P. Stamp (2006). Effects of pre-anthesis drought, nitrogen fertilizer rate, and variety on grain yield, yield components, and harvest index of tropical maize. *Agric. Water Manag.* 81: 41-58.
- Nissanka, S.P., M.A. Dixon, and M. Tollenaar (1997). Canopy gas exchange response to moisture stress in old and new maize hybrid. *Crop. Sci* 37: 172-181.
- Ori, N., M.T. Juarez, D. Jackson, J. Yamaguchi, G.M. Banowitz, and S. Hake (1999). Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell* 11: 1073-1080.
- Osborne, S.L., J.S. Schepers, D.D. Francis, and M.R. Schlemmer (2002). Use of spectral radiance to estimate in-season biomass and grain yield in nitrogen and water stressed corn. *Crop. Sci* 42: 165-171.
- O'Neill, P.M., J. F. Shanahan, and J. S. Schepers. (2006). Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop. Sci* 46:681-687
- Reynolds, M.P., R. Trethowan, M. van Ginkel, and S. Rajaran (2001). Application of physiology in wheat breeding. pp. 2-10. In M.P. Reynolds, J.I. Ortiz-Monasterio and A. McNab (eds). *Application of physiology in wheat breeding*. CIMMYT, Mexico D.F.
- Ribaut, J.M., M. Bänziger, T. Setter, G. Edmeades, and D. Hoisington (2004). Genetic dissection of drought tolerance in maize: A case study. pp. 571-611. In H. Nguyen and A. Blum (eds.). *Physiology and biotechnology integration for plant breeding*. New York: Marcel Dekker Inc., pp. 571-611.
- Sadler, E.J., P.J. Bauer, W.J. Busscher, and J.A. Millen (2000). Site-specific analysis of a droughted corn crop: II. Water use and stress. *Agron. J.* 92: 403-410.,
- Saini, H.S. and S. Lalonde (1998). Injuries to reproductive development under water stress, and their consequences for crop productivity. *J. Crop Prod.* 1: 223-248.
- Sanguineti, M.C., R. Tuberosa, P. Landi, S. Salvi, M. Maccaferri, E. Casarini, and S. Conti (1999). QTL analysis of drought related traits and grain yield in relation to genetic variation for leaf abscisic acid concentration in field-grown maize. *J. Exp. Bot.* 50:1289-1297.
- Sawkins, M.C., J. DeMeyer, and J.M. Ribaut (2006). Drought adaptation in maize. pp. 259-299. In J.M. Ribaut (ed.). *Drought adaptation in cereals*. The Harworth Press, Inc.
- Schussler, J.R. and M.E. Westgate (1995). Assimilate flux determines kernel set at low water potential in maize. *Crop. Sci* 35:1074-1080.
- Shaw, R.H. (1977). Water use and requirements of maize - a review. pp. 119-134. In *Agrometeorology of the maize (corn) crop*. Publication 480 World Meteorological Organization.

Sheshshayee, MS, H. Bindumadhava, R. Ramesh, T.G. Prasad, M.R. Lakshminarayana, and M. Udayakumar (2005). Oxygen isotope enrichment ( $\Delta 18O$ ) as a measure of time- averaged transpiration rate. *J. Exp. Bot.* 56: 3033-3039. doi: 10.1093/jxb/eri300

Teal, R.K., B. Tubana, K. Girma, K. W. Freeman, D. B. Arnall, O. Walsh and W. R. Raun (2006) In-Season prediction of corn grain yield potential using normalized difference vegetation index. *Agron. J.* 98: 1488-1494

The World Bank (2007). World development report 2008. Agriculture for development. Washington DC. [http://siteresources.worldbank.org/INTWDR2008/Resources/WDR\\_00\\_book.pdf](http://siteresources.worldbank.org/INTWDR2008/Resources/WDR_00_book.pdf). 364 pp.

Tollenaar M., and J. Wu (1999). Yield improvement in temperate maize is attributable to greater water stress tolerance. *Crop. Sci* 39: 1597-1604.

Tollenaar M., and E.A. Lee (2006). Dissection of physiological processes underlying grain yield in maize by examining genetic improvement and heterosis. *Maydica* 51: 399-408.

Tollenaar M., J. Ying, and D.N. Duvick (2000) Genetic gain in corn hybrids from the Northern and Central Corn Belt. In Proceedings of the 55th Corn Sorghum Research Conference Chicago, Il, 5-8 Dec. 2000. ASTA, Washington, D.C. pp. 53-62.

Varshney, R.K., A. Graner, and M.E. Sorrells (2005). Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci.* 10: 621-630

Vega, C.R.C., F.H. Andrade, and V.O. Sadras (2001a). Reproductive partitioning and seed set efficiency in soybean, sunflower and maize. *Field Crop Res.* 72: 163-175.

Vega, C.R.C., F.H. Andrade, V.O. Sadras, S.A. Uhart, and O.R. Valentinuz (2001b). Seed number as a function of growth. A comparative study in soybean, sunflower and maize. *Crop. Sci* 41: 748-754.

Voltas, J., I. Romagosa, P. Muñoz, and J.L. Araus (1998). Mineral accumulation, carbon isotope discrimination and indirect selection for grain yield in two-rowed barley grown under semiarid conditions. *Eur. J. Agron.* 9: 147-155.

Wanjura, D.F., and D.R. Upchurch (2000). Canopy temperature characterizations of corn and cotton water status, *Transactions ASAE* 43: 867-875,

Westgate, M.E. (1997). Physiology of flowering in maize: identifying avenues to improve kernel set during drought. pp. 136-141. In G.O. Edmeades, M. Bänziger, H.R. Mickelson and C.B. Peña-Valdivia (eds.). *Developing Drought and Low-N Tolerant Maize*. El Batán, CIMMYT, Mexico.

Westgate, M.E. (2000). Strategies to maintain ovary and kernel growth during drought. pp. 113-137. In M.E. Otegui and G.A. Slafer (eds.). *Physiological Bases for Maize Improvement*. The Howarth Press Inc.

Xu, W., D.T., Rosenow, and H.T. Nguyen (2000). Stay green trait in grain sorghum: relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. *Plant Breed.* 119: 365-367.

Zinselmeier, C., M.E. Westgate, J.R. Schussler, and R.J. Jones (1995). Low water potential disrupts carbohydrate metabolism in maize (*Zea mays* L.) ovaries. *Plant Physiol.* 107: 385-391.

CAPÍTULO **12**

---

**MEJORAMIENTO  
VEGETAL PARA  
CONDICIONES DE  
ALTAS TEMPERATURAS**

*Carolina Saint Pierre*

*Julián Pietragalla*

*Matthew Reynolds*





## MEJORAMIENTO VEGETAL PARA CONDICIONES DE ALTAS TEMPERATURAS

---

*Carolina Saint Pierre, Julián Pietragalla y Matthew Reynolds*

### **Fisiología de Trigo**

**Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo – CIMMYT**

**Km. 45, Carretera México-Veracruz**

**El Batán, Texcoco, Estado de México, CP 56130 México**

**E-mail: [c.saintpierre@cgiar.org](mailto:c.saintpierre@cgiar.org)**

---

### 12.1. INTRODUCCIÓN

Las altas temperaturas pueden causar cambios en las plantas a nivel morfológico, anatómico, fisiológico y/o bioquímico. Se considera estrés por calor cuando las temperaturas son suficientemente altas como para causar un daño irreversible, afectando el crecimiento y desarrollo vegetal. El daño dependerá de la intensidad y duración del período de temperaturas elevadas y de la tasa de aumento de las temperaturas. El efecto varía también si las altas temperaturas son diurnas o nocturnas. Asimismo, la respuesta del cultivo dependerá de la etapa fenológica en que se encuentre. Por ejemplo, la emergencia de las plantas puede verse reducida con altas temperaturas del suelo. Durante las fases vegetativas del cultivo, este estrés reduce el área fotosintética y la eficiencia del sistema fotosintético. En etapas reproductivas, las altas temperaturas reducirían el número de flores fértiles y, por consiguiente, el número de frutos o semillas. En casos extremos, podrían causar la muerte de las plantas. En algunos cultivos como el trigo, el efecto del estrés por calor también está asociado a una disminución de la calidad final. Este estrés puede ocurrir tanto en zonas donde los cultivos reciben adecuado suministro de agua, sea por precipitación o riego, o puede presentarse en combinación con estrés hídrico en zonas áridas o semiáridas.

El aumento de las temperaturas y sus consecuencias en los cultivos es actualmente un tema relevante (Lobell y Asner, 2003; Lobell y Field, 2007; Rosenzweig y Parry, 1994; Tubiello et al., 2007). Las emisiones de CO<sub>2</sub>, metano, clorofluorocarbonos y óxidos nitrosos contribuyen a un gradual aumento en las temperaturas, estimándose un aumento de la temperatura media de hasta 5 °C para el año 2100 (Wigley y Raper, 2001). Este efecto de calentamiento global podría alterar la distribución geográfica de los cultivos, y modificar las regiones y métodos de siembra de los cultivos tradicionales (Fischer et al., 1994; Howden et al., 2007; Parry et al., 1999). Las predicciones de cambios climáticos estiman aumentos en la temperatura promedio y en la variabilidad de las temperaturas extremas. Ambas variables deberían ser consideradas cuando se evalúa el efecto del calentamiento global en los cultivos. Por ejemplo, el aumento de 1.13°C observado entre 1979 y 2003 en la temperatura anual mínima se encontró asociado a fluctuaciones en el

rendimiento de arroz (Peng et al., 2004). Dichos autores estimaron un 10% de reducción del rendimiento de arroz por cada grado centígrado de aumento en la temperatura mínima en la estación de crecimiento. En trigo se observaron también valores similares de reducción del rendimiento por grado centígrado de aumento de las temperaturas (Lobell y Ortiz-Monasterio, 2007). Dadas estas observaciones, la mejora de la tolerancia a las altas temperaturas y el entendimiento de los mecanismos fisiológicos involucrados son factores clave en todo programa de mejoramiento de los cultivos.

La tolerancia a las altas temperaturas se define como la habilidad de las plantas para crecer y tener rendimientos económicamente aceptables bajo condiciones de calor. Percibido el estímulo, ocurren cambios que modifican la expresión génica. Los diversos mecanismos de supervivencia incluyen cambios fenológicos –madurez temprana, escape- morfológicos, fisiológicos y moleculares. Existe una gran variabilidad genética en la expresión de los mecanismos de tolerancia en las distintas especies. Esto crea posibilidades para la mejora de las especies susceptibles a través de los distintos métodos de mejoramiento. El objetivo de esta revisión es presentar las herramientas y métodos de mejoramiento utilizados en la búsqueda de tolerancia a altas temperaturas. Tomamos como planta modelo el trigo, si bien estos conceptos pueden extenderse a otros cereales y el fundamento teórico es transferible a otros cultivos.

## 12.2. MEJORAMIENTO DE LA TOLERANCIA A ALTAS TEMPERATURAS EN TRIGO

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es una especie adaptada a ambientes templados; sin embargo, su gran plasticidad y la necesidad de extender el área de cultivo a zonas marginales ha aumentado el área de siembra en regiones con temperaturas elevadas, como por ejemplo en India, parte de Nepal, Bangladesh, Tailandia, sur de China, Nigeria, Sudan, partes de Bolivia, Brasil y Paraguay (Dubin y Rajaram, 1996). En estas regiones, los principales daños se observan al final del ciclo de crecimiento del cultivo. El estrés por altas temperaturas puede presentarse en forma continua, con temperaturas medias diarias por encima de los 17,5 grados centígrados en el mes más frío (Fischer y Byerlee, 1991) o como estrés terminal, al final del ciclo del cultivo. Más de 7 millones de hectáreas son afectadas por altas temperaturas en forma continua, mientras que si se considera estrés terminal el número se eleva a 36 millones de hectáreas afectadas. Asimismo, las áreas tropicales pueden separarse en áreas húmedas y áreas secas, donde a los efectos del calor se suman los daños por déficit hídrico.

Las principales causas de la disminución del rendimiento en cereales son la reducción en el período de tiempo de las fases fenológicas de desarrollo y la alteración de los procesos relacionados a la asimilación del carbono: transpiración, fotosíntesis y respiración (Barnabás et al., 2008). El estrés induce cambios en la síntesis y funcionalidad de proteínas (Zhao et al., 2008), aumentando la transcripción de proteínas específicas al estrés térmico (Krishnan et al., 1989), la síntesis de fitohormonas (ABA) y de antioxidantes (Figura 12.1) (Moaed et al., 2006). El trigo presenta diferente sensibilidad según la fase fenológica en que se presente el estrés. Los umbrales también varían en trigos de invierno o de primavera, siendo los trigos invernales más afectados por los cambios en las temperaturas que los trigos primaverales. Altas temperaturas del suelo durante el período de siembra y emergencia aumentan la mortalidad de las plántulas, reduciéndose la densidad inicial. El aumento de 20.2 a 42.2 °C en la temperatura del suelo medida a 5 cm de profundidad originó una reducción del 70 % en el número de plantas por m<sup>2</sup> (Acevedo et al., 1991). La disminución del período de desarrollo vegetativo por consecuencia de las altas temperaturas

resulta en un menor desarrollo foliar y en la disminución del número de macollas (Slafer y Rawson, 1994). Altas temperaturas durante la etapa de embuche causaron una reducción en el número de granos por espiga por afectarse en el proceso de meiosis. Temperaturas mayores a 30 °C en el periodo comprendido entre meiosis y madurez del polen afectan la viabilidad del polen del trigo resultando en fallas en la fertilización y finalmente, en la reducción del número de granos. En un estudio con 16 genotipos de trigo, se demostró que el rendimiento, semillas por espiga, biomasa, y altura de la planta son más sensibles a altas temperaturas que el número de espigas por metro cuadrado, peso de 1000 granos y peso hectolítrico (He y Rajaram, 1993). Estos autores proponen el uso de granos por espiga, biomasa, índice de cosecha y peso hectolítrico como criterios de selección para rendimiento en ambientes de temperaturas elevadas. Trigos susceptibles mostraron una reducción en el rendimiento del 3% por cada grado centígrado de aumento por encima de los 15 °C (Wardlaw et al., 1989). Resumiendo, los daños observados en cereales asociados al estrés por calor comprenden la reducción en la duración de las fases fenológicas y por lo tanto, la producción de menos órganos y más pequeños, la reducción en la eficiencia de uso de la radiación solar, el aumento de la tasa de transpiración y la alteración de procesos relativos a la asimilación de carbohidratos, reduciéndose el índice de cosecha.

El mejoramiento genético comprende la obtención de cultivares tolerantes a las altas temperaturas y con un rendimiento económicamente sustentable. Diversos autores han resaltado la importancia del estudio de los mecanismos de tolerancia y de las fuentes de variabilidad genética para el estrés por calor en trigo (Reynolds et al., 2008). Los mecanismos que confieren tolerancia son genéticamente complejos, controlados por más de un gen y por diferentes genes en las distintas etapas del desarrollo y en los diversos tejidos (Maestri et al., 2002). Sumado a esto, la influencia del ambiente es generalmente alta.

El método tradicional de mejoramiento enfrenta el desafío de lograr una correcta identificación de los recursos genéticos mediante el uso de técnicas que permitan la selección de plantas tolerantes en forma eficiente y confiable. La base para el progreso en la búsqueda de tolerancia dependerá de la incorporación de diversidad genética en el programa de mejoramiento. La variabilidad puede provenir de cruzas con materiales genéticamente compatibles como los genotipos nativos (líneas criollas), así como de cruzas amplias con materiales interespecíficos (*Triticum dicoccum*; *T. dicoccoides*; *T. timopheevii*; *T. monococcum*; *T. urartu*) o intergenéricos (*Aegilops* spp.). Por ejemplo, *Aegilops speltoides*, *A. longissima* y *A. searsii* tuvieron adecuado desarrollo vegetativo y reproductivo en condiciones de altas temperaturas (Waines, 1994). La estructura del sistema radical de líneas sintéticas (Genoma AB + genoma D) explicó un mejor uso del agua disponible en el perfil del suelo al compararse con las líneas padres (Reynolds et al., 2007a). Un último método en la búsqueda de variabilidad genética se basa en nuevas tecnologías de transformación que hacen posible la incorporación de genes específicos de tolerancia provenientes de materiales genéticamente diversos. Por ejemplo, el gen DREB proveniente de *Arabidopsis* podría conferir resistencia a estreses abióticos en plantas transformadas (Qin et al., 2007). Otros genes candidatos para usar en transformación son los relacionados con enzimas de la síntesis de almidón soluble (SSS, Soluble Starch Synthase) proveniente de plantas de arroz. En plantas de trigo transformadas este gen permitiría superar la susceptibilidad a las altas temperaturas de este proceso enzimático (Reynolds y Borlaug, 2006). Mejorar la tasa de crecimiento del grano sin aumentar la duración del periodo de llenado es posible buscando variabilidad genética en cruzas amplias de especies relacionadas al trigo (Chinnusamy y Khanna-Chopra, 2003), repercutiendo en rendimiento y calidad.

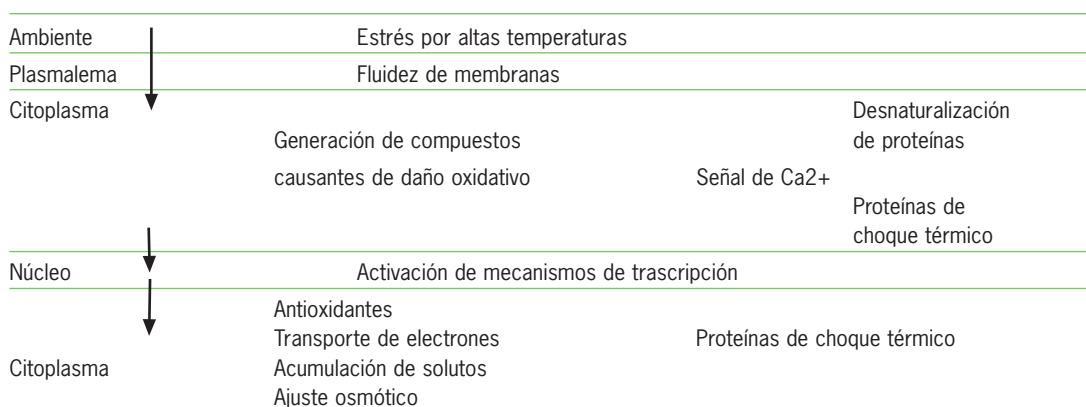
Todo programa de mejoramiento debe ser acompañado por un adecuado sistema de manejo del cultivo, que contemple la correcta definición de prácticas culturales tales como fecha y densidad de siembra, labranzas, fertilizaciones, métodos de protección de los cultivos y riegos. La agricultura conservacionista se ha asociado con beneficios en los ambientes de altas temperaturas, destacándose por ejemplo la reducción de la evapotranspiración de la superficie del suelo, el aumento de la infiltración del agua de lluvia, la mejora en la estructura de los suelos y la reducción de los procesos erosivos (Govaerts et al., 2007). La retención de materia orgánica en la cubierta del suelo y la labranza reducida son prácticas que contribuyen a la reducción de la temperatura del suelo (Badaruddin et al., 1999).

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ha clasificado los ambientes aptos para la producción de trigo en mega-ambientes (Braun et al., 1996) o áreas agro-ecológicas con similares condiciones de cultivo y sujetas a los mismos estreses bióticos y abióticos. El objeto de esta clasificación es facilitar la tarea del mejorador en la búsqueda de líneas adaptadas a ambientes específicos. En relación a la búsqueda de tolerancia a altas temperaturas, líneas avanzadas previamente seleccionadas bajo condiciones de estrés terminal por calor en Ciudad Obregón, México, son distribuidas a través de los viveros de evaluación de rendimiento para altas temperaturas (HTWYT, High Temperature Wheat Yield Nursery). Los resultados de estos ensayos internacionales permiten orientar al mejorador en la búsqueda de materiales destacados y entender las relaciones de interacción entre genotipos y ambiente (Trethowan y Crossa, 2007).

Acevedo y colaboradores (1991) identificaron tres pilares sobre los que se basa la selección para ambientes de alta temperatura. Primeramente, el proceso de selección deberá contemplar evaluaciones a campo, ya que la complejidad de los procesos afectados por el estrés hace difícil la evaluación en ambientes controlados. El segundo principio es la definición del momento en el cual las plantas son expuestas al estrés, dado que las respuestas serán muy diferentes de acuerdo al estado fenológico en que se encuentre el cultivo. Por último, el material deberá exponerse a las condiciones particulares del ambiente para el cual se está seleccionando.

### **12.3. CARACTERES FISIOLÓGICOS ASOCIADOS CON LA EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A ALTAS TEMPERATURAS**

La eficiencia de un método de selección basado únicamente en rendimiento se ve limitada por la baja heredabilidad del rendimiento y por la alta interacción entre los genotipos y el ambiente. Además, la evaluación del rendimiento en generaciones tempranas es difícil dado que el rendimiento por planta puede no estar correlacionado con el rendimiento del cultivo. Sin embargo, se ha observado un significativo progreso en el mejoramiento de trigos sometidos a estreses cuando el proceso de selección tradicional es complementado con el uso de caracteres fisiológicos (Tabla 12.1). Este procedimiento aumenta la probabilidad de obtener cruza con combinaciones genéticas aditivas para caracteres que contribuyen al rendimiento (Reynolds et al., 2007b). Siguiendo este criterio, los padres de un bloque de cruzamiento serán elegidos con la idea de combinar en la descendencia los caracteres fisiológicos relacionados con altos rendimientos y tolerancia a estreses (Tabla 12.2).



**Figura 12.1.** Mecanismos de tolerancia a estrés por altas temperaturas. Tomado de Wahid et al., 2007.

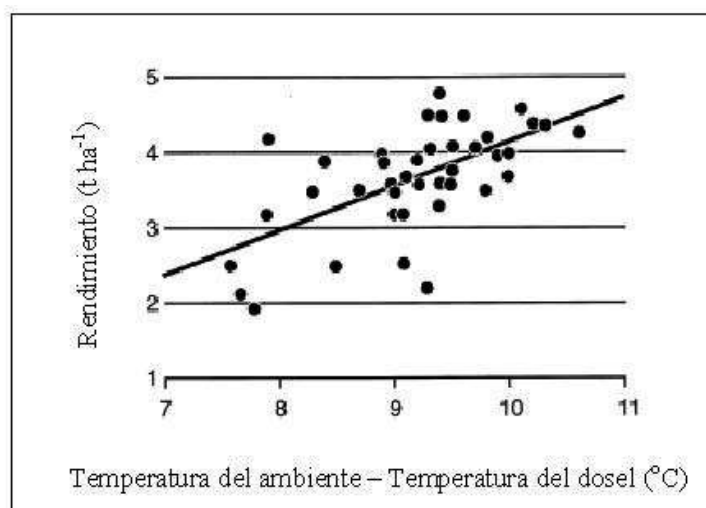
Diversos estudios han demostrado que los caracteres asociados al uso eficiente de la radiación solar como por ejemplo la cobertura temprana del suelo, el mantener verdes las hojas, y una alta tasa de fotosíntesis contribuyen en forma positiva a la tolerancia a altas temperaturas. La baja temperatura del dosel y alta conductancia estomática también han sido destacados como indicadores de tolerancia a este estrés. La selección de genotipos tempranos también se considera una estrategia para ‘escapar’ al estrés terminal.

La medición de la temperatura del dosel constituye una herramienta importante de selección, ya que presenta buena correlación con rendimiento bajo condiciones de estrés (Figura 12.2), tanto en ambientes templados como en ambientes de temperaturas elevadas (Amani et al., 1996). Comparado con la temperatura ambiente, la temperatura del dosel disminuye cuando el agua se evapora desde el follaje. La temperatura del dosel es entonces una medida indirecta del estado hídrico de las plantas, de la capacidad de acceso al agua del suelo por las raíces y de la transpiración a nivel del cultivo. La determinación es rápida, barata, no destructiva, y de fácil medición. Sin embargo, esta herramienta podría no ser útil en ambientes particulares, por ejemplo en regiones con alta humedad relativa del aire, por lo que se recomienda su evaluación en condiciones locales previo a su uso como complemento en el proceso de selección. Diversos estudios informaron sobre variabilidad genética en este parámetro, aunque poco se sabe sobre el control génico.

Los termómetros infrarrojos pueden utilizarse a campo para la determinación de la temperatura del dosel. Se deberá implementar un adecuado modelo experimental que permita un análisis espacial, incluya repeticiones y parcelas de referencia. Las mediciones se tendrán que efectuar en horas de máxima radiación (días despejados) y sin viento. Asimismo es condición necesaria la ausencia de rocío sobre las plantas. Elegir una correcta posición frente a la parcela y ángulo del termómetro frente al cultivo, evitando la proyección de sombras sobre la parcela a evaluar. Evitar también apuntar al suelo con el termómetro al tomar la medición. Esta herramienta ha sido recomendada para ambientes de baja humedad relativa, donde la expresión de la disminución de la temperatura es más evidente.

El uso de porómetros como herramienta de selección se basa en la evaluación de la resistencia o la conductancia estomática. El flujo del vapor de agua desde las hojas al ambiente es determinado por la resistencia estomática, el gradiente de presión de vapor de agua y el gradiente de temperatura, siendo la tasa de absorción de CO<sub>2</sub> mayor si las hojas mantienen sus estomas

abiertos. El porómetro se ha utilizado para la evaluación de trigos en generaciones tempranas dado que puede utilizarse en plantas individuales y la determinación es rápida. No obstante, se recomienda tomar varias mediciones por planta, y considerar que el tipo, posición y estado de la hoja a utilizar condicionará el resultado.



**Figura 12.2.** Regresión lineal entre el rendimiento y la disminución en la temperatura del dosel (temperatura ambiente – temperatura del dosel) en 40 líneas recombinantes provenientes del cruzamiento entre las variedades de trigo Seri 82 (tolerante al calor) y Siete Cerros 66 (sensible al calor), sembradas en Tlaltizapan, México, 1995-96. Tomado de Reynolds et al. 1998.

Un análisis económico del costo de los diferentes métodos fisiológicos de uso potencial en la selección concluyó que la medición de temperatura del dosel, la porometría y la observación visual son relativamente menos costosas que la técnica de discriminación isotópica del carbono (Brennan, 2007), relegando el uso de esta última herramienta a la caracterización de bloques de cruzamientos en la búsqueda de materiales con eficiencia en el uso del agua. Tanto la medición de la temperatura del dosel como medición de la conductancia estomática son dos herramientas de fácil incorporación en un programa de mejoramiento que permiten eliminar genotipos no apropiados en generaciones tempranas. La interpretación de la medición de temperatura del dosel integra la eficiencia del uso del agua de los distintos órganos aéreos de la planta (hojas, tallos y espigas) y de varias plantas de la parcela en forma rápida; la medición de porometría es más lenta, y la discriminación isotópica del carbono es muy laboriosa y costosa. Estos resultados son combinados con la selección visual del mejorador para integrar rendimiento potencial, resistencia a enfermedades y características agronómicas en el proceso de selección.

Las reservas fijadas en los tallos previamente a la floración son una de las fuentes de carbohidratos que contribuyen al llenado del grano, principalmente cuando la eficiencia fotosintética es reducida por estreses (Blum, 1998). Altas temperaturas terminales aceleran la senescencia de los tejidos, reduciendo el período de llenado de grano. Bajo estas condiciones, un alto contenido de carbohidratos solubles en tallos favorecería el llenado de los granos si existiera una adecuada movilización de dichos carbohidratos desde los tallos a los granos. La capacidad de mantener las hojas verdes por un mayor periodo de tiempo contribuiría también a un mayor aporte de carbohidratos.

Las temperaturas elevadas pueden ocasionar reacciones conocidas como daño oxidativo, lo cual lleva a la pérdida de la propiedad de semi-permeabilidad y altera las funciones de la membrana celular. Este daño es causado por compuestos como  $^1O_2$ ,  $O^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , y  $OH^{\cdot}$ . Las plantas poseen mecanismos de detoxificación de estas sustancias nocivas, los cuales resultan de gran importancia para determinar la supervivencia en condiciones de calor (Wahid et al., 2007). Muchos aspectos de los mecanismos de regulación y variación genética de la producción de antioxidantes en células expuestas a altas temperaturas quedan por ser investigados y abren nuevas posibilidades en la búsqueda de mecanismos de tolerancia al estrés.

La integridad de las membranas celulares es fundamental para garantizar procesos como la fotosíntesis y respiración. Las altas temperaturas causan modificaciones en las funciones de las membranas celulares, dado que la capa de lípidos de las membranas se vuelve más fluida. Diversos métodos son utilizados para medir la tolerancia al calor, basados en la evaluación de la actividad de membranas celulares. Así, el método de electro-conductividad evalúa la función de la membrana del plasmalema, el ensayo de fluorescencia contempla las membranas involucradas en fotosíntesis, y el ensayo de reducción del cloruro de trifeníltetrazolio observa las membranas mitocondriales.

El método de electro-conductividad mide la estabilidad de las membranas expuestas a altas temperaturas mediante la estimación de la pérdida de electrolitos en tejidos (Blum et al., 2001; Ibrahim y Quick, 2001). La aplicación de los métodos de electro-conductividad es limitada en condiciones de campo debido a las labores requeridas. Experiencias realizadas en CIMMYT han demostrado alta correlación de estabilidad de membranas y rendimiento tanto cuando la evaluación se efectuó en hojas de plantas en estado de plántula como en hojas banderas (Reynolds et al., 1994). Estos resultados sugieren la posibilidad de realizar selección en etapas tempranas del cultivo (Ducruet et al., 2007; Sayed, 2003).

Al medir la fluorescencia de la clorofila se estima el daño al fotosistema II y membranas de los tilacoides causado por las temperaturas elevadas. El valor de fluorescencia, así como la relación de este valor con respecto a la máxima fluorescencia y a la fluorescencia basal están correlacionados con la tolerancia a altas temperaturas. La desventaja de la evaluación de fluorescencia es el costo del equipo requerido. Sin embargo, el uso de este método como herramienta de selección es prometedor.

El cloruro de trifeníltetrazolio estima el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias. La aplicación de este método es limitada en condiciones de campo debido a las labores requeridas.

Una de las estrategias relacionadas a la tolerancia al estrés es la síntesis de proteínas específicas, siendo las proteínas de choque térmico las que han sido más estudiadas (Krishnan et al., 1989). Estas proteínas previenen la desnaturalización de otras proteínas y participan en procesos celulares que minimizan los efectos negativos de la deshidratación y estrés oxidativo, favoreciendo la termo-tolerancia. Otro factor que contribuiría a mejorar la tolerancia al estrés es la acumulación de 'osmolitos' u osmo-protectores, compuestos orgánicos de bajo peso molecular como azúcares, prolina, o compuestos de amonio (Ashraf y Foolad, 2007). Estos compuestos regularían el potencial de óxido-reducción de las células bajo estrés, disminuyendo los daños a nivel celular.



Estudios recientes demostraron que carotenoides, xantofilas, y algunos terpenoides podrían estar involucrados en estabilizar y foto-proteger la fase lipídica de las membranas celulares de los tilacoides (Havaux, 1998). Las ceras epicuticulares contribuirían también a la tolerancia por reflejar la luz y disminuir la temperatura de la hoja (Ishag y Mohamed, 1996). Otros mecanismos para mitigar los daños causados por las temperaturas incluyen mecanismos celulares para mantener la estabilidad de las membranas y activación de elementos de transcripción, elementos descritos en la revisión realizada por Wahid et al. (2007).

#### 12.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL MEJORAMIENTO DE PLANTAS EN CONDICIONES DE ALTAS TEMPERATURAS

El uso de herramientas genómicas, abarcando el estudio de genes, proteínas y metabolitos, ha contribuido al conocimiento de las respuestas de la planta a estreses abióticos. Dos estrategias han sido destacadas para el mejoramiento de la tolerancia a estreses abióticos (Sreenivasulu et al., 2007). La primera es la identificación de genes de tolerancia al estrés via 'functional genomics' e introducción en cultivos; y la segunda es la identificación de QTLs o genes de tolerancia, desarrollo de marcadores moleculares y posterior uso en selección asistida. El uso de marcadores moleculares ha permitido la identificación, manipulación y combinación de genes relacionados con la tolerancia al estrés (Langridge et al., 2006). Nuevas posibilidades de variación génica surgen con la implementación de técnicas biotecnológicas, por ejemplo, mediante la introducción de genes de tolerancia en especies susceptibles. Sin embargo, previo a la transformación de especies susceptibles es necesaria la correcta identificación del gen, así como su caracterización en función de los procesos anatómicos, fisiológicos y bioquímicos regulados. Las técnicas de transformación han sido identificadas como promisorias para mejora de cultivos y un campo donde todavía queda mucho por realizar (Wahid et al., 2007).

Muchos de los caracteres que determinan la tolerancia a estreses abióticos son controlados por un alto número de genes con efecto cuantitativo. Diversos QTLs asociados con tolerancias a estrés han sido identificados en especies cultivadas, por ejemplo en *Lycopersicon esculentum* (Lin et al., 2007) y *Oryza sativa var. japonica* (Kobayashi et al., 2007). Los estudios de la diversidad genética en cereales son de utilidad para encontrar nuevos QTL y alelos que luego pueden ser utilizados en programas de mejoramiento. Asimismo, Jiang y colaboradores (1999) propusieron que el mejoramiento para condiciones térmicas amplias sería posible agrupando genes de adaptación a ambientes térmicos específicos. Sin embargo, la identificación de QTL es un desafío en especies como el trigo dado su nivel de poliploidía y el bajo polimorfismo que presenta.

El estudio de la síntesis y función de proteínas vegetales (proteomics) contribuye a entender la conexión entre los factores ambientales y el desarrollo del vegetal y aporta información en la búsqueda de mecanismos de tolerancia a estreses abióticos (Barnabás et al., 2008). Estos estudios facilitarían la identificación de genes o proteínas involucrados en la respuesta a las altas temperaturas. Asimismo, el estudio de los metabolitos (metabolomics) también contribuiría con valiosa información, por ejemplo al explicar los procesos metabólicos que involucran azúcares y aminoácidos en distintas etapas de crecimiento del vegetal y en diferentes ambientes (Guy et al., 2008; Shulaev et al., 2008).

Aún quedan estudios por realizar para terminar de comprender muchos de los mecanismos fisiológicos involucrados en la tolerancia a altas temperaturas. Por ejemplo, nuevas líneas de investigación son necesarias para entender los mecanismos de control de eventos como la asignación



de foto-asimilados según fuente-destino, la plasticidad fenotípica ante condiciones ambientales adversas, y los mecanismos de identificación de estreses. Se espera que las nuevas herramientas biotecnológicas introduzcan un importante avance en la identificación de estos mecanismos y, finalmente, en la mejora de la tolerancia a estreses de las plantas cultivadas.

**Tabla 12.1.** Correlación genética para parámetros fisiológicos medidos en Tlaltizapan, México, y rendimiento de trigo para 10 variedades promediadas sobre 16 ambientes con baja humedad relativa del aire. Tomado de Reynolds et al. (2001).

Parámetro fisiológico	Correlación genética
Temperatura del dosel	0.86**
Termoestabilidad de membranas	0.81**
Clorofila en las hojas (en llenado de grano)	0.72**
Conductancia en hojas (en espigamiento)	0.63*
Fotosíntesis (en espigamiento)	0.63*

\*, significancia al 0.05; \*\*, significancia al 0.01

**Tabla 12.2.** Mecanismos fisiológicos asociados al mejoramiento de cereales en condiciones de altas temperaturas. Adaptado de Reynolds y Borlaug (2006).

Precocidad: relacionada con el escape al estrés (Barnabás et al., 2008)

Mecanismos asociados con alta eficiencia en el uso de agua

- Alta biomasa radical (Barnabás et al., 2008)
- Crecimiento temprano y alta intercepción de luz (Reynolds et al., 1994)
- Alto contenido de clorofila, alta tasa de fotosíntesis (Reynolds et al., 1994; Ristic et al., 2007)
- Alto contenido de carbohidratos en tallos y alta capacidad para movilizar dichos carbohidratos a los granos (Blum, 1988; Blum et al., 1994)

Mecanismos relacionados a la fotoprotección

- Morfología de la hoja (pubescencia, ceras, enrollamiento, color)
- Antioxidantes (Mohanty, 2003)

Mecanismos asociados a la asimilación de carbohidratos relativos a una alta eficiencia en el uso de la radiación solar

- Mantenimiento del color verde (Kumari et al., 2007)
- Estabilidad de procesos metabólicos (Majoul et al., 2004)
- Fotosíntesis de espiga y aristas de la espiga (Tambussi et al., 2007)
- Alto índice de cosecha
- Fluorescencia de la clorofila (Moffatt et al., 1990; Ristic et al., 2007)
- Termoestabilidad de membranas (Blum y Ebercon, 1981; Fokar et al., 1998; Reynolds et al., 1994)

Mecanismos ligados a la demanda de evapotranspiración

- Alta conductancia estomática (Reynolds et al., 1994)
- Baja temperatura del dosel (Blum et al., 1982; Kumari et al., 2007; Reynolds et al., 1994)
- Arquitectura del sistema radical

Resistencia a enfermedades e insectos propios de ambientes de altas temperaturas

(*Helminthosporium* spp.; *Sclerotium rolfsii*; *Xanthomonas* spp.; *Pseudomonas* spp.; áfidos)

## 12.5. CONCLUSIONES

El progreso en la mejora en los cultivos en ambientes de altas temperaturas se verá favorecido por

1. una correcta caracterización del ambiente que contemple la identificación de la intensidad y el momento en que se presentan las temperaturas limitantes y su combinación con otros factores ambientales que potenciarían el efecto perjudicial sobre el rendimiento;
2. la identificación de caracteres fisiológicos asociados a la tolerancia al estrés, definición de protocolos para su correcta evaluación a campo, y utilización de los mismos dentro del proceso de selección;
3. la implementación de herramientas biotecnológicas, como transformación y uso de marcadores moleculares;
4. el uso de prácticas agronómicas sustentables.

## REFERENCIAS

Acevedo, E., Nachit, M. and Ortiz-Ferrara, G. (1991) Effects of heat stress on wheat and possible selection tools for use in breeding for tolerance. pp. 401-421, in D.A. Saunders (ed). *Wheat for the Nontraditional Warm Areas*, CIMMYT. Iguazu, Brazil.

Amani, I., Fischer, R.A. and Reynolds, M.P. (1996). Canopy temperature depression associated with yield of irrigated spring wheat cultivars in a hot climate. *J. Agron. Crop Sci.* 176: 119-129.

Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59: 206-216.

Badaruddin, M., Reynolds, M.P. and Ageeb, O.A.A. (1999). Wheat management in warm environments: Effect of organic and inorganic fertilizers, irrigation frequency, and mulching. *Agron. J.* 91: 975-983.

Barnabás, B., Jager, K. and Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ.* 31: 11-38.

Blum, A. (1988). *Plant breeding for stress environments*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. Pp. 223.

Blum, A. (1998). Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation. *Euphytica* 100: 77-83.

Blum, A. and Ebercon, A. (1981). Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.* 21: 43-47.

Blum, A., Klueva, N. and Nguyen, H.T. (2001). Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress. *Euphytica* 117: 117-123.

Blum, A., Mayer, J. and Gozlan, G. (1982). Infrared thermal sensing of plant canopies as a screening technique for dehydration avoidance in wheat. *Field Crops Res.* 5: 137-146.

- Blum, A., Sinmena, B., Mayer, J., Golan, G. and Shpiler, L. (1994). Stem reserve mobilisation supports wheat-grain filling under heat stress. *Funct. Plant Biol.* 21: 771-781.
- Braun, H.J., Rajaram, S. and van Ginkel, M. (1996). CIMMYT's approach to breeding for wide adaptation. *Euphytica* 92: 175-183.
- Brennan, J.P., Condon, A.G., Van ginkel, M. and Reynolds, M.P. (2007). An economic assessment of the use of physiological selection for stomatal aperture-related traits in the CIMMYT wheat breeding programme. *J. Agric. Sci.* 145: 187-194.
- Chinnusamy, V. and Khanna-Chopra, R. (2003). Effect of heat stress on grain starch content in diploid, tetraploid and hexaploid wheat species. *J. Agron. Crop Sci.* 189: 242-249.
- Dubin, H.J. and Rajaram, S. (1996). Breeding disease-resistant wheats for tropical highlands and lowlands. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 503-526.
- Ducruet, J.M., Peeva, V. and Havaux, M. (2007). Chlorophyll thermofluorescence and thermoluminescence as complementary tools for the study of temperature stress in plants. *Photosynth. Res.* 93: 159-171.
- Fischer, G., Froberg, K., Parry, M.L. and Rosenzweig, C. (1994). Climate change and world food supply, demand and trade. Who benefits, who loses? *Glob. Environ. Change* 4: 7-23.
- Fischer, R.A. and Byerlee, D.B. (1991) Trends of wheat production in the warmer areas: major issues and economic considerations. pp. 3-27, in D.A. Saunders (ed). *Wheat for the Non-traditional Warm Areas*. CIMMYT. Iguaz\_, Brazil.
- Fokar, M., Nguyen, H.T. and Blum, A. (1998). Heat tolerance in spring wheat. I. Estimating cellular thermotolerance and its heritability. *Euphytica* 104: 1-8.
- Govaerts, B., Fuentes, M., Mezzalama, M., Nicol, J.M., Deckers, J., Etchevers, J.D., Figueroa-Sandoval, B. and Sayre, K.D. (2007). Infiltration, soil moisture, root rot and nematode populations after 12 years of different tillage, residue and crop rotation managements. *Soil Tillage Res.* 94: 209-219.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J. and Hinch, D.K. (2008). Metabolomics of temperature stress. *Physiol. Plant* 132: 220-235.
- Havaux, M. (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 3: 147-151.
- He, Z.H. and Rajaram, S. (1993). Differential responses of bread wheat characters to high temperature. *Euphytica* 72: 197-203.
- Howden, S.M., Soussana, J.F., Tubiello, F.N., Chhetri, N., Dunlop, M. and Meinke, H. (2007). Adapting agriculture to climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 19691-19696.
- Ibrahim, A.M.H. and Quick, J.S. (2001). Genetic control of high temperature tolerance in wheat as measured by membrane thermal stability. *Crop Sci.* 41: 1405-1407.
- Ishag, H.M. and Mohamed, B.A. (1996). Phasic development of spring wheat and stability of yield and its components in hot environments. *Field Crops Res.* 46: 169-176.

- Kobayashi, A., Bao, G., Ye, S. and Tomita, K. (2007). Detection of quantitative trait loci for white-back and basal-white kernels under high temperature stress in *japonica* rice varieties. *Breed. Sci.* 57: 107-116.
- Krishnan, M., Nguyen, H.T. and Burke, J.J. (1989). Heat shock protein synthesis and thermal tolerance in wheat. *Plant Physiol.* 90: 140-145.
- Kumari, M., Singh, V., Tripathi, R. and Joshi, A. (2007). Variation for staygreen trait and its association with canopy temperature depression and yield traits under *terminal heat stress in wheat*. pp. 357-363, in H.T. Buck, J.E. Nisi and N. Salomón (eds). *Wheat Production in Stressed Environments*. Springer Netherlands. Mar del Plata, Argentina.
- Langridge, P., Paltridge, N. and Fincher, G. (2006). Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* 4: 343-354.
- Lin, K.H., Lo, H.F., Yeh, W.L. and Chen, J.T. (2007). Identification of quantitative trait loci associated with yield of tomato under heat stress. *Acta Hort.* 760: 269-276.
- Lobell, D.B. and Asner, G.P. (2003). Climate and management contributions to recent trends in U.S. agricultural yields. *Science* 299: 1032.
- Lobell, D.B. and Field, C.B. (2007). Global scale climate-crop yield relationships and the impacts of recent warming. *Environ. Res. Lett.* 2: 14002.
- Lobell, D.B. and Ortiz-Monasterio, J.I. (2007). Impacts of day versus night temperatures on spring wheat yields: a comparison of empirical and CERES model predictions in three locations. *Agron. J.* 99: 469-477.
- Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H.T. and Marmioli, N. (2002). Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Mol. Biol.* 48: 667-681.
- Majoul, T., Bancel, E., Triboi, E., Hamida, J.B. and Branlard, G. (2004). Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. *Proteomics* 4: 505-513.
- Moaed, A., Deshmukh, P.S., Sairam, R.K., Kushwaha, S.R. and Singh, T.P. (2006). Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Sci.* 171: 382-388.
- Moffatt, J.M., Sears, R.G. and Paulsen, G.M. (1990). Wheat high temperature tolerance during reproductive growth. I. Evaluation by chlorophyll fluorescence. *Crop Sci.* 30: 881-885.
- Mohanty, N. (2003). Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of flag leaf and the grain yield in two cultivars of *Triticum aestivum* (L.) exposed to warmer growth conditions. *J. Plant Physiol.* 160: 71-74.
- Parry, M., Rosenzweig, C., Iglesias, A., Fischer, G. and Livermore, M. (1999). Climate change and world food security: a new assessment. *Glob. Environ. Change* 9: 51-67.

Peng, S., Huang, J., Sheehy, J.E., Laza, R.C., Visperas, R.M., Zhong, X.H., Centeno, G.S., Khush, G.S. and Cassman, K.G. (2004). Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 9971-9975.

Qin, F., Kakimoto, M., Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Lam Son Phan, T., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *Plant J.* 50: 54-69.

Reynolds, M., Dreccer, F. and Trethowan, R. (2007a). Drought-adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces. *J. Exp. Bot.* 58: 177-186.

Reynolds, M.P., Balota, M., Delgado, M.I.B., Amani, I. and Fischer, R.A. (1994). Physiological and morphological traits associated with spring wheat yield under hot, irrigated conditions. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 717-730.

Reynolds, M.P. and Borlaug, N.E. (2006). Impacts of breeding on international collaborative wheat improvement. *J. Agric. Sci.* 144: 3-17.

Reynolds, M.P., Nagarajan, S., Razzaque, M.A. and Ageeb, O.A.A. (2001). Heat tolerance. pp 124-135, in *Application of Physiology in Wheat Breeding*. M.P. Reynolds, J.I. Ortiz-Monasterio and A. McNab (eds). CIMMYT, Mexico, D.F.

Reynolds, M.P., Nagarajan, S., Razzaque, M.A. and Ageeb, O.A.A. (2001). Heat tolerance. pp 124-135, in M.P. Reynolds, J.I. Ortiz-Monasterio and A. McNab (eds). *Application of Physiology in Wheat Breeding*. CIMMYT, Mexico, D.F.

Reynolds, M.P., Saint Pierre, C., Saad, A.S.I., Vargas, M. and Condon, A.G. (2007b). Evaluating potential genetic gains in wheat associated with stress-adaptive trait expression in elite genetic resources under drought and heat stress. *Crop Sci.* 47: S172-189.

Reynolds, M.P., Soingh, R.P., Ibrahim, A., Ageeb, O.A.A., Larque-Saavedra, A. and Quick, J. S. (1998). Evaluating physiological traits to complement empirical selection for wheat in warm environments. *Euphytica* 100: 85-94.

Ristic, Z., Bukovnik, U. and Prasad, P.V.V. (2007). Correlation between heat stability of thylakoid membranes and loss of chlorophyll in winter wheat under heat stress. *Crop Sci.* 47: 2067-2073.

Rosenzweig, C. and Parry, M.L. (1994). Potential impact of climate change on world food supply. *Nature* 367: 133-138.

Sayed, O.H. (2003). Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* 41: 321-330.

Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G. and Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiol. Plant* 132: 199-208.

Slafer, G.A. and Rawson, H.M. (1994). Does temperature affect final numbers of primordia in wheat? *Field Crops Res.* 39: 111-117.

- Sreenivasulu, N., Sopory, S.K. and Kishor, P.B.K. (2007). Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene* 388: 1-13.
- Tambussi, E.A., Bort, J., Guamet, J.J., Nogues, S. and Araus, J.L. (2007). The photosynthetic role of ears in C<sub>3</sub> cereals: metabolism, water use efficiency and contribution to grain yield. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26: 1-16.
- Trethowan, R. and Crossa, J. (2007). Lessons learnt from forty years of international spring bread wheat trials. *Euphytica* 157: 385-390.
- Tubiello, F.N., Soussana, J.F. and Howden, S.M. (2007). Crop and pasture response to climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 19686-19690.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environ. Exp. Bot.* 61: 199-223.
- Waines, J.G. (1994). High temperature stress in wild wheats and spring wheats. *Funct. Plant Biol.* 21: 705-715.
- Wardlaw, I.F., Dawson, I.A., Munibi, P. and Fewster, R. (1989). The tolerance of wheat to high temperatures during reproductive growth. I. Survey procedures and general response patterns. *Austr. J. Agric. Res.* 40: 1-13.
- Wigley, T.M.L. and Raper, S.C.B. (2001). Interpretation of high projections for global-mean warming. *Science* 293: 451-454.
- Zhao, H., Dai, T., Jiang, D. and Cao, W. (2008). Effects of high temperature on key enzymes involved in starch and protein formation in grains of two wheat cultivars. *J. Agron. Crop Sci.* 194: 47-54.

CAPÍTULO **13**

---

**ESTRÉS POR  
METALES**

*José Luis Couselo  
Antonio Ballester*





## ESTRÉS POR METALES

---

José Luis Couselo y Antonio Ballester

**Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC**

**Apartado 122, 15080 Santiago de Compostela. E-mail: [aballester@iiag.cesga.es](mailto:aballester@iiag.cesga.es)**

---

### 13.1. INTRODUCCIÓN

Aunque la presencia en el medio de elevadas concentraciones de metales puede encontrarse de manera natural, la polución ambiental, provocada por un gran número de fuentes antropogénicas, ha introducido de forma masiva, aunque heterogénea, gran número de metales en el medio ambiente. Esto ha afectado de forma progresiva a diferentes ecosistemas al introducirlos en las cadenas tróficas (Macfarlane y Burchett, 2001). El estudio de la toxicidad y la tolerancia de las plantas a los metales han suscitado un enorme interés, habiendo sido objeto de diferentes revisiones (Sanità di Toppi y Gabrielli, 1999; Hall, 2002; Clemens, 2001, 2006; Clemens et al., 2002). Entre los metales, algunos como el Fe, Mo, Zn, Ni, Cu, Co, Va y Cr y Mn son importantes como micronutrientes pero pueden llegar a ser tóxicos cuando se encuentran en concentraciones elevadas mientras que otros como Ag, Hg, Cd, Pb y Sb no tienen funciones conocidas como nutrientes y tienen un potencial tóxico elevado debido a su reactividad con los grupos de las cadenas laterales de algunos aminoácidos. No obstante, las plantas disponen de diferentes mecanismos para intentar regular dentro de márgenes fisiológicos aceptables la concentración de los iones metálicos y también en caso de ser superados, para paliar los efectos negativos provocados por los mismos. Se habla de estrés provocado por la presencia o exceso de metales cuando los mecanismos de autoregulación y paliativos resultan insuficientes. En este sentido los metales pueden provocar desequilibrios en la nutrición mineral causados por la interferencia directa sobre ciertas reacciones metabólicas ya que pueden desactivar enzimas al unirse a los residuos de cisteínas. Incluso pueden desplazar a iones metálicos importantes en determinadas enzimas alterando directamente o indirectamente su centro activo y provocando la pérdida de actividad, como sucede con el Co, Ni y Zn que desplazan el Mg en la 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Van Assche y Clijster, 1986, 1990). También compiten en la absorción y en el transporte de iones esenciales como el Fe o el Ca (Kim et al., 2002). No obstante, a pesar de los numerosos estudios realizados hasta ahora sobre la toxicidad de los metales, en muchos casos, las dianas primarias de los metales tóxicos no han sido identificadas (Rea et al., 2004). Las plantas estresadas por metales también se ven afectadas por el estrés oxidativo que implica la formación de radicales libres cuyo exceso puede provocar desde la alteración de las bases de los ácidos nucleicos hasta el aumento de la peroxidación lipídica (Dietz et al., 1999). Aunque en ocasiones se ha discutido sobre si el estrés oxidativo es el efecto primario que provocan algunos metales, lo cierto es que por ejemplo el Cd no tiene actividad redox en condiciones fisiológicas, por lo que

no forma parte de las reacciones Fenton y Haber-Weiss, y el estrés oxidativo en este caso se debe a la reducción del glutatión reducido disponible por su unión al Cd (De Vos et al., 1992; Schützendübel y Polle, 2002). Todo esto provoca finalmente síntomas visibles en las plantas, como la inhibición en el crecimiento, la clorosis e incluso la muerte.

Para mantener la concentración de los metales esenciales dentro de parámetros fisiológicos y minimizar el efecto dañino de los metales, las plantas han desarrollado una compleja red de mecanismos homeostáticos que sirven para controlar su absorción, acumulación, transporte y detoxificación (Clemens, 2001). El conocimiento de las interacciones planta-metal es importante no sólo desde el punto de vista del conocimiento fundamental de la fisiología, bioquímica o biología molecular, sino también para la seguridad ambiental e incluso para reducir los riesgos asociados a la introducción de los elementos traza en la cadena alimenticia (Benavides et al., 2005).

En los últimos años ha habido un tremendo avance en el conocimiento, a nivel molecular, de la tolerancia de las plantas a los metales tóxicos. Sin embargo, no es posible describir un cuadro general que pueda explicar este proceso debido al gran número de diferentes factores que condicionan su estudio: i) diferentes especies vegetales e incluso variedades pueden presentar distintas respuestas a un mismo metal; ii) la diferente naturaleza química de los metales determina que se comporten de forma distinta en una misma especie vegetal; iii) la absorción de un metal por la raíz de una planta está condicionada por factores como el pH del suelo, contenido en materia orgánica, etc; iv) la mayoría de los estudios básicos se han llevado a cabo a nivel celular y, sólo en menor grado, a nivel de tejido o planta entera; v) muchos de los conocimientos sobre los mecanismos implicados en la respuesta de las plantas al exceso de metales derivan de experimentos con *Saccharomyces cerevisiae*.

En los últimos años se ha reforzado el conocimiento del complejo proceso de la homeostasis metálica utilizando especies vegetales con diferente grado de tolerancia a la presencia de metales y en condiciones de absorción similares a las naturales. Un grupo de plantas que ha centrado parte de este interés, son las denominadas *hiperacumuladoras*, entendiéndose como tales aquellas que de manera natural acumulan altas concentraciones de uno o varios metales en su parte aérea en ausencia de síntomas de toxicidad (clorosis, reducción de la producción de la biomasa aérea, etc.) (Baker y Brooks, 1989). Se han descrito al menos 400 especies vegetales hiperacumuladoras aunque la más estudiada sin duda es *Thlaspi caerulescens* que es capaz de acumular elevadas concentraciones de Cd y Zn (Baker et al., 1994). Estas plantas no sólo muestran una gran resistencia a los efectos tóxicos asociados a elevadas concentraciones metálicas sino que muestran una gran eficiencia en el transporte de los iones metálicos desde la raíces a la parte aérea.

Se pretende, en este trabajo, hacer un resumen de la investigación que se está desarrollando en las distintas etapas que condicionan la homeostasis en plantas, desde la movilización y absorción por las raíces hasta su acumulación, transporte y detoxificación dentro de las células. Como una aplicación práctica del conocimiento que se está generando, se mencionará el proceso de la fitorremediación de metales, como herramienta para la eliminación de algunos metales pesados de sustratos contaminados.

### 13.2. MOVILIZACIÓN

La biodisponibilidad de algunos metales en el suelo está limitada a causa de su baja solubilidad en agua y a fuertes enlaces con las partículas de suelo. La fracción móvil de los cationes en el suelo representa sólo a una parte del contenido total del metal que se encuentra en el suelo y sólo esta parte se considera biodisponible para ser absorbida por la planta. Poco se conoce sobre la movilización de los elementos traza por las raíces. Se considera que la acidificación de la rizosfera (a través de las bombas de protones localizadas en la membrana plasmática) y la secreción activa de compuestos de bajo peso molecular (carboxilatos), que pueden funcionar como agentes quelantes, son mecanismos básicos para aumentar la disponibilidad de los metales e iniciar su transporte al interior de las células. Por otro lado, bacterias de la rizosfera, así como las micorrizas tienen también un impacto importante (Vivas et al., 2006; Hildebrant et al., 2007).

### 13.3. ABSORCIÓN

La etapa siguiente a la movilización es la captura del metal por las células de la raíz. Los metales se unen inicialmente a la pared celular que actúa como un intercambiador de iones de baja afinidad y baja selectividad. El potencial de membrana, que es negativo en el interior de la membrana plasmática y puede exceder los -200 mV en las células de la epidermis de la raíz (Hirsch et al., 1998), suministra una fuerza que dirige la toma de cationes a través de transportadores y canales iónicos.

Algunos de los mecanismos de absorción de los metales esenciales están identificados de manera precisa (Fox y Guerinot, 1998; Hall y Williams, 2003) y desde el principio del estudio de la absorción de los metales no esenciales se asumió que no existían mecanismos específicos para la absorción de estos cationes. La primera demostración de esto quedó patente cuando, al expresar de forma heteróloga la proteína del trigo LCT1 en *Sacharomyces cerevisiae*, que está relacionada con la entrada del Ca en la célula, se indujo hipersensibilidad al Cd en la levadura (Clemens et al. 1998). Otro ejemplo lo encontramos en el caso de la familia de transportadores de metales ZIP (SLC39), habiéndose demostrado que constituyen la principal vía de entrada de Fe en las células de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Vert et al., 2002). La sobreexpresión de un transportador de esta familia, el IRT1 en *A. thaliana* provocó una acumulación mayor de Zn y Cd en las raíces bajo concentraciones limitantes de Fe indicando, de forma indirecta, que IRT1 es responsable de la entrada de Cd en las células de la raíz (Conolly et al., 2002). Otra familia de transportadores que permiten la entrada, de entre otros el Cd, es la familia Nramp (SLC11) y la sobreexpresión de AtNramp en *A. thaliana* produjo hipersensibilidad a Cd (Thomine et al., 2000). Actualmente se ha demostrado en diferentes especies como *Oryza sativa*, *Arabidopsis hallieri* y *Thlaspi caerulescens* que la absorción de metales tóxicos no esenciales como el Cd o el Pb tiene lugar, al menos parcialmente, de manera competitiva con otros cationes esenciales como el Fe, Zn o el Ca (Kim et al., 2002; Zhao et al., 2006). Además se han identificado nuevas familias de transportadores por los que pueden entrar metales tóxicos en las células (Kramer et al., 2007; Williams et al., 2000). Aparte de los transportadores más o menos específicos, también se han identificado algunos canales iónicos no selectivos como NtCBP4 y AtCNGC como vía inespecífica de entrada de metales como el Pb (Sunkar et al., 2000).

Cabe señalar que, aunque no es descartable que en algunas especies vegetales, como las hiperacumuladoras, puedan existir canales específicos de entrada de algunos metales no esenciales en las células de la raíz (sobre todo en el caso del Cd, Lombi et al., 2001), la evidencia existente parece indicar que estos metales actúan como “oportunistas”.

### 13.4. ACUMULACIÓN Y DISTRIBUCIÓN ENTRE TEJIDOS

Después de entrar en la célula, la reactividad y la solubilidad limitada de la mayoría de los iones metálicos requiere que sean quelados. Los iones metálicos se unen a agentes quelantes y a chaperonas sintetizadas por la propia célula vegetal. Los primeros contribuyen a la detoxificación del metal ya que permiten regular, dentro de unos límites, las concentraciones de diferentes metales en el citosol. Las chaperonas permiten distribuir los complejos metálicos a través de la célula para que puedan llegar a los orgánulos y a las proteínas que los requieran. En plantas, las principales clases de agentes quelantes que se han descrito son las fitoquelatinas, las metalotioneínas, los ácidos orgánicos y algunos aminoácidos. En *A. thaliana* genes codificantes de chaperonas como RAN1 se han identificado de forma específica en el tráfico intracelular de Cu para su transporte hacia orgánulos o nuevamente hacia el citosol (Himelblau y Amasino, 2000). No obstante, los mecanismos mediante los que los metales quelados se mueven a través del interior celular son poco conocidos, aunque parece claro que las principales estrategias de detoxificación son la compartimentalización de los complejos metálicos en las vacuolas y la retirada de los iones metálicos hacia el exterior celular (Clemens, 2001).

Las fitoquelatinas (PCs, del inglés phytochelatins) son pequeños péptidos capaces de unirse a iones metálicos y que responden a la estructura general  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ( $n=2-11$ ) (Grill et al., 1985). Su síntesis (Grill et al., 1989), catalizada por las fitoquelatinas sintetasas ( $\gamma$ -glutamilsisteína dipeptidil transpeptidasa) a partir del glutatión reducido (GSH), se induce después de una exposición a metales. De forma independiente, se aislaron los genes AtPCS1 (a partir de *A. thaliana*) y TaPCS1 (a partir de trigo) mediante análisis de los cDNAs de plantas sometidas a Cd (Clemens y col., 1999). Se ha comprobado que células de *S. cerevisiae* que expresan genes de fitoquelatina sintetasas, son capaces de desplegar tolerancia a Cd, que es dependiente de GSH y está relacionada con la síntesis de PCs. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la sobreexpresión de estos genes se ha hecho sobre Cd, sin estar claro que aumenten la tolerancia a otros metales, lo que lleva a pensar que la formación de PCs no representa el único mecanismo de la tolerancia de los metales en las plantas. Se considera que juegan un importante papel en el secuestro de los iones metálicos en las vacuolas mediante un mecanismo que consiste en la formación en el citosol de complejos de bajo peso molecular PC-metal que posteriormente se transportan al interior de la vacuola mediante transportadores como el Htm1, y allí se forman complejos de alto peso molecular. En un estudio llevado a cabo con plantas de maíz expuestas a elevadas concentraciones de Cd, la mayor parte del catión contenido en las células de la raíz se encontró quelado por medio de PCs (el 97% del total), mientras que en las células del tallo sólo estaba quelado con las PCs el 25% del Cd (Rauser, 2003). Por otra parte, existen evidencias de que los complejos PC-metal se desarrollan sólo de forma transitoria: en cultivos celulares se observó la desaparición de los complejos PC-metal después de varios días de tratamientos y, en plantas enteras que crecen en suelos con actividad minera, Leopold et al. (1999) no pudieron detectar PCs. De todo lo que antecede parece concluirse que las fitoquelatinas no forman quelatos con los metales durante largos períodos de tiempo aunque se desconoce qué moléculas podrían formarlos (Clemens, 2006).

Las metalotioneínas (MTs) son pequeñas proteínas, genéticamente codificadas, ricas en cisteína (por tanto con gran número de grupos tiol) que aunque se han encontrado en plantas, no juegan un papel

tan claro en la detoxificación metálica como el que tienen en células de mamíferos, en donde son capaces de enlazar con el Cd para su detoxificación. De cualquier forma, las MTs de plantas confieren tolerancia a metales cuando se expresan de forma heteróloga, por ejemplo, en *S. cerevisiae* algunos genes MT se regulan positivamente frente a excesos de metales (Cobbett y Goldsbrough, 2002).

Para comprender los mecanismos de estrés producido por los metales en el conjunto de la planta, es también importante conocer de qué forma los metales pueden recorrer el camino hasta alcanzar el xilema, a través del cual serán distribuidos a los distintos tejidos de la planta e incluso la redistribución de los metales en la parte aérea y también hacia la raíz vía floema. En este sentido, recientemente se ha demostrado que en *Solanum tuberosum* la mayor parte del Cd acumulado en los tubérculos procedía de la redistribución vía floema y no directamente de la absorción desde el sustrato contaminado con Cd (Reid et al., 2003). En cuanto al transporte por el xilema, se considera que el transporte de los metales se realiza a través del simplasto antes de pasar al flujo xilemático (Tester y Leigh, 2001). Aunque se conoce poco acerca de los transportadores metálicos implicados en la carga del xilema, se sabe que el transporte de iones hacia el xilema está estrechamente controlado por estas proteínas transportadoras de membrana (Gaymard et al., 1998). Sin embargo las perturbaciones originadas por algunos metales en las membranas celulares pueden provocar la pérdida del control de la carga del xilema (Hall 2002), lo que aumenta de forma importante la llegada de iones tóxicos a todos los tejidos de la planta, provocando síntomas agudos de estrés que llegan a comprometer la viabilidad de la planta. La forma en que se transportan los metales por el xilema es mediante la formación de quelatos con ciertos ligandos como la histidina, la nicotianamina y el citrato (Pich et al., 1994; Senden et al., 1995). En este sentido, por ejemplo, se ha comprobado que plantas de *Alyssum lesbiacum* responden a elevadas concentraciones de Ni mediante un notable aumento en los niveles de histidina y la poliamina nicotianamina también fue identificada como un ligando potencial del Ni (Krämer et al., 1996).

Una vez que los complejos metálicos alcanzan el xilema, los procesos de descarga son las etapas iniciales para la distribución y detoxificación de los metales en el tallo y las hojas, así como su posible redistribución vía el floema. El tráfico de metales que tiene lugar dentro de cada célula de la planta, intenta mantener las concentraciones dentro de rangos fisiológicos específicos y suministrar los metales a las proteínas que lo necesiten. Como se comentó anteriormente, los péptidos tiolados, las chaperonas y proteínas transportadoras están implicadas en estos procesos. El tipo de distribución varía con la especie vegetal y con el metal. Los excesos de metales esenciales y no esenciales se encuentran en las células de diferentes tejidos, especialmente en raíces y hojas aunque se han identificado tipos celulares que muestran una acumulación diferencial, como los tricomas. Como ejemplo cabe señalar que en los tricomas de *Brassica juncea*, la acumulación del Cd fue 40 veces mayor que en la hoja (Salt et al., 1995).

### 13.5. TOLERANCIA E HIPERTOLERANCIA

Los mecanismos de homeostasis metálica en las plantas proporcionan a todas las especies cierta capacidad de tolerancia que varía en función del metal y del estado fisiológico en el que se encuentra la planta. Cuando se supera la capacidad de tolerancia aparecen síntomas de toxicidad asociados al estrés por metales que conducen a la reducción de la viabilidad de las plantas. Sin embargo, el simple nivel de tolerancia basal a algunos metales como el Cd en cultivos agrícolas puede ser un problema en la alimentación animal y humana, ya que la acumulación de estos metales en cantidades que las plantas puede tolerar sin que muestren síntomas de toxicidad, puede ser un peligro para la salud (Wagner, 1993).

De manera coloquial se puede afirmar que la tolerancia basal implica la reducción de la disponibilidad de los metales tóxicos absorbidos mediante interacción con moléculas en la célula y puede tener lugar de dos formas: secuestro en vacuolas y transporte hacia el exterior de la célula (Clemens, 2006). Como hemos visto en el epígrafe anterior, los mecanismos de tolerancia incluyen la síntesis de agentes quelantes de bajo peso molecular o de tipo proteico, que pueden actuar como tampones metálicos intracelulares, así como de sustancias que median en el transporte de los metales. Aunque se han identificado elementos comunes en las maquinarias de tolerancia de diferentes especies y metales, existen evidencias de mecanismos específicos en diferentes especies y para cada metal. En el caso del Cd, uno de los mecanismos de tolerancia que se han identificado es la síntesis de fitoquelatinas. También son relevantes otro tipo de proteínas que pueden mediar en el transporte de metales hacia las vacuolas u otros compartimentos subcelulares como es la familia CDF (MTP). Así, en *A. thaliana*, MPT1 es esencial para la tolerancia a exceso de Zn (Kobae et al., 2004; Desbrosses-Fonrouge et al., 2005).

En la naturaleza podemos encontrar plantas que se han adaptado a la presencia de concentraciones muy altas de algunos metales que normalmente provocarían toxicidad en otras especies. A estas plantas se las denomina metalofitas y aunque algunas son hiperacumuladoras otras no lo son, ya que se han identificado especies metalofitas que siguen una estrategia de exclusión de algunos iones metálicos en el proceso de absorción de nutrientes en vez de acumularlos en sus tejidos. Está claramente aceptado que la tolerancia extrema y la hiperacumulación son características independientes (Bert et al., 2003). Esta tolerancia tan extrema observada en estas plantas se conoce como hipertolerancia y normalmente es específica frente a uno o pocos metales concretos. Como ejemplo, cabe señalar que en *Silene vulgaris* el fenómeno de la hipertolerancia al Cu, Cd y Zn parece estar controlado por la expresión de uno o dos genes y el proceso no está relacionado con la absorción limitada de los metales por parte de la planta (exclusión) sino que parece estarlo bajo el control de la quelación y del secuestro vacuolar (Schat, 1999). En el caso concreto del Cd, la evidencia disponible sugiere que la hipertolerancia difiere significativamente de la tolerancia, ya que las PCs no parecen jugar un papel determinante en la hipertolerancia aunque sí se observó que se perdía la hipertolerancia cuando la biosíntesis de GSH se bloqueaba (Schat et al., 2002). Los genes responsables para la hipertolerancia de Cd en plantas no son conocidos, sin embargo se han aislado genes candidatos de *Arabidopsis halleri* que codifican los transportadores de la familia ZIP, nicotinamina sintasas y HMAs, que han sido implicados en el proceso (Verret et al., 2004).

### 13.6. FITORREMEDIACIÓN

Una de las aplicaciones prácticas del conocimiento adquirido sobre los mecanismos de movilización, absorción, transporte y acumulación de los metales en plantas es la fitorremediación, es decir el uso de las plantas para eliminar, transferir, estabilizar y/o degradar diferentes tipos de contaminantes del suelo, de residuos o de depósitos o corrientes de aguas (Hughes et al., 1997). Es una tecnología emergente que trata de resolver el problema de la contaminación del suelo por metales. La fitorremediación engloba en realidad diferentes tecnologías con enfoques diferentes pero que comparten el mismo objetivo. Normalmente se distinguen 3 técnicas de fitorremediación: i) fitoestabilización, en la que las plantas se utilizan para estabilizar los contaminantes y reducir su movilidad en el medio pero sin llegar a eliminarlos; ii) fitodegradación, en el que se utilizan plantas con capacidad para absorber y metabolizar una sustancia contaminante y retirarla del medio; iii) fitoextracción, en donde las plantas se utilizan para absorber un contaminante, transportarlo y acumularlo en la parte aérea, que puede ser recolectada. En la práctica estas técnicas



pueden combinarse de manera que por ejemplo es posible que una planta extraiga un metal como el Hg del suelo, degrade los compuestos orgánicos a los que se asocia el Hg de manera que finalmente se produzca la volatilización (fitovolatilización) de mercurio elemental a través del intercambio gaseoso de la planta con la atmósfera (Rugh et al., 1998).

A efectos relacionados con el contenido de este capítulo, nos centraremos de forma específica en la fitoextracción que permite retirar metales del suelo e incluso recuperar los metales acumulados en las plantas (EPA, 2000). Ya hemos dicho anteriormente que se han identificado alrededor de 400 especies de plantas hiperacumuladoras. Sin embargo, las especies hiperacumuladoras presentan limitaciones notables ya que suelen ser especies de crecimiento lento, con escasa producción de biomasa, con un sistema radicular limitado en cuanto a la profundidad que alcanza y no siempre adaptadas a un medio contaminado concreto. Para superar estas limitaciones, se ha propuesto la utilización de otras especies que, aunque no son hiperacumuladoras, sí muestran tolerancia a la presencia de algunos contaminantes así como una capacidad limitada de acumularlos en sus tejidos (Gisbert et al., 2003; Couselo y Corredoira, 2004). Las plantas que se utilicen en fitorremediación deben tener una tolerancia elevada al estrés inducido por uno o varios metales, ser capaces de acumular metales en cantidades significativas (especialmente en la parte aérea), tener un crecimiento rápido con elevada producción de biomasa y un extenso sistema radicular, resistir enfermedades y plagas y finalmente, para evitar la introducción de los metales en las cadenas tróficas, no ser atractivas a los animales (Thangavel y Subhuram, 2004). Por este motivo, recientemente se han realizado diferentes evaluaciones de la capacidad fitorremediadora de especies arbóreas con estas características, principalmente de los géneros *Populus* sp. y *Salix* sp. (Dos Santos Utmazian et al., 2007; EPA, 2000; Meers et al., 2007). Además recientemente, el Departamento de Medioambiente de Canadá ha publicado la base de datos "Phytorem" que contiene un inventario mundial de más de 750 plantas acuáticas y terrestres, tanto salvajes como cultivadas y variedades, que potencialmente pueden utilizarse en fitorremediación (Padmavathiamma y Li, 2007). Es importante señalar que, aunque desde el punto de vista de la planta los aspectos más interesantes a considerar son la capacidad de desarrollar una gran cantidad de biomasa de forma rápida y la capacidad para acumular grandes cantidades de metales en esta parte aérea (Pilon-Smits, 2005), para que la fitoextracción sea exitosa es fundamental el desarrollo de adecuadas prácticas agronómicas adaptadas al propio cultivo.

Desde el punto de vista de la mejora genética aplicada a fitorremediación de metales pesados son 2 los caminos que pueden seguirse: i) selección de especies o variedades que muestren una capacidad natural de fitoextracción significativa y adaptadas a las condiciones del medio contaminado; ii) desarrollo de nuevas variedades mediante la inducción de variabilidad genética y selección in vitro (ver el capítulo "Selección in vitro para estreses abióticos"), o mediante la transformación genética.

En los últimos años se está haciendo incidencia en la transformación genética como una herramienta en la búsqueda de mejorar de la capacidad fitoextractora de metales en plantas no hiperacumuladoras. Sin embargo, hasta ahora, no ha sido posible conseguir unos resultados uniformes, muy al contrario, en muchos casos, los resultados obtenidos son totalmente contradictorios. A falta de un conocimiento más profundo de la base genética y molecular de la homeostasis metálica en las plantas, se han realizado diversas aproximaciones sobreexpresando algunos genes que codifican enzimas impa juncea (Gasic y Korban, 2007) donde con *AtPCS1* en algunas de las líneas transgénicas obtenidas se logró aumentar la tolerancia al Cd y al Zn en plantas cultivadas in vitro. Además, la sobreexpresión de *TaPCS1* en *Nicotiana glauca* aumentó la acumulación de Pb

y Zn con respecto a las plantas control e incluso sobre los mismos sustratos, se registraron concentraciones de ambos metales mayores que en *Thlaspi caerulescens* (Martínez et al., 2006). Sin embargo, Lee et al. (2003) encontraron hipersensibilidad al Cd al sobreexpresar *AtPCS1* directamente en *A. thaliana*. Recientemente, Couselo et al. (2006) sobreexpusieron ambas PCS, *AtPCS1* y *TaPCS1*, en *Populus tremula x tremuloides* logrando reducir la toxicidad del Cd y del Pb en las plantas que crecieron tanto en medios hidropónicos contaminados como en suelos mineros contaminados. Sin embargo las concentraciones de Pb y Cd registradas tanto en las plantas transgénicas como en los controles no difirieron significativamente. Un resultado similar también ha sido descrito en *Nicotiana tabacum* transformada con *AtPCS1* (Pomponi et al. 2006), donde además la tolerancia se vio incrementada tras la adición al sustrato hidropónico de glutatión reducido.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al MEC la ayuda económica recibida a través del proyecto AGL2005-00709.

## REFERENCIAS

- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyper accumulate metallic elements – Review of their distribution, ecology, and phytochemistry. *Biorecovery*, 1: 81-126.
- Baker, A.J.M., Reeves, R.D. and Hajar, A.S.M. (1994). Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). *New Phytol.* 127: 61–68.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M. and Tomaro, M.L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17: 21-34.
- Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W. and Verbruggen, N. (2003). Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant Soil* 249: 9–18.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. and Baker, A.J.M. (1997) Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion Biotech.* 8: 279-283.
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.J. and Schroeder, J.I. (1998). The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12043–12048.
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486.
- Clemens, S., Palmgreen, M.G. and Kramer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* 7: 309-315.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707-1719.
- Connolly, E.L., Fett, J.P. and Guerinot, M.L. (2002). Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14: 1347-1357.



- Cobbett, C. and Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53: 159-182.
- Couselo, J.L. and Corredoira, E. (2004). Transformación genética de *Populus tremula x tremuloides* con la secuencia *AtPCS1* para su uso en programas de fitorremediación. *Rev. Real Acad. Gal. Cienc.* 23: 79-94.
- Couselo, J.L., Dillewijn, P., Corredoira, E., Ramos, J.L. and Ballester, A. (2006). Phytoremediation by *Populus*: heavy metal phytoextraction and TNT phytodegradation, Proc. COST Action 859 Root to shoot translocation of pollutants and nutrients. Santiago de Compostela.
- De Vos, C., Vonk, M., Vooijs, R. and Schat, H. (1992) Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*, *Plant Physiol.* 98: 853–858.
- Desbrosses-Fonrouge, A.G., Voigt, K., Schroder, A., Arrivault, S., Thomine, S. and Krämer, U. (2005). *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation, *FEBS Lett.* 579: 4165–4174.
- Dietz, K-J, Baier, M. and Krämer, U. (1999). Free Radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. pp. 73–97, in *Heavy Metal Stress in Plants*. M.N.V. Prasad and J. Hagemeyer (Eds). Springer, Berlin.
- Dos Santos Utmazian, M.N., Wieshammer, G., Vega, R.. and Wenzel, W.W. (2007). Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environ. Pollut.* 148:155-165.
- EPA (2000). *Introduction to phytoremediation*. National Risk Management Research Laboratory. US Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio.
- Fox, T.C. and Guerinot, M.L. (1998). Molecular biology of cation transport in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49:669-696.
- Gasic, K and Korban, S.S. (2007). Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta* 225:1277-85.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J, Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J.B. and Sentenac, H. (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* 94: 647-655.
- Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walter, D.J., Bernal, M.P., Serrano, R. and Navarro-Aviñó, J. (2003). A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 440-445.
- Grill, E., Winnacker, E-L. and Zenk, M.H. (1985). Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E-L and Zenk, M.H. (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 6838-6842.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53: 1-11.

- Hall, J.L. and Williams, L.E. (2003). Transition metal transporters in plants. *J Exp Bot.* 54: 2601-13.
- Himelblau, E. and Amasino, R.M. (2000). Delivering copper within plant cells. *Curr Opin Plant Biol.* 3:205-10.
- Hildebrandt, U., Regvar, M. and Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68(1):139-46.
- Hirsch, R., Lewis, B.D., Spalding, E.P. and Sussman, M.R. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, 280: 918-921.
- Hughes, J.B., Shanks, J., Vanderford, M., Lauritzen, J. and Bhadra, R. (1997). Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environ. Sci. Tech.* 31: 266-271.
- Kim, Y.Y., Yang, Y.Y. and Lee, Y. (2002). Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol. Plant.* 116:368-372.
- Kobae, Y., Uemura, T., Sato, M.H., Ohnishi, M., Mimura, T., Nakagawa, T. and Maeshima, M. (2004). Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol.* 45: 1749-1758.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M. and Smith, A.C. (1996). Free histidina as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638.
- Krämer, U., Talke, I.N. and Hanikenne, M. (2007). Transition metal transport. *FEBS Lett.* 581:2263-72.
- Lee, S., Moon, J.S., Ko, T.S., Petros, D., Goldsbrough, P.B. and Korban, S.S. (2003). Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol.* 13: 656-663.
- Leopold, I., Gunther, D., Schmidt, J. and Neumann, D. (1999). Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 50: 1323-1328.
- Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Young, S.D. and Sacchi, G.A. (2001). Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol.* 149: 53-60.
- Macfarlane, G.R. and Burchett, M.D. (2001). Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 233-240.
- Martínez, M., Bernal, P., Almela, C., Vélez, D., García-Agustín, P., Serrano, R. and Navarro-Aviñó, J. (2006). An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere* 64: 478-485.
- Meers, E., Vandecasteele, B., Ruttens, A., Vangronsveld, J. and Tack, F.M.G. (2007). Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environ. Exp. Bot.* 60:57-68.
- Padmavathiamma, P.K. and Li, L.Y. (2007). Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut.* 184: 105-126.
- Pich, A., Scholz, G. and Stephan, U.W. (1994). Iron-dependent changes of heavy metals, nicotianamine, and citrate in different plant organs and in the xylem exudate of two tomato genotypes. Nicotianamine as possible copper translocator. *Plant Soil* 165: 189-196.

- Pilon-Smits, E.A.H. (2005). Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Biol.* 56: 15-39.
- Pomponi, M., Censi, V., Di Girolamo, V., De Paolis, A., di Toppi, L.S., Aromolo, R., Costantino, P. and Cardarelli, M. (2006). Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd(2+) tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta* 223:180-190.
- Rausser, W.E. (2003). Phytochelatin-based complexes bind various amounts of cadmium in maize seedlings depending on the time of exposure, the concentration of cadmium and the tissue. *New Phytol.* 158: 269-278.
- Rea, P.A., Vatamaniuk, O.K. and Rigden, D.J. (2004). Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase, *Plant Physiol.* 136: 2463–2474.
- Reid, R.J., Dunbar, K.R. and McClaughlin, M.J. (2003). Cadmium loading into potato tubers: the roles of the periderm, xylem and phloem. *Plant Cell Environ.* 26: 201-206.
- Rugh, C.L., Senecoff, J.F., Meagher, R.B. and Merkle, S.A. (1998). Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nat Biotechnol.* 16: 925-928.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J. and Raskin, I. (1995). Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.* 109: 1427-1433.
- Sanità di Tropi, L. and Gabbriellini, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-668.
- Schat, H. (1999). Plant responses to inadequate and toxic micronutrient availability: general and nutrient-specific mechanisms. pp. 311–326, in G. Gissel-Nielsen and A. Jensen (Eds.) *Plant Nutrition—Molecular Biology and Genetics*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Schat, R., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J. and Ballester, P.M. (2002). The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot.* 53: 2381-2392.
- Senden, M.H.M.N., van der Meer, A.J.G.M., Verburg, T.G.V. and Wolterbeek, H.Th. (1995). Citric acid in tomato plant roots and its effect on cadmium uptake and distribution. *Plant Soil* 171:333-339.
- Schützendübel, A. and Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *J. Exp. Bot.* 53: 1351–1365.
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouché, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I.N., Maathuis, F.J., Sanders, D., Bouchez, D. and Fromm, H. (2000). Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* CNGC1 gene confer Pb<sup>2+</sup> tolerance. *Plant J.* 24:533-542.
- Thangavel, P. and Subhram, C.V. (2004). Phytoextraction – Role of hyper accumulators in metal contaminated soils. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad. Part B* 70: 109-130.
- Tester, M. and Leigh, R.A. (2001). Partitioning of nutrient transport processes in roots. *J. Exp. Bot.* 52:445-57.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. and Schroeder, J.I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4991-4996.

Van Assche, F. and Clijsters, H. (1986). Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase. *J. Plant Physiol.* 125, 355–360.

Van Assche, F. and Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell Environ.* 13: 195–206.

Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A. and Richaud, O. (2004). Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett.* 576: 306-312.

Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M., Briat, J. and Curie, C. (2002). IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 4: 1233-1243.

Vivas, A., Bir, B., Ru\_z-Lozano, J.M., Barea, J.M. and Azc\_n, R. (2006). Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere.* 62(9):1523-33.

Wagner, G.J. (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron.* 51: 173-212.

Williams, L., Pitman, J. and Hall, J. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 104-126.

Zhao, F.J., Jiang, R.F., Dunham, S.J. and McGrath, S.P. (2006). Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytol.* 172:646-654.

CAPÍTULO **14**

---

**RESISTENCIA A  
IONES TÓXICOS**

*César Benito  
Francisco Javier Gallego*



## RESISTENCIA A IONES TÓXICOS

---

César Benito y Francisco Javier Gallego

**Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid**

---

### 14.1. INTRODUCCIÓN

#### 14.1.1. Los iones tóxicos

Se considera que un ión es tóxico cuando tiene efectos nocivos en el desarrollo de la planta, disminuyendo o impidiendo su crecimiento normal y la producción de los cultivos. Cualquier ión puede ser perjudicial para la planta si se encuentra por encima (toxicidad) o por debajo (deficiencia) de la concentración óptima. Existen iones esenciales para el desarrollo e iones no esenciales (sin función biológica conocida o determinada). Los iones esenciales pueden ser tóxicos a partir de concentraciones mM (macronutrientes) o  $\mu\text{M}$  (micronutrientes). Hay iones no esenciales cuyo aumento de concentración produce una disminución del crecimiento (toxicidad) e iones no esenciales cuya presencia provoca hormesis (fenómeno de respuesta a dosis caracterizado por una estimulación por dosis bajas y una inhibición para dosis altas). El estudio de los iones tóxicos que reducen la productividad en las cosechas (Al, Zn y en menor medida Cu y Ni) es muy importante desde el punto de vista agrícola. Además, los iones tóxicos pueden ser absorbidos por la planta y llegar al consumo humano a través de la cadena trófica (As, Cd, Hg, Pb etc.).

Es posible encontrar una mayor concentración de iones tóxicos de forma natural, en suelos no contaminados por el hombre, en zonas ricas en elementos metálicos (suelos con Co, Ni y Cr) procedentes de rocas básicas y ultrabásicas. La alta concentración de estos iones metálicos da lugar a suelos muy poco fértiles que limitan el crecimiento de la planta. Este tipo de suelos se encuentra en diferentes países europeos (Italia, Portugal, Países del Este, Alpes Alemanes, Cádiz, etc.). También los suelos ácidos, bastante frecuentes en zonas tropicales, provocan la aparición de iones tóxicos, en especial los iones de aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ). Otras causas naturales son la actividad volcánica, meteoros, erosión de rocas, formación de suelos, terremotos, tsunamis, etc.

Existen diferentes formas de contaminación, producidas por el hombre (antropogénicas), que aumentan la concentración de iones tóxicos en el suelo: contaminación atmosférica, fábricas de cemento, minería, depósitos de cenizas, combustión de carburantes fósiles como la gasolina con Pb (el Pb pasa a la atmósfera y se deposita cerca de las carreteras, el Zn procedente del caucho de los neumáticos y Pt de los catalizadores también se depositan), contaminación de suelos agrícolas por actuaciones agrarias (uso de pesticidas con Hg y As, empleo de pesticidas menos tóxicos con Zn y Mn, contaminación con Cu cuando se sulfatan viñedos y empleo

de fertilizantes), utilización de fangos de depuración de aguas residuales (Boro procedente de los detergentes de las lavadoras) y utilización de campos de basura (siendo B y Zn los elementos fitotóxicos más típicos, el B procede del vidrio de las basuras).

Los iones tóxicos producen grandes pérdidas en las cosechas. Por tanto, la obtención de variedades resistentes a diferentes tipos de iones tóxicos y el conocimiento de las bases moleculares de dicha resistencia son objetivos de sumo interés en investigación. Como he dicho al principio, existen muchos iones diferentes cuyo exceso o deficiencia puede afectar al desarrollo de las plantas, por tal motivo, centraré esta revisión en dos casos de gran importancia: la contaminación por metales pesados (MP) y la tolerancia al aluminio (ToAl) en suelos ácidos.

## 14.2. LOS METALES PESADOS (MP)

Los iones más perjudiciales suelen ser los metálicos, en especial los pesados. Los metales pesados (MP) tienen una densidad igual o superior a  $5 \text{ g cm}^{-3}$  o un número atómico superior a 20 (excluyendo los metales alcalinos y alcalinotérreos). El término "metal pesado" habitualmente se utiliza para referirse a elementos pesados que son tóxicos para la célula. Su presencia en la corteza terrestre casi siempre es menor del 0,01% y siempre inferior al 0,1% (Navarro-Aviñó et al. 2007). El As, B, Ba y Se (metales ligeros y no metales) se engloban con los MP por sus orígenes y comportamientos asociados. Los MP se clasifican en oligoelementos o micronutrientes (As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Se y Zn) que son necesarios en pequeñas cantidades pero tóxicos a partir de una determinada concentración y MP sin función biológica conocida (Ba, Cd, Hg, Pb, Sb y Bi) que son altamente tóxicos. En muchos casos, no se indica si se trata de elementos puros o de alguno de sus estados de oxidación que poseen diferentes propiedades físicas, químicas, tóxicas y ecotóxicas.

Las concentraciones elevadas de MP, como ya hemos dicho pueden deberse a causas naturales o antropogénicas. Los MP del suelo pueden seguir distintas vías: pasar a las aguas superficiales o subterráneas, transferirse a la atmosfera por volatilización, incorporarse a la cadena trófica a través de las plantas y retenerse en el suelo (disueltos o fijados, retenidos por adsorción, formando complejos y por precipitación).

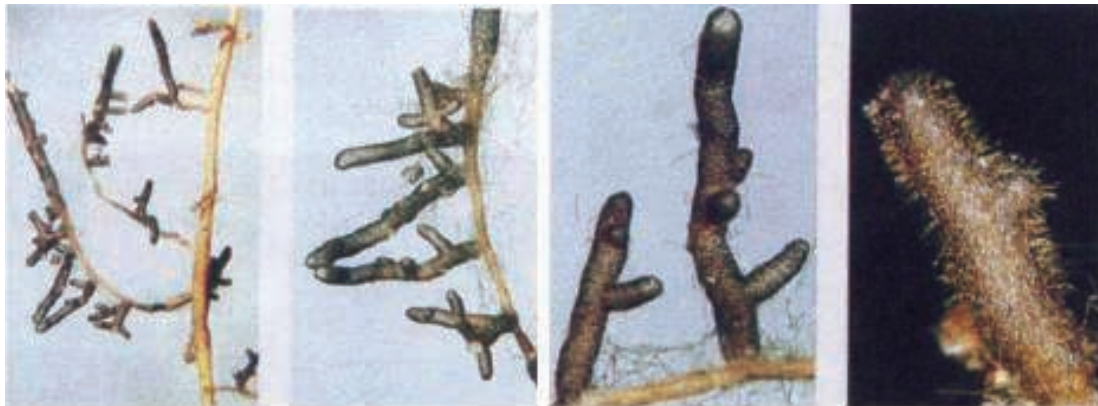
La toxicidad de un determinado MP depende de la concentración, la forma química, la presencia de otros MP (algunas mezclas producen efectos sinérgicos y otras antagónicas) y la persistencia (tiempo que tarda en transformarse en una forma no tóxica). La imposibilidad de conseguir niveles adecuados de excreción aumenta la toxicidad. Los MP suelen bioacumularse (aumento de la concentración en un organismo que llega a ser superior a la del ambiente) siendo, por este motivo, altamente tóxicos. Además muestran biomagnificación (aumento de la incorporación o concentración durante el paso por las distintas cadenas tróficas). Los MP se unen fácilmente a otras moléculas orgánicas (grupos sulfidrido, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo) produciendo daños celulares graves: inhibición de la actividad proteica, desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo normal y generación de especies reactivas de oxígeno (moléculas ROS), como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) que generan radicales libres que producen estrés oxidativo. El estrés oxidativo provoca diferentes daños en la célula: daños en el DNA, inactivación de proteínas y enzimas y peroxidación lipídica de membranas. Esta facilidad para unirse a moléculas orgánicas es la causa primaria de su elevada toxicidad.



Los MP pasan del suelo a las plantas y de estas a los mamíferos. En humanos los MP como As, Cd, Hg y Pb producen diferentes enfermedades: bronquitis, enfisema, anemia, hipertensión, infertilidad, cáncer de esófago, pulmón, riñón, vejiga y próstata, enfermedades vasculares y óseas, polineuritis, nefrotoxicidad, alteraciones neurológicas y del sistema respiratorio (As). Además, estos metales permanecen durante miles de años en el suelo generando un riesgo permanente para la salud.

#### 14.2.1. Mecanismos celulares para la tolerancia y detoxificación de MP

Las plantas con micorrizas (hongos del suelo en simbiosis con las raíces) muestran una mayor tolerancia a MP debido a que la pared celular del hongo impide que pasen a la planta (Figura 14.1). Aunque, en algunos casos las micorrizas también pueden favorecer la entrada y acumulación de MP en la planta.



**Figura 14.1.** Raíces con micorrizas. Tomada de Navarro-Aviñó et al. 2007

Existen diferentes mecanismos de tolerancia y detoxificación de MP que afectan a los siguientes procesos: transporte (entrada y salida de MP de la planta y de la célula), unión de MP a ligandos (Quelación), compartimentación vacuolar (el complejo ligando-MP ingresa en la vacuola), biotransformación (conjunto de transformaciones metabólicas implicadas en el procesamiento de los contaminantes) y reparación celular de los daños producidos. A continuación resumiré estos mecanismos que de manera esquemática se representan en la Figura 14.2.

La raíz es la puerta de entrada de los MP en la planta. Las cargas positivas de los MP interactúan con las negativas de las células de las raíces, lo que facilita su transporte a través de la pared celular. Los exudados radiculares de bajo peso molecular (ácidos orgánicos, azúcares, fenoles, aminoácidos y gases como el etileno) y alto peso molecular (autólisis de células epidérmicas y corticales, secreciones y mucílagos) facilitan la disponibilidad de los MP. La membrana plasmática es uno de los primeros elementos en responder al daño y, como consecuencia, los MP la afectan produciendo diferentes efectos: oxidación y entrecruzamiento de proteínas con grupos tiol, inhibición de proteínas de membrana esenciales ( $H^+$ -ATPasa) y cambios de permeabilidad, fluidez y composición de los lípidos de membrana. Por tanto, la membrana plasmática está involucrada en muchos mecanismos que promueven la tolerancia a MP reduciendo su captación o estimulando la entrada al citosol: mecanismos

de reparación que mantienen la integridad de la membrana, mecanismos de protección (proteínas de choque térmico, metalotioneínas, etc), mecanismos que promueven un flujo reducido o selectivo a través de la membrana y mejoran los mecanismos de homeostasis del metal.

También se han descrito transportadores de metal implicados en la homeostasis y la tolerancia: transportadores que reducen la entrada a través de la membrana (el transportador NtCBP4 de Ni regulado por calmodulina en *Nicotiana tabacum*) y transportadores de membrana plasmática que facilitan la entrada (CPx-ATPasas, Nramps, familias CNCG, CDF, LCT1 y ZIP). Las principales proteínas de membrana plasmática transportadoras de MP se indican en la Tabla 14.1.

Uno de los principales mecanismos utilizados por las plantas para amortiguar y detoxificar los MP es unirlos ligandos para formar complejos (quelación). Los grupos funcionales preferidos por los MP pesados son grupos sulfidrido, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. Uno de los metabolitos más empleados para quelar es el ácido cítrico (Tabla 14.1). Las moléculas orgánicas utilizadas principalmente como ligandos son ácidos orgánicos (málico, cítrico, oxalacético, etc), aminoácidos (cisteína, histidina, etc), y especialmente dos clases de péptidos, las fitoquelatinas (FQ) y las metalotioneínas.

Las metalotioneínas son proteínas de transporte de metales (primeras identificadas en mamíferos como transportadoras de Cd), ricas en cisteína, de bajo peso molecular (70-75 aminoácidos), encargadas de la quelación de metales pesados en el citoplasma de células de mamíferos y bacterias, aunque no parecen decisivas en la quelación de metales pesados en plantas. Las principales metalotioneínas implicadas en la tolerancia y/o acumulación de MP se indican en la Tabla 14.1.

Las fitoquelatinas (FQ) son fundamentales en la tolerancia y acumulación de MP en plantas, se inducen por tratamiento con MP y su disminución provoca una mayor sensibilidad a MP. El sustrato para la biosíntesis de las FQ es el glutatión o GSH (glutámico, cisteína y glicina unidos por enlaces peptídicos,  $\gamma$ Glu-Cys-Gly). El GSH es una molécula central en el control del estado oxidativo celular, capaz de quelar MP y detoxificar diferentes sustancias nocivas. El CD es un efector positivo de la síntesis de FQ. En la Tabla 14.1 se indican las principales FQ implicadas en la tolerancia y/o acumulación de MP. La mayor concentración de FQ y MP se detecta en las vacuolas por lo que el transporte y acumulación de MP en el interior de las vacuolas están implicados en la tolerancia y detoxificación de MP, siendo la compartimentación vacuolar el paso final.

La compartimentación vacuolar de los MP reduce su concentración en el citoplasma y resuelve el problema de su toxicidad. Un ejemplo es la acumulación de complejos de FQ y Cd en la vacuola, pero existen evidencias de acumulación de otros metales (Zn, Ni, etc.) que implican diferentes sistemas de transporte vacuolar. En la Tabla 14.1 se indican algunas de las principales proteínas descritas en el transporte vacuolar.

La biotransformación (conjunto de reacciones que transforman un compuesto tóxico en el organismo o aumentan su polaridad) es esencial para disminuir la cantidad de sustancia activa (tóxica) y reducir la persistencia en el sitio de acción. La forma de conseguirlo es aumentar la polaridad que a su vez incrementa la difusibilidad del tóxico acelerando su excreción. Se trata de convertir mediante reacciones de biotransformación un compuesto xenobiótico no polar (compuesto sintetizado por el hombre en el laboratorio y cuya estructura química es rara o inexistente en la naturaleza) por otro soluble en agua. Las principales reacciones de biotransformación son la glucoronidación, sulfatación, aminoacidación, glutatiónización, metilación y acetilación (Navarro-Aviñó et al. 2007).

Los mecanismos de reparación celular que se activan por daño celular, como el estrés oxidativo, también están involucrados en la respuesta a MP. Las metalotioneínas y las proteínas de choque térmico (su expresión aumenta por subidas inusuales de temperatura) están implicadas en la reparación de los daños producidos por los MP en la membrana plasmática. Los MP también inducen la expresión de las proteínas de choque térmico y una breve exposición a calor previa al tratamiento con MP aumenta la tolerancia, previniendo el daño en la membrana.

En la Figura 14.2 se resumen algunos aspectos clave que determinan la acumulación de MP y de su interacción con las plantas.

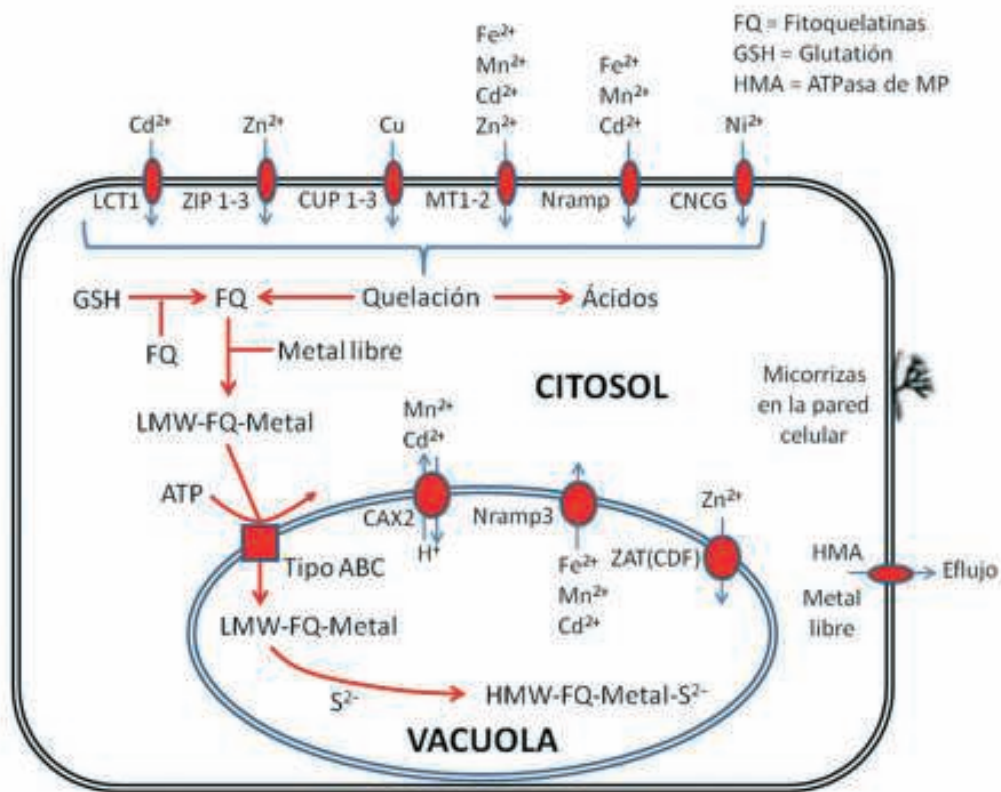
**Tabla 14.1.** Proteínas implicadas en la entrada, transporte y acumulación de MP. Modificada de Navarro-Aviñó et al. (2007)

Proteínas de membrana plasmática transportadoras de MP				
Proteína	Donante	Receptor	Funciones	Referencia
FRO2	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Quelatos de Fe, acumulación de Fe, Cu, Mn, Zn y Mg.	Delhaize 1996
FRE1, FRE2	Levadura	Tabaco	Fe(III) reductasas implicadas en acumulación y toma de Fe.	Samuelsen et al. 1998
NtCBP4	Tabaco	Tabaco	Tolerancia a Ni, Pb y MP; acumulación de Ni y Pb. Unión a calmodulina. Similar a AtCNGC1.	Arazi et al. 1999
NtCBP4	Tabaco	Tabaco	Acumulación atenuada de Pb.	Sunkar et al. 2000
AtNramp1	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Homeostasis y tolerancia a Fe.	Curie et al. 2000
AtNramp3	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Toma de Fe, Zn, Mn y Cd.	Thomine et al. 2000
IRT1, ZNT1	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Resistencia a Pb(II) y Cd(II).	Rogers et al. 2000
ZntA	<i>E. coli</i>	<i>A. thaliana</i> y Levadura.	Subfamilia ATPasas tipo P Homeostasis de Zn.	Lee et al. 2003
HMA2, HMA4	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Homeostasis de Zn.	Hussain et al. 2004
AtBOR1	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Transloca Boro de las raíces a los tallos.	Takano et al. 2005

Principal metabolito que actúa de ligando para la formación de complejos de citrato y metales				
Citrato sintasa	Tabaco y Papaya	Tabaco	Tolerancia al Aluminio	De La Fuente et al. 1997

Principales metalotioneínas implicadas en la tolerancia y/o acumulación de MP				
MT2	Humano	Tabaco	Tolerancia a Cd en germinación	Mirsa y Gedmanu 1989
MT1	Ratón	Tabaco	Tolerancia a Cd en germinación	Pan et al. 1994
MT	Guisante	<i>A. thaliana</i>	Acumulación Cu	Evans et al. 1992
CUP1	Levadura	Coliflor	16 veces más tolerante a Cd y acumulación Cd.	Hasegawa et al. 1997

Principales fitoquelatinas implicadas en la tolerancia y/o acumulación de MP				
gshII (GS) gshI ( $\gamma$ ECS)	E. coli	B. juncea	Acumulación Zn, Cr, Cu y Pb. Tolerancia y acumulación de Cd.	Zhu et al. 1999
parB	Tabaco	A. thaliana	Glutación S transferasa. Tolerancia a Cd, Al y Na.	Ezaki et al. 2000
$\gamma$ ECS	A. thaliana	A. thaliana	Tolerancia a Cd.	Xiang et al. 2001
RCS1	Arroz	Tabaco	Tolerancia a Cd. Cisteina sintasa	Harada et al. 2001
TaPCS1	Trigo	N. glauca	Acumulación de Pb, tolerancia a Cd y Pb. Fitoquelatina sintasa	Gisbert et al. 2003; Martínez et al. 2006
AtPCS1	A. thaliana	A. thaliana	Hipersensibilidad a Cd y Zn. Fitoquelatina sintasa.	Lee et al. 2003
Principales transportadores vacuolares de MP				
AtMTP1 o ZAT	A. thaliana	A. thaliana	Tolerancia y acumulación de Zn.	Zaal et al. 1999
CAX2	A. thaliana	Tabaco	Acumulación Ca, Cd y Mn. Tolerancia a Mn	Hirschi et al. 2000
YCF1	S. cerevisiae	A. thaliana	Tolerancia y acumulación de Cd y Pb.	Song et al. 2003
ZRC1	S. cerevisiae	S. cerevisiae	Antiportador con H <sup>+</sup> para almacenar Zn <sup>+2</sup>	MacDiarmid et al. 2002
PtdMTP1	Chopo híbrido	Levadura y A. thaliana	Los mutantes de levadura hipersensibles a Zn mejoran. Tolerancia a Zn en Arabidopsis.	Blaudez et al. 2003
ShMTP1	S. hamata	S. cerevisiae	Tolerancia a Mn <sup>+2</sup> por secuestro y eflujo	Delhaize et al. 2003
CAX1	A. thaliana	A. thaliana	Reducción actividad antiporte Ca <sup>2+</sup> /H <sup>+</sup> . Los mutantes cax1 crecen más con Mn <sup>2+</sup> .	Cheng et al.
AtPDR12	A. thaliana	A. thaliana	Resistencia a Pb. Transportador tipo ABC.	Lee et al. 2005
AtATM3	A. thaliana	A. thaliana	Resistencia a Cd. Transporte de conjugados de Cd a través de la membrana mitocondrial	Kim et al. 2006

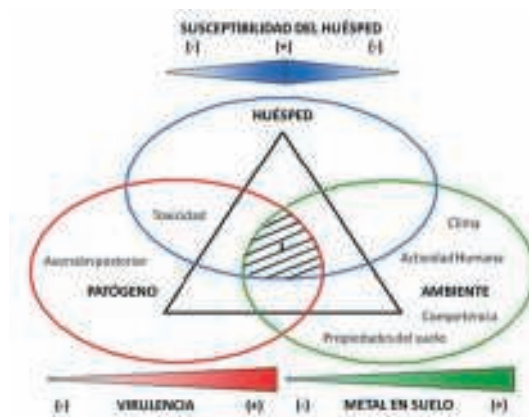


**Figura 14.2.** Interacción de los metales pesados con las plantas. Aspectos clave que determinan su acumulación. Modificada de Navarro-Aviñó et al. 2007

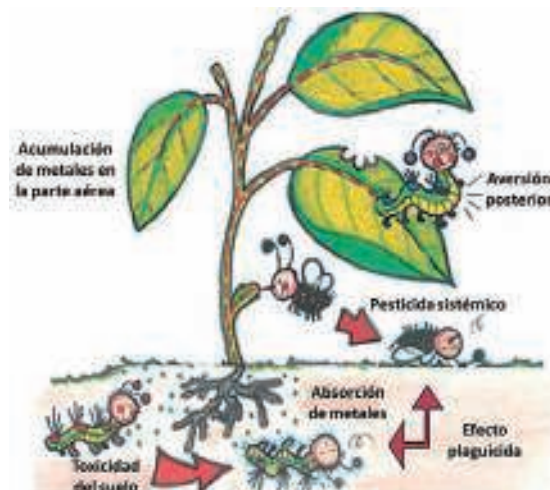
### 14.2.2. Hiperacumulación de metales pesados (MP)

El interés por las plantas hiperacumuladoras (acumulan y toleran cantidades inusualmente altas de metales en su parte aérea) ha crecido debido a su uso potencial en la fitorremediación (limpieza de suelos contaminados mediante plantas). El uso de plantas y microorganismos asociados para disminuir la concentración de MP a niveles óptimos en suelos contaminados (fitoextracción) permitiría reutilizar el suelo para fines forestales, agrícolas, hortícolas o lúdicos, evitando que los MP llegaran a zonas próximas por acción del viento y el agua (LLugany et al 2007, Poschenrieder et al 2006). Las plantas hiperacumuladoras deben poseer mecanismos de tolerancia y absorción que les permitan soportar cantidades de MP en sus tejidos que son muy tóxicas para otros organismos (superan en 100 o más veces los valores normales de MP acumulados). Tienen una tasa de crecimiento baja, poca producción de biomasa y un sistema radicular pobre, suelen encontrarse en suelos ricos en metales y tolerar uno o más MP. Se han descrito más de 400 especies pertenecientes a 45 familias distintas y la familia *Brassicaceae* es la que posee más géneros de plantas hiperacumuladoras (LLugany et al. 2007).

La hiperacumulación podría conferir una ventaja adaptativa frente al estrés biótico, protegiendo la planta contra patógenos y herbívoros (Behmer et al. 2005, Poschenrieder et al. 2006, Salt 2006). El buen funcionamiento de esta protección requiere que los MP impidan la virulencia del patógeno o herbívoro, que los MP sean más tóxicos para el herbívoro o patógeno que para la planta, y que los MP aumenten la resistencia de la planta frente al agente causante del estrés abiótico. Los tres factores que determinan la intensidad de un ataque biótico son la susceptibilidad del huésped, la virulencia del patógeno y el entorno (Figura 14.3). La cantidad de MP en el suelo puede tener una influencia positiva o negativa en la susceptibilidad de la planta y en virulencia del patógeno. Los principales factores ambientales son el clima, las propiedades del suelo, la competencia y la actividad humana. En algunos estudios se ha observado que los herbívoros que comen plantas hiperacumuladoras suelen padecer efectos tóxicos (efecto plaguicida) o responder con una aversión posterior (debida al mal sabor o por indigestión) (Figura 14.4).



**Figura 14.3.** Interacción entre los factores que determinan la intensidad de un ataque biótico: susceptibilidad del huésped, virulencia del patógeno y ambiente (modificada de Llugany et al. 2007)



**Figura 14.4.** Respuesta de patógenos y herbívoros frente a la acumulación de MP (modificada de Poschenrieder et al. 2006 y de Llugany et al. 2007).



Ya hemos dicho que los MP están presentes de forma natural en los suelos y que, últimamente, las actividades humanas han contribuido notablemente al aumento de su concentración. Algunos MP (Pb, Hg, Cd, As, Se y Cr) son muy nocivos para muchos mamíferos, incluido el hombre, son elementos no degradables que terminan acumulándose en los suelos y que acaban entrando en la cadena trófica. McGrath et al. (1993 y 2006) utilizaron por primera vez plantas hiperacumuladoras para extraer MP de suelos contaminados. Algunas especies hiperacumuladoras son *Alyssum sp.* (Ni), *Thlaspi caerulescens* (Zn/Cd) y *Melastoma malabanthricum* (Al) y su capacidad de absorción varía según el tipo de contaminante, el tipo de suelo y el pH del mismo.

La fitorremediación transfiere los MP del medio a las plantas hiperacumuladoras y, aunque los MP no sean tóxicos para estas, si lo son para los organismos que se alimentan de ellas. Su efectividad requiere especies vegetales con gran biomasa aérea y sistema radicular bien desarrollado para descontaminar zonas extensas y acumular una mayor cantidad de MP. Además interesa que tengan una elevada tasa de crecimiento y que sean fáciles de recolectar con técnicas agrícolas tradicionales. Estas características no suelen presentarse en las plantas hiperacumuladoras (Meagher et al. 2000, Barceló et al. 2001, y 2003), pero si en otros cultivos destinados al consumo humano, por lo que la transferencia por ingeniería genética de los genes responsables de la hiperacumulación a especies vegetales que reúnan estos requisitos sería deseable. Aunque este objetivo aún no se ha logrado, ya se conocen algunos genes responsables de un mayor transporte de metales (Zn) hacia la parte aérea de la planta en *Thlaspi caerulescens* (Lasat et al. 2000, Assunção et al. 2001). La fitorremediación puede ser una solución para los suelos contaminados, sin embargo, las ventajas de esta técnica producen también preocupación, ya que los MP bioacumulados en las plantas pueden pasar a la cadena trófica y el uso de plantas transgénicas sigue aún produciendo rechazo en gran parte de la sociedad.

### 14.3. LA TOLERANCIA AL ALUMINIO

#### 14.3.1. Tolerancia al aluminio (ToAl) en suelos ácidos

La baja fertilidad de los suelos ácidos se debe a una combinación de minerales tóxicos (aluminio y manganeso) y deficiencias minerales (fosforo, calcio, magnesio y molibdeno), siendo el Al (principalmente en su forma  $Al^{3+}$ ) tóxico para muchos cultivos y el principal factor restrictivo de la productividad en suelos ácidos (Eswaran et al 1997, Foy et al. 1978, Rao et al. 1993, Kochian 1995). Los suelos ácidos reducen la producción de cereales en el 30-40% de los terrenos cultivables y en más del 70% de los potencialmente cultivables (Haug 1983). La acidificación del suelo afecta aproximadamente al 40% de la superficie cultivable del mundo y se acelera debido a ciertas prácticas de labranza y a la lluvia ácida (Aniol et al. 1980, Haug 1983, Kennedy 1986). Aunque el empleo de limo (productos calcáreos y alcalinizantes) permite mantener la producción en suelos ácidos, es una solución poco eficaz, ya que el efecto neutralizante se ejerce en los primeros 25 cm. del suelo y no afecta a zonas profundas, donde penetra gran parte del sistema radicular (Guedes-Pinto 1985). Además, la contaminación es un efecto colateral no deseado. Por tanto, la obtención de variedades de plantas tolerantes al aluminio, por técnicas de mejora tradicional o mediante ingeniería genética, parece la mejor solución al problema.

Las especies vegetales muestran una gran variación en su ToAI, algunas son inherentemente más tolerantes que otras – por ejemplo, yuca (*Manihot esculenta* Crantz), caupí o chícharo salvaje (*Vigna unguiculata* L. Walp), cacahuete o maní (*Arachys hypogaea*), guandul (*Cajanus cajan* L. Millsp.), patata (*Solanum tuberosum*), arroz (*Oryza sativa* L.) y centeno (*Secale cereale* L.) (Little, 1988). El centeno es la especie de mayor tolerancia en la familia Triticeae, seguido por el Triticale (X *Triticosecale* Wittmack), trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Maugwira et al. 1976, 1978, Aniol y Madej 1996).

El estudio de los mecanismos moleculares de tolerancia al AI, el control genético y localización cromosómica de los genes de tolerancia son objetivos fundamentales en diferentes especies de cereales de elevado interés agronómico, pero también, es importante su conocimiento en otras especies relacionadas. La identificación y aislamiento de los genes de tolerancia y de marcadores moleculares totalmente ligados o muy próximos a estos genes, por ejemplo, en centeno, permitirá introducir dichos genes en otras especies menos tolerantes como trigo y cebada mediante la obtención de plantas transgénicas o mediante estrategias de selección asistida por marcadores.

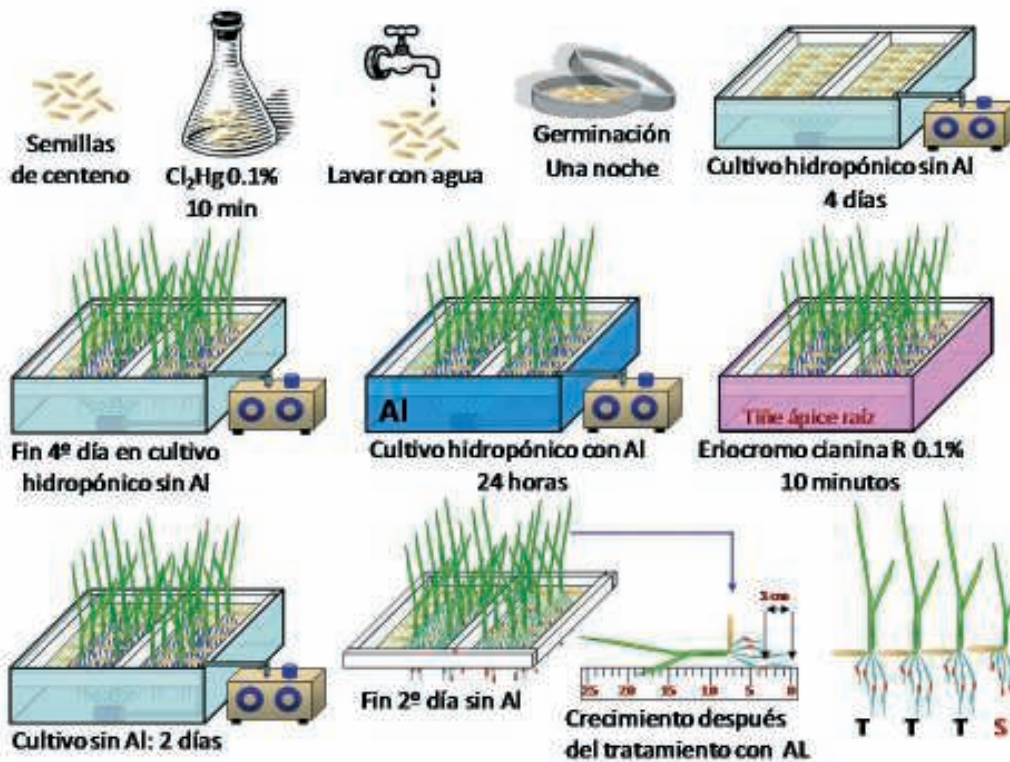
Para obtener genotipos con una mayor ToAI el investigador necesita métodos fiables y eficientes de selección. Con este propósito se han empleado diferentes métodos de cribado, desde la selección de genotipos en el laboratorio hasta bioensayos en suelo y evaluaciones de campo.

#### 14.3.2. Métodos empleados para determinar el grado de ToAI

Los métodos para evaluar la ToAI utilizados por los distintos autores son bastante variados: cultivo de células y tejidos (Corner y Meredith 1985), crecimiento en soluciones nutritivas (Baier et al. 1996), bioensayos en suelo (Stølen y Andersen 1978, Ring et al 1993) y evaluaciones en campo (Johnson et al. 1997). Los métodos de laboratorio e invernadero son los más utilizados ya que son rápidos, precisos, no destructivos y pueden aplicarse en estados tempranos de desarrollo. Sin embargo, las evaluaciones de campo son mucho más laboriosas (Craver y Ownby 1995).

El crecimiento en soluciones nutritivas en el laboratorio (Figura 14.5) es la técnica más empleada ya que proporciona un acceso sencillo a las raíces, permite controlar la disponibilidad de nutrientes, el pH y utilizar métodos de medida de la tolerancia no destructivos (Carver y Ownby 1995). Los métodos más utilizados para evaluar la tolerancia y clasificar las planta en tolerantes y sensibles son la tinción de las raíces con hematoxilina y el crecimiento de la raíces después del tratamiento con AI (Baier et al. 1995, Carver y Ownby 1995). También se ha utilizado para evaluar la ToAI el peso seco de las raíces y de la parte aérea, el número de hijuelos y el número de espigas y flores por espiga (Mugwira et al. 1976, Manyova et al. 1988). También se ha descrito correlación entre la ToAI en la inducción de síntesis de calosa (1,3-β-D-glucano) (Zhan et al. 1994, Basu et al. 1997, Host et al. 1997). Además, los resultados obtenidos con soluciones nutritivas en el laboratorio han demostrado correlacionarse muy bien con los de campo, ya que las plantas clasificadas como tolerantes normalmente muestran un mejor comportamiento y características agronómicas adecuadas en suelos ácidos (Carver et al. 1988, Rajaram y Villegas 1990, Ruiz-Torres et al. 1992, Rengel y Jurkic 1993, Baier et al. 1995).





**Figura 14.5.** Método de evaluación de la tolerancia al aluminio basado en la medición del crecimiento de las raíces después de un tratamiento con Al en una solución nutritiva a pH ácido (4.0) y tinción con Eriocromocianina R.

El método de tinción con hematoxilina es una herramienta muy poderosa para evaluar la tolerancia sin necesidad de medidas cuantitativas laboriosas. La hematoxilina forma complejos con el Al de los tejidos que ha sido inmovilizado en forma de  $AlPO_4$  en la raíz o inmediatamente debajo de la superficie de la raíz (Ownby 1993). A medida que aumenta la cantidad de Al que entra en la raíz aumenta la intensidad de tinción con hematoxilina y disminuye la tolerancia al Al (a mayor tinción menos tolerancia) (Polle et al. 1978). El método del crecimiento de la raíz habitualmente tiene en cuenta dos parámetros: el crecimiento de la raíz después del tratamiento con Al (Baier et al. 1995) y el índice de tolerancia de las raíces que consiste en comparar el crecimiento después del tratamiento con Al y el crecimiento sin tratar. Ambos métodos tienen ventajas e inconvenientes, en el caso de la tinción con hematoxilina es necesario emplear la concentración adecuada de Al según la especie estudiada (Hede et al. 2001). El crecimiento de la raíz después del tratamiento con Al es una combinación de la tolerancia (genotipo tolerante) y del vigor de la raíz, y la mejor manera de separar ambos efectos es incluir en los experimentos controles sin tratar. También se han empleado métodos que combinan la hematoxilina y el crecimiento de las raíces. Todos estos sistemas han sido empleados en una gran variedad de estudios genéticos y moleculares.

El cultivo de células y tejidos puede ser una manera de evaluar la ToAl, ya que la tolerancia se expresa a nivel celular (Taylor 1995), aunque este método ha sido poco utilizado, probablemente debido a la dificultad técnica de crecer células a pH bajo (Carver y Ownby 1995).

Los bioensayos en suelo no se realizan necesariamente en los suelos de área elegida para la producción, pero la evaluación en un suelo representativo del área elegida es un paso crítico intermedio después de las valoraciones en soluciones nutritivas y antes de las caras y tediosas evaluaciones en campo (Carver y Ownby 1995). Los bioensayos en suelo son mejores que las evaluaciones llevadas a cabo con soluciones nutritivas cuando la tolerancia puede estar influenciada por factores externos al suelo (Ring et al. 1993), sin embargo hay muy pocos ejemplos de su utilización.

Las evaluaciones en campo son el método más directo para valorar la tolerancia midiendo el rendimiento económico, normalmente se llevan a cabo dos réplicas: una en parcelas de suelo ácido y otra en parcelas tratadas con limo (Carver y Ownby 1995, Johnson et al. 1997). En las evaluaciones en campo los dos problemas más importantes son las infecciones por hongos patógenos (favorecidas por el bajo pH y la aplicación de limo) y la variación espacial del pH en la superficie y en las subcapas de suelo. Existen varios ejemplos de evaluaciones en campo, pero son muy caras y laboriosas (Stølen y Andersen 1978, Ruiz-Torres et al. 1992, Baier et al. 1995, Johnson et al. 1997)

### 14.3.3. Distribución global de los suelos ácidos

La acidez del suelo está influenciada por factores edáficos, climáticos y biológicos, estando determinada por la cantidad de iones  $H^+$  en solución. El Al es el tercer elemento más abundante después del oxígeno y el silicio, representa un 8% en peso de la corteza terrestre (FitzPatrick 1986) y forma parte de muchos minerales primarios y secundarios. A pH ácido, estos minerales se disuelven en parte liberando Al en solución al suelo, donde puede ser hidrolizado y contribuir a la acidez del suelo. Entre los cationes que más contribuyen a la acidez del suelo están los iones  $Al^{3+}$  y  $Fe^{3+}$  (Thomas y Hargrove 1984).

Los suelos de tipo granítico se acidifican más rápido que los calcáreos. Los suelos arenosos con pocas partículas de arcilla se acidifican más rápido por su menor reserva de cationes alcalinos y mayor capacidad de filtrado. Las lluvias intensas influyen en la acidificación dependiendo del flujo de agua a través del suelo (percolación). La acidificación del suelo se intensifica por la eliminación de los cationes después de la cosecha y por lluvia ácida (Ulrich et al 1980). La materia orgánica en descomposición forma ácido carbónico y otros ácidos débiles que contribuyen a la acidificación (Carver y Ownby 1995). La acidificación del suelo aumenta por aplicaciones repetidas de nitrógeno (práctica normal de labranza) en cantidades que exceden la absorción de los cultivos (Adams 1984). La producción neta de  $H^+$  tiene lugar a través de procesos naturales como la nitrificación del nitrógeno amónico.

Existen varias estimaciones de la distribución mundial de los suelos ácidos (Figura 14.6). Los suelos ácidos ocupan 1.455 millones de hectáreas (11% de la superficie terrestre) según una estima realizada por Van Wambeke (1976). Sin embargo, Haug (1983) estimó que los suelos ácidos representaban entre 30-40% de la superficie cultivable y más del 70% de la potencialmente cultivable. Posteriormente, Von Uexkull y Mutert (1995) estimaron que la extensión global de los suelos ácidos (suelos con  $pH < 5,5$ ) era de 3.950 millones de hectáreas, aproximadamente el 30% del total de la superficie mundial libre de hielos. Eswaran et al. (1997) apuntaron que el 26% de la superficie libre de hielos son suelos ácidos, estima que coincide bastante bien con la anterior. Los suelos ácidos aparecen principalmente en dos zonas terrestres: la zona norte, con frío y clima templado húmedo, y la zona subtropical, con calor y condiciones húmedas (Von Uexkull y Mutert, 1995). La mayoría de los suelos ácidos son selvas y bosques (66,3% o 2.621 millones de hectáreas), mientras que el 17,7 % (699 millones ha) está cubierto por vegetación de

estepa, pradera y sabana. Solamente 212 millones ha (5,4%) de suelos ácidos están sembrados (Von Uexkull y Mutert, 1995). Los suelos ácidos ocupan grandes extensiones de terreno potencialmente cultivable, que podrían utilizarse para reforestar y mejorar los pastos para producción animal, buenos ejemplos de esta situación se dan en la sabana de Brasil, en Colombia, Venezuela, África central y sudeste Asiático (Bourlaug y Dowsell 1997).

En Europa, los países escandinavos se encuentran entre las regiones más afectadas y en la Federación Rusa existen alrededor de 5 millones de hectáreas de suelo cultivable ácido. En Polonia, el 60% de la superficie cultivable está clasificada como ácida o muy ácida (Bogouszewski, 1980) y en Portugal el 80% de los suelos han sido definidos como ácidos (Almeida 1955). En España existen problemas de suelos ácidos en Galicia y Extremadura (14.7).

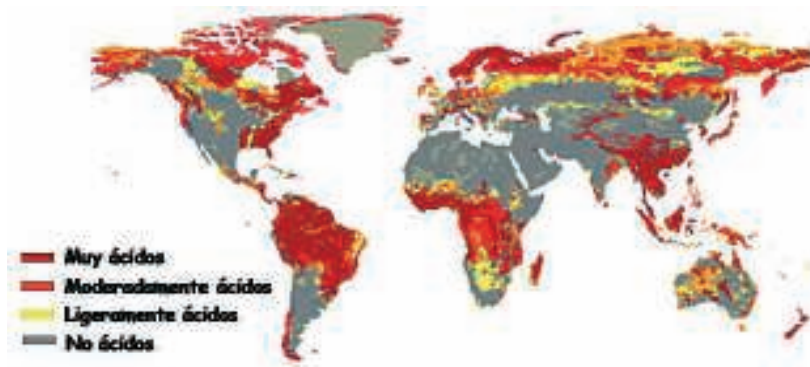


Figura 14.6. Distribución mundial de los suelos ácidos

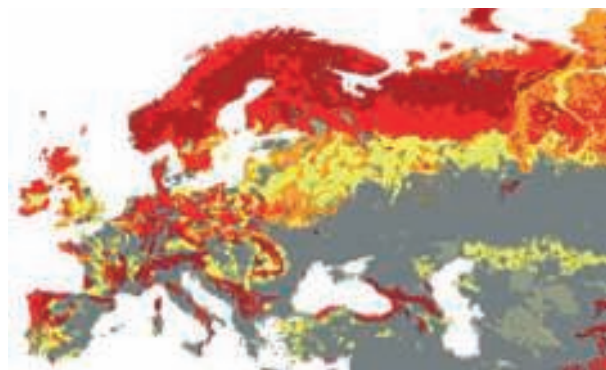


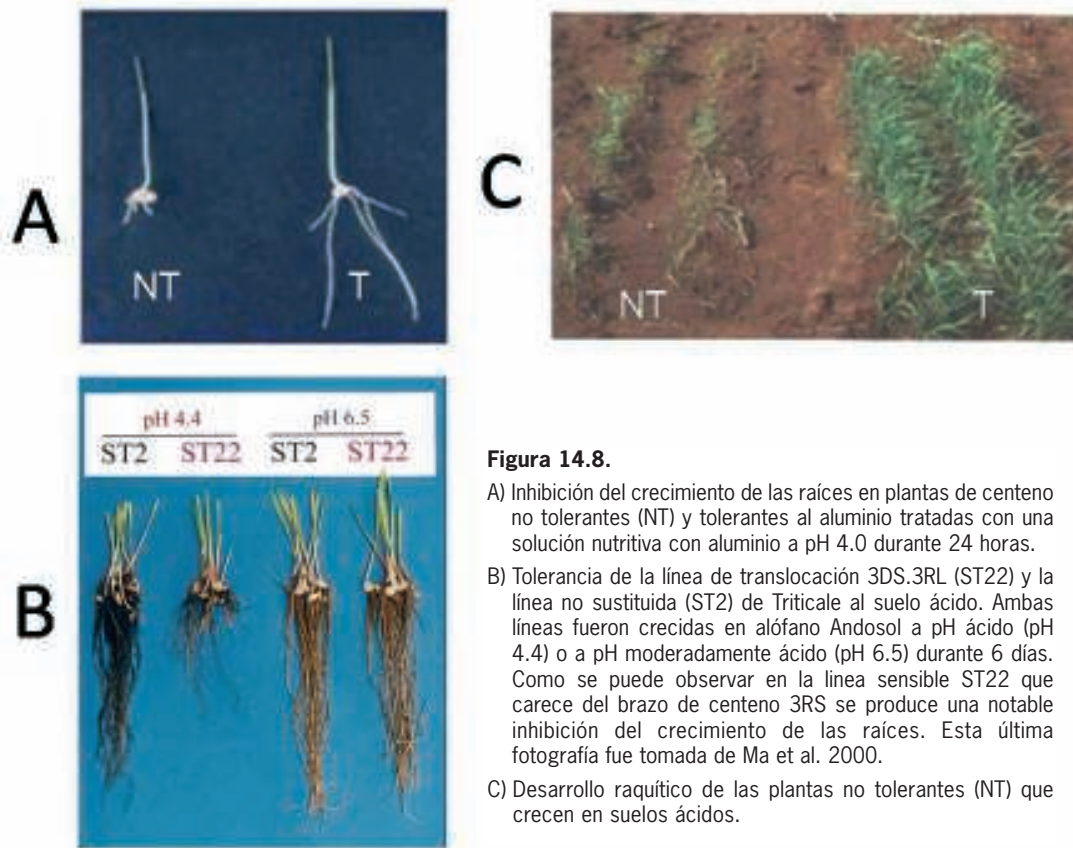
Figura 14.7. Distribución europea de los suelos ácidos

El empleo de alcalinizantes (materiales con compuestos de Ca y Mg que neutralizan la acidez del suelo) disminuye la acidez del suelo y, por tanto, la toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$  (Barber 1984). El material más empleado es la cal agrícola, procedente de piedras calizas como calcita ( $\text{CaCO}_3$ ), dolomita ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_3$ ), o una mezcla de ambas. La cal se dispersa en la superficie y luego se mezcla con el suelo en las operaciones de mantenimiento (arado, etc). En agua, el  $\text{CaCO}_3$  se disuelve y se hidroliza para formar iones  $\text{OH}^-$  que posteriormente pueden reaccionar con iones  $\text{H}^+$  formados a partir de la hidrólisis del  $\text{Al}^{3+}$  (Thomas y Hargrove 1984). Otros materiales utilizados son marga, virutas de hierro y acero, polvo de chimeneas de cementeras, basura de diferentes tipos de fábricas (de remolacha azucarera, de papel, de carburo cálcico, de asilamientos térmicos de lana de roca y plantas depuradoras de agua); aunque su uso es escaso y en áreas próximas a su origen (Thomas y Hargrove 1984). Otros factores que disminuyen la acidez del suelo son la disponibilidad de  $\text{NO}_3^-$  y la consiguiente liberación de  $\text{OH}^-$  (que puede neutralizar parte de los iones  $\text{H}^+$ ), la desnitrificación de  $\text{NO}_3^-$  y la volatilización del  $\text{NH}_3$ . Los métodos prácticos que optimizan la eficiencia en el uso de nitrógeno, y reducen en último término la cantidad de  $\text{NO}_3^-$  perdida por filtración, pueden disminuir la tasa de acidificación (Carver y Ownby 1995).

#### 14.3.4. La infertilidad de los suelos ácidos

La solubilidad de los componentes del suelo y, por tanto, la disponibilidad de nutrientes está relacionada con el pH del suelo. Los suelos ácidos son poco fértiles y, por consiguiente, fitotóxicos debido a problemas nutricionales, deficiencias, o falta de disponibilidad de nutrientes esenciales tales como calcio, magnesio, molibdeno y fósforo, y toxicidad de aluminio, manganeso y actividad de  $\text{H}^+$  (Foy et al. 1978, Foy 1984, Carver y Ownby 1995, Jayasundara et al. 1998).

La toxicidad por Al es el principal factor limitante del crecimiento en suelos ácidos (Foy et al. 1978, Foy 1984, Carver y Ownby 1995, Jayasundara et al. 1998). El principal síntoma del estrés por Al es la inhibición rápida del crecimiento radicular (Figura 14.8) (Foy et al. 1978, Foy, 1984, Taylor 1988, Jayasundra et al. 1998). Las raíces dañadas por Al son más pequeñas y quebradizas, su punta se vuelve más gruesa y de color marrón, aparecen muchas raicillas laterales y son poco eficientes absorbiendo nutrientes y agua (Foy et al. 1978). La interacción del Al con la pared celular, la membrana plasmática y el simplasma de la raíz son algunos de los mecanismos que pueden producir estos efectos (Taylor 1988, Marschner 1991, Horst, 1995, Kochian 1995). La zona terminal de 2 o 3 mm de la raíz (ápice y meristemo) es la zona crítica, la exposición al  $\text{Al}^{3+}$  de los 3 mm siguientes no produce una inhibición significativa del crecimiento (Ryan et al. 1993). Según Bennet y Breen (1991) el ápice de la raíz proporciona protección frente al  $\text{Al}^{3+}$  a través de su implicación en la percepción de la señal y distribución hormonal.



**Figura 14.8.**

- A) Inhibición del crecimiento de las raíces en plantas de centeno no tolerantes (NT) y tolerantes al aluminio tratadas con una solución nutritiva con aluminio a pH 4.0 durante 24 horas.
- B) Tolerancia de la línea de translocación 3DS.3RL (ST22) y la línea no sustituida (ST2) de Triticale al suelo ácido. Ambas líneas fueron crecidas en alófono Andosol a pH ácido (pH 4.4) o a pH moderadamente ácido (pH 6.5) durante 6 días. Como se puede observar en la línea sensible ST22 que carece del brazo de centeno 3RS se produce una notable inhibición del crecimiento de las raíces. Esta última fotografía fue tomada de Ma et al. 2000.
- C) Desarrollo raquíptico de las plantas no tolerantes (NT) que crecen en suelos ácidos.

### 14.3.5. Mecanismos de ToAl

Los mecanismos de tolerancia al Al pueden dividirse en mecanismos que facilitan la exclusión del Al de ápice de la raíz (mecanismos externos o apoplásticos) y mecanismos que confieren la habilidad de tolerar el Al en el simplasma de la planta (mecanismos internos o simplásticos de tolerancia) (Taylor 1988, Carver y Ownby 1995, Kochian 1995). La mayoría de la investigación se ha centrado en el estudio de los mecanismos externos ya que se ha supuesto que la mayoría del Al de la raíz es apoplásmico y su penetración en el simplasma es en general muy baja. Sin embargo, se ha demostrado que del 50-70% del Al total está en el simplasma (Tice et al. 1992,) y llega aquí tan solo 30 minutos después de la exposición a Al (Lazof et al. 1994).



Los mecanismos de tolerancia externos o apoplásticos más importantes son:

- 1) Exudación de ácidos orgánicos (Hue et al. 1986, Suhayda y Haug 1986, Miyasaka et al. 1991, Delhaize et al. 1993, Basu et al. 1994b, Ryan et al. 1995, Pellet et al. 1995, De la Fuente et al. 1997).
- 2) Inmovilización del Al en la pared celular (Mugwira y Egawhary 1979, Blamey et al. 1990, Taylor 1991, Kochian 1995).
- 3) Exudación de fosfato (Taylor 1991, Ryan et al. 1993, Pellet et al. 1997).
- 4) Eflujo activo de Al a través de la membrana plasmática (Zhang y Taylor 1989, 1991, Taylor 1991).
- 5) Producción de mucílago por las raíces (Horst et al. 1982, Henderson y Ownby 1991).
- 6) Exclusión de Al a través de la alteración del pH de la rizosfera (Foy et al. 1965, Mugwira et al. 1976, Mugwira y Patel 1977, Foy 1988, Taylor 1988, Taylor 1991, Kochian 1995, Pellet et al. 1997).
- 7) Permeabilidad selectiva de la membrana plasmática (Wagatsuma y Akiba 1989, Taylor 1991).

Los mecanismos de tolerancia internos o apoplásticos más importantes son:

- 1) Síntesis de proteínas de unión a Al (Aniol 1984b, Picton et al. 1991, Rincón y González 1991, Delhaize et al. 1991, Basu et al. 1994a, Somers y Gustafson 1995, Somers et al. 1996, Basu et al. 1997).
- 2) Quelación en el citosol.
- 3) Compartimentación en vacuolas.
- 4) Aparición de enzimas tolerantes a Al.
- 5) Actividad enzimática elevada (Taylor 1991).

Como puede observarse, algunos de los mecanismos de ToAl citados son semejantes a los descritos para resistir los MP.

### 14.3.6. Mecanismos genéticos de ToAl

La aplicación de cal agrícola puede disminuir la acidez en la zona superficial del suelo. Sin embargo, es una solución poco eficaz, ya que el efecto neutralizante se ejerce en los primeros 25 cm. del suelo y no afecta a zonas profundas, donde penetra gran parte del sistema radicular (Guedes-Pinto, 1985). Además, cuando las capas del subsuelo son ácidas, la mejora de la capa superficial no permite a las raíces penetrar la capa ácida y alcanzar los aportes de agua y nutrientes críticos más profundos. Por consiguiente, la obtención y selección de variedades de plantas con genotipos tolerantes al aluminio, por técnicas de mejora tradicional o mediante ingeniería genética, parece la mejor solución al problema.

El estudio del control genético (número de loci y tipo de herencia) de la tolerancia y la localización cromosómica de los genes que la confieren ha sido, y es, un objetivo básico de investigación en cereales, especialmente en trigo. Para mejorar los Triticales y en los estudios de la manipulación cromosómica de trigo es clave conocer qué cromosomas de trigo, centeno y otros cereales poseen genes de ToAl (Aniol y Gustafson 1984).

#### 14.3.6.1. Control Genético en trigo

Slootmaker (1974) encontró que el genotipo D de trigo era el más importante, seguido por los genotipos A y B. Posteriormente, Aniol y Gustafson (1984) identificaron genes de tolerancia en los brazos cromosómicos 6AL, 7AS, 4BL, 2DL, 3DL, 4DL y 7D, confirmando que los genotipos D y A eran los más importantes. Más tarde, Aniol (1990) localizó genes que controlaban la tolerancia en los brazos 2DL, 4DL y 5AS. Kerridge y Kronstad (1968) encontraron un gen dominante responsable de la tolerancia en un cruzamiento entre dos variedades de trigo, Druchamp y Brevor. Sin embargo, Aniol (1984a) concluyó que había varios genes responsables de la ToAl en trigo. Según Lafever y Campbell (1978) y Campbell y Lafever (1981), la tolerancia no se hereda de forma sencilla, su expresión es aditiva y tiene alta heredabilidad, coincidiendo este resultado con lo descrito por Aniol (1984a). Camargo (1981) demostró que la tolerancia en el cultivar Atlas66 está determinada por un mecanismo genético complejo que implica al menos dos genes dominantes principales y quizás algunos genes menores. Previamente, se había identificado un gen en el cromosoma 5D, pero Berzonsky (1992) concluyó que la tolerancia en Atlas66 estaba determinada además de por genes dominantes del genotipo D, por genes de los genotipos A y/o B. Rajaram et al. (1991) mediante diferentes cruzamientos, explicaron la tolerancia con dos genes dominantes complementarios en un parental y un gen recesivo en otros dos parentales. Camargo (1984) también ha descrito herencia recesiva en trigo para la ToAl. Sin embargo, en trigo, trabajos más recientes indican que la tolerancia está controlada por un gen mayor dominante (Delhaize et al. 1993, Sommers y Gustafson 1995, Somers et al. 1996, Riede y Anderson, 1996, Basu et al. 1997). Hace poco que se han obtenido diversos marcadores moleculares ligados al gen de tolerancia  $Alt_{BH}$  localizado en el cromosoma 4DL (Riede y Anderson 1996, Luo y Dvorák 1996, Rodríguez-Milla y Gustafson 2001).

#### 14.3.6.2. Control Genético en Centeno

El centeno es una de las especies más tolerante al estrés en la familia Triticeae (Little 1988) y varios estudios indican que el centeno es el cereal más tolerante al aluminio seguido del Triticale, el trigo y la cebada (Slootmaker 1974, Mugwira et al. 1976, Mugwira et al. 1978, Manyova et al. 1988, Aniol y Madej 1996, Hede et al. 2001).

Al igual que en otras especies, la ToAl en centeno parece presentar una herencia de tipo dominante (Aniol y Madej 1996). Mediante líneas de adición trigo-centeno y de sustitución/translocación, se ha determinado la existencia de genes que confieren tolerancia en los brazos cromosómicos 3RS (*Alt2*), 4RL (*Alt3*) y 6RS (*Alt1*) de centeno (Aniol y Gustafson, 1984, Ma et al., 2000; Aniol, 2004). Según Aniol (2004) el cromosoma que mayor tolerancia confiere es el 3R. Manyova et al. (1988) también han descrito genes en el cromosoma 5R. Mediante el análisis de descendencias que segregan para la ToAl se han detectado al menos tres loci independientes que confieren ToAl, uno en el brazo 4RL (gen *Alt3*), otro en 6RS (gen *Alt1*) y otro en 7RS (*Alt4*) (Gallego y Benito 1997, Gallego et al. 1998<sup>a</sup>, 1998<sup>b</sup>, Miftahudin et al. 2002, Matos et al. 2004, 2005). También, se ha descrito un QTL en el cromosoma 4R que explica el 48% de la variación fenotípica total y está ligado a un marcador RFLP a una distancia de 2 cM (Hede et al. 2001). En estos trabajos se han detectado diferentes tipos de marcadores moleculares (isoenzimas, RAPD, ISSR, RFLP, SCARs y SSR) estrechamente ligados a los genes de tolerancia.

#### 14.3.6.3. Control Genético en Triticale

Los triticales tienen un alto grado de ToAl, mayor que la de trigo aunque inferior a la del centeno (Mugwira et al. 1976, Mugwira et al. 1978, Hede et al. 2001). Hay genes de trigo que silencian los genes de tolerancia de centeno y otros que permiten su expresión. Aniol y Gustafson (1984) demostraron que la tolerancia que confiere el cromosoma 6R de centeno depende del cromosoma de trigo por el que sea sustituido. Gustafson y Ross (1990) encontraron supresores de la tolerancia de centeno en los brazos cromosómicos de trigo 4AL, 5AL, 6AL, 7BS, 7BL y 3DS. También detectaron activadores de la tolerancia de centeno en los brazos 2AL, 5AS, 6BS, 1DS, 1DL, 2DL, 4DL, 5DS, 5DL, 6DL, 7DS y 7DL. Ma et al. (2000), mediante el empleo de diferentes líneas de sustitución y de translocación/sustitución trigo-triticale, encontraron que el brazo cromosómico 3RS confería ToAl pero no a metales como Cd, Cu y La. Estos autores concluyeron que los genes necesarios para la tolerancia en Triticale se encontraban en el brazo 3RS y que estaban implicados en la exudación de ácidos orgánicos (citrato y malato), ya que la cantidad exudada en la línea ST2 (no sustituida) era el doble que la observada en la línea ST22 (línea que contiene un cromosoma translocado constituido por el brazo corto del 3D y el largo del 3R) (Figura 14.8).

#### 14.3.6.4. Control Genético en Cebada

La cebada es el cereal más sensible al aluminio. La tolerancia a suelos ácidos en cebada está controlada por un gen dominante (Stølen y Andersen 1978) con múltiples alelos (Minella y Sorrells 1992). Stølen y Andersen (1978) encontraron un gen dominante (*Ph1*) en el cromosoma 4H relacionado con la tolerancia a la alta acidez del suelo. Reid (1971) encontró que la tolerancia en los cultivares Dayton y Smooth Awn 86 estaba controlada por un gen dominante (*Alp*). Minella y Sorrells (1977) localizaron el gen *Alp* en el cromosoma 4H lejos del centrómero, sugiriendo que la tolerancia al bajo pH (*Ph1*) y la ToAl (*Alp*) estaban controladas por el mismo locus. En cebada se ha realizado un mapa de alta resolución del locus *Alp* de ToAl localizado en el brazo largo del



cromosoma 4H (Reid 1970, Tang et al. 2000, Raman et al. 2002). En diversos trabajos se ha propuesto que el gen *Alt<sub>BH</sub>* de trigo localizado en el brazo cromosómico 4DL, el gen *Alp* de cebada situado en el brazo 4HL y el gen *Alt3* de centeno ubicado en el brazo 4RL serían ortólogos. Sin embargo, como veremos más adelante, resultados recientes en cebada indican que el gen *Alp* no es ortólogo del gen *Alt<sub>BH</sub>* de trigo. Además, el gen *Alt3* de centeno del cromosoma 4R tampoco puede considerarse el ortólogo del de trigo, ya que el brazo largo del cromosoma 4D de trigo no es homeólogo del brazo largo del cromosoma 4R de centeno. Sin embargo, el gen *Alt4* del brazo 7RS de centeno sería el ortólogo del gen *Alt<sub>BH</sub>* de trigo, ya que el brazo corto del cromosoma 7R es en parte homeólogo del brazo largo del cromosoma 4D de trigo (Naranjo y Fernández-Rueda 1991, Devos et al. 1993, Naranjo et al. 1997, Devos y Gale 2000).

#### 14.3.6.5. Control Genético en Avena

La avena junto con el centeno son los cereales más tolerantes. Estudios llevados a cabo en Brasil indican que la ToAl está controlada por uno o dos genes dominantes en avena (Sánchez-Chacón et al. 2000, Wagner et al. 2001, Oliveira et al. 2002). Nava et al. (2006) mediante líneas consanguíneas recombinantes (RIL) detectaron que la tolerancia estaba controlada por un solo gen mayor dominante. En avena diploide se han descrito cuatro QTLs de ToAl, uno de ellos, situado en el grupo de ligamiento F, explica el 39% de la variación total observada y se ha propuesto que sería ortólogo del gen *Alt<sub>BH</sub>* de trigo (4DL), del gen *Alp* de cebada (4HL) y del gen *Alm2* de maíz (Wight et al., 2006). El gen *Alp* de cebada ya hemos comentado que no puede seguir considerándose ortólogo del de trigo.

#### 14.3.6.6. Control Genético en Maíz

En maíz se han descrito genes de tolerancia al Al en los cromosomas 2, 6 y 10 (Brondani y Pavia 1996, Sibov et al. 1999).

#### 14.3.6.7. Control Genético en Sorgo

En sorgo (*Sorghum bicolor*) mediante clonación posicional se ha identificado y secuenciado un gen mayor dominante, el gen *Alt<sub>SB</sub>*, previamente localizado en la región terminal del cromosoma 3 (Magalhaes et al. 2004) y que ha resultado ser un gen que codifica para transportador de citrato activado por aluminio denominado *SbMATE* (Magalhaes et al. 2007). Además, se ha detectado la existencia de múltiples alelos en el locus *Alt<sub>SB</sub>* que confieren niveles de tolerancia distintos (Caniato et al. 2007). Se ha propuesto que el gen *Alt<sub>SB</sub>* sería ortólogo de un QTL que se ha descrito repetidas veces en el cromosoma 1 de arroz (Wu et al. 2000, Nguyen et al. 2001, 2002, 2003, Ma et al. 2001) y también del gen *Alt2* del brazo 3RS de centeno ya que el cromosoma 1 de arroz es homeólogo de los cromosoma del grupo 3 de trigo y estos a su vez del cromosoma 3R de centeno (Caniato et al. 2007).

#### 14.3.6.8. Control Genético en Arroz

En arroz, se han localizado hasta once QTLs, encontrándose uno de los de mayor efecto en el cromosoma 3 (Nguyen et al., 2002; Nguyen et al., 2003). Dadas las relaciones de homeología existentes entre los cromosomas de arroz y trigo, se ha propuesto que este QTL del cromosoma 3 de arroz sería el ortólogo del gen *Alt<sub>BH</sub>* del brazo 4DL de trigo (Wu et al. 2000, Nguyen et al. 2003). Recientemente, se ha visto que los polisacáridos (pectina, hemicelulosas 1 y 2) de la pared celular están implicados en un mecanismo de exclusión del aluminio de las raíces de las plantas de arroz, aumentando el tratamiento con Al la actividad de la pectin metilesterasa (PME) (Yang et al 2007).

#### 14.3.6.9. Control Genético en *Arabidopsis*

En *Arabidopsis* se han detectado loci mendelianos con herencia semidominante en los cromosomas 1 y 4 (Larsen et al. 1996, Larsen et al. 1998) además de diversos QTLs que explican un 40% de la variación total observada (Kobayashi y Koyama 2002, Hoekenga et al. 2003). Hace poco se han detectado dos QTLs en *Arabidopsis*, en los cromosomas 1 y 3, estando el del cromosoma 1 relacionado con la exudación de malato (Kobayashi et al. 2005). Recientemente, en *Arabidopsis* (dicotiledónea) se ha identificado el gen *AtALMT1* en el cromosoma 1 que sería ortólogo del gen *TaAlmt1* de trigo (monocotiledónea) situado en el brazo 4DL (Hoekenga et al. 2006).

#### 14.3.6.10. Control Genético en Alfalfa

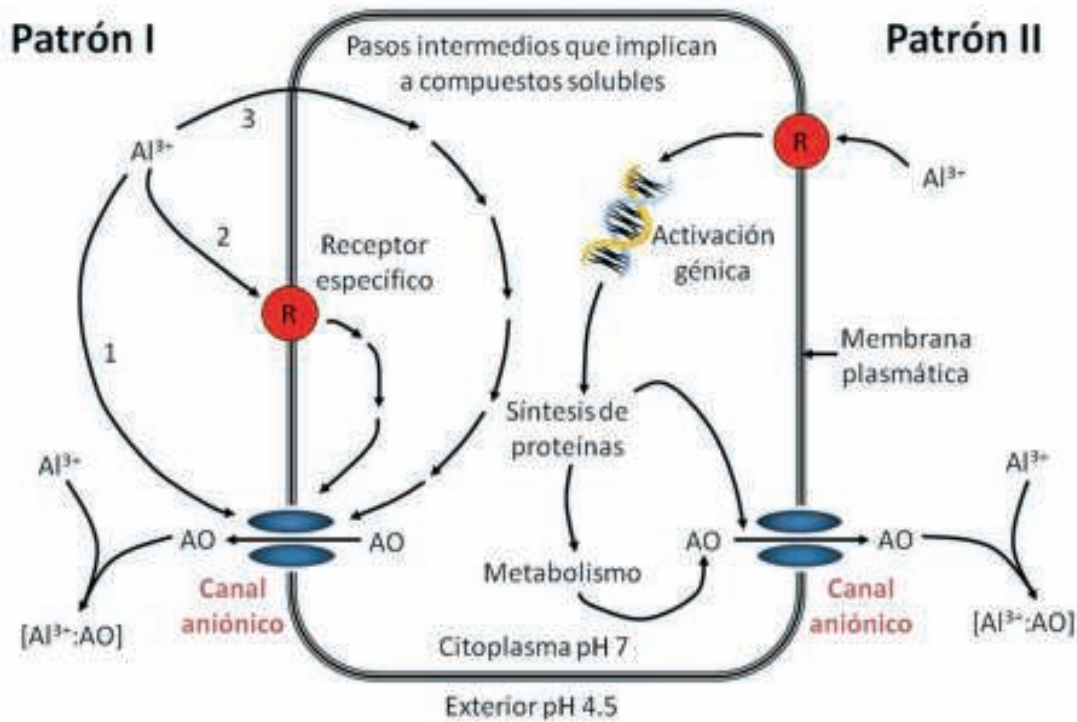
En alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *coreulea*) se han detectado cuatro RFLP asociados con la ToAl, dos de los cuales estaban presentes en genotipos de alta tolerancia (Sledge et al. 2002). También se han descrito tres putativos QTL en los grupos de ligamiento LG I, LG II y LG III que explican el 38, 16 y 27% de la variación fenotípica, respectivamente (Narasimhamoorthy et al. 2007).

#### 14.3.7. Base molecular de la ToAl

Como ya he indicado anteriormente existen distintos mecanismos internos y externos de ToAl. El mecanismo externo más estudiado y mejor descrito que explica la ToAl es la exudación de ácidos orgánicos en las raíces (malato, citrato y oxalacetato) que actúan como agentes quelantes del Al (Miyasaka et al. 1991, Delhaize et al. 1993, Ma et al. 2000, Ma et al. 2001).

Las raíces de las plantas tolerantes de trigo (*Triticum aestivum*) exudan malato, las de judía (*Phaseolus vulgaris*), cebada (*Hordeum vulgare*), maíz (*Zea mays*), *Cassia tora* y soja (*Glycine max*) exudan citrato, el trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) y el taro o ñame (*Colocasia esculenta*) exudan oxalacetato. Algunas especies como avena (*Avena sativa*), centeno (*Secale cereale*), Triticale (híbrido trigo-centeno), colza (*Brassica napus*) y rábano (*Raphanus sativus*) exudan malato y citrato.

Se han descrito dos patrones de exudación de ácidos orgánicos (Figura 14.9). En el patrón de tipo I (constitutivo) la exudación de ácidos orgánicos comienza inmediatamente después de la exposición al aluminio. Por ejemplo, la exudación de malato en trigo y oxalacetato en trigo sarraceno comienza entre 15 y 30 minutos después de la exposición a Al (Ma et al. 2001). Esta exudación rápida sugiere que el aluminio activa un mecanismo preexistente que no necesita la inducción de nuevas proteínas. En este caso, el aluminio activaría un transportador de membrana plasmática para iniciar la exudación. En el patrón de tipo II (inducible) la exudación de ácidos orgánicos comienza varias horas después de la exposición al aluminio. Por ejemplo, en *C. tora* la máxima exudación tiene lugar a las 4 horas de exposición al aluminio, en centeno la exudación va aumentando durante 10 horas alcanzando el máximo entre 20 y 24 horas. En maíz parece que se dan ambos tipos de exudación de citrato, una rápida y otra tardía que aumenta durante 48 horas. El retraso en la exudación observado en el patrón de tipo II parece indicar que se necesita la inducción de proteínas que podrían estar implicadas en el metabolismo o en el transporte y exudación de ácidos orgánicos (AO).



**Figura 14.9.**- Patrones de exudación de ácidos orgánicos (AO).

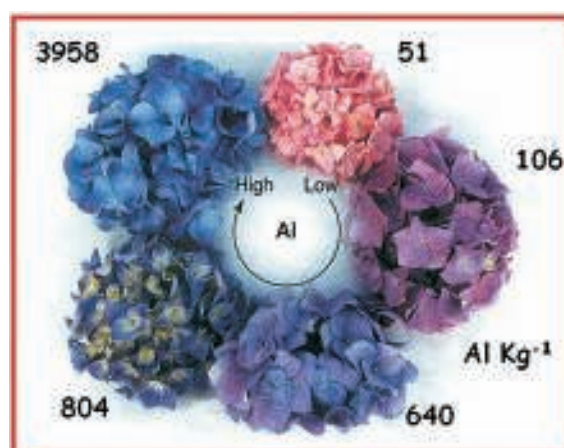
**Patrón I:** el aluminio activa canales aniónicos de la membrana plasmática.

- 1.- El Al activa directamente el canal aniónico,
- 2.- El Al interacciona con un receptor específico (R) o con la membrana directamente y se inicia una segunda cascada de mensajeros que activa el canal, y
- 3.- El Al entra en el citoplasma y activa el canal directa o indirectamente.

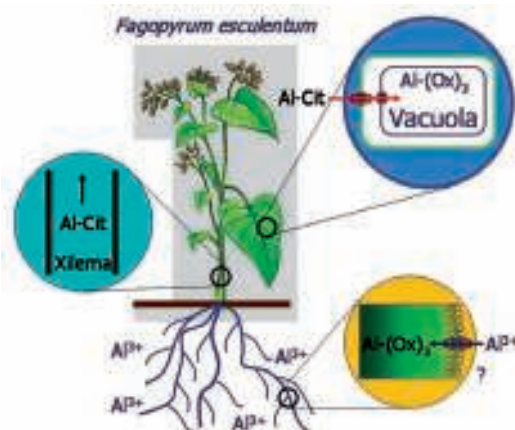
**Patrón II:** el Al interacciona con la célula, probablemente a través de una proteína receptora (R) que activa la transcripción de genes que codifican proteínas del metabolismo de AO o de su transporte a través de la membrana. Modificada de Ma et al. 2001.

Aunque el metabolismo de los AO puede cambiar en las plantas con patrón de tipo I, la capacidad de síntesis de AO no parece verse afectada por la exposición a Al. En trigo no se han detectado diferencias en las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, NAD-malato deshidrogenasa, citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente entre genotipos tolerantes y sensibles, tratados o sin tratar con Al. Sin embargo, en plantas con patrón de tipo II si se han observado cambios en la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de AO. Por ejemplo, en centeno la actividad de la citrato sintasa de las raíces aumenta un 30% después del tratamiento con Al mientras que las actividades de fosfoenolpiruvato carboxilasa, NAD-malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente no están afectadas. El aumento de actividad de citrato sintasa tiene lugar 6 horas después de la exposición a Al, justo antes del comienzo de la exudación de citrato por las raíces. Se han estudiado genes procedentes de microorganismos que confieren tolerancia a Al. Por ejemplo, el gen de citrato sintetasa de *Pseudomonas aeruginosa* se ha introducido en tabaco (De la Fuente et al., 1997) y papaya (López-Bucio et al., 2000). Las plantas transgénicas obtenidas fueron tolerantes y producían ácido cítrico en exceso. Sin embargo, en otros casos se han obtenido resultados contradictorios (Delhaize et al., 2001).

Los AO también detoxifican el Al en el interior de la planta. Se conocen algunas especies muy tolerantes que acumulan grandes concentraciones de Al en la parte aérea de la planta. *Melastoma malabatricum*, especie de bosque tropical, acumula Al y su crecimiento se estimula por Al. Las hojas de *Fagopyron esculentum* (trigo sarraceno) acumulan  $400 \text{ mg Kg}^{-1}$  de Al en peso seco después de un corto tratamiento con Al y  $15.000 \text{ mg Kg}^{-1}$  de Al en peso seco cuando crecen en suelos ácidos. Las hojas de *Hydrangea* (hortensias) acumulan  $3000 \text{ mg Kg}^{-1}$  de Al en peso seco después de varios meses creciendo en suelos ácidos y el color de los sépalos cambia del rosa al azul con el aumento de la concentración de Al (Ma et al. 2001). El color azul de los sépalos de *Hydrangea* se debe a la formación de complejos entre compuestos orgánicos y Al (Figura 14.10), cerca del 80% del Al total de las hojas de *Hydrangea* se encuentra en forma soluble y la concentración en las vacuolas puede llegar a ser de  $13.7 \text{ mM}$ . Por tanto, las plantas que acumulan Al deben tener mecanismos internos para su detoxificación.



**Figura 14.10.-** Color de los sépalos de *Hydrangea* (hortensias) con diferentes concentraciones de aluminio (Al). Las plantas de *Higrangea* crecieron en una solución nutritiva ácida con o sin Al, o en suelos modificados con o sin Al. El color azul de los sépalos se debe a la formación de complejos entre delphinidin-3-glucósido, Al y ácido cafeoilquinico. La concentración de Al en los sépalos, desde los de color rosa a los de color azul en peso seco, es 51, 106, 640, 804 y 3959  $\text{mg Kg}^{-1}$ , respectivamente. Modificada de Ma et al. 2001.



**Figura 14.11.**- Entrada, transporte y acumulación de diferentes formas de  $\text{Al}^{3+}$  en *Fagopyrum esculentum*. El  $\text{Al}^{3+}$  entra en las raíces por un mecanismo aún desconocido, luego se quelata formando complejos Al-oxalato (1:3) en las raíces, posteriormente pasa al xilema donde cambia de ligando formando complejos Al-citrato y, por último, llega a las hojas donde vuelve a formar complejos Al-oxalato y se acumula en las vacuolas. Modificada de Ma et al. 2001.

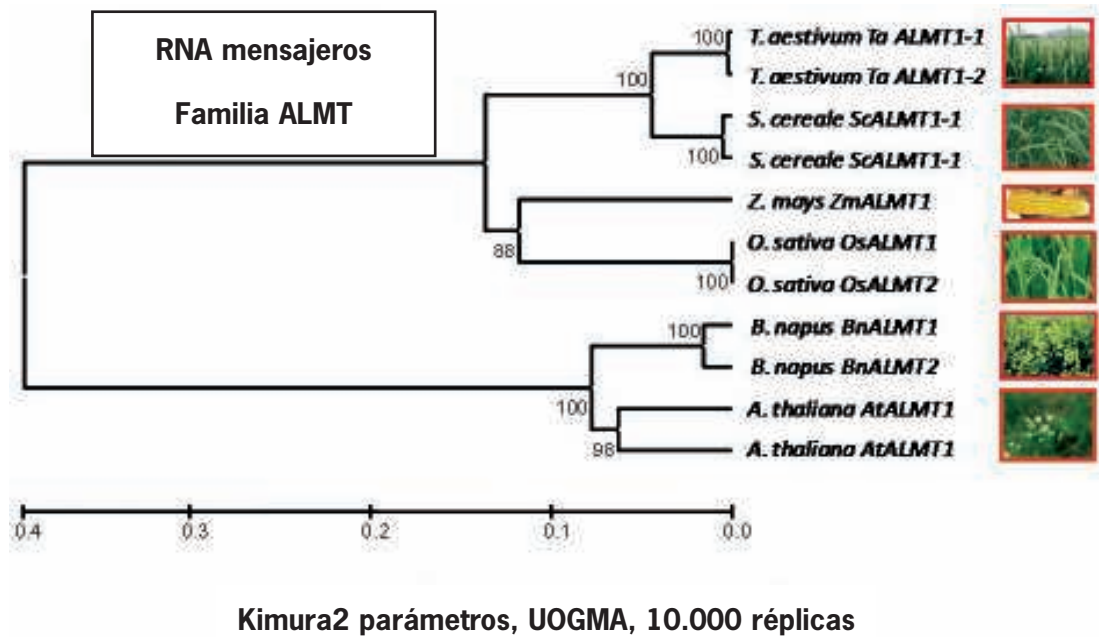
La detoxificación se consigue formando complejos de Al con ácidos orgánicos (Al-AO), quelando el Al. En *Hydrangea* se forma Al-citrato (1:1) y en *Fagopyrum esculentum* se forma Al-oxalato (1:3), siendo la estabilidad de estos complejos mayor que la del Al-ATP y previniendo la formación de complejos con otros componentes sensibles de la célula. En *Melastoma malabatricum* el Al se encuentra libre y formando complejos con oxalato en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3, los complejos con oxalato 1:1 y 1:2 son tóxicos para la célula y, posiblemente, se almacenan en la vacuola. En el trigo sarraceno (Figura 14.11) durante la entrada, transporte y acumulación del Al en la planta tienen lugar cambios en su forma química. Una vez que el  $\text{Al}^{3+}$  ha entrado en la planta, se quelata en las raíces formando complejos Al-oxalato (1:3), estos complejos pasan al xilema donde tiene lugar una reacción de cambio de ligando para formar complejos Al-citrato, en el paso del xilema a las células y las hojas, vuelve a producirse un cambio de ligando formándose complejos Al-oxalato que se almacenan en las vacuolas (Ma et al. 2001).

Recientemente se han aislado genes de ToAl en diferentes especies que codifican para proteínas de membrana que facilitan la exudación de ácidos orgánicos. Estas proteínas pertenecen a dos familias génicas, la familia ALMT (transportadores de malato activados por aluminio) y la familia MATE (exudación de toxinas y múltiples drogas).

#### 14.3.7.1. La Familia ALMT

Las proteínas ALMT implicadas en la resistencia al aluminio pertenecen a un amplio grupo de proteínas relacionadas que comparten un dominio UPF0005 (pfam01027) (Delhaize et al. 2007). Las 467 proteínas descritas con el dominio UPF0005 se encuentran en arqueas, virus, procariotas y eucariotas. Las proteínas de la familia ALMT se han definido como aquellas que tienen el dominio UPF0005, poseen entre 5 y 7 dominios transmembrana y no pertenecen a los grupos que contienen un inhibidor-Bax 1, un putativo péptido receptor de glutamato/aspartato y una putativa proteína asociada al receptor. De acuerdo con esta definición, todas las proteínas ALMT son proteínas de plantas. El primer gen de ToAl perteneciente a dicha familia se identificó en trigos tolerantes, es un gen que codifica para un transportador de malato activado por

Al<sup>3+</sup> (*TaALMT1*) que al introducirse en cebada incrementa notablemente la tolerancia en este cereal (Delhaize et al. 2004, Sasaki et al. 2004). Este gen se ha localizado en el brazo 4DL de trigo (Raman et al., 2005). Además, se ha encontrado un QTL en trigo que está en la misma posición que el gen *TaALMT1* (Ma et al. 2005). *TaALMT1* posee ortólogos en cebada, arroz, centeno (*ScALMT1*, Fontecha et al. 2007), avena (Wight et al. 2006) e incluso en especies vegetales de dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana* (*AtALMT1*, Hoekenga et al. 2006) y *Brassica* (*BnALMT1* y *BnALMT2*, Ligaba et al. 2006). Por esta causa, se ha propuesto que forma parte de un mecanismo de tolerancia al Al conservado en la Triticineas y en otras especies vegetales (Delhaize et al. 2007). En la 14.12 se muestra un dendrograma llevado a cabo con los RNA mensajeros de varios genes de la familia ALMT. Además, a partir de la secuencia del gen *TaALMT1* de trigo se han diseñado cebadores específicos que han permitido amplificar secuencias con similitudes con la secuencia de trigo superiores al 72% (Fontecha et al., 2007) y, posiblemente ortólogas, en diferentes especies como *Triticum urartu*, *Aegilops speltoides*, *Avena sativa*, *Saccharum officinarum*, *Zea mays* y *Phaseolus vulgaris*.



**Figura 14.12.-** Dendrograma obtenido con algunos RNA mensajeros de la familia ALMT de diferentes especies. Se ha empleado el índice de Kimura 2 parámetros, el método de agrupamiento UPGMA y se han realizado 10.000 réplicas. Los valores de bootstrap son bastante elevados y se indican en las correspondientes bifurcaciones. La estructura de este dendrograma se mantiene igual cuando se utilizan otros índices moleculares (Jukes-Cantor, Tajima-Nei, Tamura 3-parámetros) y otros métodos de agrupamiento (Neighbor-Joining y Mínima Evolución).



El gen *ScALMT1* de centeno está constituido por cinco intrones (dos inusualmente grandes, en especial el intrón 4) y seis exones y da lugar a un RNA mensajero de 1332 pb que codifica para una hipotética proteína hidrófoba de 452 aminoácidos y seis regiones transmembrana (Fontecha et al. 2007) (Figura 14.13). Los datos de expresión de *ScALMT1* indican que solamente se induce en presencia de Al en el ápice de las raíces de plantas tolerantes y sensibles. La expresión del gen *ScALMT1* de centeno es cinco veces menor en el ápice de las raíces de la línea sensible (Riodeva) que en el cultivar tolerante (Ailés) (Fontecha et al. 2007). El gen *ScALMT1* se comporta como totalmente ligado (no se han encontrado recombinantes en tres F<sub>2</sub> con más de 350 descendientes) al locus *Alt4* previamente localizado en el brazo 7RS de centeno por Matos et al. (2005) (Figura 14.13). Por tanto, estos resultados indican que el gen *Alt4* (*ScALMT1*) de tolerancia al Al localizado en el brazo 7RS es un transportador de malato activado por Al.

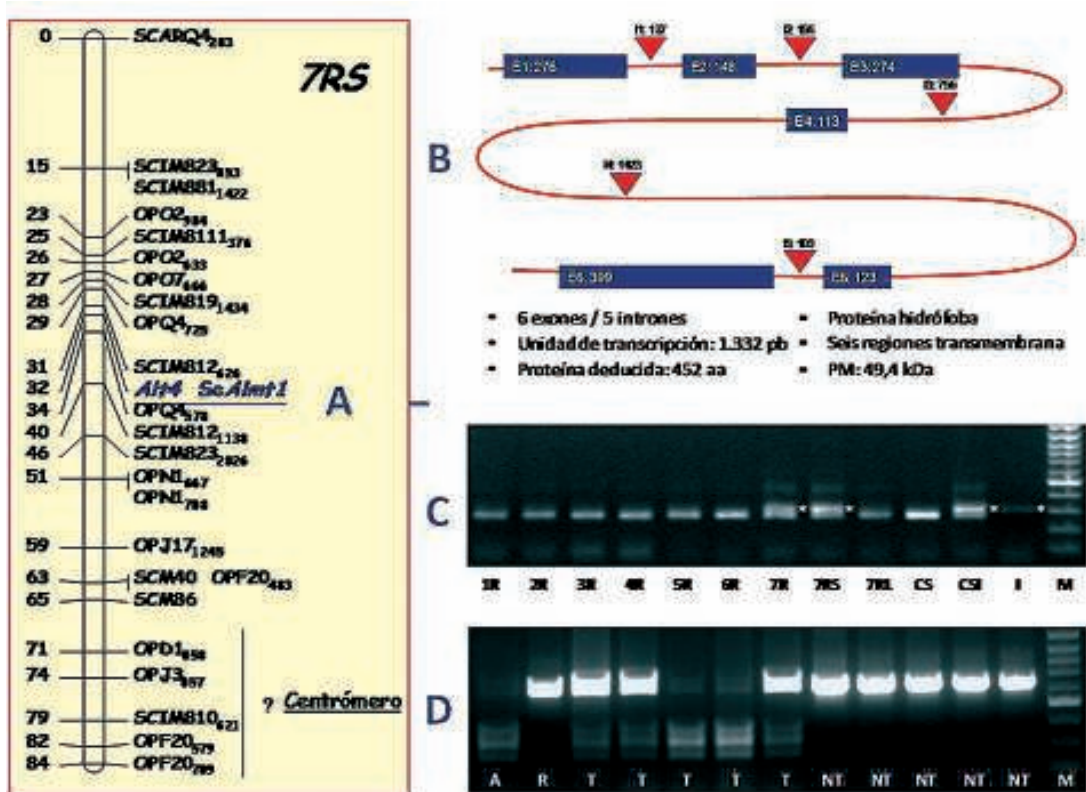


Figura 14.13.

- A) Mapa del cromosoma 7R. El locus *Alt4* y el gen *ScALMT1* ocupan la misma posición y están ligados a otros marcadores moleculares localizados en el brazo 7RS (SCM y SCIM: microsátelites e intermicrosátelites de *S. cereale*, OP : RAPD).
- B) Estructura en intrones y exones del gen *ScALMT1* de *S. cereale*.
- C) Localización cromosómica del gen *ScALMT1* en el brazo 7RS de centeno. 1R a 7R: líneas de adición disómicas trigo-centeno, 7RS y 7RL: líneas de adición ditelocéntricas trigo-centeno, CS: trigo hexaploide parental (*Triticum aestivum* cv. "Chinese Spring"), I: centeno parental (*Secale cereale* cv. "Imperial"), CSI: Híbrido trigo centeno (aniploide "Chinese Spring-Imperial") con todos los cromosomas de trigo y todos los de centeno. El asterisco indica el fragmento del gen *ScALMT1* localizado.
- D) PCR-RFLP (amplificación y posterior digestión con *BspHI*) de un fragmento del gen *ScALMT1* en 10 plantas de una F<sub>2</sub> de centeno en la que también segregaba el locus *Alt4*. El fragmento se comporta como totalmente ligado al locus *Alt4*. A: parental tolerante "Ailés", R: línea consanguínea parental no tolerante "Riodeva", T: plantas tolerantes de la F<sub>2</sub>, NT: plantas no tolerantes de la F<sub>2</sub>, M: marcador de peso molecular.

Sasaki et al. (2004) y Raman et al. (2005) han encontrado que la resistencia a Al de dos líneas isogénicas que poseen alelos que se diferencian en seis bases nitrogenadas y dos aminoácidos no está condicionada por estos alelos pero sí por el nivel de expresión del gen *TaALMT1*. Estos resultados indican que en algunos casos la tolerancia al Al puede deberse a cambios en la conformación de la proteína, mientras que en otros, podría estar regulada por diferencias en las regiones promotoras (situadas « aguas arriba ») que controlarían la expresión de los genes *ALMT1*. Sasaki et al. (2006) han analizado las regiones promotoras (« aguas arriba ») de 69 líneas de trigo y han encontrado una gran variabilidad en esta región (seis patrones distintos) con bloques de secuencias duplicados o triplicados en diferentes ordenes. El número de repeticiones en esta región parece estar correlacionado en cierta medida con la exudación de malato en las líneas. Sin embargo, dicha correlación no se mantiene en las líneas procedentes de Japón. Raman et al. (2006) han estudiado la variación en el intrón 3 del gen *TaALMT1* de trigo en 20 genotipos de trigo encontrado marcadores repetitivos (inserciones y deleciones, INDEL) que cosegregan con la ToAl y que son extremadamente útiles en programas de selección asistida por marcadores y en estudios de evolución.

#### 14.3.7.2. La familia MATE

La otra familia de proteínas, la familia MATE, es muy amplia, con representantes en todos los reinos y 48 miembros solamente en *Arabidopsis* (Magalhaes et al. 2007). Las proteínas de esta familia se caracterizaron, en primer lugar, por conferir resistencia a microbios por un mecanismo de eflujo o exudación. Por este motivo, se denominaron proteínas de exudación o eflujo de toxinas y múltiples drogas (MATE). Aunque la mayoría de los miembros de esta familia siguen sin caracterizarse, algunos funcionan eliminando compuestos tóxicos y metabolitos secundarios del citosol, exportándolos fuera de la célula o secuestrándolos en la vacuola. Recientemente, se han caracterizado tres genes de la familia MATE, el gen *Frd3* en *Arabidopsis*, el gen *Alt<sub>SB</sub>* en sorgo y el gen *Alp* en cebada. El mutante *frd3* (llamado inicialmente *nam1*) acumula metal, presenta una alta actividad Fe-reductasa en las raíces, tiene alterada la homeostasis del Fe y en algunas situaciones puede acumular el exceso de Fe en los tallos y hojas nuevas. El gen *Frd3* codifica para una proteína (FDR3) cuya función sería introducir citrato en el xilema de manera que el complejo Fe:citrato pueda subir por el xilema y estar disponible para las células de los tallos y hojas nuevas. En sorgo (*Sorghum bicolor*) mediante clonación posicional se ha identificado y secuenciado el gen *Alt<sub>SB</sub>* localizado en la región terminal del cromosoma 3 (Magalhaes et al. 2004), que ha resultado ser un transportador de citrato activado por aluminio denominado *SbMATE* perteneciente a la familia MATE (Magalhaes et al. 2007). La región codificante de este gen es idéntica en los parentales, tolerante y sensible, la diferencia más importante se ha detectado en la región “aguas arriba” a unos 1400 pb antes de la caja TATA y consiste en una inserción (INDEL) de 728 pb. Esta región polimórfica contiene un MITE (miniature inverted repeat transposable element). Este gen de sorgo podría ser ortólogo de un QTL del cromosoma 1 de arroz (Nguyen et al. 2001). El cromosoma 1 de arroz es equivalente a los cromosomas del grupo de homeología 3 de trigo y estos a su vez al 3R de centeno. En este cromosoma de centeno se han descrito genes de ToAl relacionados con la exudación de malato y citrato por las raíces (Ma et al. 2000).



En cebada también se ha realizado un mapa de alta resolución del locus *Alp* de ToAl localizado en el brazo largo del cromosoma 4H (Reid 1970, Tang et al 2000, Raman et al. 2002). Este gen ha sido propuesto como el ortólogo al gen de trigo *TaALMT1* localizado en el brazo 4DL. Dicho gen se ha secuenciado y ha resultado ser también un transportador de citrato activado por aluminio de la familia MATE, habiendo sido designado *HvMATE* (Wang et al. 2007, Furukawa et al. 2007). Por tanto, este resultado indica que el gen *Alp* (*HvMATE*) localizado en 4HL en cebada y el gen *TaALMT1* localizado en 4DL en trigo no deben ser ortólogos, ya que uno es un transportador de citrato y otro de malato, con estructuras en intrones y exones muy diferentes y pertenecientes a distintas familias génicas. Se han analizado cultivares de cebada que difieren en la resistencia al aluminio y se ha encontrado una correlación positiva con el nivel de expresión del RNA mensajero de *HvMATE* en las raíces. Sin embargo, solamente se han detectado cuatro SNPs en los ORF de estos cultivares que no explican las diferencias de expresión.

#### **14.3.7.3. Los genes ALS que codifican proteínas transportadoras de tipo ABC**

Las proteínas transportadoras ABC constituyen una gran familia, en *Arabidopsis* hay unos 130 genes que codifican para estas proteínas (Schulz y Kolukisaoglu 2006). Algunas de estas proteínas de la familia ABC detoxifican sustancias orgánicas e inorgánicas secuestrándolas en las vacuolas. En *Arabidopsis* se han descrito dos mutantes sensibles a  $Al^{3+}$  (*als1* y *als3*) que poseen mutaciones en los genes que codifican proteínas transportadoras de la familia ABC (Larsen et al. 2005, Larsen et al. 2007). La función de las proteínas ALS1 y ALS3 es aún desconocida aunque se piensa que pueden conferir tolerancia movilizando y secuestrando  $Al^{3+}$  en la planta.

#### **14.3.7.4. Exudación de aniones orgánicos por deficiencia de fósforo (P)**

Algunas especies exudan aniones orgánicos por las raíces como respuesta a la falta de fósforo (P) permitiendo a la planta explotar formas poco solubles de P. Por ejemplo, el citrato aumenta la disponibilidad de P en el suelo reponiendo el fosfato inorgánico a partir de complejos insolubles o desplazándolo a partir de ligandos de la superficie de los minerales del suelo (Ryan et al. 2001). Estudios electrofisiológicos realizados en altramuz (*Lupinus albus*) y *Arabidopsis* indican que el eflujo de citrato se lleva a cabo probablemente por canales aniónicos (Roberts 2006). No se sabe si hay proteínas de las familias ALMT y/o MATE implicadas en el eflujo de aniones orgánicos producido por la deficiencia de P.

#### **14.3.7.5. Mensajeros que se inducen por estrés con aluminio**

Se han descrito genes que responden al estrés por Al comparando los mensajeros que se expresan en plantas tolerantes y sensibles, en ausencia y presencia de Al, en especies como trigo (Snowden y Gardner 1993, Richards et al. 1994, Richards y Gardner 1994, Cruz-Ortega et al. 1997, Hamel et al. 1998), arroz (Yu et al. 1998), tabaco (Ezaki et al. 1995, 1996), *Arabidopsis* (Richards et al. 1998) y guisante (Brosché y Strid 1999, Säventrand et al. 2000). También se han generado ESTs en centeno a partir de raíces tratadas con Al y sin tratar para estudiar los cambios en la expresión bajo estrés por Al (Rodríguez-Milla et al. 2002). Además, se han detectado los genes *IMPDH* y *PEPC* que se expresan exclusivamente en soja tolerante (Ermolayev et al. 2003), los genes *TaPSS1* (Delhaize et al. 1999) y *VATPaseB* (Hamilton et al. 2001) en trigo o el gen *WAK1* en *Arabidopsis* (Sivaguru et al. 2003).

### 14.3.8. Recursos genéticos para aumentar la ToAI

Los recursos genéticos de plantas son una rica fuente de caracteres valiosos que pueden usarse para mejorar los cereales. La ToAI en trigo puede aumentarse incorporando genes de tolerancia procedentes de acervos genéticos primarios, secundarios y terciarios de la familia Triticeae. Los acervos genéticos primarios de trigo incluyen trigos hexaploides, tetraploides y diploides. Es relativamente fácil transferir genes entre especies del acervo genético primario. Las especies de *Aegilops* y centeno pertenecen al acervo genético secundario, mientras que Triticale (híbrido trigo-centeno) se clasifica entre los acervos primario y secundario. La mayoría de las especies del acervo genético secundario son bastante fáciles de cruzar con trigo, aunque puede haber problemas con la expresión de los genes ajenos en el fondo genético de trigo. El acervo genético terciario consiste en hierbas de forraje anuales y perennes que son difíciles de explotar sin el uso de técnicas especializadas. En trigo se ha identificado una gran variación en la ToAI. Una forma eficiente de identificar entradas de la colección del banco de genes es evaluar aquellas que proceden de áreas con suelos muy ácidos y problemas de AI. Algunos de los trigos y centenos más tolerantes (tales como el trigo "BH1146" y el centeno "blanco") proceden de Brasil, donde hay grandes extensiones con suelos ácidos. El germoplasma más apropiado para aumentar la ToAI es más probable encontrarlo en áreas de pH extremadamente bajo (por ejemplo Brasil). El centeno puede utilizarse como un indicador, si se encuentra centeno en el área, es probable que aparezcan trigos con buena tolerancia. El cultivar de trigo Barbela se ha cultivado durante siglos en ciertas regiones de suelos ácidos del norte de Portugal donde habitualmente se producía centeno. Barbela posee altos niveles de ToAI y tiene un pequeño segmento cromosómico de centeno, hasta un 5% de un cromosoma (Ribeiro-Carvalho et al. 1997). Barbela puede ser una buena fuente de genes de tolerancia, especialmente por no haber sido empleado todavía en la mejora de trigo. Una situación similar se encontró en Ecuador, donde se ha descrito un centeno altamente tolerante (Baier et al. 1996) y, por tanto, podría ser interesante evaluar la ToAI de las variedades locales de trigo. Sin embargo, no siempre se da esta correlación entre suelos ácidos y variedades tolerantes (Hede et al. 1996).

El centeno tiene una gran cantidad de variación que puede transferirse a trigo. El Triticale puede servir como puente para transferir los genes de tolerancia del centeno a trigo. Sloomaker (1974) al evaluar la tolerancia al AI de varias especies de *Aegilops* ha encontrado poca variación para el carácter, concluyendo que la ausencia de variación se debe a que los suelos en el centro de origen de *Aegilops* (el Creciente Fértil y Asia Menor) no son ácidos. Sin embargo, *Ae. umbellulata* muestra niveles de ToAI muy útiles (Hede et al. 2001).

Se conoce relativamente poco sobre la reacción a suelos ácidos en especies del acervo genético terciario, que además son muy difíciles de utilizar en la mejora de trigo. La preferencia es usar especies del acervo genético primario. Sin embargo, utilizando recursos genéticos del acervo genético primario, puede ser imposible conseguir una mayor ToAI que la encontrada hasta la fecha en trigo. La variación encontrada en los acervos genéticos secundario y terciario tiene un gran potencial para mejorar los niveles de ToAI en trigo. La recompensa potencial en términos de tolerancia puede hacer valioso emplear medios extraordinarios para acceder a los genes que confieren dicha tolerancia.

### 14.3.9. Conclusiones

La demanda mundial de trigo y otros cereales está aumentando debido al crecimiento de la población. Se estima que dicha demanda crecerá aproximadamente un 40% (2% anual) desde el año 1993 (552 millones de toneladas) al año 2020 (775 millones de toneladas) por lo que deberá mejorarse notablemente la producción en terrenos favorables y en ambientes marginales. Muchas de las áreas marginales son suelos ácidos, recuérdese que el 70% de los suelos potencialmente cultivables son ácidos. Por tanto, la obtención de variedades resistentes al aluminio es un objetivo de primer orden. Para ello interesa encontrar genes de tolerancia en las especies más resistentes (centeno y avena) y tratar de introducirlos en las especies de mayor interés agrícola (trigo, cebada y arroz).

En la última década, se han descrito y localizado cromosómicamente muchos genes y QTLs de ToAl, junto con marcadores moleculares estrechamente ligados, en diferentes especies vegetales. Dichos marcadores podrán emplearse en un futuro en programas de selección asistida mediante marcadores.

También, en los últimos cinco años se ha progresado bastante en el conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos de ToAl relacionados con la exudación de ácidos orgánicos. Se han identificado proteínas transportadoras de malato y citrato de las familias génicas ALMT y MATE en diversas especies implicadas en la resistencia al aluminio y que requieren la presencia de  $Al^{3+}$  para su activación. Sin embargo, no está claro todavía si la tolerancia reside en la estructura (secuencias codificantes) de las proteínas transportadoras de malato y citrato de las plantas tolerantes, o si por el contrario, se debe a las regiones reguladoras (promotores, regiones “aguas arriba” y “aguas abajo” de los genes correspondientes), o a una combinación de ambas. En el caso de las proteínas transportadoras de citrato (*SbMATE*) de sorgo no se han encontrado diferencias entre las secuencias codificantes de las variedades tolerantes y sensibles, pero sí en la región “aguas arriba”. En el caso de la proteína codificada por el gen *TaALMT1* de trigo habrá que determinar en qué residuos reside la especificidad por  $Al^{3+}$ . Tampoco se ha averiguado la base molecular de la diferencia entre las especies con patrón de exudación tipo I (constitutivo) como el trigo y tipo II (inducible) como el centeno. En las especies como el centeno, que son muy tolerantes al aluminio y tienen un patrón de tipo II, será necesario averiguar donde reside la especificidad para la inducción por Al (en la proteína o en las secuencias reguladoras). Para poder dar respuesta a estas preguntas, será necesario llevar a cabo estudios de la estructura y función de estas proteínas en distintas especies, prestando especial atención a los mecanismos que regulan la expresión de los genes que las codifican. Igualmente, también será necesario investigar el papel de las proteínas transportadoras de tipo ABC en la ToAl.

Por último, ya he mencionado que existen muchos mecanismos diferentes de ToAl (externos e internos). Hasta el momento, el mejor estudiado es la exudación de ácidos orgánicos por las raíces, sin embargo, aún quedan muchos más por explorar. Por ejemplo, los polisacáridos (pectina, hemicelulosas 1 y 2) de la pared celular están implicados en un mecanismo de exclusión del aluminio de las raíces de arroz, aumentando el tratamiento con Al la actividad de la pectin metilesterasa (PME) (Yang et al 2007). La ToAl en distintas especies probablemente se debe a un conjunto de mecanismos diferentes que están funcionando simultáneamente, por lo que aún queda una gran cantidad de investigación por realizar para desvelar las bases moleculares de estos mecanismos.

## REFERENCIAS

- Adams, F. (1984). Crop response to lime in the southern United States. pp. 211-265, in Adams, F. (ed.). *Soil acidity and liming*. American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI. USA.
- Almeida, L. A. V. (1955). A material orgânica e a calagem na fertilização da terra. Bol. Ord. Eng. 4:1-16.
- Aniol, A. (1984a). Introduction of aluminum tolerance into aluminum sensitive wheat cultivars. Z. Pflanzenzuchtg. 93:331-339.
- Aniol, A. (1984b). Induction of aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminum in the nutrient solution. Plant Physiol. 75: 551-555.
- Aniol, A. (1990). Genetics of tolerance to aluminium in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). Plant Soil 123: 223-227.
- Aniol, A. (2004). Chromosomal location of aluminium tolerance genes in rye. Plant Breed. 123(2): 132-136.
- Aniol, A., Hill, R.D. and Larter, E.N. (1980). Aluminum tolerance of spring rye inbred lines. Crop. Sci. 20: 205-208.
- Aniol, A., Gustafson, J.P. (1984). Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye, and Triticale. Can. J. Genet. Cytol. 26: 701-705.
- Aniol, A., and Madej, L. (1996). Genetic variation for aluminum tolerance in rye. Vortr. Pflanzeng. chtg. 35: 201-211.
- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B. and Fromm, H. (1999). A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni<sup>2+</sup> tolerance and Pb<sup>2+</sup> hypersensitivity in transgenic plants. Plant J. 20: 171-182.
- Assunção, A.G.L., Da Costa Martins, P., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H. and Aarts, M.G.M. (2001). Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant Cell Environ. 24: 217-226.
- Baier, A.C., Somers, D.J. and Gustafson, J.P. (1995). Aluminum tolerance in wheat: Correlating hydroponic evaluation with field and soil performances. Plant Breed. 114: 291-296.
- Baier, A.C., Somers, D.J. and Gustafson, J.P. (1996). Aluminum tolerance in Triticale, wheat and rye. pp. 437-444, in Guedes-Pinto, H. et al. (eds.). *Triticale Today and Tomorrow* Kluwer Academic Publishers.
- Barber, S.A. (1984). Liming materials and practices. pp. 171-209, in Adams, F. (ed.). *Soil acidity and liming*. American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI. USA.
- Barceló, J., Poschenrieder, C., Lombini, A., Llugany, M., Bech, J. And Dinelli, E. (2001). Mediterranean plant species for phytoremediation. pp.23, in *Abstracts Cost Action 837 WG2 workshop on Phytoremediation of Trace Elements in Contaminated Soils and Waters with Special*

---

*Emphasis on Zn, Cd, Pb and As.* (ed.) Universidad Complutense Madrid, Faculty of Chemistry, Madrid Disponible en: <http://lbewww.epfl.ch/COST837>.

Barceló, J. and Poschenrieder, C. (2003). Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science* 2(3): 333-344. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona.

Basu, A., Basu, U., and Taylor, G.J. (1994a). Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* under conditions of aluminum stress. *Plant Physiol.* 104: 1007-1013.

Basu, U., Godbold, D. and Taylor, G.J. (1994b). Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. *J. Plant Physiol.* 144: 747-753.

Basu, U., McDonald, J.L., Archambault, D.J., Good, A.G., Briggs, K.G., Aung, T. and Taylor, G.J. (1997). Genetic and physiological analysis of doubled-haploid, aluminium-resistant lines of wheat provide evidence for the involvement of a 23 kD, root exudate polypeptide in mediating resistance. *Plant Soil* 196: 283-288.

Behemer, S.T., Lloyd, C.M., Raubenheimer, D., Stewart-Clark, J., Knight, J., Leighton, R.S., Harper, F.A. and Smith, J.A.C. (2005). Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defence against insect herbivores. *Funct. Ecol.* 19: 55-66.

Bennet, R.J. and Breen, C.M. (1991). The aluminum signal: New dimensions to mechanisms of aluminum tolerance. *Plant Soil* 134:153-166.

Berzonsky, W.A. (1992). The genomic inheritance of aluminum tolerance in 'Atlas 66' wheat. *Genome* 35: 689-693.

Blamey, F.P.C., Edmeades, D.C. and Wheeler, D.M. (1990). Role of root cation-exchange capacity in differential aluminum tolerance of *Lotus* species. *J. Plant Nutr.* 13: 729-744.

Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D. and Chalot, M. (2003). Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *Plant Cell* 15: 2911-2928.

Boguszewski, W. (1980). Wapnowanie Gleb. PWRiL. Warszawa. Foy, C.D. (1988). Plant adaptation to acid, aluminium – toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19: 959-987.

Borlaug, N.E. and Dowswell, C.R. (1997). The acid lands: One of agriculture's last frontiers. pp. 5-15, in A.C. Moniz et al. (eds.). *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Brazilian Soil Science Society.

Camargo, C.E.O. (1981). Wheat improvement. I. The heritability of tolerance to aluminum toxicity. *Bragantia* 40: 33-45 (in Portuguese).

Camargo, C.E.O. (1984). Wheat improvement. VI. Heritability studies on aluminum tolerance using three concentrations of aluminum in nutrient solutions. *Bragantia* 44: 49-64 (in Portuguese).

Campbell, L.G. and Lafever, H.N. 1981. Heritability of aluminum tolerance in wheat. *Cereal Res. Common.* 9: 281-287.

- Caniato, F.F., Guimarães, C.T., Schaffert, R.E., Alves, V.M.C., Kochian, L.C., Borém, A., Klein, P.E. and Magalhaes, J.V. (2007). Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. *Theor. Appl. Genet.* 114: 863-876.
- Carver, B.F. and Ownby, J.D. (1995). Acid Soil Tolerance in Wheat. *Adv. Agron.* 54:117-173.
- Carver, B.F., Inskeep, W.P., Wilson, N.P. and Westerman, R.L. (1988). Seedling tolerance to aluminum toxicity in hard red winter wheat germplasm. *Crop Sci.* 28: 463-467.
- Cheng, N.H., Pittman, J.K., Barkla, B.J., Shigaki, T. and Hirschi, K.D. (2003). The *Arabidopsis cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses, and reveals interplay among vacuolar transporters. *Plant Cell* 15: 347-364.
- Conner, A.J. and Meredith, C.P. (1985). Large scale selection of aluminum-resistant mutants from plant cell culture expression and inheritance in seedlings. *Theor. Appl. Genet.* 71: 159-165.
- Cruz-Ortega, R., Cushman, J.C. and Ownby, J. (1997). cDNA clones encoding 1,3-beta-glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. *Plant Physiol.* 114: 1453-1460.
- Curie, C., Alonso, J.M., Le Jean, M., Ecker, J.R. and Briat, J.F. (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* 347: 749-755.
- De la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J.L. and Herrera-Estrella, L. (1997). Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276: 1566-1568.
- Delhaize, E. (1996). A metal-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 111: 849-855.
- Delhaize, E., Higgins, T.J.V. and Randall, P.J. (1991). Aluminum tolerance in wheat: Analysis of polypeptides in the root apices of tolerant and sensitive genotypes. pp: 1071-1079, in: R.J. Wright et al. (eds.). *Plant-soil interactions at low pH*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Delhaize, E., Ryan, P.R. and Randall, P.J. (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II: Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103: 695-702.
- Delhaize, E., Hebb, D.M., Richards K.D., Lin J.M., Ryan P.R. and Gardner, C. (1999). Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA - Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *J. Biol. Chem.* 274(11): 7082-7088.
- Delhaize, E., Hebb, D.M. and Ryan, P. R. (2001). Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol.* 125: 2059-2067.
- Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D.M., White, R.G. and Ryan, P.R. (2003). Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* 15: 1131-1142.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Hebb, D.M., Yamamoto, Sasaki, T. and Matsumoto, H. (2004). Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(42): 15249-15254.

- Delhaize, E; Gruber, B.D. and Ryan, P.R. (2007). The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Lett.* 581: 2255-2262.
- Devos, K.M., Atkinson, M.D., Chinoy, C.N., Francis, H.A., Harcourt, R.L., Koebner, R.M.D., Liu, C.J., Masojc, P. Xie, D.X. and Gale, M.D. (1993). Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 85: 673- 680.
- Devos, K.M. and Gale, M.D. (2000). Genome relationships: The grass model in current research. *Plant Cell* 12: 637-646.
- Ermolayev, V., Weschke, W. and Manteuffel, R. (2003). Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. *J. Exp. Bot.* 54(393): 2745-2756.
- Eswaran, H., Reich, P., and Beinroth, F. (1997). Global distribution of soils with acidity. pp. 159-164, in *Plant-Soil Interactions at Low pH*. A.C. Moniz et al. (eds.). Brazilian Soil Science Society.
- Evans, K.M., Gatehouse, J.A., Lindsay, W.P., Shi, J., Tommey, A.M. and Robinson, N.J. (1992). Expression of the pea metallothionein-like gene *PsMTA* in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for *PsMTA* function. *Plant Mol. Biol.* 20: 1019-1028.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y. and Matsumoto, H. (2000). Expression of aluminum-induced genes in transgenic *arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* 122: 657-666.
- Ezaki, B., Tsugita, S. and Matsumoto, H. (1996). Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminium treatment in tobacco cells: possible involvement of peroxidase isozymes in aluminium stress. *Physiol. Plant* 96: 21-28.
- Ezaki, B., Yamamoto, Y. and Matsumoto, H. (1995). Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminium treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. *Physiol Plant* 93: 11-18.
- FitzPatrick, E.A. (1986). An introduction to soil science. Longman Scientific & Technical. pp. 2-55.
- Fontecha, G., Silva-Navas, J., Benito, C., Mestres, M.A., Espino, F.J., Hernández-Riquer, M.V. and Gallego, F.J. (2007). Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 114: 249-260.
- Foy, C.D. (1984). Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. pp. 57-97, in F. Adams (ed.). *Soil Acidity and Liming*. American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI. USA.
- Foy, C. D. (1988). Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19:959-987.
- Foy, C.D., Armiger, W.H., Briggler, L.W. and Reid, D.A. (1965). Differential aluminum tolerance of wheat and barley varieties in acid soils. *Agro. J.* 57: 413-417.



- Foy, C.D., Chaney, R.L. and White, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 511-566.
- Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., Katsuhara, M., Takeda, K. and Ma, J.J. (2007). An aluminum-Activated citrate transporter in Barley. *Plant Cell Physiol.* 48(8): 1081-1091.
- Gallego, F.G. and Benito, C. (1997). Genetic control of aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 95: 393-399.
- Gallego, F.J., Calles, B. and Benito, C. (1998b). Molecular markers linked to the aluminium tolerance gene *Alt1* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97: 1104-1109.
- Gallego, F.J., López-Solanilla, E., Figueiras, A.M. and Benito, C. (1998a). Chromosomal location of PCR fragments as a source of DNA markers linked to aluminium tolerance genes in rye. *Theor. Appl. Genet.* 96: 426-434.
- Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walter, D.J., Bernal, M.P., Serrano, R. and Navarro-Aviñó, J. (2003). A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *BBRC* 303: 440-445.
- Guedes-Pinto, H. (1985). Novas técnicas para o melhoramento de cereais tolerantes ao alumínio. Workshop "Inovacao tecnológica e desenvolvimento regional". Universidades do Minho. Braga pp 11.
- Gustafson, J.P. and Ross, K. (1990). Control of alien gene expression for aluminum tolerance in wheat. *Genome* 33: 9-12.
- Haug, A. (1983). Molecular aspects of aluminum toxicity. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* 1: 345-373.
- Harada, E., Choi, Y.E., Tsuchisaka, A., Obata, H. and Sano, H. (2001). Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *J. Plant Physiol.* 158: 655-661.
- Hamel, F., Breton, C. and Houde, M. (1998). Isolation and characterization of wheat aluminium-regulated genes: possible involvement of aluminium as a pathogenesis response elicitor. *Planta* 205: 531-538.
- Hamilton, C. A., Good, A. G. and Taylor, J.G. (2001). Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiol.* 125(4): 2068-2077.
- Hasegawa, I., Terada, E., Sunairi, M., Wakita, H., Shinmachi, F., Noguchi, A., Nakajima, M. and Yakazi, J. (1997). Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (*CUP1*). *Plant Soil* 196: 277-281.
- Haug, A. (1983). Molecular aspects of aluminum toxicity. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* 1: 345-373.
- Hede, A.R., Skovmand, B. and Stølen, O. (1996). Evaluation of Mexican wheat landraces for tolerance to aluminum. pp. 184, in *Abstracts, 5<sup>th</sup> International Wheat Conference*. Ankara, Turkey: CIMMYT.



- Hede, A.R., Skovmand, B., López-Cesati, J. (2001). Acid Soil and Aluminum Toxicity. pp 172-182, in *Application of physiology in wheat breeding*. M.P. Reynolds, J.I. Ortiz-Monasterio and A. MacNab (eds). DF: CYMMYT, Mexico.
- Henderson, M., Ownby, J.D. (1991). The role of root cap mucilage secretion in aluminum tolerance in wheat. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 10:134-141.
- Hirschi, K.D., Korenkov, V.D., Wilganowski, N.L., and Wagner, G.J. (2000). Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco: altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* 124: 125-133.
- Hoekenga, O. A., Maron, L. G., Piñeros, M.A., Cançado, G.M.A., Shaff, J., Kobayashi, Y., Ryan, P.R., Dong, B., Delhaize, E., Sasaki, T., Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Koyama, H. and Kochian, L.V. (2006). *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103(25): 9738-9743.
- Hoekenga, O. A., Vision, T. J., Shaff, J.E., Monforte, A.J., Lee, G.P., Howell, S.H. and Kochian, L.V. (2003). Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x *Columbia*) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol.* 132(2): 936-948.
- Horst, W.J. (1995). The role of the apoplast in aluminum toxicity and resistance of higher plants: A review. *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.* 158: 419-428.
- Horst, W.J., Wagner, A., Marshner, H. (1982). Mucilage protects root meristems from aluminium injury. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 105: 435-444.
- Horst, W.J., Pschel, A.K. and Schmohl, N. (1997). Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. *Plant Soil* 192: 23-30.
- Hue, N.Y., Craddock, G.R. and Adams, F. (1986). Effect of organic acids on aluminium toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50: 28-34.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Camakaris, J., Harper, J.F. and Cobbett, C.S. (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1327-1339.
- Jayasundara, H.P.S., Thomson, B.D. and Tang, C. (1998). Responses of cool season grain legumes to soil abiotic stresses. *Adv. Agron.* 63: 77-151.
- Johnson, J.P., Carver, B.F. and Baligar, V.C. (1997). Productivity in Great Plains acid soils of wheat genotypes selected for aluminium tolerance. *Plant Soil* 188: 101-106.
- Kennedy, I.R. (1986). *Acid soil and acid rain: the impact on the environment of nitrogen and sulphur cycling*. Research Studies Press, Letchworth, UK.
- Kerridge, P.C. and Kronstad, W.E. (1968). Evidence of genetic resistance to aluminum toxicity in wheat (*Triticum aestivum* Vill., Host.). *Agron. J.* 60: 710-711.

- Kim, D.Y., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E.W., Martinoia, E. and Lee Y. (2006). *AtATM3* is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140: 922-932.
- Kobayashi, Y., Furuta, Y., Ohno, T., Hara, T., Koyama, H. (2005). Quantitative trait loci controlling aluminium tolerance in two accessions of *Arabidopsis thaliana* (Landsberg erecta and Cape Verde Islands). *Plant Cell Environ.* 28: 1516-1524.
- Kobayashi, Y. and Koyama, H.P.C. (2002). QTL analysis of Al tolerance in recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 43(12): 1526-1533.
- Kochian, L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 237-260.
- Lafever, H.N. and Campbell, L.G. (1978). Inheritance of aluminum tolerance in wheat. *Can. J. Gen. Cytol.* 20: 355-364.
- Larsen, P.B., Tai, C.Y., Kochian, L.V. and Howell, S.H. (1996). *Arabidopsis* mutants with increased sensitivity to aluminium. *Plant Physiol.* 110: 743-751.
- Larsen, P.B., Degenhardt, J., Tai, C.Y., Stenzler, L.M., Howell, S.H. and Kochian, L.V. (1998). Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminium accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol.* 117(1): 9-18.
- Larsen, P.B., Geisler, M.J.B., Jones, C.A., Williams, K.M. and Cancel, J.D. (2005). *ALS3* encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 41, 353-363.
- Larsen, P.B., Cancel, J., Rounds, M. and Ochoa, V. (2007). *Arabidopsis ALS1* encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta* 225: 1447-1458.
- Lasat, M.M., Pence, N.S., Garvin, D.F., Ebbs, S.D. and Kochian, L.V. (2000). Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Botany* 51: 71-79.
- Lazof, D.B., Goldsmith, J.G., Ruffy, T.W. and Linton, R.W. (1994). Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. *Plant Physiol.* 106:1107-1114.
- Lee, J., Bae, H., Jeong, J., Lee, J., Yang, Y., Hwang, I., Martinoia, E., and Lee, Y. (2003). Functional expression of a bacterial heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances resistance to and decreases uptake of heavy metals. *Plant Physiol.* 133: 589-596.
- Lee, S., Moon, J.S., Ko, T.S., Petros, D., Goldsbrough, P.B. and Korban, S.S. (2003). Overexpression of *Arabidopsis* Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress. *Plant Physiol.* 131(2): 656-663.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E.W. and Lee, Y. (2005). *AtPDR12* contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138: 827-836.

Ligaba, A., Katsuhara, M., Ryan, P.R., Shibasaka, M. and Matsumoto, H. (2006). The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiol.* 142: 1294-1303.

Little, R. (1988). Plant soil interactions at low pH. In: Problem Solving – The Genetic Approach. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19: 1239-1257.

López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M.F., Ramírez-Rodríguez, V. and Herrera-Estrella L. (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptative physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci.* 160: 1-13.

Luo M.C. and Dvorák, J. (1996). Molecular mapping of an aluminium tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring wheat. *Euphytica* 91: 31-35.

Llugany, M., Tolrà, R., Poschenrieder, C. and Barceló, J. (2007). Hiperacumulación de metales: ¿una ventaja para la planta y para el hombre?. *Ecosistemas* 2007/2: 1-6.

MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A. and Eide, D. (2000). Zinc transporters MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A., Eide, D. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 19(12): 2845-2855.

Ma, J.F., Bai, G.H., Carveer, B.F., and Zhou, L.L. (2005). Molecular mapping of a quantitative trait locus for aluminium tolerance in wheat cultivar Atlas 66. *Theor. Appl. Genet.* 112: 51-57.

Ma, J.F., Ryan, P.R. and Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6(6): 273-278.

Ma, J.F., Taketa, S. and Yang, Z.M. (2000). Aluminium tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in Triticale. *Plant Physiol.* 122: 687-694.

Ma, X.F., Wanous, M.K., Houchins, K., Rodríguez-Milla, M.A., Goicoechea, P.G., Wang, Z., Xie, M. and Gustafson, J.P. 2001. Molecular linkage mapping in rye (*Secale cereale* L). *Theor. Appl. Genet.* 102: 517-523.

Magalhaes, J. V., Garvin, D. F., Wang, Y., Sorrells, M.E., Klein, P.E., Schaffert, R.E., Li, L. and Kochian, L.V. (2004). Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. *Genetics* 167(4): 1905-1914.

Magalhaes, J.V., Liu, J., Guimaraes, C.T., Lana, G.P., Alves, M.C., Wang, Y.H., Schaffert, R.E., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., Shahh, J.E., Klein, P.E., Carneiro, N.P., Coelho, C.M., Trick, H.N. and Kochian, L.V. (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminium tolerance in sorghum. *Nature Genetics* 39 (9): 1156-1161.

Manyowa, N.M., Miller, T.E. and Forster, B.P. (1988). in pp. 851-857 Alien species as sources for aluminium tolerance genes for wheat, *Triticum aestivum*. *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.*

Matos, M., Camacho, M., Pérez-Flores, V., Pernaute, B., Pinto-Carnide, O. and Benito, C. (2004). Detection and mapping of SSRs in rye ESTs related with aluminium tolerance Genetic Variation for Plan Breeding. *Eucarpia XVII. Tulln (AUSTRIA)*.

Matos, M., Camacho, M.V., Pérez-Flores, V., Pernaute, B., Pinto-Carnide, O. and Benito, C. (2005). A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. *Theor. Appl. Genet.* 111: 360-369.

Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E. and Marmioli, N. (2005). Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environ. Pollut.* 134: 217-227.

Marschner, H. (1991). Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil* 134:1-24.

Martínez, M., Bernal, P., Almela, C., Vélez, D., García-Agustín, P., Serrano, R. and Navarro-Aviñó, J. (2006). An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens* with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere* 64: 478-485.

McGrath, SP., Sidoli, C.M.D., Baker, A.J.M. and Reeves, R.D. (1993). The potential for the use of metal-accumulating plants for the in situ decontamination of metal-polluted soils. pp. 673-676, in H.J.P. Eijsackers and T. Hamers (eds.) *Integrated Soil and Sediment Research: A Basis for proper Protection*. Kluwer Academic Publishers.

McGrath, SP., Lombi, E., Gray, CW., Caille, N., Dunham, SJ. and Zhao, F.J. (2006). Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environ. Pollut.* 141 (1): 115-125.

Meagher, R.B., Rugh, C.L., Kandasamy, M.K., Gragson, G. and Wang, N.J. (2000). Engineered phytoremediation of mercury pollution in soil and water using bacterial genes. pp. 201-220, in N. Terry and G. Bañuelos (eds) *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

Miftahudin, T., Scoles, G.J. and Gustafson, J.P. (2002). AFLP markers tightly linked to the aluminum-tolerance gene Alt3 in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104: 626-631.

Minella, E. and Sorrells, M.E. (1992). Aluminum tolerance in barley: Genetic relationships among genotypes of diverse origin. *Crop Sci.* 32: 593-598.

Minella, E. and Sorrells, M.E. (1997). Inheritance and chromosome location of Alp. A gene controlling aluminum tolerance in "Dayton" barley. *Plant Breed.* 116: 465-469.

Misra, S. and Gedamu, L. (1989). Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. *Theor. Appl. Genet.* 78: 161-168.

Miyasaka, S.C., Buta, J.G., Howell, R.K. and Foy, C.D. (1991). Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 96: 737-743.

Mugwira, L.M. and Patel, S.U. (1977). Root zone pH changes and ion uptake imbalances by triticale, wheat, and rye. *Agron. J.* 69: 719-722.

Mugwira, L.M. and Elgawhary, S.M. (1979). Aluminum accumulation and tolerance of triticale and wheat in relation to root cation exchange capacity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43: 736-740.

- Mugwira, L.M., Elgawhary, S.M. and Patel, K.I. (1976). Differential tolerances of triticale, wheat, rye, and barley to aluminum in nutrient solution. *Agron. J.* 68: 782-787.
- Mugwira, L.M., S.M. Elgawhary, and S.U. Patel. (1978). Aluminium tolerance in triticale, wheat and rye as measured by root growth characteristics and aluminium concentrations. *Plant Soil* 50: 681-690.
- Naranjo, T., Fernandez-Rueda, P. and Maestra, B. (1997). Chromosome rearrangements and homoeologous pairing: implications for the introgression of alien genes into wheat. pp 198–205, in. T. Lelely (ed). *Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement*. WUV-Universitätsverlag, Austria.
- Naranjo, T. and Fernández-Rueda, P. (1991). Homoeology of rye chromosome arms to wheat. *Theor. Appl. Genet.* 82: 577-586.
- Narasimhamoorthy, B., Bouton, J.H., Olsen, K.M. and Sledge, M.K. (2007). Quantitative trait loci and candidate gene mapping of aluminium tolerance in diploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet* 114: 901-913.
- Nava, I.C., Delatorre, C.A., de Lima Duarte, I.T., Pacheco, M.T. and Federizzi, L.C. (2006). Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena sativa* L.). *Euphytica* 148: 353-358.
- Navarro-Aviñó, J.P., Aguilar, I. and López-Moya, J.R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 2007/2: 1-17
- Nguyen, B.D., Brar, B.S., Bui, B.C., Nguyen, V.T., Pham, L.N. and Nguyen, H.T. (2003). Identification and mapping of the QTL for aluminium tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* Griff., into indica rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 583–593
- Nguyen, V.T., Nguyen, B.D., Sarkarung, S., Martinez, C., Paterson, A. H. and Nguyen, H. T. (2002). Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. *Mol. Genet. Genomics* 267(6): 772-780.
- Nguyen, V.T., Burow, M.D., Nguten, H.T., Le, B.T., Le, T.D. and Paterson, A.H. (2001). Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 102: 1002-1010.
- Oliveira, P.H. (2002). Herança genética e mapeamento molecular da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia 101 f. Tese (Doutorado – Agronomia – Fitotecnia). Programa de Pós-graduação em agronomia, UFRGS, Porto Alegre.
- Ownby, J.D. (1993). Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminium treated wheat roots. *Physiol. Plant.* 87: 371-380.
- Pan, A., Yang, M., Tie, F., Li, L., Chen, Z. and Ru, B. (1994). Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 24: 341-351.
- Parrot, W.A. and Bouton, J.H. (1990). Aluminum tolerance in alfalfa as expressed in tissue culture. *Crop Sci.* 30: 387-389.

- Pellet, D.M., Grunes, D.L. and Kochian, L.V. (1995). Organic acid exudation as an aluminium tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196: 788-795.
- Pellet, D.M., Papernik, L.A., Jones, D.L., Darrah, P.R., Grunes, D.L. and Kochian, L.V. (1997). Involvement of multiple aluminium exclusion mechanisms in aluminium. *Plant Soil* 192: 63-68.
- Picton, S.J., Richards, K.D. and Gardner, R.C. (1991). Protein profiles in root tips of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars with differential tolerance to aluminum. pp. 1063-1070, in R.J. Wright et al. (eds.). *Plant soil interactions at low pH*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Polle, E., Konzak, C.F. and Kittrick, J.A. (1978). Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Sci.* 18: 823-827.
- Poschenrieder, C., Tolrà, R. and Barceló, J. (2006). Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci.* 11: 288-295.
- Rajaram, S. and Villegas, E. (1990). Breeding wheat (*Triticum aestivum*) for aluminium toxicity tolerance at CIMMYT. pp. 489-495, in N. El Bassam et al. (eds.) *Genetic aspects of plant mineral nutrition*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Rajaram, S., Kohli, M.M. and Lopez-Cesati, J. (1991). Breeding for tolerance to aluminum toxicity in wheat. pp. 1019-1028, in R.J. Wright et al. (eds.) *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Raman, H., Zhang, K., Fakir, M., Appels, R., Garvin, D.F., Maron, L.G., Kochian, L.V., Moroni, J.S., Raman, S., Imitas, M., Drake-Brockman, F., Waters, I., Martin, P., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Matsumoto, Y., Matsumoto, H., Hebb, D.M., Delhaize, E. and Ryan, P. (2005). Molecular characterization and mapping of *ALMT1*, the aluminium-tolerance gene of cread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 48(5): 781-791.
- Raman, H., Moroni, J. S., Sato, K., Read, B. and Scott, B. (2002). Identification of AFLP and microsatellite markers linked with an aluminium tolerance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105(2-3): 458-464.
- Raman, H., Raman, R., Wood, R. and Martin, P. (2006). Repetitive indel markers within the *ALMT1* gene conditioning aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breed.* 18, 171–183.
- Rao, M.I., Zeigler, R.A., Vera, R. and Sarkarung, S. (1993). Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. *Bioscience* 43: 454-465.
- Reid, D.A. (1970). Genetic control of reaction to aluminum in winter barley. pp 409-413, in Nilan R.A. (ed) *Barley genetics II, Proc. 2nd Int Barley Genet. Symp.* Washington State University Press, Pullman, U.S.A.
- Reid, D.A. (1971). Genetic control of reaction to aluminum in winter barley. pp. 409-413, in Nilan R.A. (ed) *Barley Genetics II. Proc. 2nd. Int. Barley Genet. Symp.* Pullman, WA: Washington State University Press, U.S.A.

- Rengel, Z. and Jurkic, V. (1993). Evaluation of *Triticum aestivum* germplasm from Croatia and Yugoslavia for aluminum tolerance. *Euphytica* 66: 111-116.
- Ribeiro-Carvalho, C., Guedes-Pinto, H., Harrison, G. and Heslop-Harrison, J.S. (1997). Wheat-rye chromosome translocations involving small terminal and intercalary rye chromosome segments in the Portuguese wheat landrace Barbela. *Heredity* 78(5): 539-546.
- Richards, K.D. and Gardner, R.C.P.C. (1994). The effect of aluminum treatment on wheat roots - expression of heat-shock, histone and Shh genes. *Plant Sci.* 98: 37-45.
- Richards, K.D., Snowden, K.C. and Gardner, R.C.P.C. (1994). Wali6 and Wali7 - Genes induced by aluminum in wheat (*Triticum- Aestivum* L.) Roots. *Plant Physiol.* 105: 1455-1456.
- Riede, C.R. and Anderson, J.A. (1996). Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci.* 36: 905-909.
- Rincón, M. and González, R.A. (1991). Induction of protein synthesis by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) root tips. pp. 851-858, in Wright, R.J. et al. (eds.) *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ring, S.M., Fisher, R.P., Poile, G.J., Helyar, K.R., Konyers, M.K. and Morris, S.G. (1993). Screening species and cultivars for their tolerance to acidic soil conditions. *Plant Soil* 155/156:521-524.
- Roberts, S.K. (2006). Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytol.* 169, 647-666.
- Rodríguez-Milla, M.A. and Gustafson, J.P. (2001). Genetic and physical characterization of chromosome 4DL in wheat. *Genome* 44: 883-892.
- Rodríguez-Milla, M.A., Butler, E., Huete, A.R., Wilson, C.F., Anderson, O. and Gustafson, J.P. (2002). Expressed Sequence Tag-Based Gene Expression Analysis under Aluminium Stress in Rye. *Plant Physiol.* 130(4):1706-16.
- Rogers, E.E., Eide, D.J. and Guerinot, M.L. (2000). Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12356-12360.
- Ruiz-Torres, N.A., Carver, B.F. and Westerman, R.L. (1992). Agronomic performance in acid soils of wheat lines selected for hematoxylin staining pattern. *Crop Sci.* 32:104-107.
- Ryan, P.R., Ditomaso, J.M. and Kochian, L.V. (1993). Aluminum toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* 44: 437-446.
- Ryan, P.R., Delhaize, E. and Randall, P.J. (1995). Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 531-536.
- Ryan, P.R., Delhaize, E. and Jones, D.L. (2001). Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 527-560.



Salt, D.E. (2006). An extreme Plant Lifestyle: Metal Hyperaccumulation. Chapter 26. Essay 26.2. In *Plant Physiology Online*. Disponible en: <http://4e.plantphys.net/article.php?ch=&id=356>

Samuelsen, A.I., Martin, R.C., Mok, D.W. and Mok, M.C. (1998). Expression of the yeast *FRE* genes in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 118: 51-58.

Sánchez-Chacón, C.D., Federizzi, L.C., Milach, S.C.K. and Pacheco, M.T. (2000). Variabilidade genética e herança de la tolerancia á toxicidade do alumínio em aveia. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 35: 1797-1808.

Sasaki, T., Ryan, P. R., Delhaize, E., Hebb, D. M., Ogihara, Y., Kawaura, K., Noda, K., Kojima, T., Toyoda, A., Matsumoto, H. and Yamamoto, Y. (2006). Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) ALMT1 gene and its relationship to aluminum resistance. *Plant Cell Physiol.* 47(10): 1343-54.

Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, Y., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., Delhaize, E. and Matsumoto, H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* 37(5): 645-653.

Schulz, B. and Kolukisaoglu, H. (2006). Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS Lett.* 580: 1010-1016.

Sibov, S.T., Gaspar, M., Silva, M.J., Ottoboni, L.M.M., Arruda, P. and Souza, A.P. (1999). Two genes control aluminium tolerance in maize: genetic control and molecular mapping analices. *Genome* 42: 475-482.

Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z.H., Tong, H., Osawa, H., Baluska, F., Volkmann, D. and Matsumoto, H. (2003). Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132(4): 2256-2266.

Sledge, M.K., Bouton, J.H., Dall' Agnoll, M., Parrot, W.A. and Kochert, G. (2002). Identification and confirmation of aluminum tolerance QTL in diploid *Medicago sativa* subsp. *coerulea*. *Crop Sci.* 42: 1121-1128.

Slootmaker, A.L.J. (1974). Tolerance to high soil acidity in wheat related species, rye and triticale. *Euphytica* 23: 505-513.

Snowden, K.C., Gardner, R.C. (1993). Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 103: 855-861.

Somers, D.J. and Gustafson, J.P. (1995). The expression of aluminum stress induced polypeptides in a population segregation for aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 38: 1213-1220.

Somers, D.J., Briggs, K.G. and Gustafson, J.P. (1996). Aluminum stress and protein synthesis in near isogenic lines of *Triticum aestivum* differing in aluminum tolerance. *Physiol. Plant.* 97: 694-700.



- Song, W.Y., Sohn, E.J., Martinoia, E., Lee, Y.J., Yang, Y.Y., Jasinski, M., Forestier, C., Hwang, I. and Lee, Y. (2003). Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature Biotech.* 21: 914-919.
- Stølen, O. and Andersen, S. (1978). Inheritance of tolerance to low soil pH in barley. *Hereditas* 88: 101-105.
- Suhayda, C.G. and Haug, A. (1986). Organic acids reduce aluminum toxicity in maize root membranes. *Physiol. Plant.* 68: 189-195.
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouche, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I.N., Maathuis, F.J., Sanders, D., Bouchez, D. and Fromm, H. (2000). Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* *CNGC1* gene confer  $Pb^{2+}$  tolerance. *Plant J.* 24: 533-542.
- Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., Von Wirén, N. and Fujiwara, T. (2005). Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 12276-12281.
- Tang, Y., Sorrells, M.E., Kochian, L.V. and Garvin, D.F. (2000). Identification of RFLP markers linked to barley aluminium tolerance gene *Alp*. *Crop. Sci.* 40: 778-782.
- Taylor, G.J. (1988). The physiology of aluminum phytotoxicity. Vol. 24: 123-163, in H. Sigel and A. Sigel (eds.). *Metal ions in biological systems: Aluminum and its role in biology*. Marcel Dekker, New York.
- Taylor, G.J. (1991). Current Views of the aluminum stress response: The physiological basis of tolerance. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 10: 57-93.
- Taylor, G.J. (1995). Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminum resistance. *Plant Soil* 171:89-103.
- Thomas, G.W. and Hargrove, W.L. (1984). The chemistry of soil acidity. pp. 3-56, in F. Adams (ed.) *Soil Acidity and Liming*. American Society of Agronomy, Inc., Madison, WI. USA
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. and Schroeder, J.I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4991-4996.
- Tice, K.R., Parker, D.R. and McMason, D.A. (1992). Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol.* 100: 309-318.
- Ulrich, B., Mayer, R. and Khanna, P.K. (1980). Chemical changes due to acid precipitation in a loess-derived soil in Central Europe. *Soil Sci.* 130: 193-199.
- Van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A.C. and Hooykaas, P.J.J. (1999). Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol.* 119: 1047-1056.

Van Wambeke, A. (1976). Formation, distribution and consequences of acid soils in agricultural development. pp. 15-24, in M.J. Wright and S.A. Ferrari (eds.). *Proceedings of Workshop on Plant Adaptation to Mineral Stress in Problem Soils*. Spec. Publ. Cornell Univ., Agric. Exp. Stn., Ithaca, NY.

Von Uexkull, H.R. and Mutert, E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* 171:1-15.

Wagatsuma, T. and Akiba, R. (1989). Low surface negativity of root protoplasts from aluminum-tolerant plant species. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35:443-452.

Wagner, C.W., Milach, S.C.K. and Federizzi, L.C. (2001). Genetic inheritance of aluminum tolerance in oat. *Crop Breed. Appl. Biotech.* 1: 22-26.

Wang, J., Raman, H., Zhou, M., Ryan, P.R., Delhaize, E., Hebb, D.M., Coombes, N. and Mendham, N. (2007). High-resolution mapping of the Alp locus and identification of a candidate gene HvMATE controlling aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 115: 265-276.

Wight, C.P., Kibite, S., Tinker, N.A. and Molnar, S.J. (2006) Identification of molecular marker for aluminium tolerance in diploid oat through comparative mapping and QTL analysis. *Theor Appl Genet* 112: 222-231.

Wu, P., Liao, C.Y., Hu, B., Yi, K.K., Jin, W.Z., Ni, J.J. and He, C. (2000). QTLs and epistasis for aluminium tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1295-1303.

Xiang, C., Werner, B.L., Christensen, E.M. and Oliver, D.J. (2001). The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol.* 126: 564-574.

Yang, J.L., Li, Y.Y., Zhang, Y.J., Zhang, S.S., Wu, Y.R., Wu, P., Zheng, S.J. 2007. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiol.* 146: 602-611.

CAPÍTULO **15**

---

**RESPUESTA  
MOLECULAR AL  
ESTRÉS TÉRMICO  
Y A LOS ESTRESSES  
MÚLTIPLES EN PLANTAS**

---

*Sergio G. Atienza  
Antonio M. Stanca  
Luigi Cattivelli*



## RESPUESTA MOLECULAR AL ESTRÉS TÉRMICO Y A LOS ESTRESSES MÚLTIPLES EN PLANTAS

---

Sergio G. Atienza<sup>1</sup>, Antonio M. Stanca<sup>2</sup> y Luigi Cattivelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Inst. Agricultura Sostenible (CSIC) Avda. Menéndez Pidal s/n Apdo. 4084, 14080 Córdoba (España). E-mail: sgatienza@ias.csic.es*

<sup>2</sup> *CRA Genomic Research Centre, Via S. Protaso 302, 29017 Fiorenzuola d'Arda (Italy). E-mail: l.cattivelli@iol.it*

---

### 15.1. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista de la mejora, la tolerancia a estrés puede definirse como la capacidad de las plantas de mantener un rendimiento elevado en condiciones ambientales adversas. Por tanto, el objetivo de la mejora debe ser el desarrollo de plantas que sean capaces de alcanzar el máximo rendimiento potencial en condiciones óptimas pero que además se adapten a situaciones de estrés y minimicen las pérdidas en el rendimiento.

La productividad agrícola se encuentra fuertemente limitada por las condiciones ambientales. Los estreses abióticos juegan un papel muy importante en este contexto ya que el ambiente al que debe enfrentarse un cultivo varía de forma significativa a lo largo de su desarrollo.

El presente capítulo aborda el estudio de diversos estreses. Por un lado se tratará el estrés térmico, considerando tanto altas como bajas temperaturas. También se considerará la tolerancia a heladas, ya que la formación de hielo en la planta desencadena mecanismos de respuesta distintos a los causados por la acción de bajas temperaturas.

En segundo lugar se considerará el estrés múltiple. La combinación de 2 o más estreses resulta generalmente más perjudicial para un cultivo que la acción individualizada de cualquiera de ellos por separado (Mittler, 2006; Shao et al., 2007). No obstante, aunque tanto agricultores como mejoradores saben que los estreses múltiples son los causantes de las mayores pérdidas en la agricultura, hasta el momento son pocos los trabajos que han tratado de investigar los procesos desencadenados en las plantas en respuesta a la combinación de estreses.

## 15.2. DEFINICIÓN E IMPORTANCIA DEL ESTRÉS TÉRMICO Y DE LOS ESTRESSES MÚLTIPLES

La severidad del estrés por temperaturas extremas depende de varios factores como son la tasa de cambio de la temperatura, la temperatura alcanzada y el tiempo que se mantiene (Sung et al., 2003). La temperatura que causa un estrés térmico depende de la especie, el genotipo y el tejido pero generalmente se acepta que hay 4 tipos de estrés térmico: períodos continuados de alta temperatura, choque térmico, estrés por bajas temperaturas por encima de 0°C (referido en la literatura como “*chilling*”) y estrés por congelación o “*freezing*” (Sung et al., 2003).

Las plantas son organismos sésiles y por tanto carecen de la capacidad de desplazamiento de los animales como medio de defensa frente a un ambiente hostil. Esto ha hecho que hayan desarrollado mecanismos de detección de las variaciones que se producen en el ambiente para desencadenar cascadas de transducción de señales que, en último término, activan genes que producen cambios fisiológicos y bioquímicos que les permiten adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento.

El estrés por baja temperatura es uno de los estreses abióticos con mayor impacto sobre las plantas afectando la distribución geográfica de los cultivos y reduciendo el rendimiento al acortar el período de crecimiento. Muchos cultivos de gran importancia como el arroz (*Oryza sativa* L.) o el maíz (*Zea mays* L.) no soportan la incidencia de bajas temperaturas. Otros como los pertenecientes a la tribu Triticeae se cultivan en un amplio rango de condiciones ambientales, desde latitudes elevadas a los márgenes de los desiertos. La adaptación a estos distintos ambientes se realiza gracias a genes que controlan el crecimiento de la planta y el paso a la fase reproductiva como los genes de vernalización o de respuesta al fotoperíodo y que se tratan en profundidad en otro capítulo de este libro.

La aclimatación al frío es el fenómeno por el que las plantas incrementan su tolerancia en respuesta a la incidencia de bajas temperaturas aunque superiores al nivel de congelación (Hughes y Dunn, 1996; Smallwood y Bowles, 2002; Thomashow, 1998; Thomashow, 1999).

Así mismo, la aclimatación a las altas temperaturas o termo-tolerancia adquirida también juega un papel importante en la respuesta al calor (Sung et al., 2003), que también constituye un serio problema para la producción agrícola mundial (Wahid et al., 2007), sobre todo teniendo en cuenta las expectativas de cambio climático que indican que la temperatura global del planeta se incrementará entre 0,6-4°C en función de las emisiones atmosféricas en equivalentes de CO<sub>2</sub> (IPCC, 2007).

El estrés múltiple o combinado puede considerarse desde 2 puntos de vista distintos. En primer lugar, teniendo en cuenta el ciclo completo de un cultivo, las plantas tendrán que enfrentarse a distintos estreses abióticos durante su desarrollo y por tanto tendrán que desencadenar respuestas específicas en cada estadio.

De este modo un cultivo puede tener que enfrentarse a bajas temperaturas durante las fases iniciales de su desarrollo y a altas temperaturas y sequía en las fases finales del mismo. Así mismo, el grado de salinidad puede variar a lo largo del tiempo en función de las precipitaciones, del abonado y de los requerimientos hídricos en cada momento. Además, el hecho de tener que soportar un estrés en un momento específico del desarrollo puede tener incidencia en la capacidad de respuesta de la planta frente a otros estreses en posteriores etapas de su ciclo de vida.

En segundo lugar, teniendo en cuenta un instante concreto del desarrollo de un cultivo, el estrés múltiple consistiría en la aparición simultánea de varios tipos de estreses. Por ejemplo, en la cuenca mediterránea destaca sobre todo la combinación de altas temperaturas y estrés hídrico que se produce al final del ciclo de los cultivos sembrados en otoño, a los que habría que añadir la alta intensidad lumínica. Cultivos perennes como el olivo tienen que convivir con esta combinación de estreses todos los años. Por el contrario, en países de latitudes altas como Canadá o Suecia, el estrés múltiple compuesto por la acción simultánea de bajas temperaturas y alta intensidad lumínica supone uno de los mayores limitantes para la producción agrícola (Mittler, 2006).

Otras combinaciones en las que se incluyen estreses de suelo, como la presencia de metales pesados, la salinidad, la escasez de nitrógeno o la anoxia, suponen un factor de variación muy importante a tener en cuenta. Del mismo modo, es de sobra conocido que el estado nutritivo de la planta también influye de manera crucial sobre su capacidad para enfrentarse a los estreses durante su ciclo de cultivo. De hecho, en algunos casos se ha determinado la interacción negativa que se produce entre algunos estreses como la sequía, la salinidad o el ataque por patógenos y el estado nutritivo de la planta (Mittler, 2006).

En cualquier caso, tanto si se considera el estrés múltiple una sucesión de estreses a lo largo del tiempo, como si se refiere a la aparición simultánea de varios estreses, la mejora frente a la combinación de estreses requiere de estrategias de selección múltiple que tengan en cuenta este tipo de interacciones.

### **15.3. EFECTOS DE LOS ESTRESSES SOBRE LAS PLANTAS**

Las plantas han evolucionado para desencadenar cambios en respuesta a los distintos estreses que les permitan sobrevivir. La aclimatación al frío provoca modificaciones fisiológicas y bioquímicas incluyendo cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática, incremento del contenido total de proteína soluble e incremento del contenido de moléculas que pueden servir como crioprotectores (Thomashow, 1999).

Las bajas temperaturas causan diversos síntomas primarios en las plantas incluyendo lesiones en las hojas, decoloración, rotura de tejido o senescencia acelerada (Sharma et al., 2005). Una de las causas principales del daño por congelación se debe a la deshidratación inducida (Thomashow, 1998). La formación de hielo en los espacios intracelulares hace que disminuya el potencial hídrico fuera de las células, lo que provoca un flujo de agua hacia el exterior de las mismas (Pearce, 1999). Además, la congelación también puede producir daño físico de las células por el crecimiento del hielo (Pearce, 1999).

Los efectos de las altas temperaturas sobre las plantas han sido revisados recientemente (Wahid et al., 2007). En general las altas temperaturas originan deshidratación e incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto hace que se produzca una pérdida del rendimiento, que en muchos casos está relacionada con la coincidencia del estrés con el período reproductivo de la planta. Además, las altas temperaturas pueden tener otras consecuencias desde el punto de vista agronómico como la pérdida de calidad del grano en cereales (Maestri et al., 2002).

A diferencia de los estreses térmicos descritos anteriormente, para los que existen revisiones recientes, el estudio del estrés múltiple se encuentra mucho más disperso en la literatura, de ahí que en las siguientes líneas tratemos de analizar en mayor profundidad este tipo de estrés. Los efectos del estrés múltiple dependen de cada combinación de estreses, por lo que cada caso debe ser considerado por separado de forma comparativa con respecto a sus respectivos estreses individuales.

Uno de los estreses múltiples más comunes consiste en la asociación de altas temperaturas y carencia hídrica y, por tanto, es uno de los más estudiados. Rizhsky et al., (2002) investigaron el efecto del calor, la sequía y la combinación de ambos estreses en tabaco (*Nicotiana tabbacum* L.). Sus resultados mostraron que en condiciones de sequía las plantas cierran sus estomas para evitar la pérdida de agua. Por el contrario, cuando las plantas eran sometidas a altas temperaturas sin restricciones hídricas, las plantas de tabaco mantenían los estomas abiertos, ya que el objetivo era la disminución de la temperatura foliar. Es decir, la respuesta primaria frente a estos dos estreses individuales no sólo era distinta, sino antagónica, de ahí la importancia del estudio del estrés múltiple.

El estrés múltiple provocó el cierre de estomas, lo que limitó la pérdida de agua pero produjo un incremento de la temperatura foliar en varios grados respecto a la alcanzada en el estudio del efecto aislado del calor. A la vista de sus resultados, los autores concluyen que la simultaneidad de ambos estreses acentúa el estrés, por lo que resulta más perjudicial para la planta. Resultados similares han sido descritos en maíz y girasol (*Helianthus annus* L.) (Dekov et al., 2000).

Estos resultados han sido confirmados posteriormente por otros trabajos como el realizado por Xu y Zhou (2006) donde se estudia el comportamiento de la gramínea perenne *Leymus chilensis* (Trin.) Tzvel. Sus datos indican que la combinación de la desecación del suelo con la incidencia de altas temperaturas puede reducir el funcionamiento del fotosistema II, debilitar el metabolismo del nitrógeno y fortalecer el catabolismo proteico. Así mismo, se produce la peroxidación de los lípidos y se reduce la productividad de la planta. Todo ello parece confirmar que el estrés hídrico potencia los efectos adversos de las altas temperaturas.

Otros estreses múltiples importantes son los que se ocasionan al coincidir una alta intensidad lumínica y un estrés térmico, tanto de altas como de bajas temperaturas. Estos estreses múltiples originan un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el aparato fotosintético (Mittler, 2006). Las ROS son tóxicas para las células pero también intervienen en los procesos de señalización para activar las respuestas al estrés, de ahí que el control de los niveles de estas moléculas sea muy estricto (Mittler, 2002). Por tanto, cualquier alteración de los niveles de ROS en la célula causados por un estrés múltiple puede causar grandes desequilibrios, que pueden ser aún más graves si tenemos en cuenta que la combinación de una alta intensidad lumínica con altas temperaturas puede desactivar los sistemas antioxidantes de la célula como se ha visto en judía (*Phaseolus vulgaris* L.) (Ye et al., 2000).

La combinación de salinidad con sequía también es frecuente en los ecosistemas. Por ejemplo, el estudio realizado en *Spartina alterniflora* Loisel. por Brown et al. (2006), gramínea que crece en marismas como la del delta del río Mississippi, muestra que el porcentaje de supervivencia de esta especie fue del 100% cuando se aplicaron los estreses individuales de salinidad o de sequía. Sin embargo, la tasa de supervivencia se redujo al 71% cuando se combinaron ambos estreses. De ahí que se concluya que la sequía parece magnificar los efectos adversos de la salinidad en la planta (Brown et al., 2006).



Así mismo, la combinación de sequía y metales pesados parece agravar el efecto de estos estreses (Barcelo y Poschenrieder, 1990, citado por Mittler, 2006). No obstante este efecto no parece ser general ya que el exceso de boro en combinación con sequía no causó efectos aditivos en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Ben-Gal y Shani, 2003). Del mismo modo, el exceso de boro en condiciones de salinidad tampoco originó mayores daños que estos estreses por separado en *Phoenix dactylifera* L. (Tripler et al., 2007). Por otro lado, también es posible que el exceso de Boro origine unos efectos en la planta similares a los causados por la sequía y la salinidad, por lo que los mecanismos desencadenados por la planta serían comunes para ambos tipos de estreses.

Otros trabajos han estudiado el efecto de la compactación del suelo sobre los cultivos, ya que este fenómeno puede originar la aparición de estrés múltiple por combinación de sequía o anaerobiosis con impedancia mecánica (Iijima y Kato, 2007). Otro estrés múltiple descrito consiste en la incidencia simultánea de salinidad del suelo y de deposición de agua salina sobre las hojas, lo que tiene incidencia sobre todo en zonas costeras como las marismas (Elhaak et al., 1997).

Por último, aunque no es objeto de este capítulo, es necesario indicar que la combinación de estreses abióticos y bióticos también es de gran importancia en la agricultura, ya que la incidencia de los primeros puede incrementar la susceptibilidad de las plantas frente a patógenos (Iba, 2002). Por ejemplo, como se describirá más adelante en este capítulo, la fluidez de la membrana plasmática tiene importancia en la tolerancia frente a los estreses térmicos, a través de la modificación del grado de saturación de sus ácidos grasos. Además, este parámetro también está relacionado con la capacidad de replicación de los virus (Lee et al., 2001). La situación inversa también ocurre. De hecho se conoce que la infección con virus en cebada (*Hordeum vulgare* L.) disminuye la tolerancia al frío durante el invierno.

Todos estos trabajos indican que la aparición simultánea de varios estreses abióticos produce generalmente efectos mucho más perjudiciales sobre la planta que los estreses individuales por separado. De ahí que su repercusión económica sea mucho mayor. Mittler (2006) seleccionó el estrés combinado de sequía más altas temperaturas como caso particular para estudiar las pérdidas económicas ocasionadas por los estreses múltiples. Sus datos indican que las pérdidas económicas en la agricultura de EE.UU. causadas por el estrés múltiple de sequía + calor durante el período 1980-2004 eran muy superiores a la suma de las pérdidas ocasionadas por el resto de desastres naturales (excluyendo tornados, huracanes e incendios) (Mittler, 2006).

## 15.4. RESPUESTA MOLECULAR AL ESTRÉS: PERCEPCIÓN Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN

La respuesta molecular al estrés se puede definir como el conjunto de todos los cambios involucrados en la adaptación de la planta, que en último término conducen a la tolerancia al estrés. La tolerancia al estrés es un fenómeno complejo en el que se distinguen diversas fases: percepción, transducción de la señal al núcleo o al citoplasma, cambios en la expresión génica y finalmente cambios metabólicos que conducen a la tolerancia del estrés (Agarwal et al., 2006; Sharma et al., 2005; Wahid et al., 2007).

Hoy día parece obvio que los cambios metabólicos provienen de cambios en la expresión génica. Sin embargo, en los estudios de aclimatación de las plantas al frío, primero se identificaron cambios fisiológicos y bioquímicos como variaciones en la composición lipídica de las membranas, incrementos en el contenido de proteína soluble o de moléculas que sirven como crioprotectores, y a continuación se observó que la aclimatación al frío estaba asociada con cambios en la expresión génica (Van Buskirk y Thomashow, 2006). Por tanto, podemos decir que el estudio de la tolerancia al estrés partió del descubriendo de los cambios producidos en la plantas para identificar después los genes relacionados con estas modificaciones y las rutas que desencadenan las respuestas de tolerancia a estrés.

La relación directa entre los cambios en la expresión génica y el incremento de la tolerancia en las plantas es un hecho clave para el desarrollo de estrategias que permitan mejorar la adaptación de los cultivos a los estreses abióticos como veremos más adelante. Además, los genes que tienen un papel destacado en la respuesta molecular al estrés pueden ser genes candidatos que expliquen la variación detectada en trabajos de detección de QTLs (loci para caracteres cuantitativos).

### 15.4.1. Percepción del estrés

La percepción y la transducción del estrés constituyen los primeros pasos de la respuesta molecular. Las plantas pueden percibir cada estrés de diversas maneras, así como desarrollar varias rutas de señalización. En el caso del frío se considera que las membranas celulares, especialmente la membrana plasmática, son el punto primario para la percepción del estrés y la inducción de la señalización hacia el interior de la célula (Sharma et al., 2005; Sung et al., 2003; Wahid et al., 2007).

Por otro lado, se han identificado dos grupos de posibles sensores del frío como son las kinasas de histidina asociadas a membrana y las proteínas canal TRP ("*Transient Receptor Potential*") (Sung et al., 2003). Sin embargo, en este capítulo nos vamos a centrar en el papel de las membranas como sitios primarios de la percepción al estrés a modo de ejemplo de la percepción del mismo. El papel de otros sensores del estrés aparece revisado en los trabajos de Sharma et al. (2005) y Sung et al. (2003).

Dado que las membranas celulares son estructuras fluidas, las bajas temperaturas hacen que se vuelvan más rígidas, lo que sirve a las células para detectar el frío (Chinnusamy et al., 2007; Sharma et al., 2005). El papel del aumento de la rigidez de la membrana en la activación de genes de respuesta al frío se ha demostrado en alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Orvar et al., 2000), donde se descubrió que el aumento de la fluidez de las membranas impedía la aclimatación al frío. Por el contrario, la inducción de la rigidez de la membrana a 25°C permitía la aclimatación a condiciones de frío. En el mismo trabajo se demostró que la reorganización del citoesqueleto juega un papel importante en la transducción de la señal por bajas temperaturas en alfalfa.

Resultados similares se han descrito en la especie *Brassica napus* L. (Sangwan et al., 2001) donde la adición de un compuesto para aumentar la fluidez de la membrana impedía la activación mediada por frío del gen *BN115*, que es uno de los genes inducibles por bajas temperaturas en esta especie. Sin embargo, la adición de dimetil-sulfóxido (DMSO) a 25 °C, compuesto que aumenta la rigidez de la membrana, permitía la activación de este gen.

Análogamente, el uso de mutantes en *Arabidopsis* ha permitido llegar a conclusiones similares. Por ejemplo, el mutante *fad2* de *Arabidopsis* es deficiente para la oleato desaturasa, lo que hace que su membrana incremente su rigidez a temperaturas más altas de lo que lo hace en las plantas normales no mutadas (Vaultier et al., 2006). Estos experimentos permitieron concluir que el aumento de la rigidez de la membrana actúa como un mecanismo de percepción del frío en un paso previo a la ruta de la diacylglicerol kinasa en *Arabidopsis* (Vaultier et al., 2006).

Las membranas también son el punto en el que inciden las temperaturas que causan congelación tal y como se muestra en la revisión de Sung et al. (2003). Experimentos de deshidratación inducida por congelación desestabilizan la membrana y tienen como resultado la formación de una membrana en fase hexagonal invertida, la cual no se produce si las plantas han sido previamente aclimatadas al frío.

Del mismo modo, la fluidez de las membranas también juega un papel importante en la tolerancia al calor (Sung et al., 2003). Estudios con el alga unicelular *Synechocystis* PCC 6803 han sugerido que es en la membrana del tilacoide, en lugar de en la membrana plasmática, donde se genera la respuesta primaria al estrés térmico (Horvath et al., 1998). De forma análoga, el mutante deficiente para la actividad de la desaturasa n-6 cloroplástica en *Arabidopsis* acumula altos niveles de lípidos C16:1 y C18:1 así como bajos niveles de ácidos grasos polinsaturados. Este hecho hace que las membranas fotosintéticas de este mutante tengan una mayor estabilidad frente a altas temperaturas, poniendo de relieve la importancia de la composición lipídica de las membranas en la tolerancia al estrés (Hugly et al., 1989).

También se ha demostrado el papel de los ácidos grasos  $\alpha$ -linolénico (18:3) y hexadecatrienoico (16:3) en la respuesta a altas temperaturas (Murakami et al., 2000). Trabajos previos habían demostrado en *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats y en *Nerium oleander* L. que se producía una reducción de estos ácidos grasos como respuesta al aumento de la temperatura (Pearcy, 1978; Raison et al., 1982). Partiendo de este conocimiento se silenció el gen que codifica para la  $\omega$ -3 desaturasa en tabaco. Dado que esta enzima participa en la síntesis de los ácidos grasos trienoicos, las plantas silenciadas mostraron niveles más bajos de estos compuestos que las plantas control, lo que mejoró la aclimatación a las altas temperaturas (Murakami et al., 2000). En la revisión realizada por Sung et al. (2003) se describen otros estudios donde también se pone de relevancia la importancia de la composición en ácidos grasos de las membranas celulares en relación con el estrés térmico.

## 15.4.2. Señalización

### 15.4.2.1. Bajas temperaturas

Una de las moléculas más importantes en la señalización del frío es el  $\text{Ca}^{2+}$ . El papel de este catión en la activación de las rutas de respuesta para incrementar la tolerancia al frío ha sido revisado recientemente (Sharma et al., 2005; Sung et al., 2003). Básicamente, parece que el incremento de la rigidez de la membrana provoca cambios estructurales que permiten la entrada de

Ca<sup>2+</sup> en el citosol, lo que a su vez origina la activación de las kinasas tipo MAPK (“*Mitogen activated protein kinases*”) y CDPK (“*Calcium dependent protein kinase*”), así como una cascada de respuestas posteriores que llevan en último término a la activación de los genes responsables de la tolerancia al frío.

En el caso de la congelación se produce un incremento de ABA (ácido abscísico) de forma transitoria en la célula, lo que activa rutas de respuesta que desencadenan la expresión de determinados genes. En concordancia, la aplicación exógena de ABA refuerza la tolerancia a la congelación, lo que indica un papel importante de esta hormona en la aclimatación al frío (Sharma et al., 2005).

#### 15.4.2.2. Altas temperaturas

El aumento de la fluidez de las membranas debido a la incidencia de altas temperaturas origina un flujo de Ca<sup>2+</sup> hacia el interior de la célula y la activación de las kinasas tipo MAPK y CDPK, al igual que ocurre en respuesta al frío. Esta ruta lleva en último término a la producción de antioxidantes y osmólitos compatibles que participan en el balance hídrico y en el ajuste osmótico de la célula (Sung et al., 2003).

Por otro lado, la producción de ROS se incrementa en respuesta a aquellos estreses que limitan la fijación de CO<sub>2</sub> como la sequía, el estrés térmico o la combinación de estas condiciones con alta intensidad lumínica (Mittler et al., 2004). Las ROS se producen fundamentalmente en orgánulos como las mitocondrias y los cloroplastos donde se desarrolla una actividad metabólica oxidativa elevada o existe un flujo de electrones intenso y como se ha comentado anteriormente tienen una gran importancia en la tolerancia al estrés (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004).

El estrés por altas temperaturas es complejo y causa distintos daños en las diferentes etapas del desarrollo de las plantas en un amplio rango de componentes celulares. De ahí que no sea extraño que se activen distintas rutas de respuesta como demuestran los trabajos realizados con mutantes de *Arabidopsis* (Larkindale et al., 2005). Los resultados de estos investigadores indican que existen rutas de respuesta específicas para la tolerancia basal (capacidad inherente de las plantas para soportar temperaturas superiores a las óptimas) o para la termotolerancia adquirida, así como rutas comunes a ambos tipos de tolerancia. De este modo, la respuesta mediada por etileno parece estar relacionada únicamente con la tolerancia basal, la ruta mediada por ABA estaría involucrada únicamente en la termotolerancia y otras rutas como las activadas por ROS actuarían en ambos casos (Larkindale et al., 2005). Los autores concluyen que la inducción de alguna de estas rutas permite a la planta adquirir un cierto grado de tolerancia al calor, por lo que la pérdida de alguna de ellas simplemente disminuye el grado de la tolerancia.

#### 15.4.3. Cambios en la expresión génica

Los primeros estudios que mostraron que durante la aclimatación al frío se producían cambios en la expresión génica fueron los realizados en espinaca por Guy et al. (1985). A la vista de los resultados de este trabajo se realizaron estudios similares en otras especies (Thomashow, 1999). Los realizados en *Arabidopsis* permitieron identificar genes que incrementaban su expresión en respuesta al frío y que recibieron distintos nombres: *COR* (“*cold-induced*”), *LTI* (“*low-temperature induced*”), *KIN* (“*cold-induced*”), *RD* (“*responsive to dehydration*”) y *ERD* (“*early responsive to dehydration*”) (Van Buskirk y Thomashow, 2006).

El estudio de la transcriptómica junto con el desarrollo de los microarrays ha permitido avanzar en la identificación de los genes inducibles por distintos estreses incluyendo frío, sequía, salinidad, etc. tanto en especies modelo como *Arabidopsis* (Seki et al., 2002a; Seki et al., 2001; Seki et al., 2002b), como en cultivos como el arroz (Rabbani et al., 2003) o la cebada (Ozturk et al., 2002). Estos genes pueden agruparse en 2 categorías atendiendo a las funciones de los productos que se derivan de ellos: proteínas funcionales (algunas de ellas llevando a la acumulación de osmolitos) y proteínas reguladoras (Agarwal et al., 2006; Svensson et al., 2006; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005).

### **15.4.3.1. Proteínas funcionales y osmolitos**

#### 15.4.3.1.1. Respuesta a las bajas temperaturas

El primer grupo estaría formado por proteínas funcionales. Dentro de este grupo se incluirían enzimas relacionadas con la síntesis y detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS), otras enzimas de detoxificación como la glutatión S-transferasa, proteínas de membrana que mantienen el flujo hídrico, otras proteínas relacionadas con la protección de macromoléculas como las proteínas LEA ("*Late Embriogenesis Abundant*") (Agarwal et al., 2006; Cattivelli et al., 2002; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005), proteínas de localización cloroplástica (Baldi et al., 1999; Crosatti et al., 1999), proteínas ribosómicas (Baldi et al., 2001) y enzimas relacionadas con la síntesis de osmolitos, que son compuestos que pueden acumularse incluso a grandes concentraciones sin interferir con los procesos fisiológicos. Uno de estos osmolitos es la prolina, en las que las enzimas pirrolina-5-carboxilasa-sintetasa (P5CS) y pirrolina-5-carboxilasa reductasa (P5CR) juegan un papel esencial (Ashraf y Foolad, 2007; Delauney y Verma, 1993).

El número de compuestos englobados en este grupo es muy elevado. Además, la distribución de compuestos como los osmolitos protectores depende de la especie, por lo que es imposible analizarlos en detalle. En cualquier caso sí cabe destacar algunos de ellos relacionados con la aclimatación al frío. Aparte de la prolina mencionada anteriormente, dentro del grupo de osmolitos protectores tenemos azúcares como la trehalosa, aminoácidos como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y aminos cuaternarias como la glicina. Estos compuestos juegan un papel central en la respuesta de la célula frente a diversos estreses (Yancey, 2004) ya que evitan la deshidratación de la misma y contribuyen al ajuste osmótico (Yancey, 2005).

#### 15.4.3.1.1. Respuesta a altas temperaturas

La respuesta al choque térmico se encuentra muy conservada y se caracteriza por una rápida inducción de las proteínas de choque térmico ("*Heat shock proteins*") (HSPs) cuya función primaria es la de actuar como carabinas moleculares (chaperonas) para asegurar el correcto funcionamiento de muchas proteínas en condiciones de altas temperaturas (Miller y Mittler, 2006). De hecho, se considera que la expresión de las HSPs bajo la regulación de los factores de transcripción relacionados con el estrés por calor ("*Heat stress transcription factors*") (HSFs) juega un papel central en la adquisición de la termotolerancia en plantas (Kotak et al., 2007). Del mismo modo, estas proteínas no sólo incrementan su expresión en respuesta a un choque térmico, sino que también lo hacen frente a una subida gradual de la temperatura (Wahid et al., 2007).

Existen 5 familias de HSPs (Hsp70/DnaK; Hsp90/HtpG; Hsp60/GroEL; HSP/sHSP; Hsp100/ClpB) (Kotak et al., 2007; Wang et al., 2004). Las familias génicas de HSPs son complejas. Muchos miembros de estas familias son esenciales para el correcto crecimiento y desarrollo de las plantas, por

lo que resulta difícil investigar su papel durante el estrés (Kotak et al., 2007). Estas proteínas son responsables del plegado, ensamblado, translocación y degradación de proteínas en muchos procesos normales de la célula y además, participan en la estabilización de proteínas y membranas (Wang et al., 2004). Los estudios más avanzados sobre las funciones de estas proteínas durante el estrés térmico se han llevado a cabo en las familias Hsp100/ClpB y sHSPs y han sido recientemente revisados (Kotak et al., 2007). Del mismo modo, el conocimiento actual sobre las funciones de las distintas familias de HSPs ha sido revisado extensamente en los últimos años (Baniwal et al., 2004; Kotak et al., 2007; Nakamoto y Vigh, 2007; Wang et al., 2004).

Aunque las HSPs sean probablemente las proteínas de estrés más importantes en la respuesta al calor, otras proteínas como la ubiquitina, las proteínas LEA y las dehidrinas también juegan un papel importante (Kotak et al., 2007).

En segundo lugar, la protección frente al estrés oxidativo originado por el incremento de las ROS es uno de los principales objetivos de la respuesta al calor. El estrés oxidativo puede originar diversos efectos como son daño en las membranas a través de la peroxidación de los lípidos, oxidación e inhibición de proteínas y daños en ADN y ARN (Mittler, 2002). Además, la existencia de niveles altos de ROS puede desencadenar también una ruta de muerte celular programada (Mittler, 2002). De ahí que la protección frente al estrés oxidativo sea un componente importante para la tolerancia al calor (Wahid et al., 2007). Estudios realizados en *Lolium perenne* L. y *Festuca arundinacea* Schreb. muestran que las plantas aclimatadas al calor producían menos ROS como resultado de una mayor actividad de sus sistemas antioxidantes, concretamente debido a un aumento en la síntesis de ascorbato y glutatión (Xu et al., 2006).

### **15.4.3.2. Proteínas reguladoras**

#### a. Respuesta al frío

El segundo grupo considerado está formado por proteínas reguladoras relacionadas con la expresión génica y la transducción de señales (Agarwal et al., 2006; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005) e incluiría factores de transcripción (CBF-DREB, MYC, bZIP, MYB etc.), proteínas kinasas y enzimas relacionadas con el metabolismo de los fosfolípidos.

Los estudios más completos de las rutas de respuesta a los estreses abióticos se han desarrollado en *Arabidopsis*, dado la cantidad de recursos disponibles en esta especie modelo. Los resultados obtenidos están siendo muy útiles para la identificación de las rutas de respuesta a los distintos estreses y para encontrar genes ortólogos en otras especies. De ahí que estos conocimientos sean de utilidad para el progreso en cultivos de interés mundial, al incrementar el grado de conocimiento en las rutas de señalización y respuesta a los distintos estreses abióticos, lo que ofrece nuevas posibilidades de mejora.

El estudio de los promotores de los genes inducibles por frío ha permitido descubrir que contienen unos elementos reguladores ("*cis-acting elements*") que permiten su regulación transcripcional en respuesta a estas condiciones ambientales (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Las proteínas codificadas por los factores de transcripción poseen unos dominios específicos que reconocen estos elementos reguladores y que por tanto permiten la regulación transcripcional de estos genes.

Uno de los avances más importantes para el entendimiento de la regulación de la expresión génica durante la aclimatación al frío fue la identificación de los factores CBF1-3 ("*C-repeat-binding factors*") (Gilmour et al., 1998; Stockinger et al., 1997) también conocidos como DREB1B, -1C y -1A



respectivamente (“*dehydration-responsive element-binding factors*”) (Liu et al., 1998). Ortólogos de estos genes se han encontrado en especies como el arroz (Dubouzet et al., 2003) y han sido bien estudiados en cebada (Francia et al., 2004; Skinner et al., 2005), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Badawi et al., 2007; Vagujfalvi et al., 2005) y *Triticum monococcum* L. (Miller et al., 2006; Vagujfalvi et al., 2005).

Los CBFs/DREB1s son factores de transcripción que pertenecen a la familia AP2/EREBP (APETALA2/“*ethylene-responsive element-binding factor*”) (Gilmour et al., 1998; Liu et al., 1998) y se unen a los elementos reguladores de respuesta a frío y deshidratación conocidos como CRT/DRE (“*C-repeat/dehydration response element*”). Estos elementos (CCGAC) funcionan en las rutas de respuesta independientes de ácido abscísico (Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005) y están involucrados no sólo en la respuesta frente al frío sino también frente al estrés osmótico (Baker et al., 1994; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994).

Las proteínas originadas a partir de los factores de transcripción *CBF/DREB1* se unen a los elementos CRT/DRE en los promotores de algunos genes inducibles por frío y los activan. Los factores de transcripción *CBF/DREB* son inducidos a su vez por frío de forma transitoria, a pesar de no llevar la secuencia CCGAC en sus promotores. Chinnusamy et al., (2003) identificaron un factor de transcripción que induce la expresión de los genes *CBF/DREB1* que ha sido llamado *ICE1* (“*Inducer of CBF expression 1*”). El *ICE1* ha sido identificado gracias al mutante *ice1* de *Arabidopsis*. La mutación de este gen bloquea la expresión del *CBF3*, lo que produce una disminución de la expresión de muchos genes regulados a su vez por los *CBF*, y conlleva una reducción en la tolerancia a frío y congelación. Estudios posteriores han profundizado en el control de *ICE1* sobre la parte del transcriptoma inducido por frío (Lee et al., 2005).

Hasta el momento el *ICE1* es el único factor de transcripción identificado que actúa directamente sobre el promotor de un *CBF* (Van Buskirk y Thomashow, 2006). Aunque el *ICE1* no parece estar relacionado con la inducción por frío de *CBF1* y *CBF2*, este factor de transcripción es de tipo-MYC bHLH (“*MYC basis helix-loop-helix*”), y dado que se han descrito más de 160 factores de transcripción de este tipo en *Arabidopsis*, no se puede descartar que existan otros factores de transcripción análogos relacionados con *CBF1* y *CBF2* (Van Buskirk y Thomashow, 2006).

Por otro lado, que el *ICE1* sólo regule a *CBF3* y no a *CBF1* o *CBF2* sugiere que los 3 *CBFs* pueden tener papeles no equivalentes. Recientemente se ha estudiado en detalle el papel de cada uno de los *CBFs* (Novillo et al., 2004; Novillo et al., 2007). En un primer momento estos autores demostraron que la expresión de *CBF1* y *CBF3* es anterior a la de *CBF2* durante la aclimatación al frío (Novillo et al., 2004). El estudio del mutante *cbf2* les permitió concluir que *CBF2* regula negativamente la expresión de *CBF1* y *CBF3*. Esto posibilita que la expresión de estos genes sea transitoria y esté controlada de forma estricta, lo que garantiza a su vez la correcta inducción de los genes de respuesta a frío y el preciso desarrollo de la tolerancia al estrés.

Recientemente, los mismos autores han demostrado que *CBF1* y *CBF3* están regulados de forma distinta a *CBF2* (Novillo et al., 2007). En este trabajo se concluye que ni *CBF1* ni *CBF3* están implicados en la regulación de otros *CBF* y que ambos regulan positivamente la aclimatación al frío mediante la activación del mismo conjunto de genes. Además, los resultados de este trabajo permiten concluir que *CBF1* y *CBF3* tienen un efecto aditivo concertado para inducir el conjunto de genes activados por *CBF* y para el desarrollo completo de la aclimatación al frío.

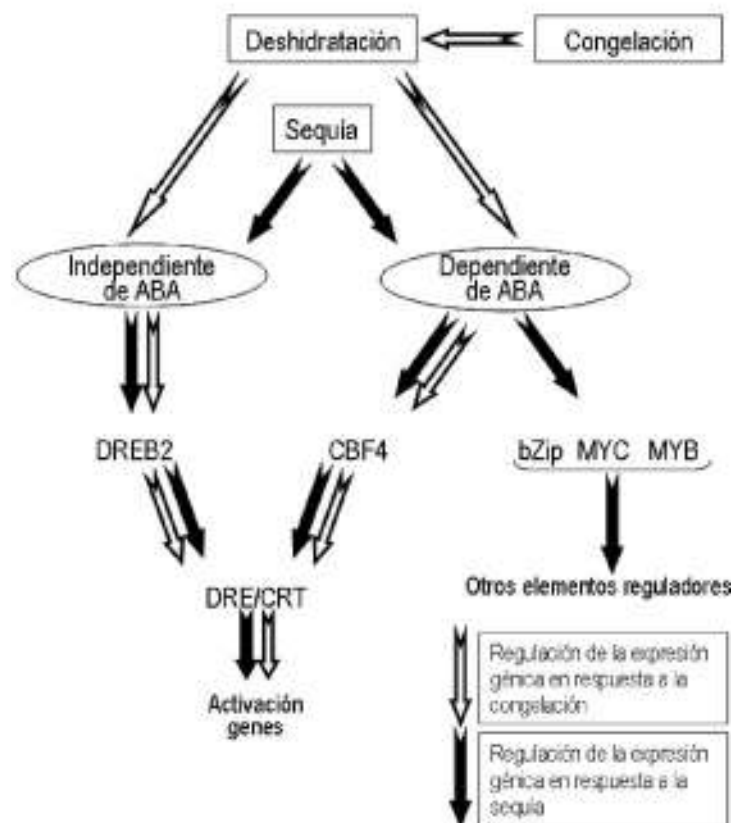
A pesar de que la ruta de respuesta al frío regulada por los factores de transcripción *CBF/DREB* parece tener un papel predominante en la aclimatación al frío en *Arabidopsis*, existen evidencias

de la existencia de rutas alternativas de respuesta a frío independientes de *CBF* revisadas recientemente (Van Buskirk y Thomashow, 2006) y que no serán tratadas en este capítulo. Entre estas rutas está la regulada por el factor de transcripción *ZAT12* (Vogel et al., 2005) y la implicación de otros genes como *HOS9* (Zhu et al., 2004), *HOS10* (Zhu et al., 2005) y *ESKIMO1* (Xin et al., 2007).

Así mismo, el papel regulatorio de la ubiquitinación proteica (Zhu et al., 2007) o el papel de moléculas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos como las helicasas también intervienen en la adaptación al frío y otros estreses abióticos (Kant et al., 2007; Vashisht y Tuteja, 2006; Zhu et al., 2007).

### b. Respuesta a la deshidratación inducida por congelación

Como se ha comentado anteriormente el principal efecto de la congelación es la inducción de deshidratación en las células. La capacidad de la planta para soportar estas condiciones está relacionada con su capacidad de respuesta a la sequía y, de hecho, la respuesta de las plantas a congelación y a sequía es muy similar (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000) existiendo zonas de solape entre ambas respuestas como se pone de manifiesto en la Figura 15.1. No obstante, en el caso de la sequía existen otras rutas dependientes de ABA, en las que se activan factores de transcripción de los tipos bZIP, MYC y MYB y que no se activan en respuesta a la congelación (Figura 15.1).



**Figura 15.1.** Solapamiento entre las rutas de respuesta a sequía y a deshidratación inducida por congelación.



En la actualidad se consideran dos rutas de respuesta a la deshidratación inducida por congelación (Sharma et al., 2005; Sung et al., 2003). La primera de ellas es independiente de ABA y depende de los factores de transcripción DREB2. Como los DREB1, los DREB2 tienen un dominio ERF/AP2 que reconoce la secuencia DRE (Liu et al., 1998). Tanto *DREB2A* como *DREB2B* se inducen en respuesta a deshidratación y salinidad de forma independiente al ABA, pero no responden al frío. Aunque tanto DREB1 como DREB2 reconocen el elemento DRE, tienen distinta especificidad por su secuencia diana. De este modo, el DREB1 se une preferentemente al elemento A/GCCGACNT (Maruyama et al., 2004) mientras que el DREB2A lo hace al elemento ACCGAC (Sakuma et al., 2006a), lo que hace que controlen conjuntos de genes distintos. A pesar de todo, aunque los genes regulados por DREB2A juegan un papel importante en la tolerancia a la deshidratación, no son suficientes por sí solos para soportar las condiciones de congelación (Sakuma et al., 2006b).

La segunda ruta de respuesta a la deshidratación inducida por congelación está relacionada con el *CBF4*. Este gen codifica para una proteína que es el homólogo más cercano a las proteínas CBF1/DREB en *Arabidopsis* (Haake et al., 2002). Este gen se induce rápidamente tanto por sequía como en respuesta a ABA pero no responde a frío. La sobre-expresión del *CBF4* provoca la expresión de genes inducibles por frío y por sequía e incrementa la tolerancia de las plantas frente a ambos estreses (Haake et al., 2002).

#### c. Respuesta a las altas temperaturas

Los factores de transcripción relacionados con el calor ("*heat stress transcription factors*", Hsfs) constituyen el final de la ruta de transducción de la señal de este estrés (Baniwal et al., 2004). Estos genes dan lugar a unas proteínas reguladoras que pueden encontrarse en formas inactivas principalmente en el citoplasma. Estas proteínas se activan como consecuencia del estrés y provocan la modificación de la expresión de genes relacionados con la tolerancia (Baniwal et al., 2004). Se ha determinado que la respuesta al estrés térmico se encuentra controlada por los Hsfs que actúan uniéndose a los elementos reguladores de choque térmico ("*heat shock element*", HSE) de los promotores de los genes inducibles por este estrés y que constan de un motivo palindrómico nGAAn muy conservado (Miller y Mittler, 2006).

La complejidad de este tipo de proteínas en plantas es muy alta como se deduce del número de genes que las codifican. En levadura existe un único gen de este tipo y en vertebrados 4 (Baniwal et al., 2004; Miller y Mittler, 2006). Sin embargo, en plantas el número es mucho más alto. Se han descrito 21 Hsfs en *Arabidopsis* (Nover et al., 2001) y entramados que varían entre unos 18 Hsfs en tomate a 34 en soja (Miller y Mittler, 2006).

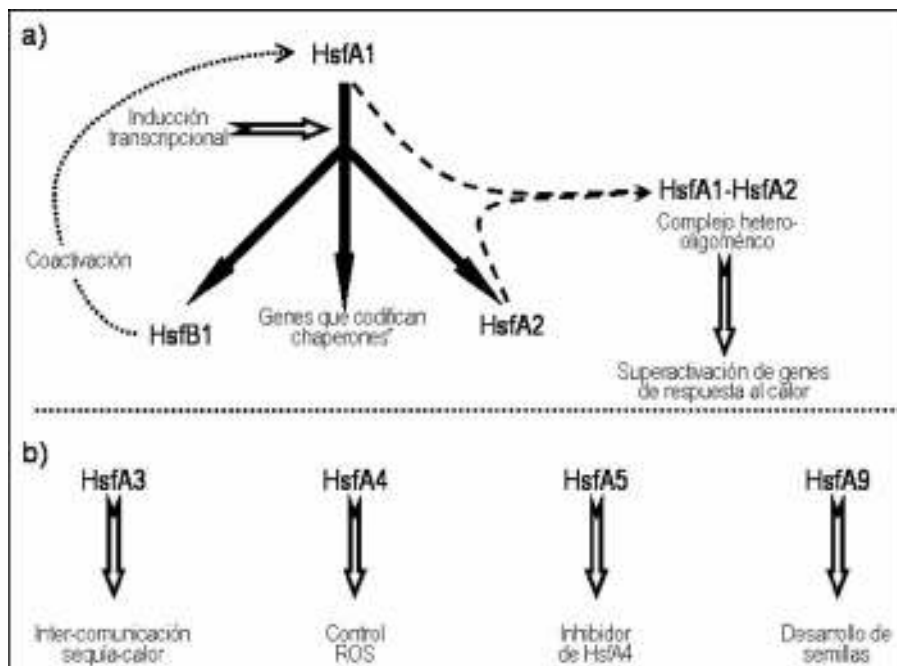
En plantas existen 3 clases de Hsfs, llamadas A, B y C, que se distinguen en base a sus dominios de oligomerización (Baniwal et al., 2004; Kotak et al., 2007; Nover et al., 2001). La complejidad de estas familias y el conocimiento obtenido hasta el momento parece indicar que existe una gran diversificación entre ellos.

Un ejemplo de esta diversificación se encuentra en la revisión realizada por von Koskull-Doring et al. (2007) donde se detalla el conocimiento actual de los Hsfs en tomate y *Arabidopsis*. Así, en tomate existe una tríada de Hsfs que coopera para desencadenar la respuesta al choque térmico. En primer lugar, el HsfA1a actúa como un regulador maestro responsable de la expresión de genes inducidos por calor, como demuestra el hecho de que plantas con este gen silenciado a nivel post-transcripcional sean extremadamente sensibles al calor debido a la práctica eliminación de la síntesis inducida por calor de moléculas carabina ("*chaperones*"), así como de HsfA2 y HsfB1 (Mishra et al., 2002); en segundo lugar, se forman complejos hetero-oligoméricos entre HsfA1a y

HsfA2 que funcionan como super-activadores de la expresión génica en respuesta al calor (Port et al., 2004). Por último, el HsfB1 funciona como coactivador cooperando con los Hsf de la clase A, así como con otros factores de transcripción para mantener o restaurar la expresión de los genes conocidos como “housekeeping” (Bharti et al., 2004) (Figura 15.1).

Del mismo modo, el estudio de 7 de los 21 Hsfs descritos en *Arabidopsis* ha permitido avanzar en el conocimiento de esta diversificación. Al contrario de lo que ocurre en tomate, donde el HsfA1 actúa como un regulador maestro para la adquisición de la termotolerancia inducida, en *Arabidopsis* no existe ningún Hsf que actúe de esta forma (von Koskull-Doring et al., 2007).

Existen otros Hsfs con funciones específicas en tomate (von Koskull-Doring et al., 2007). Por ejemplo, el HsfA4 actúa como un potente activador de genes inducibles por el calor y participa en el control del metabolismo de las ROS, mientras que el HsfA5 parece inhibir la actividad de Hsf4. Por otro lado, el HsfA3 parece jugar un papel en la intercomunicación entre la sequía y el calor, ya que recientemente se ha demostrado que la inducción del HsfA3 en respuesta a estos dos estreses depende del DREB2A. De hecho, la sobre-expresión del DREB2A produjo la inducción de genes inducibles por calor y una mayor tolerancia térmica, mientras que la represión de este gen la redujo (Sakuma et al., 2006b). Por último, se ha visto que el HsfA9 juega un papel especial en la respuesta al calor durante el desarrollo de la semilla (Figura 15.2).



**Figura 15.2.** Complejidad de la respuesta al calor mediada por Hsfs en tomate [Elaboración propia a partir de (von Koskull-Doring et al., 2007)]

a) La respuesta al calor en tomate está regulada por una tríada de Hsfs. En primer lugar, el HsfA1 actúa como un interruptor principal que activa a genes que codifican para carabinas moleculares, así como a HsfA2 y HsfB1. HsfA1 y HsfA2 forman complejos hetero-oligoméricos que actúan como superactivadores de la expresión génica en respuesta al calor. Por otro lado, el HsfB1 actúa como co-activador de HsfA1 y además coopera con otros factores de transcripción para mantener o restaurar la expresión de genes “housekeeping”.

b) Papel de otros Hsfs en respuesta al calor.

Todos estos trabajos muestran la gran complejidad del papel de los Hsf en plantas. La diversificación de los distintos miembros de esta familia lleva a la formación de un complejo entramado que parece esencial en el desarrollo y supervivencia de las plantas frente a estrés en los distintos estadios de su desarrollo.

### 15.5. EL ESTRÉS MÚLTIPLE

A pesar de los estudios a nivel fisiológico que indican que los estreses múltiples desencadenan una respuesta diferencial en las plantas, y de las pérdidas económicas que causa la combinación de estreses, son pocos los trabajos que han abordado el estudio de la respuesta de las plantas a nivel molecular frente a estos estreses.

Estudios en tabaco han demostrado que la respuesta frente al estrés combinado de sequía y altas temperaturas desencadenaba una respuesta a nivel molecular que era muy diferente de la respuesta frente a los estreses simples (Rizhsky et al., 2002).

Este trabajo se realizó con un número de transcritos bajo, de ahí que posteriormente se abordara el estudio de la respuesta frente a este estrés complejo en la especie modelo *A. thaliana*. Para ello utilizaron el chip ATH1 de *Arabidopsis* comercializado por la empresa Affymetrix ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). Sus resultados confirmaron los obtenidos previamente en tabaco. De los 1833 transcritos que modificaron su expresión en el estrés múltiple, 772 no habían variado su comportamiento frente a los estreses simples (Mittler, 2006; Rizhsky et al., 2004). Además, un número similar de genes que modificaron su expresión en respuesta a estos estreses permanecieron inalterados frente al estrés combinado. Por ejemplo, los niveles de prolina se incrementaron en respuesta a la sequía pero no tras el estrés combinado (Rizhsky et al., 2004), lo que concuerda con el nivel de expresión de la  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxylasa-sintetasa en cebada frente a estos mismos estreses (Atienza et al., 2004)

Estos resultados llevaron a concluir que el estrés combinado es percibido como un nuevo estrés, distinto de los anteriores, ya que las plantas desencadenan una respuesta que activa o reprime una gran cantidad de genes que no son activados por los estreses simples. Sin embargo, la validación de este tipo de resultados en especies cultivadas constituye un paso fundamental para la aplicación de los resultados en la agricultura.

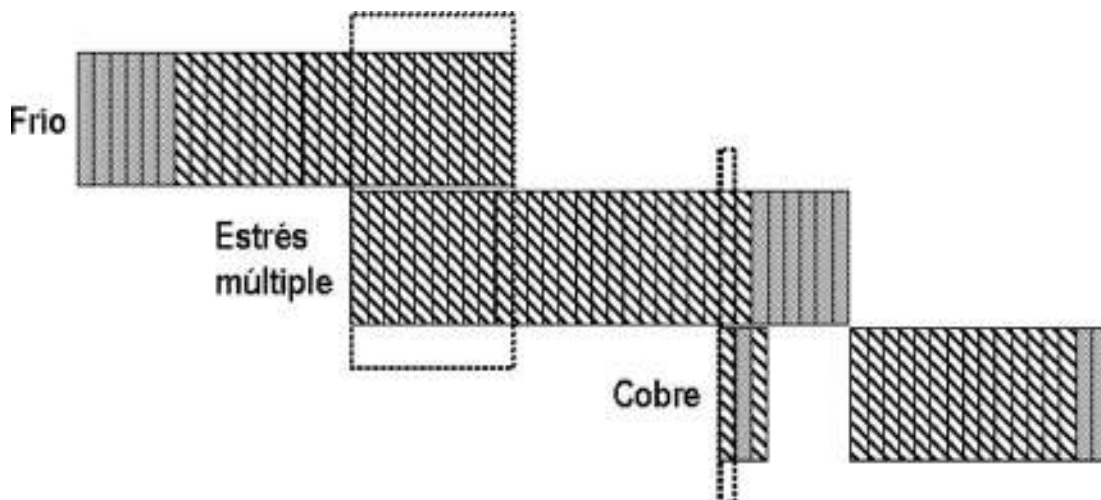
En cebada se han desarrollado una serie de experimentos para estudiar la respuesta de este cultivo frente a distintos estreses abióticos, incluyendo dos estreses múltiples: sequía junto a calor y frío junto a cobre (Atienza et al., 2004). Para la realización de este estudio se desarrolló un microarray de ADNc a partir de secuencias que habían sido relacionadas con la respuesta a estreses abióticos en distintas especies de la tribu Triticeae.

En total se seleccionaron más de 300 secuencias entre las que había secuencias de las rutas de metabólicas relacionadas con los azúcares, los lípidos y los aminoácidos; otras pertenecientes a familias génicas involucradas en la respuesta al ambiente como proteínas LHC ("*Light Harvesting Complex*"), ELIP ("*Early Light-Inducible Protein*") y factores de transcripción tipo CBF o AP2; también proteínas con dominios de ligamiento de metales pesados (Atienza et al., 2004). Los resultados obtenidos con el microarray fueron validados en un subconjunto de genes mediante la realización de Northern.

En el estrés de sequía + calor, la alta temperatura aceleró el proceso de deshidratación. Con excepción de un gen que codifica para una proteína tipo metalotioneína, ninguno de los genes activados por sequía se activaron en el estrés compuesto y viceversa (Atienza et al., 2004).

Durante el estrés múltiple de frío más metales pesados (cobre), la respuesta molecular de las plantas era mucho más parecida a la desencadenada para tolerar el frío que a la inducida a consecuencia del cobre, ya que 10 genes mostraron el mismo comportamiento frente al estrés múltiple y en respuesta a frío mientras que sólo 1 modificó su perfil de expresión de igual manera en respuesta al estrés combinado y a cobre (Figura 15.3).

La conclusión a la vista de los resultados fue la misma obtenida en los trabajos en tabaco y en *Arabidopsis* citados con anterioridad: la respuesta al estrés múltiple (frío + cobre) es muy distinta de la suma de las respuestas frente a los 2 estreses simples. De esta forma, de los 31 genes que modificaron su expresión en respuesta al estrés múltiple, 18 constituían una respuesta diferencial ya que no cambiaron su expresión en ninguna de las dos condiciones de estrés simple (Figura 15.3). Además, el perfil de expresión de 2 genes que modificaron su expresión tanto en el estrés múltiple como en cobre lo hicieron en sentido contrario en cada situación (Figura 15.3).



**Figura 15.3.** Solapamiento entre la respuesta al estrés múltiple (Frío + cobre) y las respuestas frente a los respectivos estreses simples.

El grado de solape entre cada par de estreses indica la similitud entre ellos, mientras que las zonas que no solapan (o en las que la expresión génica es distinta), muestran la respuesta diferencial.

La mayor similitud entre las respuestas al estrés múltiple y al frío podría indicar una reducción de la entrada de cobre debido a la baja temperatura. Sin embargo, la detección de diversos genes que se activan específicamente en respuesta al estrés combinado y el cambio en el comportamiento de otros genes sugiere que la planta percibe el estrés múltiple como un nuevo estrés, y por tanto desencadena una respuesta específica (Atienza et al., 2004).

A la vista de estos resultados, el estudio de los estreses múltiples adquiere gran importancia de cara a mejorar la tolerancia de los cultivos frente al ambiente. La mejor opción sería considerar las combinaciones de estreses como estreses nuevos, diferentes de los estreses simples, para su estudio a nivel molecular. Para ello será crucial la caracterización de los estreses en condiciones de campo y el conocimiento del estadio fenológico en que se producen, para intentar reproducir cada situación en el laboratorio, si bien la realización de estos experimentos no siempre es trivial.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es el conocimiento de las interacciones que se producen entre los distintos estreses, ya que éstas pueden ser negativas o positivas, es decir, la aparición de un determinado tipo de estrés puede hacer que se incremente o disminuya la tolerancia frente a otro estrés. Mittler (2006) propuso una “matriz de estrés”, basada en los resultados de diversos autores, en la que se observa que la mayor parte de las interacciones son negativas, es decir, la incidencia de un tipo de estrés tiende a disminuir la tolerancia frente a otro distinto. Sin embargo, hay ciertas interacciones que parecen incrementar la tolerancia por desencadenar rutas similares de respuesta.

## 15.6. PERSPECTIVAS DE MEJORA

El incremento del conocimiento de las rutas de respuesta a los estreses abióticos, a través de la identificación de los genes reguladores que desencadenan las respuestas y de los genes sobre los que actúan, ha abierto nuevas vías para el incremento de la tolerancia a dichos estreses, a través del desarrollo de plantas transgénicas y de estrategias de MAS (“Marker Assisted Selection”). Además, cuanto mejor conozcamos los mecanismos de tolerancia mayores serán las posibilidades de manejarlos de forma óptima.

Las primeras plantas transgénicas en las que se pretendía incrementar la tolerancia a los estreses abióticos fueron desarrolladas para sobre-exresar genes clave de la ruta de respuesta. De esta forma, se han desarrollado plantas transgénicas en las que se modifica la expresión de genes reguladores relacionados con la producción de osmolitos, con el transporte iónico, mecanismos de detoxificación y relacionados con la producción de proteínas LEA y HSPs (Wang et al., 2003; Zhang et al., 2004).

Por destacar algunos casos particulares, se ha demostrado que la sobre expresión de los genes *CBF-DREB1* permite incrementar la tolerancia a congelación en plantas (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998). Del mismo modo, la acumulación de osmolitos como respuesta durante la aclimatación al frío y en respuesta a sequía o salinidad, ha promovido el desarrollo de plantas transgénicas para incrementar la tolerancia osmótica mediante el aumento de los niveles de prolina (Ashraf y Foolad, 2007). Para ello se ha empleado la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas como la  $\Delta$ -pirrolina-5-carboxilasa-sintetasa (Kavi Kishor et al., 1995). También se han manipulado los genes de la ruta de síntesis de la trehalosa, considerada como uno de los osmoprotectores más efectivos, lo que ha permitido de nuevo el desarrollo de plantas transgénicas con una mayor tolerancia al estrés (Almeida et al., 2007). La transgenia también ha sido utilizada para abordar la presencia de metales pesados en el suelo (Dahleen y Manoharan, 2007).

Todos estos trabajos han puesto de manifiesto que la manipulación de genes clave en la respuesta molecular al estrés permite el incremento de la tolerancia al mismo, de ahí que la producción de plantas transgénicas sea una vía muy a tener en cuenta en la mejora genética vegetal. Sin embargo, el proceso no es fácil, ya que la sobre expresión de los genes implicados, sobre todo cuando es constitutiva, puede tener efectos adversos en el crecimiento o en otros caracteres importantes (Wang et al., 2003). De ahí que se haya propuesto la modificación de las rutas de respuesta al estrés mediante la utilización de promotores inducibles por estrés o específicos de un tejido concreto (Kasuga et al., 1999; Wang et al., 2003; Zhang et al., 2004). Por tanto, los genes introducidos en las variedades sólo se activarían en un momento específico del desarrollo o cuando se manifestasen las condiciones adversas, por lo que evitarían, al menos en parte, los efectos adversos derivados de la expresión constitutiva de estos genes.

A pesar de las grandes posibilidades que ofrece la manipulación génica existen limitaciones graves para explotar este potencial de una manera más extensa. Una de las principales es que la mayoría de los estudios se han realizado en invernadero, bien debido a la baja cantidad de semilla disponible, o bien por las dificultades administrativas para desarrollar ensayos en condiciones de campo. Por tanto, se desconoce el valor real de muchos de los transgénicos desarrollados durante los últimos años. Es más, en la mayor parte de los transgénicos desarrollados en cultivos como el arroz no se ha estudiado el efecto sobre el rendimiento (Vij y Tyagi, 2007).

La situación se complica aún más si tenemos en cuenta que el ambiente en el que se desarrollan las plantas es complejo ya que a lo largo de su ciclo tienen que soportar tanto estreses bióticos como abióticos, tanto de forma sucesiva como simultánea a lo largo del tiempo. A pesar de ello, la mayor parte de los estudios realizados se centran en la respuesta de las plantas a un único estrés, y generalmente en un momento determinado del desarrollo, mientras que la respuesta al estrés se encuentra regulada en función del desarrollo (Vij y Tyagi, 2007). Por tanto, la respuesta a los estreses puede ser diferente en función del momento del desarrollo en que se produzca, lo cual es aún más evidente si lo que se produce es un estrés múltiple, como ya se ha detallado en este capítulo.

De ahí que sea necesario el desarrollo de metodologías más efectivas que permitan comprender las estrategias defensivas de las plantas en situaciones que simulen lo mejor posible los estreses que se producen en campo, ya que este conocimiento ofrecería mayores posibilidades de mejora en el futuro.

En este contexto, los estudios que muestran la inter-comunicación ("cross-talk") entre rutas de respuesta a distintos estreses, ofrecen la posibilidad de descubrir factores de resistencia intrínsecos que son vitales en las plantas para tratar con un rango amplio de estreses, incluyendo tanto los bióticos como los abióticos (Iba, 2002).

La importancia del estudio de la inter-comunicación ha sido bien plasmada en la revisión realizada por Knight y Knight (2001). Estos autores definen la inter-comunicación como cualquier punto de dos rutas de señalización desencadenadas por distintos estreses que convergen. Existen distintos tipos de inter-comunicación.



En primer lugar, la inter-comunicación puede producirse entre dos rutas de señalización que pueden interferir tanto de forma negativa como positiva. También pueden existir rutas de señalización que utilicen la misma molécula, como en el caso del calcio. La mayoría de los estreses abióticos producen un incremento del catión  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, por tanto, la respuesta frente a un estrés podría agotar el  $\text{Ca}^{2+}$  con lo que no estaría disponible para desencadenar la respuesta de tolerancia frente a un estrés inmediatamente posterior (Knight y Knight, 2001).

Por último, distintos estreses pueden desencadenar respuestas similares. Por ejemplo, tanto la sequía como la congelación provocan deshidratación y por tanto, ambos estreses requieren una respuesta parecida. De hecho, se ha descrito anteriormente que las respuestas frente a sequía, salinidad y frío tienen algunos elementos en común (Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Seki et al., 2003).

Otro ejemplo de similitud en la respuesta a distintos estreses es la producción de antioxidantes o de enzimas detoxificadoras común en todos los estreses que producen un incremento de ROS, incluyendo tanto estreses bióticos como abióticos (Fujita et al., 2006; Mittler et al., 2004; Suzuki y Mittler, 2006).

Del mismo modo, aunque la respuesta a la sequía y al calor es muy distinta, resultados recientes indican que el DREB2A funciona tanto en sequía como en respuesta al choque térmico (Sakuma et al., 2006b). Este factor de transcripción se une al elemento DRE y activa la expresión de genes involucrados a la respuesta a la sequía y a la salinidad en *Arabidopsis*. En la región central del DREB2A existe un elemento regulador negativo cuya eliminación convierte al DREB2A en una forma activa constitutiva (DREB2A CA). La sobre-expresión del gen *DREB2A CA* indujo la expresión de genes inducibles por sequía y salinidad, pero también de genes inducibles por calor. La termotolerancia de las plantas en las que sobre-expresó el gen *DREB2A* se incrementó de forma notable mientras que disminuyó en las plantas "knockout". Por tanto, los autores concluyeron que el factor de transcripción DREB2A juega un papel importante en la inter-comunicación de las respuestas a sequía y calor.

La identificación de genes reguladores que participan en la activación de rutas de respuesta frente a distintos estreses constituye una herramienta muy interesante de cara a la mejora. Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión constitutiva del gen *MBF1c* ("multiprotein bridging factor 1c") en *Arabidopsis* incrementa la tolerancia al calor, al estrés osmótico y a la combinación de ambos estreses y además aumenta la resistencia frente a infecciones bacterianas (Suzuki et al., 2005). Además, el desarrollo de plantas transgénicas de *Arabidopsis* para el *Osmyb4* incrementa la tolerancia a la sequía, la salinidad, la radiación ultravioleta y el ozono, así como la resistencia frente a virus, bacterias y hongos (Vannini et al., 2006). El gen *Osmyb4* codifica para un factor de transcripción tipo MYB en arroz y parece jugar un papel destacado en la inter-comunicación de las cascadas de señalización frente a diversos estreses (Vannini et al., 2006).

En definitiva, dado que las rutas de señalización forman entramados y las plantas se encuentran en un ambiente complejo y soportan la acción de estreses múltiples, la inter-comunicación entre las distintas rutas es crucial para desencadenar las respuestas de tolerancia (Knight y Knight, 2001). De este modo, aunque el estudio de las rutas de señalización en los estreses aislados resulta de gran interés, los resultados pueden ser engañosos de cara a su aplicación en campo.

## 15.7. REFLEXIONES FINALES

El estudio de los estreses múltiples tendrá necesariamente que incrementarse en los próximos años, si queremos aumentar las posibilidades de mejora de los cultivos ante el ambiente. El objetivo debería ser reproducir las condiciones ambientales que se dan en el campo en los experimentos realizados en el laboratorio. Así mismo, el estudio de estos estreses en los estadios de desarrollo del cultivo en el que realmente se producen también es crucial, ya que no es lo mismo someter a una planta a un estrés múltiple de sequía y altas temperaturas en estado de plántula que en antesis, cuando la fase reproductiva está en funcionamiento y probablemente se desencadenen mecanismos de respuesta específicos para proteger los órganos reproductivos.

Por otra parte, aunque el conocimiento generado en las plantas modelo resulta muy valioso, la validación de estos resultados en las especies cultivadas es uno de los grandes desafíos de la investigación agrícola en el siglo XXI en relación con la mejora de los estreses abióticos. El segundo gran desafío será la evaluación agronómica de los materiales generados en base a la modificación de las rutas de respuesta mediante el uso de promotores inducibles por estrés.

En algunos casos, la variación natural en algunos de genes de la respuesta molecular al estrés explica las diferencias en niveles de resistencia entre distintos genotipos. En estos casos, estos genes son excelentes candidatos para identificar la base molecular de los QTLs de respuesta al estrés detectados en trabajos de mapeo genético. Por ejemplo, en cebada se han mapeado 13 genes que codifican para factores de transcripción y otros genes reguladores para ver si co-localizaban con QTLs de resistencia a frío y a sequía (Tondelli et al., 2006). Este trabajo ha permitido constatar que un cluster de 6 genes CBF (*HvCBF*) co-localiza con el locus de resistencia a frío *Fr-H2*. Además, 4 de los 12 QTLs descritos para resistencia a sequía co-localizan con genes reguladores en los cromosomas 2H, 5H y 7H, mientras que 3 dehidrinas co-localizan con QTLs menores en los cromosomas 5H y 6H (Tondelli et al., 2006).

La mejora de la tolerancia a los estreses abióticos pasará necesariamente en los próximos años por el avance en la identificación de las rutas de respuesta a los estreses múltiples. Esto permitirá seleccionar nuevos genes candidatos que respondan de forma específica frente a estos estreses. Del mismo modo, habrá que seguir considerando los estudios genéticos de localización de QTLs, ya que muchos de los genes candidatos que se identifiquen pueden estar relacionados con la variación explicada por estos QTLs.

Por otro lado, el desarrollo de plantas modificadas genéticamente, a través de la alteración de las rutas de respuesta a los distintos estreses mediante la utilización por ejemplo de promotores inducibles, puede suponer una herramienta clave en el desarrollo de plantas más resistentes a las condiciones ambientales adversas.

La culminación de todos estos esfuerzos requerirá necesariamente la experimentación en campo de los materiales generados, ya que en el siglo XXI los cultivos seguirán sembrándose en el campo y no en los laboratorios. Sin embargo, estos estudios se enfrentarán a dos problemas de importancia. En primer lugar, el rechazo a los organismos transgénicos en la Unión Europea, normalmente por causas poco relacionadas con la ciencia, hace que este tipo de estudios sean prácticamente imposibles debido a la gran cantidad de labor administrativa que conlleva la realización de los ensayos y al riesgo inherente de destrucción de los campos de ensayo por desaprensivos. Esto hace que en la UE se esté renunciando a una tecnología que no es la panacea, pero que tampoco es desdeñable.



## REFERENCIAS

- Agarwal, P.K., Agarwal, P., Reddy, M.K. and Sopory, S.K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* 25:1263-1274
- Almeida, A.M., Cardoso, L.A., Santos, D.M., Torne, J.M. and Fevereiro, P.S. (2007). Trehalose and its applications in plant biotechnology. *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant.* 43:167-177
- Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Botany.* 59:206-216
- Atienza, S.G., Faccioli, P., Perrotta, G., Dalfino, G., Zschiesche, W., Humbeck, K., Stanca, A.M. and Cattivelli, L. (2004). Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions. *Plant Sci.* 167:1359-1365
- Badawi, M., Danyluk, J., Boucho, B., Houde, M. and Sarhan, F. (2007). The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBFs*. *Mol. Genet. Genomics.* 277:533-554
- Baker, S.S., Wilhelm, K.S. and Thomashow, M.F. (1994). The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* *cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.* 24:701-713
- Baldi, P., Grossi, M., Pecchioni, N., Vale, G. and Cattivelli, L. (1999). High expression level of a gene coding for a chloroplastic amino acid selective channel protein is correlated to cold acclimation in cereals. *Plant Mol. Biol.* 41:233-243
- Baldi, P., Vale, G., Mazzucotelli, E., Govoni, C., Faccioli, P., Stanca, A.M. and Cattivelli, L. (2001). The transcripts of several components of the protein synthesis machinery are cold-regulated in a chloroplast-dependent manner in barley and wheat. *J. Plant Physiol.* 158:1541-1546
- Baniwal, S.K., Bharti, K., Chan, K.Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S.K., Nover, L., Port, M., Scharf, K.-D., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D. and Von Koskull-Doring, P. (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosciences.* 29:471-487
- Barcelo, J. and Poschenrieder, C. (1990). Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.* 13:1-37
- Ben-Gal, A. and Shani, U. (2003). Water use and yield of tomatoes under limited water and excess boron. *Plant Soil.* 256:179-186
- Bharti, K., von Koskull-Doring, P., Bharti, S., Kumar, P., Tintschl-Korbitzer, A., Treuter, E. and Nover, L. (2004). Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with the plant CREB binding protein ortholog HAC1. *Plant Cell.* 16:1521-1535
- Brown, C.E., Pezeshki, S.R. and DeLaune, R.D. (2006). The effects of salinity and soil drying on nutrient uptake and growth of *Spartina alterniflora* in a simulated tidal system. *Environ. Exp. Bot.* 58:140-148

- Cattivelli, L., Baldi, P., Crosatti, C., Di Fonzo, N., Faccioli, P., Grossi, M., Mastrangelo, A.M., Pecchioni, N. and Stanca, A.M. (2002). Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticeae*. *Plant Mol. Biol.* 48:649-655
- Crosatti, C., de Laureto, P.P., Bassi, R. and Cattivelli, L. (1999). The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene *cor14b* and the accumulation of the corresponding protein. *Plant Physiol.* 119:671-680
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.-h., Hong, X., Agarwal, M. and Zhu, J.-K. (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 17:1043-1054
- Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J.K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12:444-451
- Dahleen, L.S. and Manoharan, M. (2007). Recent advances in barley transformation. *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant.* 43:493-506
- Dekov, I., Tsonev, T. and Yordanov, I. (2000). Effects of water stress and high-temperature stress on the structure and activity of photosynthetic apparatus of *Zea mays* and *Helianthus annuus*. *Photosynthetica.* 38:361-366
- Delauney, A.J. and Verma, D.P.S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4:215-223
- Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 33:751-763
- Elhaak, M.A., Migahid, M.M. and Wegmann, K. (1997). Ecophysiological studies on *Euphorbia paralias* under soil salinity and sea water spray treatments. *J. Arid Environ.* 35:459-471
- Francia, E., Rizza, F., Cattivelli, L., Stanca, A.M., Galiba, G., Tóth, B., Hayes, P.M., Skinner, J.S. and Pecchioni, N. (2004). Two loci on chromosome 5H determine low temperature tolerance in the new 'winter' x 'spring' ('Nure' x 'Tremois') barley map. *Theor. Appl. Genet.* 108:670-680
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:436-442
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M. and Thomashow, M.F. (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant J.* 16:433-442
- Guy, C.L., Niemi, K.J. and Brambl, R. (1985). Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3673-3677
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J.L., Pineda, O., Thomashow, M.F. and Zhang, J.Z. (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130:639-648

- Horvath, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Torok, Z., Pali, T., Balogh, G., Kovacs, E., Nadasdi, L., Benko, S., Joo, F. and Vigh, L. (1998). Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: Identification of hsp17 as a "fluidity gene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3513-3518
- Hughes, M.A. and Dunn, M.A. (1996). The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.* 47:291-305
- Hugly, S., Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C. (1989). Enhanced thermal tolerance of photosynthesis and altered chloroplast ultrastructure in a mutant of *Arabidopsis* deficient in lipid desaturation. *Plant Physiol.* 90:1134-1142
- Iba, K. (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53:225-245
- Iijima, M. and Kato, J. (2007). Combined soil physical stress of soil drying, anaerobiosis and mechanical impedance to seedling root growth of four crop species. *Plant Prod. Sci.* 10:451-459
- IPCC (2007). *Climate change 2007: synthesis report*. Intergovernmental Panel on Climate Change., Valencia, p 23
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S., Zarka, D.G., Schabenberger, O. and Thomashow, M.F. (1998). *Arabidopsis* *CBF1* overexpression induces cor genes and enhances freezing tolerance. *Science*. 280:104-106
- Kant, P., Kant, S., Gordon, M., Shaked, R. and Barak, S. (2007). *STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1* and *STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2*, two DEAD-box RNA helicases that attenuate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses. *Plant Physiol.* 145:814-830
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech.* 17:287-291
- Kavi Kishor, P.B., Hong, Z., Miao, G.-H., Hu, C.-A.A. and Verma, D.P.S. (1995). Overexpression of  $\Delta$ -Pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108:1387-1394
- Knight, H. and Knight, M.R. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6:262-267
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Doring, P., Vierling, E. and Scharf, K.D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:310-316
- Larkindale, J., Hall, J.D., Knight, M.R. and Vierling, E. (2005). Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signalling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.* 138:882-897
- Lee, B.H., Henderson, D.A. and Zhu, J.K. (2005). The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell.* 17:3155-3175
- Lee, W.-M., Ishikawa, M. and Ahlquist, P. (2001). Mutation of host  $\Delta 9$  fatty acid desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis. *J. Virol.* 75:2097-2106

- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10:1391–1406
- Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H.T. and Marmiroli, N. (2002). Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Mol. Biol.* 48:667-681
- Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J.* 38:982-993
- Miller, A.K., Galiba, G. and Dubcovsky, J. (2006). A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-A(m)2 in *Triticum monococcum*. *Mol. Genet. Genomics.* 275:193-203
- Miller, G.A.D. and Mittler, R.O.N. (2006). Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann. Bot.* 98:279-288
- Mishra, S.K., Tripp, J., Winkelhaus, S., Tschiersch, B., Theres, K., Nover, L. and Scharf, K.-D. (2002). In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev.* 16:1555-1567
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-410
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11:15-19
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9:490-498
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H. and Iba, K. (2000). Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science.* 287:476-479
- Nakamoto, H. and Vigh, L. (2007). The small heat shock proteins and their clients. *Cell. Mol. Life Sci.* 64:294-306
- Nakashima, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiol. Plantarum.* 126:62-71
- Nover, L., Bharti, K., Ouml, P., Mishra, S.K., Ganguli, A. and Scharf, K.-D. (2001). *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperon.* 6:177-189
- Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Salinas, J. (2004). *CBF2/DREB1C* is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *CBF3/DREB1A* expression and plays a central role in, stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:3985-3990
- Novillo, F., Medina, J. and Salinas, J. (2007). *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in CBF regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:21002-21007

- Orvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F. and Dhindsa, R.S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23:785-794
- Ozturk, Z.N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, C.B., Galbraith, D.W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. and Bohnert, H.J. (2002). Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.* 48:551-573
- Pearce, R.S. (1999). Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regul.* 29:47-76
- Pearcy, R.W. (1978). Effect of growth temperature on the fatty acid composition of the leaf lipids in *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. *Plant Physiol.* 61:484-486
- Port, M., Tripp, J., Zielinski, D., Weber, C., Heerklotz, D., Winkelhaus, S., Bublak, D. and Scharf, K.-D. (2004). Role of Hsp17.4-CII as coregulator and cytoplasmic retention factor of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Plant Physiol.* 135:1457-1470
- Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol.* 133:1755-1767
- Raison, J.K., Roberts, J.K.M. and Berry, J.A. (1982). Correlations between the thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of the higher plant, *Nerium oleander*, to growth temperature. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 688:218-228
- Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 130:1143-1151
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S. and Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134:1683-1696
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006a). Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell.* 18:1292-1309
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006b). Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:18822-18827
- Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J. and Dhindsa, R.S. (2001). Cold-activation of *Brassica napus* *BN115* promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires  $Ca^{2+}$  influx. *Plant J.* 27:1-12
- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, A., MNakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2002a). Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Func. Integr. Genomics.* 2:282-291
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr. Opi. Biotech.* 14:194-199

- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell Rep.* 13:61-72
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. (2002b). Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31:279-292
- Shao, H.B., Jiang, S.Y., Li, F.M., Chu, L.Y., Zhao, C.X., Shao, M.A., Zhao, X.N. and Li, F. (2007). Some advances in plant stress physiology and their implications in the systems biology era. *Colloid Surf. B-Biointerfaces.* 54:33-36
- Sharma, P., Sharma, N. and Deswal, R. (2005). The molecular biology of the low-temperature response in plants. *Bioessays.* 27:1048-1059
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:217-223
- Skinner, J.S., von Zitzewitz, J., Szucs, P., Marquez-Cedillo, L., Filichkin, T., Amundsen, K., Stockinger, E.J., Thomashow, M.F., Chen, T.H.H. and Hayes, P.M. (2005). Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant Mol. Biol.* 59:533-551
- Smallwood, M. and Bowles, D.J. (2002). Plants in a cold climate. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 357:831-847
- Stockinger, Eric, J., Gilmour, Sarah, J. and Thomashow, Michael F. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1035-1040
- Sung, D.-Y., Kaplan, F., Lee, K.-J. and Guy, C.L. (2003). Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci.* 8:179-187
- Suzuki, N. and Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plantarum.* 126:45-51
- Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H.J., Shuman, J., Shulaev, V. and Mittler, R. (2005). Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiol.* 139:1313-1322
- Svensson, J.T., Crosatti, C., Campoli, C., Bassi, R., Stanca, A.M., Close, T.J. and Cattivelli, L. (2006). Transcriptome analysis of cold acclimation in barley *Albina* and *Xantha* mutants. *Plant Physiol.* 141:257-270
- Thomashow, M.F. (1998). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 118:1-8
- Thomashow, M.F. (1999). Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Ann Rev Plant Physiol - Plant Mol. Biol.* 50:571-599



- Tondelli, A., Francia, E., Barabaschi, D., Aprile, A., Skinner, J.S., Stockinger, E.J., Stanca, A.M. and Pecchioni, N. (2006). Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. *Theor. Appl. Genet.* 112:445-454
- Tripler, E., Ben-Gal, A. and Shani, U. (2007). Consequence of salinity and excess boron on growth, evapotranspiration and ion uptake in date palm (*Phoenix dactylifera* L., cv. Medjool). *Plant Soil.* 297:147-155
- Vagujfalvi, A., Aprile, A., Miller, A., Dubcovsky, J., Delugu, G., Galiba, G. and Cattivelli, L. (2005). The expression of several *Cbf* genes at the *Fr-A2* locus is linked to frost resistance in wheat. *Mol. Genet. Genomics.* 274:506-514
- Van Buskirk, H.A. and Thomashow, M.F. (2006). *Arabidopsis* transcription factors regulating cold acclimation. *Physiol. Plantarum.* 126:72-80
- Vannini, C., Iriti, M., Bracale, M., Locatelli, F., Faoro, F., Croce, P., Pirona, R., Di Maro, A., Coraggio, I. and Genga, A. (2006). The ectopic expression of the rice *Osmyb4* gene in *Arabidopsis* increases tolerance to abiotic, environmental and biotic stresses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69:26-42
- Vashisht, A.A. and Tuteja, N. (2006). Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to engineer plant stress tolerance. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 84:150-160
- Vaultier, M.-N., Cantrel, C., Vergnolle, C., Justin, A.-M., Demandre, C., Benhassaine-Kesri, G., Cicek, D., Zachowski, A. and Ruelland, E. (2006). Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells. *FEBS Lett.* 580:4218-4223
- Vij, S. and Tyagi, A.K. (2007). Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotech. J.* 5:361-380
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk, H.A., Fowler, S.G. and Thomashow, M.F. (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J.* 41:195-211
- von Koskull-Doring, P., Scharf, K.D. and Nover, L. (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci.* 12:452-457
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Botany.* 61:199-223
- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta.* 218:1-14
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9:244-252
- Xin, Z., Mandaokar, A., Chen, J., Last, R.L. and Browse, J. (2007). *Arabidopsis* *ESK1* encodes a novel regulator of freezing tolerance. *Plant J.* 49:786-799
- Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H. and Cui, L. (2006). Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environ. Exp. Botany.* 56:274-285

Xu, Z.Z. and Zhou, G.S. (2006). Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta*. 224:1080-1090

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*. 6:251-264

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci*. 10:88-94

Yancey, P.H. (2004). Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead Sea to the deep sea. *Sci. Progress*. 87:1-24

Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol*. 208:2819-2830

Ye, L., Gao, H.Y. and Zou, Q. (2000). Responses of the antioxidant systems and xanthophyll cycle in *Phaseolus vulgaris* to the combined stress of high irradiance and high temperature. *Photosynthetica*. 38:205-210

Zhang, J.Z., Creelman, R.A. and Zhu, J.-K. (2004). From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol*. 135:615-621

Zhu, J., Shi, H., Lee, B.-h., Damsz, B., Cheng, S., Stirm, V., Zhu, J.-K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (2004). An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, *HOS9*, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9873-9878

Zhu, J., Verslues, P.E., Zheng, X., Lee, B.-h., Zhan, X., Manabe, Y., Sokolchik, I., Zhu, Y., Dong, C.-H., Zhu, J.-K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (2005). *HOS10* encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:9966-9971

Zhu, J.H., Dong, C.H. and Zhu, J.K. (2007). Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr. Opin. Plant Biol*. 10:290-295



CAPÍTULO **16**

---

**RESISTENCIA A  
HERBICIDAS**

*José Ignacio Cubero  
Elena Prats*



## RESISTENCIA A HERBICIDAS

---

*José Ignacio Cubero y Elena Prats*

**Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC / Departamento de Genética, UCO.  
Finca Alameda del Obispo, Av. Menéndez Pidal s/n, Apdo. 4084, 14080 Córdoba  
E-mail: elena.prats@ias.csic.es**

---

### 16.1. INTRODUCCIÓN

Las malas hierbas son un problema de la agricultura desarrollada. Podría decirse que en la de subsistencia no existen, pues lo que nace entre las plantas cultivadas se aprovecha como forraje del escaso ganado que se posee. Sin embargo, en una agricultura moderna compiten con el cultivo para todos los elementos vitales incluyendo la luz por supuesto. Su eliminación sólo fue posible por procedimientos mecánicos hasta el siglo XX.

Hoy en día, una agricultura desarrollada no se entiende sin herbicidas y los nuevos productos son cada vez más respetuosos con el ambiente, eficaces pero fácilmente degradables y a la vez más inocuos contra la planta cultivada y contra la fauna acompañante. La tendencia ha sido ir buscando fitoquímicos cada vez más selectivos contra especies o grupos de especies concretos, si bien no todos los especialistas están de acuerdo con una excesiva especificidad, prefiriendo por el contrario moléculas de amplio espectro. La consecución de variedades cultivadas resistentes a herbicidas permitirá sin duda progresar en esta vía.

Los herbicidas se han clasificado de muchas maneras; entre ellas, por el momento de aplicación (presembrado, preemergencia, postemergencia), por su relación con la planta diana (contacto, traslocación), por su persistencia en el terreno, por la composición química y por el modo de acción. Estos dos últimos son, quizá, los más adecuados para el objeto del presente capítulo.

Los herbicidas actúan sobre un sitio específico o primario hacia el cual se mueve una vez aplicado; su acción en este sitio provoca reacciones secundarias que son las que determinan su efecto sobre la planta. El tránsito desde la entrada hasta la llegada al sitio de acción comporta una serie de pasos (entrada, difusión, conversión metabólica, entrada en células y orgánulos celulares) en cada uno de los cuales se puede provocar una barrera de resistencia al efecto herbicida.

La aplicación masiva de herbicidas coincidió, como tantas otras cosas en agricultura, con el final de la II Guerra Mundial; el 2,4-D se popularizó inmediatamente por el buen control que ejercía sobre hierbas de hoja ancha en cereales. Como sucedió con el uso, también masivo, de insecticidas, las resistencias o tolerancias no tardaron en aparecer. Un buen número de especies la tienen natural, es decir, son capaces de sobrevivir al tratamiento a las dosis recomendadas aunque, como asimismo en el caso de los insecticidas y, en general, de todo tratamiento sea del tipo que sea, dosis mayores manifiestan el efecto tóxico. Tal tolerancia natural, al depender de la constitución genética, puede estar presente en toda una especie o bien en ciertos genotipos de la misma.

En otras, la presión selectiva que implica un tratamiento reiterado sobre todo favorece las mutaciones que producen una cierta barrera a la acción del producto aplicado. Si la presión selectiva se mantiene, lo que es automático en el caso de herbicidas de larga persistencia en el terreno, al seguirse con la aplicación del producto, las estirpes con tales mutaciones se verán favorecidas, aumentando el número de individuos y, con ellos, la posibilidad de que aparezcan nuevas mutaciones que refuercen la barrera o produzcan otras nuevas. Se originan así biotipos con *resistencia adquirida*.

Es evidente que si tal resistencia se produce de forma natural, también puede conseguirse por procedimientos de Mejora genética siguiendo las mismas pautas que para cualquier otro carácter y, en efecto, como luego veremos, se han aplicado todos los métodos conocidos incluyendo la ingeniería genética.

## 16.2. ALGUNOS TÉRMINOS IMPORTANTES

Aparte de *resistencia* y *tolerancia*, que requieren el párrafo siguiente por entero, es conveniente definir algunos términos que se utilizan en relación con las malas hierbas (Hatzios, 2001).

*Selectividad* es la capacidad que tiene un herbicida para controlar o eliminar algunas malas hierbas sin dañar a otras, al menos de manera perceptible.

El *mecanismo de acción de un herbicida* es la interferencia de dicho herbicida con un cierto compuesto o proceso bioquímico que conlleva la letalidad sobre la mala hierba.

El *modo de acción de un herbicida* es la secuencia de sucesos que lleva a la muerte de la planta diana.

*Sitio de acción* es el lugar donde se fija la molécula herbicida o el paso metabólico concreto en que actúa.

## 16.3. RESISTENCIA Y TOLERANCIA

El uso de uno u otro está teóricamente bien delimitado para los casos de enfermedades y plagas, si bien la práctica presenta dificultades de aplicación. Básicamente, la diferencia *teórica* consiste en que el agente dañino no hace daño (al menos visible o comercial) en la planta pero se multiplica en ella. Se tiende a no utilizar variedades *tolerantes* porque pueden comportarse como propagadoras del agente nocivo.

En el caso de resistencia a herbicidas no puede aplicarse tal distinción. De ahí que la diferencia estribe en el grado de supervivencia *intrínseca* o *natural* de la planta: si lo hace a las dosis recomendadas, es *tolerancia*, y si lo hace a dosis más altas, a veces hasta 100 (como en el caso de muchas malas hierbas resistentes a la triazina), e incluso 1000 veces mayor que la recomendada, letales para el biotipo natural, *resistencia*, lo que implica una cierta inducción por selección natural o bien, en el caso de plantas cultivadas, de modificación genética por cualquiera de las técnicas disponibles (Retzinger y Mallory-Smith, 1997, en Hatzios, 2001).

Ambos términos se utilizan con frecuencia indistintamente por muchos agrónomos; por ejemplo, se habla de la tolerancia transgénica al glifosato, si bien es efectiva y está causada por un simple gen cuyo modo de acción se conoce.

Se ha propuesto un sistema de control poligénico para la tolerancia y monogénico para la resistencia, a la manera de las resistencias horizontal y vertical de Van der Plank para la resistencia a enfermedades, pero faltan estudios genéticos que lo avalen.

Las tasas de mutaciones espontáneas se han estimado en raras ocasiones, no ofreciendo diferencias con las registradas para otros genes; para resistencia a triazinas se obtuvo  $10^{-8}$ , dato concordante con mutaciones en bacterias al transmitirse tal resistencia por el cloroplasto, y para resistencia a sulfonilureas  $10^{-6}$ , en el rango de mutación espontánea en eucariontes.

Al igual que en los casos de enfermedades y plagas, se llama *resistencia cruzada* cuando un mecanismo de resistencia es eficaz contra más de un herbicida (de ser, por el contrario, más sensible a otro herbicida sería un caso de resistencia cruzada *negativa*) y *resistencia múltiple* cuando un mismo biotipo (o variedad) tiene más de un mecanismo de resistencia a uno o varios herbicidas (Hatzios, 2001; Navas Palmero, 2007).

Hay que insistir en el hecho de que la resistencia adquirida a herbicidas surge como respuesta a una presión de selección producida por un tratamiento reiterado con el mismo producto, es decir, de una mala práctica agrícola, pues siempre hay que buscar la diversificación tanto en cultivos y variedades dentro de éstos como en las aplicaciones de cualquier fitoquímico. De igual forma que una rotación rompe el ciclo de un agente patogénico y una variedad multilínea dificulta el libre flujo de una sola raza, cambiar de herbicida (eliminando los persistentes en el terreno justamente porque su presión de selección es aún más continua), o utilizar mezclas de herbicidas con distintos medios de acción dificulta la aparición de resistencia. Hay que tener en cuenta que “cambiar de herbicida” significa elegirlos con *diferente modo de acción*, pues de otra manera la presión selectiva es la misma aunque se siga una buena rotación con diferentes cultivos.

Por el contrario, la aparición de resistencia se favorece con la aplicación del herbicida a dosis bajas, por la misma razón que el uso de antibióticos en el hombre a dosis más bajas que las bactericidas favorece la aparición de mutantes resistentes; en efecto, las mutaciones de efectos débiles pueden fijarse con facilidad y son el material idóneo para, viviendo ya en un ambiente con antibiótico, permitir que surjan alelos más eficaces. La acumulación progresiva de mutaciones es un hecho experimental bien comprobado.

Por la misma razón que los buenos genes de resistencia a enfermedades hay que protegerlos, por lo valiosos que son, mediante las prácticas agronómicas adecuadas como las mencionadas más arriba, la sensibilidad a un buen herbicida hay que protegerla evitando las malas prácticas, también esbozadas más arriba, que favorecen la aparición de resistencia. Una vez que ésta hace su aparición, seguir tratando con el mismo herbicida es suicida, pues la mala hierba resistente puede terminar por extenderse indefinidamente.

En el caso en que el resistente sea un cultivo concreto, o una variedad del mismo, hay que manejarlo con cuidado para evitar que, precisamente por la persistencia en la aplicación del herbicida al que es resistente, se produzcan biotipos resistentes al mismo, con lo que perdería su eficacia.

La norma fundamental para proteger los genes valiosos es, como en cualquier otro caso de interacción entre dos organismos, diversificar en el tiempo y en el espacio tanto el material cultivado como el fitoquímico que se aplica.

#### 16.4. LA RESISTENCIA A HERBICIDAS EN EL MUNDO

El primer caso de resistencia fue descrito en 1970 (Ryan, 1970, en Salas, 2001) y sin haber llegado al medio siglo, la relación de casos es enorme (puede consultarse, permanentemente actualizada, en [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com)), cayendo fuera de los límites del presente capítulo. Los casos más frecuentes se han encontrado contra los inhibidores de ALS (ej.: clorsulfurón) y triazinas (ej.: atrazina); otros menos frecuentes, pero aún abundantes, son las resistencias a inhibidores de la ACCasa (diclofop-metil), auxinas sintéticas (2,4-D), bipyridilos (paraquat), ureas y amidas (clortolurón), glicinas (glifosato) y dinitroanilinas (trifluralina), siendo los menos frecuentes, entre otros casos, la resistencia a tiocarbamatos (trialato), triazoles (amitrole), inhibidores de la PPO (oxifluorfenol), cloroacetamida (butacloro) inhibidores de la síntesis de carotenoides (flurtamona), mitosis (profam) y celulosa (diclobenil) y nitrilos (bromoxinil). Los casos descritos se extienden por todo el mundo desarrollado, con máximos en Europa y en EEUU.

La relación anterior se refiere a resistencias naturales en malas hierbas. Aunque luego se hablará de ellas, se han incorporado resistencias a glifosato y broxinil por ingeniería genética a algunos cultivos.

Malas hierbas resistentes se han encontrado en gran número de familias, destacando en Europa los géneros de Poáceas *Avena*, *Lolium* y *Setaria*, como asimismo en un gran número de especies del género *Amaranthus*, introducida desde América como consecuencia de los contactos entre ambos mundos.

#### 16.5. DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA

Debe comenzar, evidentemente, con la observación en campo, descartando los casos que se puedan deber a una mala técnica de aplicación (por ejemplo, heterogeneidad de la aplicación) o circunstancias ambientales (lluvia tras la aplicación). Los campos con una larga tradición de monocultivo y de aplicación reiterada del mismo herbicida son los mejores candidatos a la aparición de resistencia.

En todo caso, la posible resistencia ha de ser confirmada experimentalmente, debiendo disponerse siempre de una línea testigo con la mayor garantía posible de no haber estado sometida a la presión selectiva continuada por el herbicida. Los bioensayos analizan la relación entre el peso seco o fresco de la planta estudiada en función de dosis crecientes del herbicida. La respuesta es una sigmoide sobre la que se estiman dos índices (Salas, 2001): (1) la *reducción del crecimiento (GR)* que es la dosis del herbicida que produce una reducción del peso (seco o fresco) del 10% (GR10), 50% (GR50%) y del 90% (GR90) en relación con el mismo material no tratado, y el *factor de resistencia (FR)*, que es el cociente entre el GR50 de la forma resistente y el GR50 de la forma susceptible. Un  $FR = 1$  indica ausencia de resistencia,  $>1$  es resistencia y  $<1$  indica resistencia cruzada *negativa*.

## 16.6. MECANISMOS DE RESISTENCIA A HERBICIDAS

Hay tres mecanismos básicos de resistencia: (a) modificación del sitio de acción, (b) detoxificación de la molécula herbicida y (c) el herbicida no puede alcanzar el sitio de acción. Junto a mecanismos menos importantes, los podemos describir sucintamente como sigue (Hatzios, 2001; Navas Palmero, 2007):

### 1. Pérdida de especificidad por cambios en el sitio de acción primario.

Este suele ser una proteína (enzima o estructural) y la acción del herbicida sobre ella desencadena los efectos que llevan a la muerte de la planta. Una mutación, que puede ser simplemente el cambio de un aminoácido puede hacer que se pierda la interacción entre el herbicida y el sitio de acción al modificarse la conformación de éste. Es el caso del dominio carboxil-transferasa de la ACCasa o en la proteína D1 del fotosistema II; en este caso se trata de un cambio de serina a glicina en la posición 264 que confiere una resistencia 1000 veces mayor a las triazinas.

Es un mecanismo muy común de resistencia a herbicidas, a veces caracterizada molecularmente, que puede ser eficaz contra compuestos pertenecientes a la misma familia química. Se han descrito resistencias de este tipo en *Alopecurus myosuroides*, *Setaria viridis*, *Phalaris paradoxa*, *Eleusine indica*, *Avena* spp., *Lolium* spp. y *Brassica rapa* (transferida por metodología clásica a colza). La resistencia *adquirida* (pero no la *natural*; véase más abajo, parágrafo 3) a los herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa (ALS), entre los que están las sulfonilureas y las imidazolinonas, se debe a mutaciones, especialmente en tres sitios, que han alterado la ALS. También parece ser éste el mecanismo de resistencia encontrado en algunas especies a herbicidas que alteran el ciclo mitótico como las dinitroanilinas, al haberse encontrado diferencias entre las tubulinas de biotipos resistentes y susceptibles.

El mecanismo de resistencia transgénica a glifosato producida por el gen CP4epsps de *Agrobacterium tumefaciens* pertenece a esta clase.

### 2. Modificación de la molécula (degradación) a formas no tóxicas.

Es un proceso bien estudiado que caracteriza muchos casos de resistencia. La modificación puede estar causada por oxidación, reducción o hidrólisis y posterior conjugación de los compuestos resultantes con otras moléculas (azúcares, ácidos orgánicos, glutatión, etc.) que reducen o anulan la toxicidad, como sucede en algunos biotipos de *Abutilon theophrasti* que resisten a la atrazina conjugándola con glutatión. Los productos de la reacción pueden secuestrarse en orgánulos o biopolímeros como en el caso siguiente.

Se encuentran dentro de esta clase casos de resistencia múltiple, como es el de *Alopecurus myosuroides*, que puede metabolizar un buen número de herbicidas con diferentes modos de acción. La resistencia *natural* (pero no la *adquirida*; véase más arriba, parágrafo 1) a los herbicidas que inhiben la acetolactato sintasa (ALS), entre los que están las sulfonilureas y las imidazolinonas, se debe a su rápida metabolización. Los casos de tolerancia natural (preexistente) a herbicidas de acción auxínica, como el muy famoso 2,4D, parecen debidos a la degradación de la molécula a compuestos no tóxicos, aunque en dicotiledóneas también se encuentra un mecanismo de conjugación con azúcares.

Las resistencias transgénicas a glufosinato, procedente de *Streptoyses*, y a bromoxinil, de *Klebsiella ozaenae*, también pertenecen a esta clase, al ser convertidas las moléculas herbicidas respectivamente a un derivado acetilado y a un derivado del ácido benzoico (Devine, 2001).

### 3. El herbicida no llega al sitio de acción

Desde el sitio de aplicación, el herbicida debe translocarse a las hojas, como en el caso de los de aplicación al suelo, o bien, en los foliares, debe hacerlo a los meristemos o raíces. Esta resistencia, pues, está asociada a procesos de secuestro (se ha sugerido el caso del algodón a algunos herbicidas y de otras especies al paraquat), que reduce el movimiento, o compartimentación en vacuolas o biopolímeros mediante mecanismos no bien conocidos aunque sugeridos para algunos herbicidas de acción hormonal o inhibidores del fotosistema I. Es posible que las escasas especies en las que se ha encontrado resistencia al glifosato posean un mecanismo alterado de translocación del herbicida.

### 4. Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción

La acción del herbicida necesita una concentración mínima para ser efectiva. Si alguna reacción metabólica de la planta dificulta la absorción, la penetración o la translocación de la molécula, la concentración umbral puede no alcanzarse. Son mecanismos, no obstante, más sensibles a la acción ambiental que los dos anteriores, por lo que pueden causar tolerancia más que resistencia.

### 5. Reparación de efectos fitotóxicos

La planta se ve afectada pero se recupera cuando cesa el contacto con el herbicida. Es el caso de los herbicidas que, como algunos inhibidores del acetil coenzima A carboxilasa, actúan sobre la membrana plasmática modificando su polaridad. Una vez que deja de aplicarse el herbicida, la membrana puede recuperarse, como se ha descrito en avena, trigo harinero y *lolium rigidum*. Al igual que los casos 3 y 4, parece un mecanismo más propio de la tolerancia que de una buena resistencia.

### 6. Ausencia de células diana

Podría calificarse de escape e incluirse quizá en los casos 3 ó 4 anteriores. Si el herbicida penetra fundamentalmente por un tejido y éste ha dejado de producirse a consecuencia del desarrollo adquirido por la planta, ésta puede completar su ciclo sin daño. No obstante, el herbicida puede penetrar más lentamente por otros tejidos y a altas concentraciones puede manifestarse el efecto tóxico. Es el caso de las habas de crecimiento determinado (con el gen *ti* en homocigosis) que resisten hasta cuatro veces más cantidad de glifosato aplicado para combatir *Orobanche crenata* que los genotipos normales (Nadal et al., 2001).

### 7. Sobreexpresión del gen cuya actividad está bloqueada por el herbicida

Tan solo aplicable por ingeniería genética, consiste en evitar el efecto herbicida por la superproducción del metabolito diana. En realidad, se consigue el mismo efecto que el señalado en el párrafo 4.



## 16.7. MÉTODOS DE MEJORA APLICABLES

Siempre que se la ha buscado, se ha encontrado resistencia a herbicidas (Salas, 2001; de Prado y col., 2001; Osuna y col., 2001a,b) o, cuando menos, variabilidad suficiente para acometer un programa de mejora. La experiencia de los mejoradores muestra que la introgresión desde material silvestre es difícil y, en todo caso, muy lenta debido a la existencia de ligamiento con otros genes que, siendo favorables en un ambiente natural, no lo son para su uso comercial. Estos bloques génicos son difíciles de romper, por lo que hace falta un programa previo de premejora (véase capítulo 18 en esta obra).

### 16.7.1. Selección y cruzamiento

Se ha conseguido resistencia por metodología clásica en soja, colza, lechuga (en los tres casos a sulfonilureas), *Lolium* (glifosato, dalapón), colza (atrazina) y se ha observado variación a algunos herbicidas en otras especies, como por ejemplo a glufosinato y otras moléculas relacionadas (avena entre otras), así como niveles de resistencia que podrían tener importancia práctica en soja y algodón a fluridona y norflurazón (Sherman y col., 1996); no, por ahora, a glifosato, al menos para considerar la posibilidad de seleccionar una variedad comercial (pero véase el párrafo siguiente y Gressel (2000), respecto a *Lotus corniculatus* y *Eleusine indica*).

Es frecuente que la resistencia aparezca en una mala hierba, que han mostrado una rápida y excelente capacidad de adaptación a herbicidas, como es el caso de la resistencia encontrada a sulfonilureas e imidazolinonas y, sobre todo, a la triazina (en nada menos que unas 60 especies con numerosos biotipos en cada una extendidos por todo el mundo). Justamente la resistencia a la triazina fue el primer caso de transferencia por cruzamiento y posterior selección a un cultivo (colza, *Brassica napus*) desde una mala hierba (una mala hierba compañera de nabo, *B. rapa*).

Aparece resistencia asimismo incluso a nuevas moléculas, como es el caso de numerosas gramíneas a los inhibidores de la biosíntesis de lípidos (aril-oxifenoxi-propionatos y ciclohexanedionas); en otros casos (glifosato), la adquisición de resistencia no ha tenido lugar o es muy lenta (Sherman y col., 1996). No pocas especies (por ejemplo, *Conyza*) han mostrado resistencia a paraquat y a 2,4-D. Se ha detectado, asimismo, resistencia simultánea a varios herbicidas, como es el caso de algunos biotipos de *Setaria viridis* a trifluralina, terbutol, DCPA y carbamatos (Smeda y Vaughn, 1994), lo que presenta un aspecto preocupante por la similitud de sitios de acción que nuevos herbicidas puedan tener con los ya existentes.

Se han transferido resistencias a atrazina desde malas hierbas compañeras a col y colza (canola) y de *Setaria viridis* a *S. italica*, así como de lechuga silvestre (*Lactuca serriola*) a la cultivada (*L. sativa*).

### 16.7.2. Mutagénesis

Se han utilizado tanto rayos X como agentes químicos, sobre semillas, embriones o cultivos de tejidos para conseguir formas resistentes en soja, colza, maíz, cebada y trigo. El procedimiento es de bajo coste aunque la cantidad de "basura" genética generada por mutaciones no deseadas exige varios retrocruzamientos (con selección) para la transferencia a líneas comerciales.

En tiempos recientes se están consiguiendo mutaciones específicas mediante el uso de secuencias cortas de ADN especialmente construidas para conseguir cambios de nucleótidos concretos del gen diana. Se ha señalado así la obtención de maíz resistente a inhibidores de la acetolactato sintetasa (Zhu y col, 2000). Tiene la ventaja, además, de que no dejan rastro alguno en el genoma modificado, con lo que toda protesta antibioteconológica deja de tener sentido.

Por mutagénesis, directa o en cultivo de tejidos, se han obtenido resistencias a triazinas, imidazolinonas, sulfonilurea y setoxidim, (revisados en Hall et al., 1996; Tan et al., 2005; Saari y Mauvais, 1996; Somers, 1996). Los que han tenido un mayor éxito han sido los resistentes a imidazolinonas estando disponibles actualmente para su cultivo genotipos resistentes de maíz, colza, arroz, trigo y girasol (Tan et al., 2005). En un campo más restringido por ahora a la investigación, también se han conseguido resistencias en *Arabidopsis thaliana* a diclobenil e isoxabeno, en algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii* a orizalina y en algunas cianobacterias a norflurazón. Aparte del gran interés de poseer organismos en el que estudiar los mecanismos de resistencia, los genes encontrados podrían ser transferidos por ingeniería genética a plantas superiores; en el caso de la cianobacteria *Synechococcus*, el gen, obtenido mediante tratamiento con metasulfonato de etilo (EMS) ha sido clonado, aunque por ahora solo para su estudio.

### 16.7.3. Por cultivo de tejidos

La técnica se describe en el capítulo 17 de la presente obra, en el que asimismo se citan algunos casos de aplicación a resistencia a herbicidas. Las líneas que siguen completan la información allí dada.

Se han utilizado tanto propágulos de distintos genotipos cultivándolos en un medio con el herbicida para obtener un índice de resistencia como para conseguir directamente regenerantes, esto es, genotipos, resistentes. Una posibilidad interesante, en especies en las que existan protocolos de regeneración a partir de granos de polen o de microsporas, es aplicar el agente mutagénico sobre estos elementos y obtener dihaploides a continuación; la cantidad de granos de polen que se puede tratar es realmente ilimitada.

En el caso de utilizar el cultivo para obtener un índice de resistencia, la respuesta se mide o en número de supervivientes, en grado de daño a los callos correspondientes, etc. La hipótesis es que la respuesta en cultivo *in vitro* está correlacionada con la respuesta de la planta *in vivo*, en condiciones de campo, pero tal hipótesis no se ha cumplido en numerosos casos, ya que la respuesta depende del tipo de tejido y de su grado de desarrollo, por lo que las células *in vitro* pueden verse afectadas pero no las de la planta adulta, o viceversa.

En el caso de selección directa en el cultivo de tejidos, el más usual, se obtienen directamente líneas resistentes, pero, al igual que en cualquier otro procedimiento de mejora genética, éstas han de ser cruzadas con posterioridad con líneas de valor comercial para transferir los genes encontrados, pues el regenerante muestra normalmente muchas mutaciones no favorables a causa de variación somaclonal ocasionada por muy distintos factores (mutaciones naturales preexistentes en el tejido cultivado o producidas en el propio medio de cultivo, aparición de poliploides, etc.)

Se han utilizado todo tipo de explantos: foliares, cotiledonares, internodales, etc., así como protoplastos, polen y microsporas. El cultivo se ha hecho en medio líquido o sólido y, normalmente, se utiliza mutagénesis artificial para conseguir la mayor variación posible en las células cultivadas. Aparte de la obtención de resistencia por cultivo continuado en un medio con norflurazón en la

cianobacteria *Synechococcus* (Sherman y col., 1996), se ha conseguido resistencia a sulfonilurea en colza y remolacha y a diclofop e imidazolinona en maíz y en colza (para detalles sobre la resistencia a este último, véase Coutino et al., cap. 17).

#### 16.7.4. Por ingeniería genética

Los primeros cultivos transgénicos resistentes a herbicidas, el algodón resistente a bromoxinil en USA y colza (canola) resistente a glufosinato en Canadá, se comercializaron en 1995. Desde entonces la lista se ha incrementado considerablemente (Tabla 1, Duke y Cerdeira, 2005).

Entre las resistencias más importantes conseguidas desde el punto de vista comercial desde el comienzo de la aplicación de la ingeniería genética se encuentra la resistencia al bromoxinil, al glifosato y al glufosinato.

**Tabla 16.1.** Cultivos resistente a herbicidas por ingeniería genética (adaptada de Duke y Cerdeira, 2005).

Herbicida	Cultivo	Año desde el que está disponible
Bromoxinil	Algodón <sup>1</sup>	1995
	Colza <sup>2</sup>	2000
Glufosinato	Colza	1995
	Maiz	1997
	Algodón	2004
Glifosato	Soja	1996
	Colza	1996
	Algodón	1997
	Maiz	1998
	Remolacha <sup>3</sup>	1999

<sup>1</sup>No se utiliza desde 2004

<sup>2</sup>No se utiliza desde 2001

<sup>3</sup>No ha llegado a cultivarse. Desechada desde 2004

Cultivos resistentes al bromoxinil, que bloquea el transporte de electrones en el fotosistema II, se han conseguido mediante la introducción del gen que codifica la nitrilasa obtenido de una bacteria del suelo, *Klebsiella ozaenae*. Este enzima convierte el benzonitrilo en un derivado del ácido benzoico no fitotóxico (ácido 3,5-dibromo-4-motoxibenzoico, Stalker et al., 1996). A pesar de su importancia inicial, cultivos transgénicos resistentes al bromoxinil dejaron de comercializarse en 2004 por razones económicas.

El glifosato es un herbicida no selectivo y de gran eficacia ya que se transloca fácilmente a tejidos metabólicamente activos como los meristemas. Actúa en la ruta del Shikimato, mediante la inhibición de la 5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), reduciendo por tanto la formación de aminoácidos aromáticos y provocando la acumulación de ácido shikimico y otros derivados que no pueden fluir a través de la ruta. La mayoría de cultivos transgénicos resistentes al glifosato como la soja o el algodón, portan el gen CP4 de *Agrobacterium sp.* que codifica una EPSPS altamente resistente al glifosato. En otros casos como la colza la resistencia se ha conseguido mediante la introducción del gen que codifica la glifosato oxidoreductasa encontrado en *Ochrobactrum antropi* (raza LBAA) y que degrada el glifosato a glioxilato y aminometilfosfonato no tóxicos.

También se han conseguido cultivos resistentes al glufosinato, versión sintética de la fosfotricina, mediante ingeniería genética. Este herbicida inhibe la glutamina sintetasa provocando la acumulación de uno de sus sustratos, el ión amonio, e interfiriendo con el metabolismo fotosintético (Lydon y Duke, 1999). La fosfotricina se produce de forma natural por *Streptomyces hygroscopicus* que a su vez se protege de esta toxina inactivándola metabólicamente mediante la fosfotricina-*N*-acetil transferasa (PAT) codificada por los genes *pat* y *bar*. La resistencia a este herbicida conseguida en colza, algodón y maíz se ha conseguido mediante la introducción de estos genes detoxificantes.

Además de los casos mencionados, hay que indicar que se ha logrado transferir genes de resistencia a herbicidas (particularmente los genes *bar* y *pat* de resistencia a glufosinato) a numerosas especies, no buscando un material comercial resistente sino líneas experimentales para uso en investigación. Un caso de gran aplicación práctica, dada la acusación permanente de los ecofundamentalistas de *escape de genes* es el estudio de difusión de polen de plantas transgénicas en condiciones naturales, pues basta aplicar el herbicida en las plantas nacidas de las semillas de las plantas situadas a cierta distancia de la planta transgénica en estudio para estimar la frecuencia de llegada del polen. Es lógico que se hayan transformado plantas modelo como el tabaco y *Arabidopsis thaliana* para investigación básica.

Esos son los casos más conocidos y de los que se han conseguido variedades comerciales de mayor o menor difusión. Se han conseguido, tanto con *Agrobacterium* como con los métodos que se describen a continuación, otras muchas líneas experimentales resistentes a herbicidas (por ejemplo, a paraquat) que por diversas razones no alcanzan la fase comercial.

Por medio de transformación con cañón o acelerador de partículas se ha transferido con éxito siguiendo esta técnica resistencia a glufosinato a maíz, cebada, arroz y caña de azúcar, y a glifosato a maíz.

Finalmente, por absorción directa del ADN por protoplastos se ha conseguido transferir resistencia a glufosinato a arroz y caña de azúcar.

#### 16.7.4. Barajado génico

Como hemos comentado anteriormente la gran cantidad de “basura genética” generada por las mutaciones no deseadas complica y retarda la obtención de las variedades comerciales. La evolución dirigida mediante el barajado génico es una de las alternativas actuales más innovadoras y con la que ya se han conseguido avances en la resistencia a herbicidas. La técnica del barajado génico o “*ADN shuffling*” se basa en la generación de diversidad mediante la recombinación homóloga *in vitro* de un conjunto de genes parentales (homólogos o variantes del mismo gen generadas mediante mutagénesis dirigida) seleccionados por fragmentación aleatoria y reensamblados en un proceso en el que los segmentos homólogos actúan como cebadores recíprocos. La genoteca resultante se escruta según los parámetros deseados y se aísla la progenie que presente las características deseadas, que puede utilizarse como población parental en una nueva ronda de cribado. En el caso de barajado multigénico se consigue aún un mejor resultado ya que se aprovecha la variabilidad natural de los genes de interés, partiendo para el cribado de los genes naturalmente existentes en diversas especies vegetales que codifican enzimas capaces de catalizar el proceso de interés (Benítez, 2005).

Así por ejemplo empleando como parentales los genes *atzA* y *triA* de *Pseudomonas* spp. se han conseguido mediante barajado génico estirpes capaces degradar la triacina eficazmente cuyo gen puede ser introducido en las plantas para conseguir la resistencia al herbicida (Raillard et al., 2001). Recientemente también se han conseguido tolerancia a glifosato en *Arabidopsis*, tabaco y maíz mediante barajado génico. Este herbicida puede ser detoxificado mediante su acetilación. Castle y col. (2004) cribaron una colección de microorganismos y descubrieron enzimas con actividad *N*-acetiltransferasa aunque con propiedades cinéticas insuficientes para conferir tolerancia al herbicida. Tras 11 ciclos de ADN shuffling se consiguió mejorar la actividad enzimática en casi 4 órdenes de magnitud y desde la quinta ronda el enzima confería tolerancia al herbicida

## 16.8. EL USO DE LA RESISTENCIA A HERBICIDAS

### 16.8.1. Críticas de carácter general

La crítica más seria que se le puede hacer al uso de variedades resistentes a herbicidas es que la aplicación reiterada de un mismo compuesto puede favorecer la aparición de biotipos resistentes de malas hierbas. Es la manera en que, salvo casos de tolerancia preexistente, se han originado las resistencias detectadas. Pero esto es algo atribuible no al herbicida sino a una mala aplicación del mismo, es decir, a una mala agricultura: han de diversificarse cultivos y agroquímicos, recuperando las rotaciones preferiblemente largas y, si es posible, utilizar variedades con distintos genes de resistencia a distintos herbicidas.

La decisión más fácil en cuestiones de resistencia a cualquier tipo de estrés biótico (sembrar y aplicar siempre lo mismo) es, como bien se sabe, la más peligrosa, pues es la manera más segura de destruir la eficacia de dicho gen. Parece olvidarse una vez más la experiencia de tantos casos nefastos en el caso de resistencia a enfermedades y la adquisición de resistencia a los plaguicidas más variados en insectos. Los genes de resistencia, sea cual sea el objeto de la misma, son sumamente valiosos como para dejar perder su eficacia por un mal manejo.

Otra crítica con base experimental cierta es que el uso reiterado de un mismo herbicida, si no causa la aparición de resistencia como se ha señalado en el caso anterior, sí puede ocasionar un cambio significativo en el espectro de malas hierbas de la zona de actuación, pues las especies o biotipos que desaparecen dejan paso a otros para los que la molécula aplicada no resulta efectiva. De nuevo hay que insistir en la diversificación de cultivos, variedades y fitoquímicos y diseñar adecuadamente las rotaciones convenientes.

A veces el carácter positivo conlleva por sí mismo el aspecto negativo, como ocurre en los casos de efectos pleiotrópicos. Uno de estos casos es el de resistencia a la triazina; al estar causada por una modificación en el centro activo del fotosistema II, afecta evidentemente al transporte de electrones y a la eficacia fotosintética, ocasionando una disminución en el rendimiento. No es de extrañar el que fueran sustituidos a la larga por otros herbicidas.

Como en muchos otros casos de genes valiosos para un determinado carácter, sobre todo si la transferencia se ha hecho desde materiales silvestres o asilvestrados, pueden ir asociados a caracteres con efectos negativos ya que la selección natural ha ido fijando por ligamiento bloques génicos difíciles de romper por recombinación, al menos a corto plazo, pues la aplicación reiterada del retrocruzamiento ha dado casi siempre resultados positivos. Es evidente que tal problema puede soslayarse por medio de ingeniería genética, pero para ello hay que identificar el gen

responsable de la resistencia, aislarlo, clonarlo y transferirlo. Un largo camino si el gen de resistencia se localiza en una planta superior (aunque, sin embargo, se hizo para el glifosato desde *Petunia*). No es extraño que los genes utilizados hasta ahora en los cultivos comerciales transgénicos de mayor éxito procedan de microorganismos (véase más arriba), cuyas rutas metabólicas se conocen mucho mejor que las de plantas superiores.

En todo caso, el gran número de genes de resistencia encontrados hasta ahora en la Naturaleza es demasiado grande como para ser olvidado. No es necesario, además, pensar exclusivamente en ingeniería genética; los métodos convencionales, auxiliados por nuevas herramientas (por ejemplo, la selección asistida por marcadores), ofrecen muchas soluciones. Existen por tanto, material y métodos suficientes para conseguir variedades aptas para una agricultura eficaz y, al mismo tiempo, respetuosa con el ambiente.

### 16.8.2. Caso de las variedades transgénicas

La resistencia transgénica a herbicidas en variedades cultivadas de maíz, soja, algodón y colza fue acogida favorablemente por los agricultores de EEUU y Canadá desde su comienzo. Entre los factores que contribuyeron a dicha disposición favorable destacan: (1) el uso directo cuando surge el problema, evitando los herbicidas de preemergencia y disminuyendo, por tanto, el impacto ambiental; (2) la mayor facilidad de aplicación y menor consumo de energía en el proceso; (3) una mayor facilidad para el laboreo mínimo al evitarse los herbicidas de aplicación en suelo y (4) el rendimiento económico es mayor que en el caso de variedades convencionales.

Al comienzo de su difusión comercial, las críticas a su uso procedían de varios puntos de vista diferentes:

- (1) Que se incrementaría la aplicación del herbicida, lo que se ha demostrado no solo rotundamente falso; de hecho, el consumo de los herbicidas críticos ha disminuido en los países que han aceptado las variedades transgénicas.
- (2) Que se produciría un *escape de genes* hacia las especies silvestres en el ambiente circundante, cosa sólo posible en especies alógamas. Esta crítica, común a todas las variedades modificadas por ingeniería genética, ha sido debatida suficientemente en todos sus aspectos (p.ej., Cubero, 2003). Cabe mencionar aquí:
  - (a) que sólo puede ocurrir tal *escape* cuando existan especies silvestres que se puedan cruzar con la cultivada;
  - (b) que el gen *escapado* sólo tendría posibilidades de éxito cuando tuviera alguna ventaja selectiva, y es difícil pensar cuál sería tal ventaja en el caso de un gen de resistencia a un herbicida en plena naturaleza sin contacto con tratamientos de dicho herbicida;
  - (c) que el mismo *escape* se produciría en el caso de variedades resistentes obtenidas por procedimientos clásicos (véase más arriba) sin que exista ninguna crítica respecto a ellas;
  - (d) que, de hecho, existe el *escape* desde el mismo origen de la agricultura, y si esto ha modificado el ambiente, no parece haber sufrido efectos negativos pues nadie se ha percatado de ello hasta ahora;

- (e) que en el caso de que existan especies silvestres relacionadas, el flujo génico puede medirse y de hecho se ha medido (con frecuencia se han empleado los genes *bar* y *pat* de resistencia a glufosinato de amonio para ello), resultando tasas despreciables incluso entre especies próximas;
- (f) y, finalmente, que siempre se pueden establecer medidas de protección, como se hace desde mucho antes de la llegada de la ingeniería genética para la producción de semilla certificada, y prácticas de “buena agricultura”, como se hace el en caso del maíz Bt resistente a taladro.
- (3) Si el escape ocurre no hacia al medio natural sino hacia variedades convencionales de la misma especie (sólo posible asimismo en especies alógamas), estas últimas pueden “contaminarse” (la terminología es ecofundamentalista, aunque ha sido lamentablemente utilizada en la normativa europea sobre organismos modificados genéticamente), lo que ha dado origen a la última batalla planteada contra las variedades transgénicas de todo tipo: la *coexistencia* entre éstas y las convencionales. El problema, asimismo resuelto para la semilla certificada con mucha antelación a la existencia de la ingeniería genética, se evita estableciendo distancias mínimas entre cultivos colindantes y/o barreras entre ellas. Existe un sinfín de estudios experimentales relativos al maíz Bt y algunos a la colza, demostrando la facilidad de establecer tales distancias.

Hay que señalar que la existencia de los transgenes en el material comercializado se ha probado inocua en todos los sentidos para la alimentación y el medio ambiente. Si en el futuro existiera algún caso en que no fuera así, habría que tomar las medidas oportunas o, incluso, retirar el producto antes de su salida al mercado, como se hizo en el caso de las líneas experimentales de soja que había recibido un gen de palmera brasileña para incrementar su proporción de aminoácidos azufrados que resultó ser un agente alergénico.

Vale la pena indicar una posible fuente de complicaciones aunque, hasta ahora, no se haya hecho realidad. La introducción por ingeniería genética de un gen de resistencia proveniente de otra especie convierte la planta transgénica en un *heterocigoto estructural*, pues el gen anterior de susceptibilidad sigue en su lugar de origen, distinto del de inserción del nuevo gen. Esa situación puede crear una interacción génica indeseable. Posiblemente, la solución más factible hoy en día sería el silenciamiento del gen original; también cabría la inserción por recombinación homóloga, de estar puesto a punto el protocolo experimental, o sobreexpresar la acción del gen de resistencia. Pero en cualquier caso se complicaría el proceso de obtención de una variedad comercial.



## REFERENCIAS

- Benítez, A. (2005). *Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas*. Editorial Reverté S.A. Barcelona. España.
- Castle, L.A., Siehl, D.L., Gorton, R., Patten, P.A., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H., Duck, N., Wong, J., Liu, D. and Lassner, M.W. (2004). Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. *Science* 304: 1151 – 1154.
- Cubero, J.I. (2001). *Introducción a la Mejora Genética Vegetal*. Ed. Mundi Prensa, Madrid, España.
- De Prado, R., Cubero, S. y Osuna M.D. (2001). Pp 261-274, en R. De Prado y J.V. Jorrín (eds.). *Uso de herbicidas en la Agricultura del siglo XXI*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, España.
- Devine, M.D. (2001). Herbicide-resistant crops: advantages and limitations. pp. 395-401, en R. De Prado y J.V. Jorrín (eds.), *Uso de herbicidas en la Agricultura del siglo XXI*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, España.
- Duke, S.O. and Cerdeira A.L. (2005). Potential environmental impact of herbicide-resistant crops. *Coll. Biosafety Rev.* 2: 66-143
- Gressel, J. (2000). Molecular biology of weed control. *Transgenic Res.* 9:355-382
- Hall, J.C., Donnelly-Vanderloo, M.J. and Hume, D.J. (1996). Triazine-resistant crops: The agronomic impact and physiological consequences of chloroplast mutation. pp. 107-126, in S. O. Duke (ed). *Herbicide-Resistant Crops*. CRC Press, Boca Ratón, FL, EEUU.
- Hatzios, K.K. (2001). Mechanisms of resistance to herbicides. pp. 275-287, en R. De Prado y J.V. Jorrín (eds.). *Uso de herbicidas en la Agricultura del siglo XXI*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, España.
- Lydon, J., and Duke, S.O. (1999). Inhibitors of glutamine biosynthesis. pp. 445-464, in B.K. Singh (ed). *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker, New York, EEUU.
- Nadal, S., Moreno, M.T., Rubiales, D. y Cubero, J.I. (2001). Efectos de diferentes dosis de glifosato en el control de jopo y en la producción de "Retaca", un cultivar de haba hortícola de crecimiento determinado. pp. 553-555, en R. De Prado y J.V. Jorrín (eds.). *Uso de herbicidas en la Agricultura del siglo XXI*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, España.
- Navas-Palmero, J.A. (2007). *Phalaris paradoxa*: identificación de resistencia herbicidas inhibidores de la acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa). Trabajo Profesional Fin de Carrera, ETSIAM, Córdoba, España.
- Osuna, MD., De Prado, J.L. y De Prado R. (2001). Resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa en España. pp 289-298, en R. De Prado y J.V. Jorrín (eds.). *Uso de herbicidas en la Agricultura del siglo XXI*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, España.
- Osuna, M.D., Ruiz, A.M. y De Prado, R. (2001). Resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS en España. pp 299-306, en R. De Prado y J.V. Jorrín (eds.) *Uso de herbicidas en la Agricultura del siglo XXI*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, España.



- Raillard, S., Krebber, A., Chen, Y., Ness, J.E., Bermudez, E., Trinidad, R., Fullem, R., Davis, C., Welch, M., Seffernick, J., Wackett, L.P., Stemmer W.P. and Minshull, J. (2001). Novel enzyme activities and functional plasticity revealed by recombining highly homologous enzymes. *Chem. Biol.* 8:891-898.
- Retzinger, E.J. and MallorySmith, C. (1997). Classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. *Weed Technol.* 11: 384-393.
- Saari, L.L. and Mauvais, C.J. (1996). Sulfonyurea herbicide-resistant crops. pp. 127-142, in S.O. Duke (ed). *Herbicide-Resistant Crops*. CRC Press, Boca Ratón, FL, EEUU.
- Salas, M., (2001). Resistencia a herbicidas. Detección en campo y laboratorio. pp. 251-260, en R. De Prado y J.V. Jorrín (eds.). *Uso de herbicidas en la Agricultura del siglo XXI*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, España.
- Sherman, T.D., Vaughn, K.C. and Duke, S.O. (1996). Mechanisms of action and resistance to herbicides. pp. 13-35, S.O. Duke (ed). *Herbicide-Resistant Crops*. CRC Press Boca Ratón, FL, EEUU.
- Smeda, R.J. and Vaughn, K.C. (1994). Resistance to dinitroaniline herbicides. Pp 215-228, in Poeles, S.B. Holtum, J.A.M. Lewis (eds.). *Herbicide Resistance in Plants*. Boca Ratón, FL., EEUU.
- Somers, D.A. (1996). Aryloxyphenoxypropionate- and cyclohexanedione- resistant crops. pp. 175-188, in S.O. Duke (ed). *Herbicide-Resistant Crops*. CRC Press Boca Ratón, FL, EEUU.
- Stalker, D.M., Kiser, J.A., Baldwin, G., Coulombe, B. and Houck, C.M. (1996). Cotton weed control using the BXN™ system. pp. 93-105, in S.O. Duke (ed). *Herbicide-Resistant Crops*. CRC Press Boca Ratón, FL, EEUU.
- Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K. and Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: History, current status, and future. *Pest Manag. Sci.* 61: 246-257.
- Zhu, T., Mettenburg, K., Peterson, L. and Baszczyński, C.L. (2000). Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Biotech.* 18: 555-558.



CAPÍTULO **17**

---

**SELECCIÓN IN VITRO  
PARA ESTRESSES  
ABIÓTICOS**

*José Luis Couelo*

*Ana M. Vieitez*

*Antonio Ballester*



## SELECCIÓN IN VITRO PARA ESTRESSES ABIÓTICOS

---

José Luis Couselo, Ana M. Vieitez y Antonio Ballester

**Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC**

**Apartado 122, 15080 Santiago de Compostela. E-mail: [aballester@iiag.cesga.es](mailto:aballester@iiag.cesga.es)**

---

### 17.1. INTRODUCCIÓN

Los estreses abióticos, como salinidad, sequía, temperaturas extremas, toxicidad química, etc., son la causa primaria de la pérdida del 50% de los cultivos en todo el mundo (Bray et al., 2000). Las respuestas de las plantas a estos tipos de estreses provocan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan de forma negativa al crecimiento de las plantas y a su productividad y mediante programas específicos de mejora vegetal se trata de conseguir el desarrollo de plantas capaces de soportar el efecto adverso de los estreses abióticos.

El cultivo in vitro de tejidos vegetales es una herramienta que se utiliza no sólo en la propagación clonal a gran escala de especies con características determinadas sino también en la generación de variabilidad genética mediante procesos como el de la variación somaclonal, la mutagénesis in vitro, el desarrollo de haploides e híbridos somáticos, el rescate de embriones y la transformación genética (Dita et al., 2006). El uso del cultivo in vitro en la selección para estreses abióticos proporciona, de forma fundamental, variabilidad y esta variabilidad debe ser explotada en toda su amplitud en los programas de mejora convencional. Por tanto, la correcta identificación de la variabilidad originada bajo condiciones de in vitro, es un aspecto importante al objeto de evitar la posible eliminación de material valioso que podía integrarse en los programas clásicos de mejora (Zhu et al., 2000). Para que pueda aplicarse con eficacia, es condición necesaria que el cultivo in vitro de tejidos vegetales sea capaz de regenerar plantas completas que puedan ser aclimatadas y cultivadas en el exterior. Desgraciadamente, hay especies (entre ellas muchas leguminosas, especies leñosas, etc.) que son realmente recalcitrantes a la regeneración, un proceso que aún hoy en día se basa en aproximaciones empíricas por combinación de diferentes medios de cultivo, reguladores de crecimiento, pH del medio, condiciones ambientales de crecimiento, etc. Sin embargo, sin un sistema de regeneración apropiado y que esté bien definido, la aplicación de las técnicas de selección in vitro (independientemente del tipo de estrés que se estudie) podrían ser totalmente ineficaces.

La selección in vitro se utilizó con profusión en los años 80 pero no llegaron a desarrollarse cultivares resistentes o tolerantes a estreses abióticos que fueran utilizados por los agricultores (Rowland et al., 1989). Posiblemente este hecho sea consecuencia del carácter multigénico de las respuestas de las plantas al estrés abiótico, al contrario de lo que sucede en el caso del estrés biótico, dependiente en muchos casos de caracteres monogénicos. Las complejas respuestas genéticas del estrés abiótico son difíciles de controlar, por ello, el uso de variantes dentro de los programas de mejora (Zhu et al., 2000; Flowers, 2004) y la transformación genética pueden ser de gran ayuda y parecen ser los caminos más prometedores (Vinocur y Altman, 2005).

Se describen a continuación algunas de las técnicas del cultivo in vitro de tejidos vegetales que pueden utilizarse en la selección de variantes para estreses abióticos.

## 17.2. VARIACIÓN SOMACLONAL

El término de variación somaclonal fue acuñado por Larkin y Scowcroft (1981) para explicar la variación que se genera en el cultivo de células somáticas, en las plantas regeneradas y en sus progenias. Según sea el origen de las células o los tejidos cultivados la variación puede tener diferentes nominaciones: la variación protoclonal (producida por el cultivo de protoplastos), variación gametoclonal (anteras y microsporas), variación calliclonal (callos), variación mericlinal (meristemas apicales), variación somaclonal (mediante el cultivo de hojas, tallos, raíces u otros tejidos somáticos). La variación somaclonal puede inducirse por diferentes métodos, entre los que se incluyen:

- I) el cultivo de callos y suspensiones celulares durante varios ciclos;
- II) mediante la regeneración de un gran número de plantas derivadas de cultivos desarrollados durante largos períodos de tiempo;
- III) sometiendo los cultivos a tratamientos de estrés tanto abiótico como biótico;
- IV) mediante la multiplicación durante largos ciclos de especies que pueden originar variantes.

La variación es impredecible y puede ser heredable (genética) o no heredable (epigenética). No se conoce si la variación somaclonal es el resultado de la existencia de diferencias genéticas en algunas células somáticas o es inducida por componentes específicos del medio de cultivo. El desarrollo de variación somaclonal está asociado a mutaciones puntuales, reordenamiento y recombinación cromosómica, metilación del DNA, alteración en el número de secuencias, etc. y parece estar influenciada por el genotipo, el tipo de explanto, el medio de cultivo, la edad de la planta de donde se iniciaron los cultivos, etc. (Veilleux y Jonson, 1998). La especie vegetal y el número de subcultivos al que se someten los explantos durante el cultivo in vitro son otros aspectos que afectan al proceso. El propio sistema de cultivo puede actuar como un sistema mutagénico ya que las células pasan por una experiencia traumática una vez que son aisladas y pueden reprogramarse durante la regeneración de una forma diferente a como lo hacen en condiciones naturales. La reprogramación de eventos puede crear un amplio rango de variación epigenética (Jain, 2000) y aunque la variación somaclonal es difícil de controlar, hay especies (por ejemplo plantas solanáceas) que tienen una mayor tendencia a producirla; el tipo de cultivo afecta de forma notable a la variación: el cultivo de células aisladas o callos no diferenciados es más proclive a la variación que el cultivo de meristemas ya formados (yemas apicales y axilares) y la reducción del número de subcultivos reduce también la probabilidad de la inducción de variabilidad. Es posible que una combinación de las condiciones del cultivo y los factores genéticos den como resultante la aparición de la variación somaclonal (Brar y Jain, 1998).

Aunque la naturaleza heredable de la variación somaclonal se ha puesto de evidencia, también puede existir, como hemos dicho, la variación debida a cambios epigenéticos. La tecnología del cultivo in vitro no ha sido incorporada rutinariamente a los programas de mejora ya que algunos investigadores temen que la ocurrencia incontrolada de la variación somaclonal pueda arruinar sus valiosos stocks genéticos. Sin embargo, un mejor control y conocimiento de los mecanismos de la variación somaclonal puede ser de gran ayuda en los programas de mejora por la gran variabilidad que se origina a través del proceso (Jain, 2001).

El control y aprovechamiento de la variación somaclonal tienen a día de hoy un apoyo notable en el uso de las técnicas moleculares que permiten una identificación eficaz de los somaclones. Aparte los caracteres morfológicos, los marcadores bioquímicos (isoenzimas) y/o moleculares (RAPD, SSR, RFLP, AFLP, etc.) pueden ser utilizados en los programas de mejora a través de la selección asistida por marcadores.

Entre las posibilidades que ofrece la existencia de la variación somaclonal pueden citarse el aumento de la variabilidad genética de caracteres agronómicos, la posibilidad de hacer una selección de somaclones in vitro, el desarrollo de germoplasma élite y nuevos cultivares comerciales, el aumento de la introgresión de genes foráneos en especies cultivadas y la mejora de plantas ornamentales. Por el contrario también se han identificado algunas desventajas entre las que pueden citarse la pobre capacidad de regeneración de cultivos viejos (muchos años de subcultivos), la capacidad de regeneración es restringida y no es factible en todos los genotipos, algunos somaclones son inestables después de los cruzamientos convencionales, algunos desarrollan características indeseables como aneuploidía, esterilidad, etc., muchas veces la variación obtenida no es novedosa y, finalmente, la variación somaclonal es difícil de predecir (Brar y Jain, 1998).

La investigación futura debería dirigirse a descifrar los mecanismos que regulan la variación somaclonal, de tal forma que, por una parte, puedan producirse somaclones deseables y, por otra, pueda minimizarse la variación somaclonal durante la propagación clonal y durante el desarrollo de plantas transgénicas. Debería darse un impulso especial para tratar de aislar un mayor número de somaclones con uno o dos cambios en los caracteres deseados que, por otra parte, estén ausentes en cultivares bien adaptados de cultivos importantes. También sería interesante explorar la variación somaclonal en especies que se propagan vegetativamente, especialmente aquellas que tienen una base genética muy estrecha y aquellas que son difíciles de mejorar mediante los sistemas convencionales de mejora.

### 17.3. MUTAGÉNESIS

La mayoría de la variación genética explorada en programas de mejora ha ocurrido de forma espontánea y esta variabilidad suele almacenarse en colecciones de germoplasma. Sin embargo, cuando estas colecciones no facilitan un alelo determinado o la especie que porta el carácter deseado está filogenéticamente muy distante para utilizar en los programas de mejora, las mutaciones inducidas suministran una herramienta muy útil en el desarrollo de caracteres deseados. Alrededor de 2385 variedades mutantes se han liberado de forma oficial, el 70% fueron liberadas como mutantes directos y el 30% después de un programa de cruzamientos (Maluszynski et al. 2000). La mutagénesis causa cambios aleatorios en el DNA nuclear o en los orgánulos citoplásmicos originando mutaciones a nivel de secuencia, cromosomas o del genoma (deleciones, translocaciones, duplicaciones, aneuploidía, etc.), creando de esta forma la correspondiente variabilidad (Donini y Sonnino, 1998).

Aunque las semillas son las dianas más comunes en los tratamientos mutagénicos, el cultivo in vitro de microsporas y posterior conversión en embriones somáticos es el método más utilizado en cultivo in vitro. Dirigiendo el tratamiento de mutagénesis a células gaméticas aisladas y posteriormente induciendo embriogénesis y la producción de plantas doble haploides, es posible el desarrollo directo de mutantes homocigotos (Szarejko y Foster, 2006). Se evita así el efecto de enmascaramiento de quimeras posibilitando la expresión e identificación de caracteres recesivos y dominantes en las células, tejidos y plantas haploides. Los tratamientos de mutagénesis pueden ser físicos (radiación ionizante, UV) o químicos (etil-metil-sulfonato, EMS, derivados nitrosos, azidas), los primeros ofrecen menos riesgos al manipulador que los segundos, que suelen ser compuestos tóxicos y cancerígenos.

Las microsporas son la fuente ideal de la inducción de mutagénesis in vitro pero también se han utilizado otros tejidos haploides, células, órganos, explantos. En una reciente revisión, se puede encontrar un resumen de las técnicas de mutagénesis utilizadas en diferentes especies (Szarejko y Foster, 2006). Estas técnicas suelen estar estrechamente relacionadas con el desarrollo de haploides, doble haploides y posterior selección in vitro, ya que una de las mayores dificultades de la aplicación de la mutagénesis es el gran número (miles) de líneas embriogénicas mutantes que suelen generarse en cada proceso. En otros muchos casos y en plantas propagadas vegetativamente, la mutagénesis es eficaz mediante la irradiación de cultivos in vitro a gran escala suministrando una herramienta sencilla, rápida y eficiente en la mejora de especies hortícolas (Ahloowalia, 1998).

#### **17.4. CULTIVO DE ANTERAS Y MICROSPORAS. PRODUCCIÓN DE HAPLOIDES. RESCATE DE EMBRIONES Y FUSIÓN DE PROTOPLASTOS**

Los haploides son plantas autónomas, esporofíticas que tienen el número cromosómico gametofítico ya que se originan a partir de una célula gamética en el saco embrionario o en el polen. El embrión haploide puede derivar de una célula huevo (gimnogénesis), de una célula gametofítica distinta de la célula huevo (apogamia) o de un gameto masculino (androgénesis). Puede también originarse a partir del núcleo de la microspora antes de la primera mitosis del grano de polen, cuando el polen o las anteras se cultivan in vitro (Khus y Virmani, 1996). La tecnología de doble haploides se refiere, fundamentalmente, al uso del cultivo in vitro de anteras y microsporas para la obtención de embriones haploides que, mediante técnicas de duplicación cromosómica, pueden convertir los haploides estériles en líneas fértiles, homocigotas. Por tanto, esta tecnología ofrece a los mejoradores una herramienta eficaz para la producción de líneas homocigotas que pueden multiplicarse y liberarse como cultivares o usarse como líneas recombinantes en los programas de mejora. Una eficiente producción de doble haploides puede reducir de forma notable el tiempo y los costos del desarrollo de un cultivar y se han generado mediante esta tecnología algunas variedades mejoradas con respecto a algún tipo de estrés (Qian et al., 2000). Ya que esta metodología depende del cultivo de tejidos, su aplicación sólo es de interés en aquellas especies/genotipos que muestran una eficaz capacidad de regeneración. Por otra parte, y puesto que todas las líneas homocigotas no tienen porque ser de interés, se hace necesario realizar una selección posterior para elegir los individuos portadores de caracteres deseados. Actualmente, además de los sistemas de selección in vitro se han producido grandes avances en los métodos de selección asistida por marcadores moleculares.



En general, las plantas haploides se regeneran a partir de las microsporas que contiene la antera y aunque la tecnología se utiliza ampliamente, los mecanismos involucrados en el proceso no son del todo conocidos. Debe evitarse, por ejemplo, la formación de callo como una etapa previa a la embriogénesis a fin de evitar, en lo posible, la aparición de variación gametoclinal. El cultivo de microsporas aisladas tiene sus ventajas sobre el cultivo de anteras ya que, eliminando la pared de la antera, se pueden evitar los posibles efectos de tejidos esporofíticos. Más de 1000 embriones por mililitro pueden producirse a partir de cultivos de microsporas a alta densidad una vez sincronizados y, puesto que no existe tejido esporofítico, los componentes del medio de cultivo y los distintos tratamientos inciden directamente sobre las microsporas. En un medio rico en sacarosa las microsporas aisladas derivan en granos de polen maduro y fértil, mientras que bajo tratamientos de estrés, las microsporas inducen la embriogénesis y los granos de polen inmaduro, después de una transferencia a un medio rico en componentes, desarrollan embriones (Foster et al., 2007). Cualquier forma de estrés es necesario para inducir embriogénesis mediante el cultivo de microsporas. Como una especie de estrategia de supervivencia, el cultivo de microsporas, comprometido a desarrollarse en granos de polen, deja la vía gametofítica y toma el modo esporofítico de desarrollo produciendo embriones haploides o doble haploides y plantas completas (Shariatpanahi et al., 2006). Plantas haploides de cereales, derivadas del cultivo de microsporas, tienen con frecuencia un carácter albino aunque es posible reducir su número controlando las condiciones de cultivo u otros factores ambientales (Cistué y Kasha, 2006). Por otra parte, mediante gimnogénesis (cultivo de las células haploides del gametofito femenino, usualmente la célula huevo no fertilizada) es posible también el desarrollo de embriones haploides. El proceso, que inicialmente no necesita un pretratamiento de estrés para su inducción, sí requiere de un tratamiento de duplicación cromosómica para producir doble haploides (Foster et al., 2007).

El éxito en el cultivo de anteras y microsporas está relacionado con el genotipo de la planta donadora, las condiciones de crecimiento de estas plantas donadoras, el estado del desarrollo de la microspora, el pretratamiento al que se ha sometido el material antes de su puesta en cultivo (generalmente un tratamiento de estrés) así como el medio y las condiciones del cultivo. Para una primera y exhaustiva información sobre los aspectos fundamentales y las aplicaciones de la producción de plantas haploides mediante técnicas in vitro se remite al lector a consultar la serie de 3 volúmenes: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants* (SM Jain, SK Sopory y RE Veilleux, editores), publicada por Kluwer Academia Publishers (1996).

También pueden producirse embriones haploides en plantas después de polinización entre especies distantes y aunque los mecanismos involucrados no se conocen, en la mayoría de los casos tiene lugar una doble fertilización formando un cigoto híbrido y un endosperma. Después de la división celular en el cigoto, se eliminan los cromosomas paternos originándose un embrión haploide; el endosperma también sufre eliminación cromosómica y normalmente aborta antes del desarrollo de la semilla. Como consecuencia, debe utilizarse la técnica del rescate de los embriones antes de su aborto para que puedan cultivarse in vitro y regenerarse plantas a partir de ellos. Utilizando esta técnica es necesaria también la adición de tratamientos químicos para la duplicación cromosómica y el desarrollo de plantas doble haploides (Foster et al., 2007). Caracteres relacionados con la tolerancia a estrés abiótico disponible en germoplasma de especies salvajes podrían, utilizando esta metodología, introducirse en especies de interés agronómico. El uso del rescate de embriones se ha desarrollado con éxito en la producción de algunos híbridos interespecíficos habiéndose llevado a cabo algunos ensayos de tolerancia a estrés (Tonguc y Griffiths, 2004).

Una alternativa al empleo de los híbridos obtenidos por técnicas convencionales entre especies alejadas es el uso de la hibridación somática mediante la fusión de protoplastos. Esta tecnología tiene una aplicación potencial en la mejora ya que puede traspasar la incompatibilidad sexual o las barreras reproductivas generando nuevas combinaciones nucleares o citoplásmicas. Sin embargo ocurre con frecuencia una pérdida de cromosomas útiles o incorporación de cromosomas no deseables en el producto final de la fusión; además, la aneuploidía de los híbridos somáticos derivados de fusiones simétricas o asimétricas tiene un efecto negativo sobre los híbridos debido a su baja fertilidad y desarrollo aberrante y anormal (Liu et al., 2006). Una dificultad añadida que suele tener esta técnica es la baja capacidad de regeneración de plantas completas a partir del cultivo de protoplastos, aspecto que se ha observado en muchas de las especies ensayadas.

### 17.5. SELECCIÓN IN VITRO

La variación somaclonal sólo es evidente cuando las plantas regeneradas expresan modificaciones fenotípicas o citológicas. Desde un punto de vista práctico, la frecuencia de la variación somaclonal debería ser alta para poder seleccionar caracteres deseables y las líneas generadas deberían desarrollarse bien bajo diferentes regímenes medioambientales. La selección en condiciones de campo necesita algunos años y diferentes generaciones para que los mejoradores puedan seleccionar por caracteres deseados. La selección in vitro puede acortar considerablemente el tiempo de selección ya que los cambios ambientales del cultivo son mínimos bajo estas condiciones y de esta manera se puede ahorrar tiempo en el desarrollo de líneas resistentes a estreses abióticos bien entendido que los variantes seleccionados deberán ser ensayados en campo para confirmar la estabilidad genética y la funcionalidad del carácter seleccionado. Además, las líneas resistentes a estrés derivadas de procesos de mejora convencional o de los programas de transformación genética, pueden ser estudiadas mediante la selección in vitro y esto es particularmente atractivo para algún estrés abiótico donde los métodos convencionales de selección son poco eficientes. La variación somaclonal y la mutagénesis in vitro seguidos de una selección eficaz pueden ser un complemento interesante en los programas de mejora convencional.

Cualquier experimento de selección in vitro debe apoyarse en ensayos apropiados que faciliten la medida de la resistencia o tolerancia obtenida. Estos ensayos deben ser reproducibles, sencillos y ofrecer la máxima eficacia y una dependencia mínima de factores ambientales y su eficacia debe basarse en los resultados obtenidos a través del estudio de muchos genotipos. En los ensayos de selección deberían incluirse tanto tejidos diferenciados como hojas, tallos y raíces y tejidos desdiferenciados como callos, suspensiones celulares o protoplastos, lo que permitiría determinar si la expresión de un carácter determinado es comparable a nivel celular, de callo o de órgano. Existe la controversia sobre si la selección debe hacerse antes o después de la regeneración de la planta completa, pero eso dependerá de la capacidad disponible para evaluar el mayor número de individuos con el mínimo esfuerzo y la máxima eficacia. La selección in vitro ofrece la posibilidad de evaluar miles de individuos en una placa Petri, pero el número de plantas regeneradas después de una fuerte presión de selección, es limitado. Por eso, a veces, es preferible hacer el proceso de selección después de la regeneración. Cuando se dispone de un agente selectivo adecuado y bien definido, la selección in vitro es altamente recomendable, en caso contrario la evaluación de los regenerantes es la opción más aconsejable (Remotti, 1998).

Dentro de los estreses abióticos, la salinidad ha sido el más estudiado mediante selección in vitro (Zair et al., 2003). Para ello, cultivos de células aisladas o de callos se someten a concentraciones salinas elevadas bien durante un período corto de tiempo o durante un cierto número de subcultivos. Algunos autores estiman que la selección durante el primer subcultivo podría ser la mejor estrategia para evaluar la tolerancia a salinidad o a cualquier otro tipo de estrés ya que una exposición prolongada podría promover la adaptación al estrés y las plantas regeneradas podrían no mostrar la tolerancia deseada (Santos et al., 2000).

## 17.6. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Excepto en casos puntuales (*Arabidopsis*) los sistemas de transformación genética tienen su sustento en el cultivo in vitro de tejidos vegetales. Antes de iniciar cualquier proyecto de transformación es necesario disponer de un sistema eficaz y reproducible que permita la regeneración completa de las plantas transformadas. Sin este sistema, sólo se conseguirá estudiar el efecto de la inserción de los genes a nivel celular pero no podrá explotarse todo el potencial que esta tecnología puede suministrar a nivel aplicado. Para la transformación genética (mediante métodos tan conocidos como son los métodos biolísticos o mediante co-cultivo con suspensiones de *Agrobacterium*), se han utilizado meristemos ya formados (yemas apicales o axilares), células aisladas, callos en suspensión, microsporas y protoplastos y embriones somáticos. El uso de meristemos ya formados tiene la gran ventaja de que la regeneración de plantas completas no es, en la mayoría de los casos, difícil. Sin embargo, tiene la gran desventaja de la inestabilidad de los transgenes y de la formación de un gran número de quimeras. Mejor alternativa parece a día de hoy la transformación a partir del cultivo de entrenudos o secciones de hojas o raíces, que bajo ciertas condiciones y en determinadas especies, permite el desarrollo de brotes adventicios transformados. El problema reside en que el proceso organogénico por esta vía no es factible en muchas especies. La utilización del cultivo de células aisladas o callos en suspensión es otra alternativa aunque ya se ha mencionado anteriormente que se puede producir variación somaclonal, no deseable, en este tipo de cultivos. Sin duda el sistema de embriogénesis somática parece ser, a día de hoy, el más eficaz para utilizar en los sistemas de transformación genética. La selección del tipo de explanto es de gran importancia ya que se ha observado que los embriones somáticos en estado globular o cotiledonar temprano tienen un mayor número de células embriogénicas en división que en estadios de desarrollo posteriores, como el cotiledonar (Yeung, 1995). El genotipo de las líneas embriogénicas es otro factor a tener en consideración (Corredoira et al., 2007).

La transformación genética se está utilizando en la búsqueda de tolerancia a estreses abióticos y posiblemente compita con ventaja con los sistemas clásicos de mejora debido al carácter poligénico de la tolerancia y a la falta de fuentes naturales de tolerancia apropiadas (Foolad, 2004).

Todas las tecnologías basadas en el cultivo in vitro de células, órganos o tejidos vegetales utilizadas para la selección para estreses abióticos se están empleando en mayor o menor grado. Sin embargo debe recordarse que estas tecnologías deben emplearse como etapas intermedias en un proceso de mejora genética pues ningún carácter de resistencia o tolerancia ha de seleccionarse, de forma definitiva, a nivel del cultivo in vitro. La transmisión del carácter a la descendencia y los estudios agronómicos correspondientes determinarán de forma definitiva la eficacia de la mejora en la producción final.

A continuación se exponen algunos ejemplos concretos sobre el uso de la tecnología del cultivo in vitro de tejidos vegetales en la selección de variantes para estreses abióticos.

### 17.7. TOLERANCIA A SALINIDAD

La selección *in vitro* se aplicó de forma rutinaria en los años 80 del siglo pasado para la consecución de cultivos tolerantes a salinidad, pero en aquella época no fue posible la liberación de cultivares apropiados para los agricultores (Flowers, 2004). A pesar de ello, se han conseguido algunos avances. Zair et al. (2003) concluyen que la regeneración de plantas a partir del cultivo de callos bajo elevadas concentraciones de ClNa puede ser un método válido de selección a salinidad. Por otra parte, el cultivar de arroz Pokkali es altamente tolerante a salinidad, produce una cosecha baja pero, a través del cultivo de células en suspensión, ha sido posible la inducción de variación somaclonal, identificados algunos variantes como agrónomicamente mejorados y algunos de ellos capaces de retener elevada tolerancia a salinidad. El somaclón TCCP 266-2-49-B-B-3 es un parental muy popular que ha producido líneas altamente productivas y tolerantes. El desarrollo de estas líneas (a través de hibridación y selección) suele llevar un promedio de 8-10 años pero este período puede acortarse con el cultivo de anteras (líneas AC). Algunas de estas líneas se generaron en 3 años, la mayoría de ellas se utilizaron como parentales en los programas de mejora en diferentes países y una de ellas (IR51500-AC11-1) fue la primera línea AC liberada como el primer cultivar de arroz recomendado para el cultivo en condiciones adversas (Gregorio, 2002; Senadhira et al., 2002).

A pesar del gran esfuerzo llevado a cabo en la sobre-expresión de genes que puedan conferir tolerancia a salinidad, no es posible concluir en este momento que se hallan obtenido cultivares auténticamente tolerantes mediante transformación genética (Cuartero et al., 2006). Según estos autores, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en plantas modelo (*Arabidopsis*, tabaco) y trasladar los resultados obtenidos a plantas de interés agronómico no es sencillo. En muchas ocasiones, la evaluación de las plantas transgénicas tiene lugar mediante condiciones de *in vitro* y, aunque suele existir alguna relación entre la tolerancia *in vitro* a nivel de callo y de las plantas crecidas en invernadero, la selección *in vitro* debe tomarse sólo como un criterio de pre-selección y no como el único criterio para determinar el grado de tolerancia a salinidad en las plantas transformadas (Cuartero et al., 2006).

### 17.8. TOLERANCIA A TEMPERATURA Y SEQUÍA

Se han utilizado diferentes aproximaciones *in vitro* para la selección de cultivares tolerantes a temperaturas elevadas. El más sencillo es la evaluación de la germinación de los granos de polen y el crecimiento del tubo polínico *in vitro* y la selección de genotipos tolerantes. Esta técnica ha sido empleada en cacahuete y pimiento (Kakani et al., 2002; Reddy y Kakani, 2007) y algodón (Kakani et al., 2005; Liu et al., 2006), en este último caso los autores relacionaron los datos de temperatura con la retención de las cápsulas de las plantas crecidas al exterior. En el estudio se utilizaron modelos de regresión lineales y no lineales comúnmente utilizados en la respuesta del desarrollo de las plantas a los cambios de temperatura.

Por el contrario, para la obtención de plantas tolerantes a bajas temperaturas se ha descrito recientemente otra aproximación en colza, mediante la producción de mutantes generados a partir de radiación UV de microsporas cultivadas *in vitro* y posterior selección *in vitro* mediante análisis bioquímicos de moléculas señal como ácido salicílico, ácido jasmónico, etc. Posteriormente las plantas haploides mutantes seleccionadas fueron tratadas con colchicina para la obtención de doble haploides que finalmente fueron evaluadas en campo y seleccionadas las líneas más tolerantes y las de mejores características agronómicas (McClinchey y Kott, 2007).

La selección in vitro sobre tolerancia a sequía suele llevarse a cabo mediante el cultivo en medios con diferentes concentraciones de sorbitol o polietilenglicol, examinándose las características de las raíces de las plantas regeneradas. Los ensayos se han realizado con éxito en trigo y patata (Ye et al., 2002; Gopal y Iwama, 2007). Sin embargo, no hay información sobre el comportamiento agronómico de los genotipos seleccionados. Otra alternativa, aplicada a trigo, ha sido el desarrollo de haploides y mutantes y posterior cultivo de un número limitado de plantas, que se evaluaron bajo distintas condiciones ambientales, habiéndose seleccionado algunas líneas tolerantes a sequía (Khan et al., 2001).

Mediante transformación genética se han insertado genes en especies de cultivo que producen líneas tolerantes a cambios de temperaturas y sequía pero, en nuestro conocimiento, los resultados están todavía a nivel de laboratorio (Zhang et al., 2004)

### 17.9. RESISTENCIA A HERBICIDAS

Las técnicas de cultivo in vitro han sido de gran interés en el desarrollo de cultivos tolerantes a herbicidas del tipo imidazolinona (que incluyen a imazapir, imazapic, imazethaphyr, imazamox, imazamethabenceno e imazaquin).

El desarrollo de maíz tolerante a imidazolinona comenzó en 1982 mediante la selección de líneas celulares cultivadas in vitro a partir de callos de maíz híbrido tolerantes al herbicida y posterior introducción de alguna de estas líneas en variedades de maíz comercial (Tan et al., 2005). Se introdujeron en el mercado en 1992 como maíz IMI y hoy son conocidos como maíz Clearfield®. Alternativamente, se obtuvieron algunas líneas resistentes mediante mutagénesis del polen a través del uso de etyl-metasulfonato (EMS). En el caso de la colza, se aislaron microsporas de la variedad Topas, se sometieron a mutagénesis con etil-nitrosourea y se regeneraron embriones y eventualmente plántulas haploides que posteriormente se duplicaron con colchicina (Swanson et al., 1989) y dos de las líneas doble-haploides mostraron tolerancia a imidazolinona. Se introdujeron en el mercado en 1995 y se les conoce como colza Clearfield®. Por otra parte, semillas de arroz de la variedad AS3510 se sometieron a mutagénesis con EMS y plantas M<sub>2</sub> se pulverizaron con imazetapyr aislándose una planta resistente de la que salieron dos variedades resistentes (CL121 y CL141) que se introdujeron inicialmente en el mercado en 2001 (Webster y Masson, 2001). En el caso del trigo, semillas del cultivar Fidel se sometieron a mutagénesis con azida sódica y las semillas M<sub>2</sub> fueron tratadas con el herbicida. Se seleccionaron cuatro plantas tolerantes que fueron las donantes del carácter de resistencia y las primeras variedades de trigo resistentes a imidazolinona se liberaron al mercado en 2001 (Pozniak y Hucl, 2004). Finalmente, en 1998 se descubrió en Kansas una población de girasol salvaje tolerante a imazetapyr que fue la fuente de genes para introducir el carácter de tolerancia a imidazolinona en el girasol cultivado (Al-Khatib y Miller, 2000), introducido para su comercialización en 2003 (Tan et al., 2005), aunque en este caso, no ha sido necesaria la aplicación de las técnicas de cultivo in vitro.

Ni que decir tiene que plantas tolerantes a herbicidas se han obtenido también mediante transformación genética, sobre todo plantas tolerantes a glifosato (Dill, 2005). Sin embargo, este apartado es tratado con más profundidad en otro capítulo de este libro.

### **17.10. TOLERANCIA A METALES PESADOS**

La técnica más utilizada para la inducción de líneas tolerantes a metales pesados es la selección de callos cultivados *in vitro* en medios que contienen elevadas concentraciones de metales. Las plantas regeneradas pueden someterse posteriormente o no a un nuevo programa de presión bajo niveles elevados de metales pesados e incluso puede determinarse la tolerancia en cultivos hidropónicos por períodos de tiempo más o menos largos. Las plantas utilizadas para este tipo de estudios son tanto plantas modelo como el tabaco (Rout y Sahoo, 2007) como especies de interés agronómico (Samantaray et al., 1999; Nehnevajova et al., 2007). Aunque los ensayos para determinar la tolerancia tengan lugar a nivel de invernadero, las plantas no se han incorporado a programas de mejora convencional por lo que no se conoce el carácter heredable de la tolerancia observada.

Los programas de transformación genética suelen estar orientados a la sobreexpresión de genes relacionados con el transporte de iones metálicos a través de las membranas y relacionados también con la síntesis de péptidos quelantes que juegan un importante papel en el secuestro y detoxificación de metales pesados (ver el Capítulo “Estrés por metales pesados”). Los resultados obtenidos son muy variados ya que dependen de la especie estudiada, el tipo de gen incorporado y el tipo de ensayo realizado después de la regeneración (*in vitro*, en cultivo hidropónico, en maceta o en campo). Muchas veces la expresión de gen permite a la planta tolerar elevadas concentraciones de metales pero no su acumulación (Gasic y Korban, 2007), por lo que estas plantas no son apropiadas para su uso en programas de fitorremediación.

### **17.11. CONCLUSIONES**

Es indudable que el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ofrece unas herramientas que pueden ser de utilidad en la búsqueda de tolerancia o resistencia de especies de interés agronómico a estreses abióticos. Sin embargo es preciso también conocer los límites de su aplicación. Si no existe un protocolo eficaz y reproducible de regeneración de plantas a partir de un tipo de explanto determinado, la aplicación de la técnica está muy limitada; lo mismo ocurre si los métodos de selección *in vitro* no son adecuados. Pero aunque estos métodos de selección sean apropiados, el uso de la tecnología *in vitro* ha de considerarse como una etapa intermedia del proceso y no como una etapa final. Todo producto que salga de *in vitro* ha de utilizarse siguiendo las pautas de un programa de mejora convencional con los estudios de respuesta agronómica correspondientes. Sólo así se podrá determinar si la variabilidad originada y seleccionada *in vitro* tiene validez práctica para el desarrollo de nuevas variedades que puedan utilizarse a nivel comercial.

### **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al MEC la ayuda económica recibida a través de los proyectos AGL2005-00709 y AGL2006-01387.

## REFERENCIAS

- Ahloowalia, B.S (1998). In vitro techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. pp 293-309, in S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia (eds.) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Al-Katib, K. and Miller, J.F. (2000). Registration of four genetic stocks of sunflower resistant to imidazolinone herbicides. *Crop Sci.* 42: 869-870
- Brar, D.S. and Jain, S.M. (1998). Somaclonal variation: Mechanism and applications in crop improvement. pp 15-37, in S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia (eds.) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. pp 1158-1249, in W. Gruissem, B. Buchannan and R. Jones (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD, USA.
- Cistué, L. and Kasha, K.J. (2006). Gametic embryogenesis in *Triticum*: a study of some critical factors in haploid (microspore) embryogenesis. pp 321- 342, in A. Mujib and J. Samaj (eds.) *Plant Cell Monograph (2) Somatic Embryogenesis*. Springer, Berlin.
- Corredoira, E., San-José, M.C., Vieitez, A.M. and Ballester, A. (2007). Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 91: 281-288
- Cuartero, J., Bolarín, M.C., Asins, M. and Moreno, V. (2006). Increasing salt tolerance in tomato. *J. Exp. Bot.* 57: 1045-1058
- Dill, G.M. (2005). Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Manag. Sci.* 61: 219-224
- Donini, P. and Sonnino, A. (1998). Induced mutation in plant breeding: Current status and future outlook. pp 255-291, in S.M. Jain, D.S. Brar, B.S. Ahloowalia (eds.). *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Dita, M.A., Risipail, N., Prats, E., Rubiales, D. and Singh, K.B. (2006). Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147: 1-24
- Flowers, T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319
- Foolad, M.R. (2004). Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 76: 101-119.
- Foste, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J. and Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci.* 12: 368-375
- Gasic, K. and Korban, S.S. (2007). Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta* 225: 1277-1285
- Gomal, J. and Iwama, K. (2007). In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Rep.* 26: 693-700



- Gregorio, G.B., Senadhira, D., Mendoza, R.D. Manigbas, N.L., Roxas, J.P. and Guerta, C.Q. (2002). Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresses in rice. *Field Crops Res.* 76: 91-101
- Jain, S.M. (2000). Mechanisms of spontaneous and induced mutations in plants. *Radiation Res.* Vol. 2, Cong. Proc. 255-258
- Jain, S.M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166
- Kakani, V.G., Prasad, P.V.V., Craufurd, P.Q. and Wheeler, T.R. (2002). Response in vitro pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. *Plant Cell Environ.* 25: 1651-1661
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Koti, S., Wallace, T.P., Prasad, P.V.V., Reddy, V.R. and Zhao, D.. (2005) Difference in in vitro pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperatures. *Ann. Bot.* 96: 59-67
- Khan, A.J., Hassan, S., Tariq, M. and Khan, T. (2001). Haploidy breeding and mutagenesis for drought tolerance in wheat. *Euphytica* 120: 409-414
- Khush, G.S. and Virmani, S.S. (1996). Haploids in plant breeding. pp. 11-34, in S.M. Jain, S.K. Sopory and R.E. Veilleux (eds.) *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214
- Liu, Z., Yuan, Y-L., Liu, S-Q., Yu, X-N. and Rao, L-Q. (2006). Screening for high temperature tolerant cotton cultivars by testing in vitro pollen germination, pollen tube growth and boll retention. *J. Integr. Plant Biol.* 48: 706-714
- Maluszynski, M., Nichterlein, K., van Zanten, L. and Ahloowalia, B.S. (2000). Officially released mutant varieties – the FAO/IAEA database. *Mut. Breed. Rev.* 12: 1-84
- McClinchey, S.L. and Kott, L.S. (2007). Production of mutants with high cold tolerance in spring. *Euphytica.* 162: 51-67.
- Nehnevajova, E., Herzig, R., Erismann, K-L. and Schwitzguébel, J-P. (2007). In vitro breeding of *Brassica juncea* L. to enhance metal accumulation and extraction properties. *Plant Cell Rep.* 26: 429-437
- Pozniak, C.J. and Hucl, P.J. (2004). Genetic analysis of imidazolinone resistance in mutation-derived lines of common wheat. *Crop Sci.* 44: 23-30
- Qian, Q., Zeng, D.L., He, P., Zheng, X.W., Chen, Y. and Zhu, L.H. (2000). QTL analysis of rice seedlings cold tolerance in a double haploid population derived from anther culture of a hybrid between indica and japonica rice. *Chin. Sci. Bull.* 45: 448-453



- Reddy, K.R. and Kakani, V.G. (2007). Screening *Capsicum* species of different origins for high temperature tolerance by in vitro pollen germination and pollen tube length. *Sci. Horti.* 112: 130-135
- Remotti, P.C. (1998). Somaclonal variation and in vitro selection for crop improvement. pp 169-201 In: S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia (eds.) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Rout, G.R. and Sahoo, S. (2007). In vitro selection and plant regeneration of copper-tolerant plants from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. cv. 'Xanthi'. *Plant Breed.* 126: 403-409
- Rowland, G.G., McHughen, A. and McOnie, C. (1989). Field performance at saline-affected sites of a somaclonal variant of McGregor flax selected for salt tolerance in vitro. *Can. J. Plant Sci.* 69: 49-60
- Samantaray, S., Rout, G.R. and Das, P. (1999). In vitro selection and regeneration of zinc tolerant calli from *Setaria italica* L. *Plant Sci.* 143: 201-209
- Santos, C.L.V., Gomes, S. and Caldeira, G. (2000). Comparative responses of *Helianthus annuus* plant calli exposed to NaCl. II Selection of stable salt tolerant calli cell lines and evaluation of osmotic adjustment and morphogenic capacity. *J. Plant Physiol.* 156: 68-74
- Senadhira, D., Zapata-Arias, F.J., Gregorio, G.B., Alejar, M.S., de la Cruz, H.C., Padolina, T.F. and Galvez, A.M. (2002). Development of the first salt-tolerant rice cultivar through indica-indica anther culture. *Field Crops Res.* 76: 103-110
- Shariatpanahi, M.E., Bal U., Heberle-Bors, E. and Touraev, A. (2006). Stresses applied for the reprogramming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol. Plant.* 127: 519-534
- Swanson, E.B., Herrgesell, N.J., Arnoldo, M., Sippell, D.W. and Wong, R.S.C. (1989). Microspore mutagenesis and selection: canola plants with field tolerance to the imidazolinones. *Theor. Appl. Genet.* 78: 525-530
- Szarejko, I. and Foster, B.P. (2007). Doubled haploidy and induced mutation. *Euphytica* 158: 359-370.
- Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K. and Shaner, D.L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.* 61: 246-267
- Tonguc, M. and Griffiths, P.D. (2004). Transfer of powdery mildew resistance from *Brassica carinata* to *Brassica oleraceae* through embryo rescue. *Plant Breed.* 123: 587-589
- Veilleux, R.E. and Johnson, A.A.T. (1998). Somaclonal variation: molecular analysis, transformation and utilization. *Plant Breed. Rev.* 16: 229-268
- Vinocur, B. and Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opi. Biotech.* 16: 123-132
- Webster, E.P. and Masson, J.A. (2001). Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone-tolerant rice. *Weed Sci.* 49: 652-657.

Ye, X., Du, L., Xu, H. and Xin, Z. (2002). Root characters of several wheat genotypes. *J Tritical Crops* 22: 43-46

Yeung, E.C. (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. pp 205–248, in T.A. Thorpe (ed.) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Zair, I., Chlyah, A., Sabounji, K., Tittahsen, M. and Chlyah, H. (2003). Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of in vitro selection pressure. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73: 237-244

Zhang, J.Z., Creelman, R.A. and Zhu, J-K. (2004). From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol.* 135: 615-621

Zhu, G.Y., Kinet, J-M., Bertin, P., Bouharmont, J. and Lutts, S. (2000). Crosses between cultivars and tissue culture-selected plants for salt resistance improvement in rice, *Oryza sativa*. *Plant Breed.* 119: 497-504

CAPÍTULO **18**

---

**LA INCORPORACIÓN  
DE GERMOPLASMA  
EXÓTICO**

*Amando Ordás  
Pedro Revilla*



## LA INCORPORACIÓN DE GERMOPLASMA EXÓTICO

---

*Amando Ordás, Pedro Revilla*

**Misión Biológica de Galicia, CSIC. Apartado 28, 36080 Pontevedra.**

**Correo-e: [aordas@mbg.cesga.es](mailto:aordas@mbg.cesga.es)**

---

### 18.1. INTRODUCCIÓN

Germoplasma exótico es todo aquel material genético que no ha sido previamente evaluado o seleccionado en un área determinada por lo que carece de adaptación al medio ambiente para el que el mejorador destina sus nuevas variedades. Lo que es exótico para una zona puede ser germoplasma local para otra y viceversa.

En lo que sigue se utilizará muy a menudo el maíz para exponer el desarrollo que ha tenido la incorporación de germoplasma exótico a los programas de mejora de las zonas templadas por dos motivos. En primer lugar, el maíz es el cultivo más importante de la primera potencia económica y científica del mundo. En segundo lugar, es el cultivo en que más se ha utilizado el germoplasma exótico. Esto es debido a que es una especie de día corto inicialmente muy sensible al fotoperiodo, lo que es un inconveniente si se trata de realizar cruzamientos entre materiales tropicales en verano en una zona templada (la solución es efectuar esos cruzamientos en viveros de invierno). Aunque hay resultados experimentales que muestran que la respuesta fotoperiódica puede ser eliminada o, al menos, muy atenuada por selección masal (Goodman, 1999), esta sensibilidad al fotoperiodo limitó en el pasado el uso de germoplasma tropical y subtropical (donde, probablemente, se encuentra la mayor parte de la variabilidad genética de la especie) en la agricultura norteamericana. Ello condujo a un cuello de botella genético, por lo que los mejoradores, al tratar de huir de los peligros derivados de dicho cuello de botella, han tenido que dirigir su vista al maíz exótico.

Más adelante, en el apartado 18.3, se exponen con detalle todos los usos del germoplasma exótico en la mejora de los cultivos. Ahora nos detendremos en unos ejemplos muy concretos que ilustran la utilidad de este germoplasma en el caso concreto del maíz. Una de las primeras razones para su empleo fue la necesidad de ensanchar la base genética de las variedades cultivadas. Hasta los años 50, el Corn Belt norteamericano, así como el resto de las zonas maiceras del mundo, estaba sembrado con variedades de polinización libre. La mejora moderna del maíz comenzó en los Estados Unidos de América cuando, a principios del siglo pasado, Shull publicó sus estudios sobre consanguinidad e hibridación. Las teorías de Shull han demostrado ser completamente correctas con el paso del tiempo y condujeron a la adopción de los híbridos, primero dobles y posteriormente simples, como el tipo de variedad estándar en el Corn Belt norteamericano, desplazando completamente a las variedades de polinización libre. Algo similar ocurrió en Europa Occidental.

Esta sustitución de las variedades de polinización libre por híbridos simples ha tenido unas consecuencias nefastas desde el punto de vista de la amplitud de la base genética del material cultivado. Los mejoradores norteamericanos, especialmente los del sector privado –que son los principales proveedores de híbridos en las zonas templadas– han tenido siempre objetivos a corto plazo y se han centrado en muy poco germoplasma para el desarrollo de sus líneas puras. Prácticamente todos los híbridos cultivados en el Corn Belt en los últimos años proceden de una muestra muy pequeña de germoplasma. Una primera encuesta reveló que el 73% de la semilla necesaria para producir los híbridos que se sembraron en esa región en 1970 procedía de sólo cinco líneas puras (o líneas derivadas de ellas) que, a su vez, procedían de dos variedades de polinización libre (Reid Yellow Dent y Lancaster Surecrop) pertenecientes a la raza Corn Belt Dent (Tabla 18.1). La situación europea, aunque no tan grave, es parecida en lo que se refiere a la estrechez de la base genética de los híbridos comerciales.

Por todo ello se comenzaron programas encaminados a ensanchar la base genética de los híbridos cultivados incorporando germoplasma exótico a los programas de mejora para reducir el impacto de posibles amenazas y también para incorporar genes reguladores de caracteres productivos no presentes en el material cultivado en una zona determinada. La mayoría de la mejora finalista en los EE. UU. se lleva a cabo desde hace ya bastantes años por compañías privadas que han incorporado también el germoplasma exótico a sus programas de mejora (Mikel y Dudley, 2006).

**Tabla 18.1.** Proporción del uso de cinco líneas puras públicas de maíz (y derivadas de ellas) en la producción de semilla híbrida de 1970 en el Corn Belt (Sprague, 1971).

Línea pura (y derivadas)	%
B37 (H84)	28
B14 (B14A, A632, A634, A635)	18
Oh43 (A619)	15
WF9* (W64A, A554)	14
C103 (Mo17, C123)	8

\* La línea WF9 no estaba incluida en la encuesta, pero sí sus derivadas.

Un ejemplo de la incorporación de caracteres productivos lo podemos encontrar en el programa de la Universidad de Minnesota de los años 60 encaminado a la mejora de los componentes del rendimiento (prolificidad, longitud de la mazorca y profundidad del grano) como un medio de incrementar el rendimiento. Para aumentar la profundidad del grano se recurrió a ‘Cuzco Blanco’, una población peruana caracterizada por granos de una excepcional longitud. Como resultado de este programa, y a partir de ‘Cuzco Blanco’, se desarrolló una población sintética [AS-DK(S)C3] adaptada a zonas templadas de ciclo corto (Peterson et al., 1976). Mediante autofecundación por el método de mazorca-a-surco obtuvimos de esta población en la Misión Biológica de Galicia la línea pura EP50, con un tamaño de grano muy por encima de lo que consideramos normal. En las pruebas de aptitud combinatoria, sus cruzamientos con el híbrido B37 y B14A alcanzaron producciones muy altas; por ejemplo, en un ensayo realizado en Aranjuez en 1981 el híbrido (B37 y B14A) EP50 alcanzó una producción de 14.150 kg/ha, nada menos que un 58% más que la media de los dos híbridos testigos (Pioneer 301B y Pioneer 3618). Hay que señalar que la humedad del

grano en recolección de los híbridos testigos fue de 21,8%, frente a un 25% del híbrido experimental, lo que supone en la escala FAO un ciclo y medio, aproximadamente, de diferencia. Aún así, la producción de este híbrido fue espectacular en este experimento y, en general, muy alta en los distintos ensayos en que se evaluó. Sin embargo, la línea EP50 tenía un grave problema. La población AS-DK(S)C3, de la que derivaba, tenía un zuro muy grueso, carácter que se transmitió a la línea, lo que, unido a la gran longitud del grano, hacía que el zuro se secara con mucha dificultad y el exceso de humedad provocaba la aparición de enmohecimientos en la semilla; todo esto originaba un poder germinativo muy bajo lo que podía provocar la pérdida de la línea pura, algo que, finalmente, ocurrió. Este caso ilustra las posibilidades del material exótico, pero también las dificultades con que se tropieza al tratar de introducirlo en un programa de mejora.

Otro uso del germoplasma exótico es, como se indicó anteriormente, el de proporcionar genes para mejorar la resistencia a estreses bióticos. Un ejemplo de esto lo tenemos en la introducción de resistencia a roya en la línea pura de maíz B14. Esta línea –o derivadas de ella– ha sido una de las más utilizadas en los programas de mejora de maíz de la zona templada. En la actualidad la línea original ya no se emplea, pero al principio de su uso se tropezaba con su extrema susceptibilidad a la roya del maíz (*Puccinia sorghi*). Esta roya está presente en Galicia, pero aparece tarde, bastante después de la floración, y su ataque se reduce, generalmente, a unas pústulas en las hojas inferiores de la planta cuando ésta ha comenzado a secar, por lo que los daños que causa son mínimos. Sin embargo, cuando en 1974 introdujimos la línea B14 en la Misión Biológica de Galicia, observamos un ataque extremadamente virulento de roya, que comenzaba antes de la floración cubriendo la planta completamente de pústulas. Ello hacía que la producción de grano fuera muy escasa y, finalmente, tuvimos que eliminar la línea de nuestra colección. En la Universidad de Iowa desarrollaron una versión, llamada B14A, resistente a la enfermedad, pero que en todos los demás aspectos es prácticamente igual a la línea original. Para introducir la resistencia a roya, manteniendo las excelentes características agronómicas de la línea B14, hubo que recurrir a germoplasma exótico, a la variedad Cuzco ya mencionada, en la que se encuentra el gen Rp1, situado en el brazo corto del cromosoma 10, que confiere resistencia a la enfermedad. La variedad Cuzco se cruzó con una variedad adaptada precoz (Early Dent) y en la descendencia se seleccionó material con el gen Rp1. Esta selección se cruzó con la línea B14 y posteriormente se retrocruzó otras siete veces por la línea (Russell et al., 1971). El resultado final fue la línea B14A, fenotípicamente idéntica a la B14, salvo en la resistencia a roya, y que contiene, teóricamente al menos, el 99,8% del genoma nuclear de esta última. En la Misión Biológica de Galicia la línea B14A se mantiene sin problema alguno.

Para concluir esta rápida visión de los usos más comunes del germoplasma exótico nos detendremos en su uso como fuente de genes que aportan un valor añadido al proporcionar caracteres que no están presentes en las variedades comúnmente cultivadas en la zona. Como ejemplo veremos un caso de búsqueda de genes para mejorar la calidad del maíz dulce.

La mayoría del maíz en el mundo se cosecha para grano, efectuándose la cosecha cuando el grano ha cesado de acumular materia seca y tiene un contenido de agua relativamente bajo. Cualquier tipo de maíz se puede usar como hortaliza siempre que los granos se consuman en estado inmaduro, pero las variedades que se conocen con el nombre de ‘maíz dulce’ han sido desarrolladas específicamente para su uso hortícola y se basan en uno o varios mutantes que alteran el contenido de hidratos de carbono en el endospermo. Históricamente, el primer mutante empleado fue el *sugary1* (*su1*) y hasta los años sesenta decir “maíz dulce” significaba maíz homocigoto para este mutante, pero a partir de 1961 empezaron a aparecer nuevos mutantes

que mejoraban la calidad del gen *su1*. Uno de estos mutantes es el *sugary enhancer1 (se1)*, encontrado en Bolivia 1035, una línea pura exótica de maíz harinoso. El mutante *se1*, que debe ir acompañando al *su1*, eleva el nivel de sacarosa en el grano, manteniendo unos altos niveles de fitoglucógeno (lo que es necesario para que el grano tenga una buena textura).

Pero no sólo en el maíz la incorporación de genes procedentes de material exótico ha tenido éxito. En patata y caña de azúcar, por ejemplo, se han desarrollado programas de incorporación de germoplasma exótico que han resultado exitosos. En ambos cultivos la introducción de poblaciones exóticas de amplia base, que se sometieron a una selección de intensidad suave para adaptación, resistencia a enfermedades y rendimiento, condujo, tras unos 20 a 30 años, a un material con rendimientos similares a los de los cultivares locales. Los cruzamientos entre las poblaciones locales y las exóticas exhibieron una gran heterosis y sirvieron de base para el desarrollo de nuevas variedades comerciales (Simmonds, 1993).

También se ha tenido gran éxito en la incorporación de germoplasma en cultivos propagados clonalmente debido a que se puede aprovechar de un modo completo la heterosis que se consigue en la primera generación de cruzamientos exótico x adaptado (Holland, 2004). Sin embargo, muchas especies alógamas (incluyendo la mayoría de los cultivos forrajeros) se autofecundan con dificultad y por ello el mejorador las maneja como poblaciones. En estos cultivos, a pesar de la gran heterosis que aparece en la generación  $F_1$  de los cruzamientos exótico x adaptado, los típicos híbridos  $F_1$  no pueden ser empleados a escala comercial (Brummer, 1999). Una solución es el empleo de híbridos varietales, lo que abre nuevas oportunidades para la incorporación de germoplasma exótico en la mejora de especies alógamas (Brummer, 1999).

## 18.2. FUENTES DE GERMOPLASMA

En el caso del maíz, en las zonas templadas hay tres orígenes geográficos que pueden aportar germoplasma exótico para un programa de mejora (Goodman, 1999). En la mayoría de los casos el germoplasma exótico que el mejorador incorpora a su programa procede de otras zonas templadas. Así, por ejemplo, en los Estados Unidos, la mayoría del germoplasma exótico procede de Argentina, Europa y Sudáfrica (Tabla 18.2). Al contrario, el germoplasma norteamericano, especialmente el del Corn Belt y Sur de Canadá, se usa ampliamente en Europa Occidental. Líneas puras del Norte del Corn Belt, tales como A427, A619, WH, WJ, W33, W64A, W182E, etc., fueron cruzadas por líneas de origen francés o español, constituyendo la base de los primeros híbridos del INRA que tanto contribuyeron a extender el maíz híbrido por Europa Occidental. En España, en los programas de mejora, comenzados en los años setenta, del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, la Misión Biológica de Galicia o la Estación Experimental de Aula Dei, se han empleado, para cruzar con las líneas derivadas de las poblaciones españolas, líneas puras norteamericanas como A632, A635, A641, W64A, W117 ó CI31A. Pero mucho antes de esta época, en los albores del nacimiento del maíz híbrido, Gallástegui en la Misión Biológica de Galicia había desarrollado unos híbridos –los primeros en Europa– basándose casi exclusivamente en germoplasma procedente de Estados Unidos: líneas puras obtenidas en Pontevedra a partir de las variedades Longfellow, Gold Nugget, Sanford White, Large White y otras. Estos híbridos tuvieron bastante difusión en la época anterior a la Guerra Civil de 1936–39 (Ordás, 2003).



**Tabla 18.2.** Uso de germoplasma exótico en los híbridos de maíz en Estados Unidos en 1996 (Goodman, 1999).

Procedencia	Germoplasma exótico (%)	Procedencia	Germoplasma exótico (%)
Zona Templada		Zona Tropical	
Argentica	1,99	Caribe	0,23
Australia	0,03	México	0,07
Europa	0,46		
Sudáfrica	0,08		
Total	2,56	Total	0,30

El segundo origen de germoplasma exótico para las zonas templadas es el maíz de las zonas bajas de los trópicos, tales como Cuban Flint, Suwan, Tusón y Tuxpeño que han sido algo empleadas en los Estados Unidos, principalmente como fuentes de resistencia a plagas o enfermedades (Goodman, 1999).

Una tercera fuente de germoplasma exótico para las zonas templadas pueden ser las zonas altas de los trópicos, en las que se encuentran razas como Chalqueño, Cuzco, Sabanero o San Gerónimo, que pueden ser de interés. Este material ha sido menos usado que los anteriores en los Estados Unidos por su falta de tolerancia al calor y a otros estreses (Goodman, 1999). No obstante, hay ejemplos del uso con éxito de alguno de estos materiales en las zonas templadas. Así, por ejemplo, la raza San Gerónimo, procedente de la altiplanicie peruana, ha sido empleada en Wisconsin para desarrollar la línea pura A552 (Coors y Mardones, 1989) y, junto con la raza mejicana Cónico, en Nueva Zelanda (Eagles et al., 1989). El uso de la raza Cuzco como fuente de grano largo ha sido comentado en otra parte de este capítulo.

En otros cultivos distintos del maíz, un mejorador de zonas templadas tiene actualmente a su disposición una gran cantidad de material exótico documentado, y en algunos casos incluso mejorado, en centros internacionales tales como el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, en México); el IITA (International Institute of Tropical Agriculture, en diversos países centroafricanos) para cassava, caupí, soja, maíz, plátano, etc.; el IRRI (International Rice Research Institute, en Filipinas y otros países asiáticos y africanos); el CIP (Centro Internacional de la Papa, en Perú); etc. También hay centros nacionales como el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) de México, que ha desarrollado variedades mejoradas de trigo, cebada, maíz, soja, garbanzo, judía, cártamo, etc.; el EMBRAPA (Empresa Brasileira de Enquisa Agropecuária), que conserva actualmente más de 82.000 entradas de diversos cultivos: algodón, judía, maíz, soja, café, sorgo, hortalizas, ...; el ICARDA (International Center for Research in the Dry Areas) en Siria, que conserva unas 55.000 entradas de cereales, 27.000 de legumbres y 28.000 de plantas forrajeras; el ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), con base en la India, pero con centros en diversos países africanos, que tiene colecciones de garbanzos, guandú, cacahuete, mijo perla y sorgo; etc.

### **18.3. INTROGRESIÓN, INCORPORACIÓN Y COMBINACIÓN DE GERMOPLASMA EXÓTICO**

Muchos de los actuales cultivos de zonas templadas (como maíz, tomates, patatas o pimientos) tienen origen exótico más o menos reciente. Los lugares de origen albergan la mayor parte de la diversidad, por lo que la mejora de esos cultivos depende de recursos que siguen estando mayoritariamente en las regiones tropicales de las que proceden (Prohens et al., 2005). Debido al origen tropical de muchos cultivos, su posterior expansión hacia latitudes y alturas más elevadas ha requerido una constante mejora de su adaptación a condiciones ambientales adversas. La mejora del material exótico y de su adaptación a las diversas regiones en las que se ha introducido se ha realizado desde la domesticación del cultivo, que ha supuesto un proceso largo y complejo, en el que se ha reducido y modificado la variabilidad existente en las áreas originales. En suma, el germoplasma exótico conserva un potencial incalculable de variabilidad disponible para la mejora de los cultivos adaptados a las zonas templadas (Menkir et al., 2006). Aunque la utilización de germoplasma exótico es un proceso milenario, su empleo según criterios científicos comenzó a mediados del siglo XX y cobró su máximo auge en el último cuarto de ese siglo.

Debido a la gran diversidad existente en los centros de origen de los cultivos de origen tropical, en relación a la variabilidad disponible en las zonas templadas, la agricultura de las zonas templadas requiere continuas introducciones de germoplasma exótico. La diversidad del germoplasma exótico constituye su principal valor, ya que aporta material para afrontar problemas, principalmente resistencias a plagas, enfermedades y estreses ambientales (Singh y Hymowitz, 1999; Banziger y Cooper, 2001; Brandolini et al., 2000; Revilla et al., 2005). Además, el germoplasma exótico representa un recurso para aumentar la variabilidad con el fin de ampliar las posibilidades de mejora del germoplasma adaptado. No obstante, la mayor parte de la variabilidad existente en el germoplasma exótico no tiene una utilidad inmediata para la mejora del germoplasma adaptado a zonas templadas, y apenas una pequeña proporción de genotipos exóticos tienen un valor evidente.

La contribución del germoplasma exótico en la mejora comercial no ha alcanzado grandes proporciones (Goodman, 2004), pero se ha producido en un proceso lento y continuo en la incorporación de germoplasma exótico a los programas de mejora de zonas templadas desde mediados del siglo XX (Vetelainen, 1994; Vetelainen et al., 1996). Estas aportaciones han sido posibles gracias a las redes de mejora establecidas entre los programas privados y los públicos, tales como los programas LAMP y GEM, descritos posteriormente, y a la actividad de instituciones como el CIMMYT.

#### **18.3.1. Variabilidad en el germoplasma exótico**

Dos cuestiones fundamentales que se plantean cuando se trata de incorporar germoplasma exótico a un programa de mejora son la elección de los genotipos y la proporción de germoplasma exótico más adecuada. La variabilidad existente en el germoplasma exótico de los cultivos de origen tropical es tan amplia que su conservación y conocimiento tan solo pueden considerarse preliminares (Beuselinck y Steiner, 1992). Además, los países que detentan la máxima riqueza en recursos fitogenéticos suelen carecer de recursos para acometer recolecciones, estudios y conservaciones a gran escala, por lo que apenas dispone de información fraccionada y el origen geográfico del germoplasma exótico permite realizar una somera clasificación de la variabilidad disponible (Srivastava et al., 2000; Steiner y de los Santos, 2001).

El conocimiento de la variabilidad existente es esencial para el planteamiento de un programa de mejora (Beuselinck y Steiner, 1992), por lo que la mayor parte de los trabajos publicados sobre germoplasma exótico se han centrado en describir, clasificar y evaluar (Brandolini et al., 2000; Mashingaidze y Muchena, 1984; Menkir y Akintunde, 2001; Oury et al., 2006; Revilla et al., 2005; Singh et al., 2000; Taba et al., 2006). Sin embargo, la enorme variabilidad disponible es con frecuencia inabordable, por ejemplo el Centro de Recursos Genéticos del Trigo (WGRC) ha organizado una colección de trabajo de más de 11.000 entradas de variedades de trigo silvestres (Gill et al., 2006). Por ello, en los últimos tiempos, se están realizando colecciones nucleares de germoplasma exótico de diversos cultivos tales como patata (Errebhi et al., 1998), cacahuete (Upadhyaya et al. 2002, 2005), almorta (Granati et al., 2003), sándalo (Shashidhara et al., 2003), guisante (Baranger et al., 2004), maíz (Taba et al., 2006), o garbanzo (Upadhyaya et al., 2007).

La elección de los genotipos se suele resolver mediante evaluaciones para el carácter que se pretenda mejorar. Sin embargo, la evaluación de genotipos exóticos para su incorporación a programas de mejora de áreas templadas plantea algunos problemas experimentales debido a su deficiente adaptación. Para afrontar este problema se han propuesto diseños experimentales concretos, tales como cruzamientos de los genotipos exóticos con probadores adaptados (Martin et al., 1996) y los métodos de transferencia de alelos, inicialmente propuestos por Dudley (1984) y modificados o expandidos por el propio Dudley y otros investigadores, para identificar poblaciones o líneas puras que puedan ser de utilidad en la mejora de genotipos y que se pueden emplear tanto con material exótico como con material adaptado. Esta metodología se ha usado en la Misión Biológica de Galicia [véase, por ejemplo, Ordás et al. (2005), en donde se pueden encontrar referencias adicionales]. No obstante, estas propuestas no han gozado de amplia aceptación entre los mejoradores. En el terreno de la biología molecular también se han desarrollado métodos adecuados a las dificultades que presenta la utilización de germoplasma exótico para estudios genéticos, por ejemplo mediante autofecundación de retrocruzamientos en algodón (Chee et al., 2005).

En cuanto a la segunda cuestión, la proporción óptima de genotipo exótico que conviene introducir, puede variar desde un solo gen para incorporar una resistencia, como antes hemos visto en el caso de la línea pura de maíz B14, hasta un porcentaje apreciable del genoma para mejorar caracteres cuantitativos. En este último caso, los resultados más satisfactorios se obtienen cuando se emplean proporciones de germoplasma exótico tan reducidas como sea posible, para lo cual se recurre a uno, dos o tres retrocruzamientos con el parental adaptado, de modo que se obtenga un 75%, un 87,5%, o un 93,75% de germoplasma adaptado, respectivamente (Thompson y Nelson, 1998). Isleib (1999) desarrolló una metodología para decidir el número de retrocruzamientos necesarios, dependiendo del número de diferencias alélicas entre padres, de la proporción de alelos deseables en el mejor padre y del número de loci homocigotos para los alelos deseables en los que una progenie debe exceder al mejor padre para que sea seleccionada. En la práctica, las proporciones de germoplasma resultantes en los genotipos obtenidos tras seccionar material segregante proveniente de cruzamientos entre adaptado y exótico son variables, debido al efecto de la selección sobre las frecuencias de alelos procedentes de los padres adaptado y exótico (Tarter et al., 2004; Vetelainen, 1994).

Sean cual sean las proporciones, la mejor estrategia consiste en emplear una población con amplia base genética para aumentar las posibilidades de éxito. Una forma de construir poblaciones con amplia base genética consiste en realizar cruzamientos múltiples de genotipos exóticos y adaptados (Vetelainen, 1994; Vetelainen et al., 1996), incluso entre diversas especies

relacionadas (Del Blanco et al., 2001). Los más entusiastas abogan por el empleo directo de germoplasma exótico como material base para obtener genotipos con valor comercial (Goodman, 2004) o para la obtención de híbridos adaptado/exótico (Godshalk y Kauffmann, 1995).

Las variedades exóticas se pueden usar como fuentes de genes (Trifunovic, 2001) u otros elementos genéticos, tales como transposones (Gutierrez-Nava et al., 1998), o bien como poblaciones base de mejora. Se usan como genes concretos cuando se trata de incorporar cualidades de herencia oligogénica, ya sean resistencias (Brandolini et al., 2000; Revilla et al., 2005), caracteres de calidad (Bernacchi et al., 1998; Oury et al., 2006; Singh et al., 2000), rendimiento (Thompson y Nelson, 1998), eficacia fotosintética (Thompson et al., 1995), o estabilidad (Roy et al., 2004).

Los genotipos exóticos se pueden emplear para obtener líneas puras mediante autofecundaciones a partir del material exótico directamente (Burton, 1982; Goodman, 2004) o tras cruzamientos con materiales adaptados (Bosch et al., 1994; Menkir et al., 2006, 2007; Tarter et al., 2003, 2004). Esta segunda opción resulta más apropiada a medida que disminuye la adaptación del material exótico. Alternativamente, puede emplearse el germoplasma exótico para ampliar la diversidad genética, con el fin de proporcionar más oportunidades de selección (Biasutti et al., 2000; Mas et al., 1998). Un caso especial de la utilización de germoplasma exótico para ampliar la base genética lo constituye su empleo para la obtención de nuevos patrones heteróticos en maíz (Mickelson et al., 2001; Reif et al., 2003) o bien para ampliar los ya existentes en el maíz adaptado, fundamentalmente Reid o Lancaster (Mickelson et al., 2001). El esfuerzo dedicado en otros cultivos para desarrollar patrones heteróticos a partir de germoplasma exótico ha sido menor que en el maíz, aunque sí se ha publicado algún caso, por ejemplo en mijo (Burton y Werner, 1991).

### 18.3.2. Métodos de mejora

Históricamente la mejora pre-genética se realizaba por selección masal a partir de variedades exóticas o de cruzamientos entre éstas y las adaptadas. La selección masal practicada por los agricultores ha sido muy eficaz aunque no era sistemática y los agricultores disponían de tiempo ilimitado, de modo que podemos suponer que se daban suficientes oportunidades a la recombinación genética para romper los bloques de ligamiento. Precisamente las oportunidades de recombinación a lo largo del tiempo han constituido una de las claves del éxito en la domesticación y adaptación de cultivos. En efecto, la recombinación continúa siendo una condición para que la selección sea eficaz cuando se cruzan genotipos muy dispares (Casañas et al., 2001), aunque su efecto sobre la ganancia esperada no es siempre rotundo, sino que depende de la combinación específica de genotipos (Simic et al., 2003). El cruzamiento adaptado por exótico –con o sin posteriores retrocruzamientos por el padre adaptado– seguido de selección directa, sin recombinar, se ha continuado empleando en la mejora genética actual (Mas et al., 1998; Simic et al., 2003). Cuando el cruzamiento adaptado x exótico es seguido de retrocruzamientos, suele mejorar el resultado de la selección, y se hace innecesaria la recombinación (Hoffbeck et al., 1995).

El objetivo de la mejora de la adaptación es conseguir una variedad capaz de sobrevivir y producir un rendimiento abundante y de calidad aceptable (Stehli et al. 1999). Los criterios de selección concretos que se usan como objetivos de mejora pueden ser muy diversos, por ejemplo nascencia, vigor, floración, aspecto de planta y de mazorca, rendimiento y calidad, o combinaciones de varios caracteres (Vetelainen et al., 1997). Biasutti et al. (2000) comprobaron la eficacia de la selección masal sobre diversos caracteres morfológicos y agronómicos en germoplasma exótico y el resultado fue favorable tanto si la presión de selección se ejercía directamente sobre el rendimiento o sobre caracteres morfológicos.

En todo programa de mejora que incluya germoplasma exótico, no se debe ignorar que se produce una inevitable selección natural por adaptación. Esta presión de selección natural es mayor cuanto más diferentes sean las condiciones de origen y de destino de las variedades. Tanto en la selección natural como en la artificial, una elevada presión de selección garantiza el éxito a corto plazo, pero lo compromete a largo plazo porque reduce la variabilidad. Sin embargo, cuando la población base es exótica, normalmente cuenta con una amplia variabilidad y ésta es la principal garantía de éxito de un programa de selección.

La mejora genética del material exótico ha conservado el objetivo y los criterios de selección históricos, ampliando y precisando los métodos, sistematizando el proceso y regulando la presión de selección. En efecto, la introducción de la genética ha permitido desarrollar diseños genéticos y técnicas experimentales más consistentes y fiables, pero los problemas con que se encuentran los mejoradores que utilizan germoplasma exótico siguen siendo que no germina, no sobrevive, no se reproduce o no produce un rendimiento aceptable.

La incorporación de métodos genéticos en la mejora supuso una mayor eficacia en general, aunque la selección masal ha seguido siendo utilizada preferentemente para la adaptación del material exótico. Entre los principales impulsores de la utilización de germoplasma exótico destaca el trabajo realizado en maíz por M.M. Goodman, quien, durante las últimas cuatro décadas, ha utilizado más de 1.300 entradas de maíz iberoamericano y obtenido líneas semiexóticas con gran aptitud combinatoria. Para ello ha aplicado una selección secuencial por insensibilidad al fotoperiodo a partir de cruzamientos entre poblaciones exóticas y una línea adaptada, por aptitud combinatoria de los materiales heterocigotos y por aspecto general durante la obtención de las líneas. Durante estas obtenciones, se observaba una rápida e importante mejora en rendimiento y valor agronómico per se y en cruzamientos con probadores en las primeras generaciones, mientras que la selección durante las posteriores generaciones de autofecundación mejoraban el valor per se, pero no su aptitud combinatoria (Tarter y Holland, 2006).

La principal aportación de la mejora genética, respecto a la pre-genética, a la adaptación de germoplasma exótico de maíz ha sido el empleo de la autofecundación para obtener líneas puras que pueden utilizarse en la producción de híbridos o de ciclos mejorados de la población. La eficacia está prácticamente garantizada cuando se parte de líneas puras exóticas para obtener líneas de segundo ciclo, como lo muestran los resultados de la mayoría de los centros de mejora (Mashingaidze y Muchena, 1984; Ordás et al., 1994; Sarcevic et al., 2004). La obtención de líneas a partir de cruzamientos de germoplasma adaptado por exótico continúa siendo un método habitual por sus excelentes resultados (Menkir et al., 2006, 2007; Tarter et al., 2003, 2004). Sin embargo, los programas que tratan de incorporar germoplasma exótico terminan más frecuentemente en fracaso que en éxito (Selig et al., 1999).

Los programas de mejora que incorporan germoplasma exótico suelen tener una orientación finalista destinada a obtener variedades mejoradas, aunque son más frecuentes las publicaciones de resultados teóricos iniciales que las que muestran resultados concretos de mejora. En varios cultivos se han realizado estudios genéticos de variabilidad (Birhman y Kang, 1993), de estructura genética (Gouesnard et al., 1996; Mas et al., 1998), de componentes de la varianza (McCarty et al., 2004), o de efectos genéticos (Ortiz y Golmirzaie, 2003) en material exótico para determinar la estrategia de mejora más adecuada. Se han desarrollado genotecas en melón (Eduardo et al., 2005) y poblaciones de mapeo en cruzamientos interespecíficos y se ha aprovechado la inestabilidad genética de los cruzamientos interespecíficos para estudiar efectos

genéticos en condiciones peculiares, tales como líneas de adición resultantes de cruzamientos entre especies silvestres de soja (Singh et al., 1998), o mapas genéticos en cruzamientos de tomate y especies relacionadas (Chen y Foolad, 1999, Yates et al., 2004). Tras tantos estudios, lo que se constata es que la estructura genética de las poblaciones exóticas no difiere sustancialmente de la estructura genética del germoplasma adaptado.

Una de las alternativas más inmediatas que ofrecen los diseños experimentales actuales es perfeccionar el método de selección masal, por ejemplo mediante selección estratificada (Bletsos y Goulas, 1999), sin que ello haya supuesto necesariamente progresos significativos en los resultados. La otra aportación de la mejora genética, la autofecundación, se encuentra con que los genotipos tropicales y semitropicales presentan mayores tasas de depresión por endogamia, si bien esta característica también puede mejorarse por selección (Vasal et al., 1995). La importancia de la autofecundación reside en que cuando se practica en una variedad de polinización libre, permite eliminar los alelos deletéreos, resultando en una mejora agronómica que es proporcionalmente más importante cuanto peor comportamiento o adaptación tenga la variedad per se. Por ello, la mejora de material exótico mediante selección genealógica con autofecundaciones sucesivas optimiza los resultados a corto plazo, dando lugar a variedades inmediatamente utilizables (Ordás et al., 1994). La mejora intrapoblacional de material exótico con descendencias autofecundadas es uno de los métodos más empleados y con mejores resultados (Iglesias y Hallauer, 1989). Sarcevic et al (2004) obtuvieron una variedad sintética a partir de líneas exóticas y la sometieron a dos ciclos de mejora por progenies autofecundadas, obteniendo importantes aumentos del rendimiento. Nass y Coors (2003) también emplearon con éxito la selección intrapoblacional con familias autofecundadas a partir de material parcialmente exótico. Simic et al. (2003) mejoraron significativamente la precocidad de material parcialmente exótico empleando selección recurrente con familias autofecundadas. La obtención de descendencias no autofecundadas es menos común cuando se trabaja con germoplasma exótico, pero también se emplea; así, la selección basada en familias de hermanos completos también ofrece resultados favorables, al tiempo que permite conservar mayor variabilidad (Hyrkas y Carena, 2005).

Las nuevas tecnologías están teniendo una importante aplicación en la incorporación de germoplasma exótico. Precisamente, uno de los avances más recientes en la mejora del maíz ha consistido en la producción masiva de dobles haploides, técnica que también se ha ensayado en maíz exótico (Spitko et al., 2006) y que permite acelerar y simplificar el proceso de selección y de obtención de líneas, al tiempo que reduce notablemente la deriva y permite conservar la variabilidad más eficazmente.

En los últimos tiempos, se ha propuesto la mejora asistida por marcadores para transferir genes de interés del germoplasma exótico al adaptado (Concibido et al., 2003; Wu et al., 2007; Zalapa et al., 2007). Aunque no se han publicado resultados de programas de selección asistida por marcadores a partir de material exótico, hay abundantes publicaciones sobre detección de QTL y empleo de marcadores para facilitar la identificación de alelos favorables en germoplasma exótico de diversas especies (Bernacchi et al., 1998; Burton y Werner, 1991; Selig et al., 1999; Yates et al., 2004; Wu et al., 2007; Zalapa et al., 2007). No obstante, la mayor parte de las veces se emplean los marcadores moleculares sencillamente para evaluar los resultados de los programas de selección (Selig et al., 1999), caracterizar y clasificar las variedades (Powell et al., 1991; Reif et al., 2003; Singh et al., 1999), analizar la variabilidad disponible en el germoplasma base y en las variedades mejoradas o determinar la proporción de germoplasma silvestre introducida en



variedades cultivadas. Finalmente, también la mutagénesis ha sido empleada para mejorar la adaptación del germoplasma exótico (Abdurakhmonov et al., 2007).

En el futuro, es de esperar que la genética molecular aporte valiosa información para los mejoradores en todos los ámbitos y, en particular, para la incorporación de germoplasma exótico (Prohens et al., 2005; Xiao et al., 1998).

### **18.3.3. Mejora de la resistencia a estreses abióticos**

El estrés abiótico viene dado por cualquier característica física que comprometa el normal desarrollo del cultivo, tales como condiciones extremas de temperatura, humedad o disponibilidad de nutrientes. La mejora de la resistencia a estreses abióticos es particularmente importante para aumentar la sostenibilidad de la agricultura, mediante la reducción de insumos. En los países industrializados predomina la agricultura intensiva, en la que las carencias ambientales se afrontan mediante la aportación de productos sintéticos, mientras que la agricultura de bajos insumos predomina en sociedades tecnológicamente poco desarrolladas, en las que no es posible o resulta excesivamente caro corregir las deficiencias. No obstante, las sociedades más avanzadas son cada vez más conscientes de la necesidad de incrementar la sostenibilidad mediante la reducción de insumos, para lo que es imprescindible cultivar variedades tolerantes a los diversos estreses. Las condiciones climáticas varían en el tiempo y en el espacio, por lo que la optimización del cultivo se verá considerablemente mejorada si se tienen en cuenta las afinidades específicas de cada genotipo a cada ambiente.

La importancia de la aportación del germoplasma exótico a la mejora de resistencia a estreses abióticos se debe a su gran variabilidad y a su uso prolongado en condiciones de estrés abiótico, de modo que frecuentemente se encuentran fuentes de resistencia a los diversos estreses ambientales dentro del germoplasma exótico, ya sea a condiciones generales de aridez o a estreses ambientales concretos. En efecto, las variedades tradicionalmente cultivadas en condiciones de estrés, suelen estar adaptadas a las circunstancias adversas, para lo que han desarrollado mecanismos que les permiten resistirlas, como un sistema radicular apropiado para resistir la sequía en soja (Hudak y Patterson, 1996).

Uno de los programas más destacados en la utilización de germoplasma exótico para mejorar la resistencia a estrés ambiental es el programa de resistencia a la sequía desarrollado por el CIMMYT para producir maíz adecuado para su cultivo en regiones marginales o tecnológicamente retrasadas (Banziger y Cooper, 2001). El germoplasma exótico se usa habitualmente como fuente de resistencia a estreses abióticos importantes como la sequía (Mashingaidze y Muchena, 1984; McMichael y Quisenberry, 1991; Singh y Hymowitz, 1999; Menkir y Akintunde, 2001; Monneveux et al., 2006; Taba et al., 2006), el frío (Brandolini et al., 2000; Revilla et al., 2005), la carencia de nitrógeno (Vasal et al., 1999), la acidez (Spaner et al., 1995), o la densidad de cultivo (Elhattab et al., 1985). Asimismo, el germoplasma exótico se usa como fuente de resistencia a estreses abióticos de importancia más restringida, como el calor (Leipner et al., 1999), el encharcamiento (Lemkekeyes y Sachs, 1989), la aridez (Yitbarek y Hilger, 1995), la salinidad (Cocks, 2001), o a las carencias minerales (Srivastava et al., 2000).

La mayoría de los trabajos publicados sobre germoplasma exótico y resistencia a estrés abiótico hasta la fecha se limitan a evaluar germoplasma para un posterior uso en programas de mejora. Habitualmente se evalúa el germoplasma exótico directamente o tras cruzarlo con germoplasma adaptado para identificar fuentes de resistencia. Estos materiales de partida, seguidos o no de retrocruzamientos y de recombinaciones, se emplean como fuentes de líneas por autofecundaciones, y la subsiguiente obtención de híbridos (Menkir y Akintunde, 2001; Zaidi et al., 2007). Los métodos de mejora son esencialmente los mencionados anteriormente, ya sea la clásica selección genealógica, selección masal, selección recurrente intrapoblacional por familias autofecundadas o por medios hermanos (Monneveux et al., 2006; Omoigui et al., 2006), o la identificación de marcadores asociados a resistencias a estreses abióticos (Steiner y de los Santos, 2001) para la posterior aplicación de selección asistida por marcadores (Albertini et al., 2001; Concibido et al., 2003).

La mejora de la resistencia a estreses ambientales frecuentemente resulta un objetivo complejo e inabordable por los métodos habituales de mejora, y requiere el uso de criterios indirectos, tales como criterios morfológicos o fisiológicos (Zaidi et al., 2007; Monneveux et al., 2006; Omoigui et al., 2006; Cocks, 2001). Los criterios indirectos pueden ser caracteres morfológicos implicados en la respuesta al carácter, tales como el desarrollo radicular para resistir la sequía (Hudak y Patterson, 1996), la altura de la caña de trigo para resistencia a la aridez (Annicchiarico y Pecetti, 2003), o una combinación de diversos caracteres agronómicos. Además, se han identificado criterios químicos para estimar calidad, como la composición de fibras en variedades forrajeras (Singh et al., 2000); criterios fisiológicos, como la eficacia fotosintética en relación con la resistencia al frío o al calor (Leipner et al., 1999); o marcadores moleculares para detectar loci asociados a cualquier carácter (Ragot et al., 1995).

En los cruzamientos entre genotipos exóticos y adaptados, con frecuencia ocurre que la distancia genética es de tal magnitud que el cruzamiento no resulta posible o bien se encuentran aislamientos genéticos que impiden el cruzamiento entre determinadas especies, tal como ocurre entre sorgo y algunas especies relacionadas (Hodnett et al., 2005). En tales casos se pueden emplear cruzamientos forzados en latitudes intermedias o, si los cruzamientos no son posibles, métodos de transformación genética, aunque no se han publicado trabajos sobre estos temas hasta la fecha. En algunos cultivos se recurre con cierta frecuencia a cruzamientos interespecíficos para transferir resistencia a estreses abióticos. Los cruzamientos interespecíficos son habitualmente empleados en cultivos tan variados como la patata (Birhman y Kang, 1993; Powell et al., 1991), el tomate (Bernacchi et al., 1998; Chen y Foolad, 1999; Yates et al., 2004), el algodón (McMichael y Quisenberry, 1991), el maíz (Williams et al., 1995), la cebada (Vetelainen et al., 1997), el arroz (Xiao et al., 1998), la soja (Singh et al., 1998) o la remolacha azucarera (Panella y Lewellen, 2007). Los cruzamientos entre especies pueden plantear desequilibrios genéticos (Ehlenfeldt y Hanneman, 1984) que requieren soluciones técnicas genéticamente complejas, como retrocruzamientos alternativos con cada uno de los padres (Anderson et al., 1996), o la formación de híbridos entre donantes de citoplasma y de genes nucleares (Golmirzaie et al., 2003). Si las especies cruzadas son lejanas los cruzamientos directos pueden ser imposibles, aunque pueden conseguirse mediante métodos alternativos de incorporación de genes, tales como cruzamientos con especies intermedias (Eubanks, 2006).

Son escasas las publicaciones que muestran que los cruzamientos entre especies consiguen transmitir caracteres de interés. En conjunto, el empleo de germoplasma exótico en programas de mejora de resistencia a estreses frecuentemente resulta en un éxito muy limitado o en un fracaso, pero las contadas ocasiones en que ha dado lugar a resultados favorables, justifican sobradamente el esfuerzo invertido.



## 18.4. PROYECTOS QUE USAN GERMOPLASMA EXÓTICO

Probablemente el maíz sea el cultivo en el que se han realizado los mayores esfuerzos a gran escala para la incorporación de germoplasma exótico al material cultivado. Por ello, en lo que sigue, expondremos brevemente los grandes programas que se han llevado a cabo en la zona templada para incorporar maíz exótico.

En los años cincuenta se recogieron, estudiaron y clasificaron las razas locales de maíz de México, el Caribe y América Central y del Sur (REFS). Todo el material recolectado, una vez clasificado, se guardó en bancos de germoplasma y, posteriormente, se organizaron programas para su uso. En ellos se puede encontrar información sobre germoplasma útil para el mejorador. Tres grandes programas se han organizado para el uso efectivo de este germoplasma conocidos como Latin America Maize Regeneration Project (LAMRP), Latin America Maize Project (LAMP) y U.S. Germplasm Enhancement of Maize Project (GEM).

### 18.4.1. LAMRP

Algunas entradas recolectadas según lo expuesto en el párrafo anterior se perdieron al cabo de unos años, lo que hizo surgir la preocupación en la comunidad científica sobre el estado de conservación del germoplasma en los bancos. Por ello el U.S. Department of Agriculture apoyó un proyecto para la regeneración de las entradas conservadas en Colombia, México y Perú. De un total de 18.298 entradas, se regeneró con éxito aproximadamente el 40% (Goodman, 1988). Semilla de las entradas regeneradas se almacena en la North Central Plant Introduction Station, Ames, Iowa.

### 18.4.2. LAMP

Este trabajo, que concluyó en 1996, fue el primer proyecto internacional coordinado para la evaluación de uno de los principales cultivos del mundo. Contó con ayuda financiera de una empresa privada (Pioneer Hi-Bred Intl.) y el apoyo administrativo del USDA. Participaron investigadores de 12 países (Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Chile, Estados Unidos, Guatemala, México, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela) con el objetivo principal de evaluar las características agronómicas de más de 12.000 entradas que se conservaban en los bancos de germoplasma de Iberoamérica y los Estados Unidos. Un segundo objetivo fue la comprobación de la situación de los distintos bancos en lo que se refería a las cantidades de semilla conservada y a las condiciones de conservación (Salhuana et al., 1998).

### 18.4.3. GEM

El objetivo de este proyecto es, como su nombre claramente indica, aumentar la diversidad del germoplasma del maíz empleado en los Estados Unidos. Este objetivo se pretende alcanzar a través de un esfuerzo conjunto del USDA-ARS e investigadores públicos y privados utilizando germoplasma exótico junto con material adaptado, tanto público como privado, siendo aquél la fuente de alelos favorables que, una vez identificados, se incorporan al germoplasma adaptado. El proyecto está actualmente en ejecución. Una descripción actualizada del mismo puede verse en: [http://www.public.iastate.edu/~usda-gem/GEM\\_Project/GEM\\_Project.htm#Maize](http://www.public.iastate.edu/~usda-gem/GEM_Project/GEM_Project.htm#Maize)

#### **18.4.4. Otros proyectos que usan germoplasma exótico**

Además de los proyectos mencionados en los párrafos anteriores existen diversos centros, generalmente internacionales, que trabajan con material exótico. Entre ellos hay que mencionar a la mayoría de los citados en el apartado 18.2.

#### **18.5. CONCLUSIÓN**

En principio, la mejora de germoplasma exótico no difiere esencialmente de la mejora del material adaptado. Un aspecto de especial relevancia es la selección de un medio ambiente adecuado para la expresión plena del carácter o caracteres buscados en ese material exótico. Una importante ventaja del material exótico es que para la mayoría de los caracteres la cantidad de variación genética observada es, en general, mayor que de la que se dispone al emplear material adaptado, lo que hace que la respuesta a la selección sea muy alta, si bien hay que tener en cuenta el nivel de expresión del carácter buscado puesto que, como es obvio, un nivel de partida muy bajo puede hacer que el resultado final no sea tan bueno como se esperaba. Hay que tener en cuenta, además, la posible aparición de caracteres secundarios indeseables.

La ganancia genética puede verse afectada por la existencia de un gran componente de la varianza genotipo x ambiente si la evaluación se lleva a cabo simultáneamente en una zona templada y en el trópico (Betrán et al., 2006).

En la actualidad el uso de material exótico es corriente en numerosos cultivos buscando tolerancia a estreses abióticos y bióticos, resistencia a nuevas razas de patógenos, tolerancia a condiciones de bajos insumos, nueva variabilidad genética, etc.

La incorporación de germoplasma exótico es el mejor medio para ensanchar la base genética de los actuales cultivos, pero no es una tarea fácil ni rápida (Holland, 2004). Las nuevas directrices para la incorporación e introgresión de este germoplasma se basan en el uso de marcadores de ADN para caracterizar el valor de regiones específicas del genoma en las fuentes de germoplasma exótico (Tanksley y McCouch, 1997).

El análisis de marcadores, combinado con la evaluación fenotípica de progenies derivadas de cruzamientos exótico x adaptado, permite la identificación de alelos favorables en el germoplasma exótico, independientemente de los efectos que puedan causar los alelos desfavorables. La selección asistida por marcadores puede ser también usada como ayuda en los programas de "conversión" de exóticos al asegurar la introgresión precisa de alelos de adaptación en el germoplasma exótico a partir de material élite. Sin embargo, los marcadores moleculares por sí solos no pueden resolver el problema inicial de cómo identificar las fuentes de germoplasma exótico adecuadas para nuestro trabajo. Las estrategias basadas en marcadores moleculares pueden complementar, pero nunca reemplazar, los programas de incorporación a largo plazo basados en la selección fenotípica (Holland, 2004).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto AGL2007-64218/AGR).

## REFERENCIAS

- Abdurakhmonov, I.Y., Kushanov, F.N., Djaniqulov, F., Buriev, Z.T., Pepper, A.E., Fayzieva, N., Mavlonov, G.T., Saha, S., Jenkins, J.N. and Abdugarimov, A. (2007). The role of induced mutation in conversion of photoperiod dependence in cotton. *J. Hered.* 98: 258–266.
- Albertini, E., Barcaccia, G., Porceddu, A., Sorbolini, S. and Falcinelli, M. (2001). Mode of reproduction is detected by Parth1 and Sex1 SCAR markers in a wide range of facultative apomictic Kentucky bluegrass varieties. *Mol. Breed.* 7: 293–300.
- Anderson, N.O., Ascher, P.D. and Haghghi, K. (1996). Congruity backcrossing as a means of creating genetic variability in self pollinated crops: Seed morphology of *Phaseolus vulgaris* L and *P. acutifolius* A. Gray hybrids. *Euphytica* 87: 211–224.
- Annicchiarico, P. and Pecetti, L. (2003). Developing a tall durum wheat plant type for semi-arid, Mediterranean cereal-livestock farming systems. *Field Crops Res.* 80: 157–164.
- Banziger, M. and Cooper, M. (2001). Breeding for low input conditions and consequences for participatory plant breeding: Examples from tropical maize and wheat. *Euphytica* 122: 503–519.
- Baranger, A., Aubert, G., Arnau, G., Laine, A.L., Deniot, G., Potier, J., Weinachter, C., Lejeune-Henaut, I., Lallemand, J. and Burstin, J. (2004). Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1309–1321.
- Bernacchi, D., Beck-Bunn, T., Eshed, Y., Lopez, J., Petiard, V., Uhlig, J., Zamir, D. and Tanksley, S. (1998). Advanced backcross QTL analysis in tomato. I. Identification of QTLs for traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 381–397.
- Betrán, F.J., Mayfield, K., Isakeit, T. and Menz, M. (2006). Breeding maize exotic germplasm. pp 352–367, in *Plant Breeding: The Arnel R. Hallauer International Symposium*. K.R. Lamkey and M. Lee (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- Beuselinck, P.R. and Steiner, J.J. (1992). A proposed framework for identifying, quantifying, and utilizing plant germplasm resources. *Field Crops Res.* 29: 261–272.
- Biasutti, C.A., Casanoves, F. and Peiretti, D.A. (2000). Response to different adaptive mass selection criteria in maize exotic population. *Maydica* 45: 89–94.
- Birhman, R.K. and Kang, G.S. (1993). Analysis of variation and interrelationships in potato germplasm. *Euphytica* 68: 17–26.
- Bletsos, E.A. and Goulas, C.K. (1999). Mass selection for improvement of grain yield and protein in a maize population. *Crop Sci.* 39: 1302–1305.
- Bosch, L., Casanas, F., Ferret, A., Sanchez, E. and Nuez, F. (1994). Screening tropical maize populations to obtain semiexotic forage hybrids. *Crop Sci.* 34: 1089–1096.
- Brandolini, A., Landi, P., Monfredini, G. and Tano, F. (2000). Variation among Andean races of maize for cold tolerance during heterotrophic and early autotrophic growth. *Euphytica* 111: 33–41.

- Brummer, E.C. (1999). Capturing heterosis in forage crop cultivar development. *Crop Sci.* 39:943–954.
- Burton, G.W. (1982). Developing superior inbreds from exotic germplasm of pearl-millet. *Crop Sci.* 22: 653–655.
- Burton, G.W. and Werner, B.K. (1991). Genetics-markers to locate and transfer heterotic chromosome blocks for increased pearl-millet yields. *Crop Sci.* 31: 576–579.
- Casañas, F., Bosch, L., Sanchez, E., Almirall, A., Valero, J. and Nuez, F. (2001). Expected and achieved responses to selection for stem thickness in the generations F-2 and F(2)Syn(3) of the semiexotic maize population Mo17xLa Posta. *Maydica* 46: 283–289.
- Chee, P.W., Draye, X., Jiang, C.X., Decanini, L., Delmonte, T.A., Bredhauer, R., Smith, C.W. and Paterson, A.H. (2005). Molecular dissection of phenotypic variation between *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* (cotton) by a backcross-self approach: III. Fiber length. *Theor. Appl. Genet.* 111: 772–781.
- Chen, G.Q. and Foolad, M.R. (1999). A Mol. linkage map of tomato based on a cross between *Lycopersicon esculentum* and *L. pimpinellifolium* and its comparison with other molecular maps of tomato. *Genome* 42: 94–103.
- Cocks, P.S. (2001). Ecology of herbaceous perennial legumes: a review of characteristics that may provide management options for the control of salinity and waterlogging in dryland cropping systems. *Aust. J. Agri. Res.* 52: 137–151.
- Concibido, V.C., La Vallee, B., Mcclaird, P., Pineda, N., Meyer, J., Hummel, L., Yang, J., Wu, K. and Delannay, X. (2003). Introgression of a quantitative trait locus for yield from *Glycine soja* into commercial soybean cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 106: 575–582.
- Coors, J.G. and Mardones M. (1989). Registration of W552, W570, W572, and W576 parental lines of corn. *Crop Sci.* 29: 247–248.
- Del Blanco, I.A., Rajaram, S. and Kronstad, W.E. (2001). Agronomic potential of synthetic hexaploid wheat-derived populations. *Crop Sci.* 41: 670–676.
- Dudley, J.W. (1984). Theory for identification and use of exotic germplasm in maize breeding programs. *Maydica* 29: 391–407.
- Eagles, H.A., Hardacre, A.K., and Bansal, R.K. (1989). Testcross performance of maize lines from backcross populations containing highland Mexican or highland Peruvian germplasm. *Euphytica* 41:263–272.
- Eduardo, I., Arus, P. and Monforte, A.J. (2005). Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. *Theor. Appl. Genet.* 112: 139–148.
- Ehlenfeldt, M.K. and Hanneman, R.E. (1984). The use of endosperm balance number and 2n gametes to transfer exotic germplasm in potato. *Theor. Appl. Genet.* 68: 155–161.

- Elhatab, A.H., Shaban, S.A., Gheith, E.M.S. and Bedeer, A.H. (1985). Response of an exotic hybrid and 2 synthetic maize varieties to plant-density. *Zeitschrift fur Acker und Pflanzenbau-J. Agron. Crop Sci.* 154: 267–275.
- Errebhi, M., Rosen, C.J., Lauer, F.I., Martin, M.W., Bamberg, J.B. and Birong, D.E. (1998). Screening of exotic potato germplasm for nitrogen uptake and biomass production. *Amer. J. Potato Res.* 75: 93–100.
- Eubanks, M.W. (2006). A genetic bridge to utilize *Tripsacum* germplasm in maize improvement. *Maydica* 51: 315–327.
- Gill, B.S., Friebe, B., Raupp, W.J., Wilson, D.L., Cox, T.S., Sears, R.G., Brown-Guedira, G.L. and Fritz, A.K. (2006). Wheat Genetics Resource Center: The first 25 years. *Adv. Agron.* 89: 73–136.
- Godshalk, E.B. and Kauffmann, K.D. (1995). Performance of exotic x temperate single-cross maize hybrids. *Crop Sci.* 35: 1042–1045.
- Golmirzaie, A.M., Tenorio, J., Serquen, F. and Ortiz, R. (2003). Cybrids and tetrad sterility for developing true potato seed hybrids. *Ann. Appl. Biol.* 143: 231–234.
- Goodman, M.M. (1988). Final report of USDA-NCSSU specific coop. Agreement no. 58-7b30-573 of the Latin American Maize Regeneration Project. Dept. of Crop Sciences, North Carolina State Univ., Raleigh, NC, USA [Citado por Betrán et al. (2006)].
- Goodman, M.M. (1999). Broadening the genetic diversity in maize breeding by use of exotic germplasm. pp 139–148, in J. C. Coors and S. Pandey (eds.) *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, USA.
- Goodman, M.M. (2004). Developing temperate inbreds using tropical maize germplasm: Rationale, results, conclusions. *Maydica* 49: 209–219.
- Gouesnard, B., Sanou, J., Panouille, A., Bourion, V. and Boyat, A. (1996). Evaluation of agronomic traits and analysis of exotic germ plasm polymorphism in adapted x exotic maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 92: 368–374.
- Granati, E., Bisignano, V., Chiaretti, D., Crino, P. and Polignano, G.B. (2003). Characterization of Italian and exotic *Lathyrus* germplasm for quality traits. *Genet. Res. Crop Evol.* 50: 273–280.
- Gutierrez-Nava, M.D., Warren, C.A., Leon, P. and Walbot, V. (1998). Transcriptionally active MuDR, the regulatory element of the Mutator transposable element family of *Zea mays*, is present in some accessions of the Mexican landrace Zapalote chico. *Genetics* 149: 329–346.
- Hodnett, G.L., Burson, B.L., Rooney, W.L., Dillon, S.L. and Price, H.J. (2005). Pollen-pistil interactions result in reproductive isolation between *Sorghum bicolor* and divergent *Sorghum* species. *Crop Sci.* 45: 1403–1409.
- Hoffbeck, M.D., Openshaw, S.J., Geadelmann, J.L., Peterson, R.H. and Stuthman, D.D. (1995). Backcrossing and intermating in an exotic x adapted cross of maize. *Crop Sci* 35: 1359–1364.
- Holland, J.B. (2004). Breeding: Incorporation of exotic germplasm. pp. 222–224, in *Encyclopedia of crop science*. R.M. Goodman (ed.). Marcel Dekker, Inc.

- Hudak, C.M. and Patterson, R.P. (1996). Root distribution and soil moisture depletion pattern of a drought-resistant - Soybean plant introduction. *Agron. J.* 88: 478–485.
- Hyrkas, A. and Carena, M.J. (2005). Response to long-term selection in early maturing maize synthetic varieties. *Euphytica* 143: 43–49.
- Iglesias, C.A. and Hallauer, A.R. (1989). S2 Recurrent selection in maize populations with exotic germplasm. *Maydica* 34: 133–140.
- Isleib, T.G. (1999). Recovery of superior homozygous progeny from biparental crosses and backcrosses. *Crop Sci.* 39: 558–563.
- Leipner, J., Stehli, A. and Soldati, A. (1999). Photosynthetic performance of exotic maize (*Zea mays* L.) germplasm from tropical highlands at low and high temperature. *J. Appl. Bot.-Angewandte Botanik* 73: 20–24.
- Lemkekeyes, C.A. and Sachs, M.M. (1989). Genetics-variation for seedling tolerance to anaerobic stress in maize germplasm. *Maydica* 34: 329–337.
- Martin, S.K.S., Lewers, K.S., Palmer, R.G. and Hedges, B.R. (1996). A testcross procedure for selecting exotic strains to improve pure-line cultivars in predominantly self-fertilizing species. *Theor. Appl. Genet.* 92: 78–82.
- Mas, M.T., Bosch, L., Casanas, F., Valero, J. and Nuez, F. (1998). Semiexotic population of corn Mo17xAcross 8443 La Posta as a base for forage breeding. *Maydica* 43: 291–300.
- Mashingaidze, K. and Muchena, S.C. (1984). An evaluation of the drought resistance of maize (*Zea mays*-I) hybrids developed from an 8x8 diallel cross of inbreds developed from Zimbabwean and exotic germ-plasm. *Zimbabwe J. Agric. Res.* 22: 85–99.
- McCarty, J.C., Jenkins, J.N. and Wu, J.X. (2004). Primitive accession derived germplasm by cultivar crosses as sources for cotton improvement: I. Phenotypic values and variance components. *Crop Sci.* 44: 1226–1230.
- McMichael, B.L. and Quisenberry, J.E. (1991). Genetics-variation for root shoot relationships among cotton germplasm. *Env. Exp. Bot.* 31: 461–470.
- Menkir, A. and Akintunde, A.O. (2001). Evaluation of the performance of maize hybrids, improved open-pollinated and farmers' local varieties under well-watered and drought stress conditions. *Maydica.* 46: 227–238.
- Menkir, A., Ingelbrecht, I. and The, C. (2007). Testcross performance and diversity analysis of white maize lines derived from backcrosses containing exotic germplasm. *Euphytica* 155: 417–428.
- Menkir, A., Olowolafe, M.O., Ingelbrecht, I., Fawole, I., Badu-Apraku, B. and Vroh, B.I. (2006). Assessment of testcross performance and genetic diversity of yellow endosperm maize lines derived from adapted x exotic backcrosses. *Theor. Appl. Genet.* 113: 90–99.
- Mickelson, H.R., Cordova, H., Pixley, K.V. and Bjarnason, M.S. (2001). Heterotic relationships among nine temperate and subtropical maize populations. *Crop Sci.* 41: 1012–1020.

- Mikel, M.A. and Dudley, J.W. (2006). Evolution of North American dent corn from public to proprietary germplasm. *Crop Sci.* 46:1193–1205.
- Monneveux, P., Sanchez, C., Beck, D. and Edmeades, G.O. (2006). Drought tolerance improvement in tropical maize source populations: Evidence of progress. *Crop Sci.* 46: 180–191.
- Nass, L.L. and Coors, J.G. (2003). Potential of exotic x adapted maize germplasm for silage. *Maydica* 48: 197–206.
- Omoigui, L.O., Alabi, S.O., Ado, S.G., Ajala, S.O. and Kamara, A.Y. (2006). Genetics gains from cycles of full-sib recurrent selection for low nitrogen tolerance in a tropical maize population. *Maydica* 51: 497–505.
- Ordás, A. (2003). Cruz Gallástegui: pionero de la mejora genética de plantas. pp 299–326, En M. Candela (ed.), *Los orígenes de la genética en España*. Sociedad Estatal de Conmemoraciones Culturales, S.A., Madrid, España.
- Ordás, A., Revilla, P., Malvar, R.A. and Carrea, M.E. (1994). Development of sweet corn hybrids adapted to the environmental-conditions of the northwest of Spain. *Maydica* 39: 171–175.
- Ordás, B., Revilla, P., Soengas, P., Ordás, A. and Malvar, R.A. (2005). *Sugary enhancer1* inbreds to improve the quality of *sugary1* hybrids of sweet corn. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 130: 68–74.
- Ortiz, R. and Golmirzaie, A.M. (2003). Genetics parameters for agronomic characteristics. I. Early and intermediate breeding populations of true potato seed. *Hereditas* 139: 212–216.
- Oury, F.X., Leenhardt, F., Remesy, C., Chanliaud, E., Duperrier, B., Balfourier, F. and Charmet, G. (2006). Genetics variability and stability of grain magnesium, zinc and iron concentrations in bread wheat. *Eur. J. Agron.* 25: 177–185.
- Panella, L. and Lewellen, R.T. (2007). Broadening the genetic base of sugar beet: introgression from wild relatives. *Euphytica* 154: 383–400.
- Peterson, R.H., Gadelmann, J.L., Rinke, E.H. and Sentz, J.C. (1976). Registration of six maize germplasm populations (Reg. No. GP 64 to 69). *Crop Sci.* 16: 605–606.
- Powell, W., Phillips, M.S., McNicol, J.W. and Waugh, R. (1991). The use of DNA markers to estimate the extent and nature of genetic-variability in *solanum-tuberosum* cultivars. *Ann. Appl. Biol.* 118: 423–432.
- Prohens, J., Rodriguez-Burruezo, A. and Nuez, F. (2005). Utilization of genetic resources for the introduction and adaptation of exotic vegetable crops: The case of pepino (*Solanum muricatum*). *Euphytica* 146: 133–142.
- Ragot, M., Sisco, P.H., Hoisington, D.A. and Stuber, C.W. (1995). Mol.-marker-mediated characterization of favourable exotic alleles at quantitative trait loci in maize. *Crop Sci.* 35: 1306–1315.
- Reif, J.C., Melchinger, A.E., Xia, X.C., Warburton, M.L., Hoisington, D.A., Vasal, S.K., Beck, D., Bohn, M. and Frisch, M. (2003). Use of SSRs for establishing heterotic groups in subtropical maize. *Theor. Appl. Genet.* 107: 947–957.



- Revilla, P., Butrón, A., Cartea, M.E., Malvar R.A. and Ordás, A. (2005). Breeding for cold tolerance. pp 301–398, in M. Ashraf and P.J.C. Harris (eds.). *Abiotic Stresses. Plant resistance through breeding and molecular approaches*. The Haworth Press, Inc., USA.
- Roy, J.K., Lakshmikumar, M.S., Balyan, H.S. and Gupta, P.K. (2004). AFLP-based genetic diversity and its comparison with diversity based on SSR, SAMPL, and phenotypic traits in bread wheat. *Biochem. Genet.* 42: 43–59.
- Russell, W.A., Penny, L.H., Sprague, G.F., Guthrie, W.D. and Dicke, F.F. (1971). Registration of maize parental lines (Reg. Nos. PL 1 to 13). *Crop Sci.* 11: 143.
- Salhuana, W., Pollak, L.M., Ferrer, M., Paratori, O. and Vivo, G. (1998). Breeding potential of maize accessions from Argentina, Chile, USA, and Uruguay. *Crop Sci.* 38: 866–872.
- Sarcevic, H., Pejic, I., Baric, M. and Kozumplik, V. (2004). Performance and inbreeding depression of an exotic maize population under selfed progeny recurrent selection. *Bodenkultur* 55: 21–27.
- Selig, L., Lambert, R.J., Rocheford, T.R. and Da Silva, W.J. (1999). RFLP and cluster analysis of introgression of exotic germplasm into US maize inbreds. *Maydica* 44: 85–92.
- Shashidhara, G., Hema, M.V., Koshy, B. and Farooqi, A.A. (2003). Assessment of genetic diversity and identification of core collection in sandalwood germplasm using RAPDS. *J. Hort. Sci. Biotech.* 78: 528–536.
- Simic, D., Presterl, T., Seitz, G. and Geiger, H.H. (2003). Usefulness of F2,F2-SYN2, and BC1 populations derived from four adapted by exotic maize crosses. *Maydica* 48: 299–305.
- Simmonds, N.W. (1993). Introgression and incorporation. Strategies for the use of crop genetic resources. *Biol. Rev.* 68:539–562.
- Singh, R.J. and Hymowitz, T. (1999). Soybean genetic resources and crop improvement. *Genome* 42: 605–616.
- Singh, R.J., Kollipara, K.P. and Hymowitz, T. (1998). Monosomic alien addition lines derived from *Glycine max* (L) Merr and *G-tomentella* Hayata: Production, characterization, and breeding behaviour. *Crop Sci.* 38: 1483–1489.
- Singh, S., Negi, A.S., Agarwal, D.K., Katiyar, P.K. and Singh, U.P. (2000). Chemical composition, in vitro dry matter digestibility, total phenolics and proanthocyanidins in hedge lucerne (*Desmenthus virgatus*) exotic germplasm. *Indian J. Animal Sci.* 70: 1246–1249.
- Singh, A., Negi, M.S., Rajagopal, J., Bhatia, S., Tomar, U.K., Srivastava, P.S. and Lakshmikumar, M. (1999). Assessment of genetic diversity in *Azadirachta indica* using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99: 272–279.
- Spaner, D., Brathwaite, R.A.I. and Mather, D.E. (1995). Comparison of open-pollinated stress-tolerant and landrace maize for production under stress conditions in Trinidad. *Maydica* 40: 331–337.
- Spitko, T., Sagi, L., Pinter, J., Marton, L.C. and Barnabas, B. (2006). Haploid regeneration aptitude of maize (*Zea mays* L.) lines of various origin and of their hybrids. *Maydica* 51: 537–542.
- Sprague, G.F. (1971). Genetic vulnerability in corn and sorghum. *Proc. Annu. Corn and Sorghum Res. Conf.* 26:96–104.



- Srivastava, S.P., Bhandari, T.M.S., Yadav, C.R., Joshi, M. and Erskine, W. (2000). Boron deficiency in lentil: Yield loss and geographic distribution in a germplasm collection. *Plant Soil* 219: 147–151.
- Stehli, A., Soldati, A. and Stamp, P. (1999). Vegetative performance of tropical highland maize (*Zea mays* L.) in the field. *J. Agron. Crop Sci.* 183: 193–198.
- Steiner, J.J. and De los Santos, G.G. (2001). Adaptive ecology of *Lotus corniculatus* L. genotypes: I. Plant morphology and RAPD marker characterizations. *Crop Sci.* 41: 552–563.
- Taba, S., Diaz, J., Aragon, F., Rincon-Sanchez, F., Hernandez, J.M. and Krakowsky, M. (2006). Evaluation of Zapalote Chico accessions for conservation and enhancement. *Maydica* 51: 209–218.
- Tanksley, S.D., McCouch, S.R. (1997). Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277:1063–1066.
- Tarter, J.A., Goodman, M.M. and Holland, J.B. (2003). Testcross performance of semiexotic inbred lines derived from Latin America maize accessions. *Crop Sci.* 43: 2272–2278.
- Tarter, J.A., Goodman, M.M. and Holland, J.B. (2004). Recovery of exotic alleles in semiexotic maize inbreds derived from crosses between Latin Amer. accessions and a temperate line. *Theor. Appl. Genet.* 109: 609–617.
- Tarter, J.A. and Holland, J.B. (2006). Gains from selection during the development of semiexotic inbred lines from Latin Amererica maize accessions. *Maydica* 51: 15–23.
- Thompson, J.A. and Nelson, R.L. (1998). Utilization of diverse germplasm for soybean yield improvement. *Crop Sci.* 38: 1362–1368.
- Thompson, J.A., Nelson, R.L. and Schweitzer, L.E. (1995). Relationships among specific leaf weight, photosynthetic rate, and seed yield in soybean. *Crop Sci.* 35: 1575–1581.
- Trifunovic, S., Husic, I., Rosulj, M. and Stojsin, R. (2001). Evaluation of US and Yugoslavian maize populations as sources of favorable alleles. *Crop Sci.* 41: 302–308
- Upadhyaya, H.D., Bramel, P.J., Ortiz, R. and Singh, S. (2002). Developing a mini core of peanut for utilization of genetic resources. *Crop Sci.* 42: 2150–2156.
- Upadhyaya, H.D., Dwivedi, S.L., Gowda, C.L.L. and Singh, S. (2007). Identification of diverse germplasm lines for agronomic traits in a chickpea (*Cicer arietinum* L.) core collection for use in crop improvement. *Field Crop Res.* 100: 320–326.
- Upadhyaya, H.D., Swamy, B.P.M., Goudar, P.V.K., Kullaiswamy, B.Y. and Singh, S. (2005). Identification of diverse groundnut germplasm through multienvironment evaluation of a core collection for Asia. *Field Crop Res.* 93: 293–299.
- Vasal, S.K., Dhillon, B.S., Srinivasan, G., Zhang, S.H. and Mclean, S.D. (1995). Recurrent selection for breeding stress tolerance in four intermediate-maturity maize populations. *Maydica* 40: 159–164.
- Vasal, S.K., Srinivasan, G., Cordova, H., Pandey, S., Jeffers, D., Bergvinson, D. and Beck, D. (1999). Inbred line evaluation nurseries and their role in maize breeding at CIMMYT. *Maydica* 44: 341–351.

- Vetelainen, M. (1994). Widening of genetic-variation in barley breeding programs - experiences from composite crosses to Nordic barley breeding populations. *Acta Agric. Scand. Sect. B-Soil Plant Sci.* 44: 129–135.
- Vetelainen, M., Nissila, E., Tigerstedt, P.M.A. and vonBothmer, R. (1996). Utilization of exotic germplasm in Nordic barley breeding its consequences for adaptation. *Euphytica* 92: 267–273.
- Vetelainen, M., Suominen, M. and Nissila, E. (1997). Agronomic performance of crosses between Nordic and exotic barleys. *Euphytica* 93: 239–248.
- Williams, C.G., Goodman, M.M. and Stuber, C.W. (1995). Comparative recombination distances among *Zea mays* L. inbreds, wide crosses and interspecific hybrids. *Genetics* 141: 1573–1581.
- Wu, J.X., Jenkins, J.N., McCarty, J.C., Zhong, M. and Swindle, M. (2007). AFLP marker associations with agronomic and fiber traits in cotton. *Euphytica* 153: 153–163.
- Xiao, J.H., Li, J.M., Grandillo, S., Ahn, S.N., Yuan, L.P., Tanksley, S.D. and McCouch, S.R. (1998). Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics* 150: 899–909.
- Yates, H.E., Frary, A., Doganlar, S., Frampton, A., Eannetta, N.T., Uhlig, J. and Tanksley, S.D. (2004). Comparative fine mapping of fruit quality QTLs on chromosome 4 introgressions derived from two wild tomato species. *Euphytica* 135: 283–296.
- Yitbarek, N. and Hilger, T.H. (1995). Potential of adapted Ethiopian maize germplasm as a source material for maize improvement in semiarid environments. *J. Appl. Bot.-Angewandte Botanik* 69: 157–162.
- Zaidi, P.H., Maniselvan, P., Sultana, R., Yadav, M., Singh, R.P., Singh, S.B., Dass, S. and Srinivasan, G. (2007). Importance of secondary traits in improvement of maize (*Zea mays* L.) for enhancing tolerance to excessive soil moisture stress. *Cereal Res. Comm.* 35: 1427–1435.
- Zalapa, J.E., Staub, J.E., McCreight, J.D., Chung, S.M. and Cuevas, H. (2007). Detection of QTL for yield-related traits using recombinant inbred lines derived from exotic and elite US Western Shipping melon germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 114: 1185–1201.

CAPÍTULO **19**

---

**MEJORA Y SELECCIÓN  
DE PATRONES *PRUNUS*  
TOLERANTES A  
ESTRESSES ABIÓTICOS**

*María Ángeles Moreno  
Yolanda Gogorcena  
Jorge Pinochet*



## MEJORA Y SELECCIÓN DE PATRONES *PRUNUS* TOLERANTES A ESTRESSES ABIÓTICOS

---

María Ángeles Moreno<sup>1,2</sup>, Yolanda Gogorcena<sup>1</sup> y Jorge Pinochet<sup>3</sup>

<sup>1</sup> **Departamento de Pomología, Estación Experimental de Aula Dei (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Apdo. 13.034, 50.080 Zaragoza**

<sup>2</sup> **Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA 95616, USA**

<sup>3</sup> **Agromillora Catalana S.A., C/ El Rebato s/n, 08739 Subirats (Barcelona)**

---

### 19.1. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Prunus* cultivadas por su fruto tienen una gran importancia a nivel mundial con una producción que se acerca a los 35 millones de toneladas anuales (FAOSTAT, 2008). En España, se destinan 782.000 ha a estas especies, con una producción total de 1.871.000 t en 2006. De ellas, el melocotonero es la especie frutal de hueso más cultivada y también presenta mayor producción y superficie cultivada que los frutales de pepita. Además, con una producción de 1.255.600 t en 2006, representa el tercer país con mayor producción a nivel mundial y en torno al 29% del total europeo. También la producción española para albaricoquero, almendro, cerezo y ciruelo, se encuentra entre los cuatro países máximos productores en Europa.

En la fruticultura moderna, un árbol frutal está formado por dos individuos que están unidos mediante el injerto de la variedad, o parte aérea, sobre el patrón que aporta las raíces. En la selección de una variedad se tienen en cuenta sus buenas características productivas y adaptación a las condiciones climáticas del área de cultivo. En el caso de los patrones frutales, es prioritaria su buena adaptación a las características edafológicas y condiciones limitantes del terreno donde se establece la plantación. Además, deben mostrar una buena compatibilidad con las variedades injertadas, e inducir productividad, calidad de fruto y control del vigor del árbol (Wertheim y Webster, 2005). La selección de patrones frutales por su tolerancia a estreses abióticos representa una de las estrategias más convenientes en fruticultura, ya que a diferencia de otras especies hortícolas una plantación frutal permanece en el mismo terreno durante mucho más tiempo, oscilando entre 15 y 20 años según especies. Una larga permanencia del árbol frutal en el mismo suelo hace imprescindible la adecuada elección de la especie del patrón a utilizar, teniendo en cuenta la variabilidad disponible en el género *Prunus* para la adaptación a las condiciones y/o estreses más limitantes en el área de cultivo.

El género *Prunus* (subfamilia Prunoideae de la familia Rosaceae) es un género muy amplio y diverso, con un número de especies arbóreas o arbustivas, que podría alcanzar las 400 (Rehder, 1940). Este género tiene su origen principalmente en el hemisferio Norte y está ampliamente

extendido en Europa. El número básico de cromosomas es  $x = 8$ . Entre las especies más cultivadas por su fruto, el melocotonero [*P. persica* (L.) Batsch], almendro [*P. dulcis* D.A. Webb (anteriormente *P. amygdalus* Batsch)], albaricoquero (*P. armeniaca* L.), cerezo (*P. avium* L.) y ciruelo japonés (*P. salicina* Lindl.) son diploides, con  $2n = 2x = 16$ . Algunas especies tetraploides incluirían al guindo (*P. cerasus* L.) y al endrino (*P. spinosa* L.) ( $2n = 4x = 32$ ), mientras que las hexaploides estarían representadas por los ciruelos europeos comunes [*P. domestica* L. y *P. insititia* L. ( $2n = 6x = 48$ )]. Otras especies *Prunus*, con niveles variables de ploidía, adquieren especial interés utilizadas como patrones. Entre ellas, cabría citar las especies *P. cerasifera* Ehrh., *P. davidiana* (Carr.) Franch., *P. americana* Marsh, *P. munsoniana* Wight y Hedr., *P. mira* Koehne, *P. ferganensis* (Kost. y Rjab.) Kov y Kost., *P. kansuensis* Rehd., *P. besseyi* Bailey, *P. fruticosa* Pall., *P. mahaleb* (L.) y *P. tomentosa* Thunb.

Tradicionalmente, el empleo de patrones pertenecientes a la misma especie que la variedad injertada, y su reproducción sexual por semilla, representaba la estrategia más utilizada, sobre todo por las dificultades de propagación asexual o vegetativa de numerosas especies. Los avances en los métodos de propagación clonal, primero con el empleo de hormonas sintéticas de enraizamiento y después con la aplicación masiva de las técnicas de micropropagación, han facilitado el uso de patrones clonales e híbridos interespecíficos pertenecientes a distintas especies. Además, la existencia de un gran número de especies dentro del género *Prunus* aumenta la disponibilidad de patrones, dada la buena compatibilidad de injerto en combinaciones patrón-variedad de diferentes especies. Igualmente, la facilidad de hibridación interespecífica entre especies próximas aumenta la variabilidad disponible y la obtención de híbridos con dos o más especies en su genotipo (Kester y Assai, 1986; Renaud et al., 1988; Moreno y Cambra, 1994; Gradziel, 2003).

En las condiciones de cultivo predominantes en el área mediterránea, la presencia de suelos pesados y calizos origina los estreses abióticos más comunes que limitan el cultivo de la mayoría de las especies frutales de hueso. En dichos suelos son muy frecuentes los problemas de asfixia de raíces y clorosis férrica, asociados a mortalidad de árboles, deficiencia de hierro y de otros nutrientes (Tagliavini y Rombolà, 2001). Dada la importancia económica de estos estreses, la búsqueda de tolerancia ha sido un objetivo prioritario en los programas de mejora de patrones en distintos países europeos (Bernhard y Grasselly, 1959; Moreno et al., 1994, 1995a; Salesses et al., 1998; Felipe et al., 1997; Nicotra y Moser, 1997).

En la actualidad, la creciente salinización del terreno, procedente del agua de riego y/o como consecuencia de unas malas prácticas agrícolas, también constituye un fuerte limitante para el cultivo de algunos frutales de hueso en zonas tradicionales de cultivo del área mediterránea. La disponibilidad de agua representa otro de los factores limitantes que adquiere especial relevancia en las condiciones actuales de cultivo, dada la creciente vulnerabilidad de la cuenca mediterránea frente a este recurso. Sin embargo, la tolerancia a sequía no se ha considerado tradicionalmente como objetivo prioritario en la mejora de patrones frutales porque las tierras con déficit de agua se destinaban a otros cultivos menos rentables, con la excepción del almendro, considerado como un cultivo tradicional de secano y con un mayor nivel de tolerancia a dicho estrés. No obstante, la tolerancia frente a sequía ya ha comenzado a incluirse en algunos programas de mejora (Dirlewanger et al., 2004b). Por otra parte, en Estados Unidos y Canadá, se ha buscado además la tolerancia frente al frío, obteniéndose algunos patrones tolerantes a fuertes descensos térmicos invernales (Reighard, 2002). Sin embargo, en nuestras latitudes este problema climático tiene poca relevancia.

En zonas tradicionales de cultivo son también frecuentes los problemas de replantación, asociados a presencia de nematodos (género *Meloidogyne* y *Pratylenchus*), hongos de suelo (*Armillaria mellea*, *Phytophthora spp.*, *Rosellinia necatrix*) y/o bacterias (*Agrobacterium tumefaciens*), que ocasionan decaimiento y mortalidad de árboles (Calvet et al., 2000). Estos factores, considerados como estreses bióticos, en ocasiones se ven muy relacionados con algunos de los estreses abióticos antes mencionados. Como ejemplo, es bien conocido que las condiciones de excesiva humedad y mal drenaje del suelo ocasionan las condiciones más favorables para la proliferación de hongos patógenos del suelo, entre ellos diversas especies de *Phytophthora* (Mircetich y Matheron, 1976).

Dada la mayor importancia económica en nuestras condiciones de cultivo de los estreses abióticos relacionados con la clorosis férrica y asfixia de raíces, en este capítulo se profundizará en dichos estreses. Además, existe una mayor disponibilidad de trabajos relacionados con la selección y fisiología de estos estreses, que pueden ser utilizados como modelo y referencia en otros menos estudiados. También se hará referencia al estrés causado por la salinización del terreno, aunque los trabajos de mejora y selección en *Prunus* relacionados con dicho estrés son más escasos.

## 19.2. TOLERANCIA A CLOROSIS FÉRRICA POR DEFICIENCIA DE HIERRO EN SUELOS CALIZOS

Los suelos calizos presentan, en general, un elevado contenido de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), caliza activa y/o pH alto, que disminuyen la disponibilidad del hierro presente en el medio y su asimilación por la planta. Este tipo de suelos es común en muchas de las áreas mejor adaptadas, por sus condiciones climáticas, al cultivo de los principales frutales de hueso, tanto en los países europeos como a nivel mundial (Tagliavini y Rombolà, 2001). En el área mediterránea, la clorosis férrica es un desarreglo nutricional que afecta a un gran número de cultivos y en el caso de los árboles frutales y otras especies leñosas, es especialmente grave en melocotonero, cítricos, peral, kiwi y vid. Se estima un gasto anual de más de 100 millones de euros en tratamientos correctores con quelatos de hierro, que además son muy contaminantes (Álvarez et al., 2003).

### 19.2.1. Respuestas fisiológicas y metabólicas

Entre los síntomas visuales más característicos e inmediatos de la carencia de hierro se observa el amarilleamiento internervial de las hojas más jóvenes, permaneciendo verdes sus nerviaciones. En los casos más severos todas las hojas pueden estar cloróticas y adquirir un color casi blanco, con inhibición de la síntesis de clorofila y del índice de fotosíntesis. Los síntomas visuales en hojas son más evidentes en primavera, al comienzo del periodo vegetativo de la planta, cuando su crecimiento es más activo. La clorosis puede provocar además una reducción en el desarrollo del árbol, de la producción (Almalotis et al., 1995; Tagliavini et al., 2000) y de la calidad del fruto (Álvarez-Fernández et al., 2003; 2006), unido al retraso de su maduración (Sanz et al., 1997). A largo plazo, puede provocar la muerte temprana del árbol. Por otra parte, la deficiencia de hierro también parece estar asociada a una mayor susceptibilidad de los árboles a los ataques de patógenos (Rombolà y Tagliavini, 2006). Además, las plantas con deficiencia de hierro muestran una menor eficiencia en el uso del agua (Abadía et al., 2004; Rombolà et al., 2005), ya que, aunque los niveles de transpiración son similares a los de las plantas no cloróticas, las deficientes no son capaces de fijar tanto carbono.

Entre los mecanismos de tolerancia se apunta sobre todo a determinadas características de las raíces, como el mantenimiento de su crecimiento o de una mayor superficie de raíz durante el estrés (Byrne et al., 1990). El descenso del pH, aumento del contenido de ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), así como de la capacidad reductora de hierro de las raíces, también han sido relacionados con los mecanismos bioquímicos que conducen a un aumento de la disponibilidad de hierro (Rabotti et al., 1995; Ollat et al., 2003; Gogorcena et al., 2000; 2004; Jiménez, 2006; Jiménez et al., 2008). El aumento en la capacidad reductora de hierro de las raíces podría incrementar la concentración de  $Fe^{2+}$  en la rizosfera y, por lo tanto, su adquisición por un transportador de membrana (Yi y Guerinot, 1996). También la acumulación de azúcares en la raíz es un mecanismo de aporte de energía a los procesos de respuesta frente al estrés (Thimm et al., 2001). Los azúcares oxidados mediante la glicólisis podrían ser utilizados para suministrar carbono al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y sintetizar ATP y NAD(P)H (Abadía et al., 2002; Dondini et al., 2006). A su vez, se incrementaría la concentración de ácidos orgánicos (malato y citrato) (Ollat et al., 2003; Jiménez et al., 2007) y de algunos aminoácidos (Zocchi, 2006).

### 19.2.2. Variabilidad genética y material vegetal

En el género *Prunus* existe variabilidad genética para la tolerancia a la clorosis férrica (Almaliotis et al., 1995; Shi y Byrne, 1995). La fuente de tolerancia más utilizada ha sido la del almendro, explotada en los híbridos almendro x melocotonero, como patrones para melocotonero, almendro y, en menor medida, ciruelo (Moreno, 2004). Dada la gran sensibilidad a la clorosis férrica del pie franco de melocotonero, los híbridos almendro x melocotonero han permitido su cultivo en suelos calizos, ya que además presentan una buena compatibilidad de injerto con dicha especie. Son vigorosos y muy apropiados también para ser usados en suelos pobres y en situaciones de replantación de frutales (Pinochet et al., 1999; Masai y Loreti, 2004). Entre los más utilizados en la cuenca mediterránea, cabe destacar al híbrido GF 677 (Bernhard y Grasselly, 1959), y otros con interés más local como Adafuel (Cambra, 1990; Moreno et al., 1994) y Mayor. Más recientemente, han experimentado una gran difusión los híbridos GxN (almendro Garfi x melocotonero Nemared): Garnem, Felinem y Monegro; procedentes de cruzamientos dirigidos y caracterizados por su resistencia a nematodos agalladores y color rojo de sus hojas (Felipe et al., 1997).

Por otra parte, existe una amplia gama de patrones ciruelo correspondientes a varias especies (*P. domestica*, *P. insititia*, *P. cerasifera*) que muestran un buen comportamiento en suelos calizos. Entre ellos, cabe destacar al híbrido interespecífico Damas GF 1869 (*P. domestica* x *P. spinosa*), al Pollizo de Murcia (*P. insititia*) y sus selecciones clonales Adesoto 101, Montizo y Monpol, como tolerantes o muy tolerantes (Byrne et al., 1990; Felipe y Pascual, 1990; Moreno et al., 1995a; Jiménez et al., 2008). Los ciruelos híbridos de San Julián, y los patrones Myrabi, Brompton y GF 43, podrían clasificarse como moderadamente tolerantes, seguidos por Myran (ciruelo x melocotonero), San Julián A, Ishtara (híbrido complejo de ciruelo x melocotonero) y Julior, que oscilarían de moderadamente susceptibles a susceptibles. Igualmente, se ha visto que el nivel de tolerancia en melocotonero es muy bajo y con muy poca variabilidad (Byrne et al., 1990; Jiménez, 2006).



En cerezo también se han observado grandes diferencias en tolerancia, según la especie y base genética predominante en el genotipo del patrón empleado. La especie *P. mahaleb* y sus selecciones clonales SL 64 y SL 405, así como el patrón Adara (*P. cerasifera*) destacan por su elevada tolerancia a clorosis (Breton et al., 1972; Perry, 1987; Moreno et al., 1996). Con un nivel de tolerancia intermedio podrían considerarse las selecciones de la especie *P. cerasus* (CAB 6P y CAB 11E) e híbridos interespecíficos de *P. mahaleb* x *P. avium*: MaxMa 14, MaxMa 60 (Moreno et al., 2001; Jiménez et al., 2004; 2007). Otros patrones procedentes del Norte de Europa, como las selecciones Grand Manil (Damil, Camil e Inmil), y los híbridos interespecíficos Colt (*P. avium* L. x *P. pseudocerasus* Lindl.) y Gisela 5 (*P. canescens* x *P. cerasus*), han mostrado problemas de adaptación a las condiciones más cálidas del área mediterránea y suelos con problemas de clorosis y de estrés hídrico (Moreno et al., 2001; De Salvador et al., 2005).

### 19.2.3. Métodos de selección de patrones tolerantes a la clorosis férrica

Tradicionalmente los métodos de selección frente a clorosis han estado basados en la observación de síntomas visuales en hojas y brotes, características de crecimiento y producción de las plantas, concentración de Fe en hojas, flores y brotes leñosos, y estimación del contenido foliar de clorofila en plantaciones establecidas en condiciones clorosantes de campo (Figura 19.1A) (Almaliolis et al., 1995; Moreno et al., 1996; 2001; Jiménez et al., 2004; 2007; Zarrouk et al., 2005). El análisis mineral de las hojas es el método tradicional de prognosis del estado nutricional de los cultivos (Leece, 1975). No obstante, el análisis mineral de otros órganos de la planta, como las flores, se ha utilizado como un método más precoz de evaluación del estado nutricional en cerezo y melocotonero (Abadía et al., 2000; Jiménez et al., 2004; Zarrouk et al., 2005). Sin embargo, estos métodos suponen un elevado coste en tiempo y en espacio necesario, por lo que se han utilizado sólo en fases finales de selección o de transferencia al sector comercial.

En fases previas de selección y/o con fines experimentales más básicos se han estudiado los mecanismos fisiológicos implicados en la manifestación de la clorosis férrica con plantas establecidas en maceta y/o cultivo hidropónico (Figura 19.1B), con un mayor control de las soluciones nutritivas minerales y de la deficiencia de hierro inducida (Romera et al., 1991a; 1991b; Cinelli et al., 1995; 2004; Cinelli y Loreti, 2004).



**Figura 19.1.** A. Síntomas de clorosis férrica en condiciones clorosantes de campo (izquierda).  
B. Evaluación de patrones *Prunus* en condiciones de cultivo hidropónico (derecha).

La inducción de la actividad reductasa férrica (FC-R) se ha descrito como una respuesta frente a la deficiencia de hierro para diversos genotipos de frutales de hueso (Cinelli et al., 1995; Cinelli y Loreti, 2004; Gogorcena et al., 2000; 2004). Esta inducción se consigue por adición de hierro tras un corto periodo de deficiencia, dado que la total ausencia de hierro no provoca un aumento en dicha actividad (Gogorcena et al., 2000). El método utiliza plantas de cultivo *in vitro* que se desarrollan posteriormente en condiciones de cultivo hidropónico, y a las que se somete a deficiencia de hierro. Así, en un estudio reciente con distintas especies de *Prunus*, se evaluaron patrones clonales de ciruelo, cerezo, híbridos almendro x melocotonero y francos de melocotonero, ya seleccionados y/o en fases avanzadas de selección (Jiménez et al., 2008). La mayor o menor inducción en la actividad FC-R permitió establecer una clasificación de los genotipos en función de su tolerancia a la clorosis férrica. Así, por ejemplo, los patrones Adesoto, Felinem, GF 677 y Krymsk 86, mostraron una alta inducción de la actividad FC-R en el tratamiento inductor. Algunos de estos patrones (Adesoto, Felinem y GF 677) habían sido previamente evaluados y considerados como tolerantes (Moreno et al., 1995a; Socias i Company et al., 1995; Felipe et al., 1997; Cinelli et al., 2004; Gogorcena et al., 2004; Giorgi et al., 2005). En cambio, los patrones *P. persica* x *P. davidiana*: Barrier, Cadaman y Nemaguard, y otros francos de melocotonero (*P. persica*), mostraron una baja o nula capacidad de inducción de la actividad FC-R, confirmando datos previos para alguno de ellos (Romera et al., 1991a; 1991b; Gogorcena et al., 2004). No obstante, la comparación de los resultados con plantas establecidas en condiciones controladas de cultivo hidropónico y en condiciones clorosantes de campo (viveros y plantaciones experimentales) mostró una mayor correlación cuando las plantas en campo no estaban injertadas con variedades (Jiménez et al., 2008). Posiblemente, otros aspectos agronómicos y fisiológicos del árbol, como el vigor, producción, efecto de la combinación patrón-variedad, etc., también podrían influir en la respuesta de las plantas a la deficiencia de hierro (Zarrouk et al., 2005).

Por otro lado, en un estudio de patrones *Prunus* con distinta base genética: Adesoto (ciruelo), Barrier (híbrido de melocotonero x *P. davidiana*) y GF 677 (almendro x melocotonero), sus raíces también mostraron una acumulación de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), ácidos orgánicos (malato, citrato y succinato) y aminoácidos (alanina, glutamato, glutamina y valina) y actividad PEPC, como respuesta a la deficiencia de hierro (Jiménez et al., 2005a; 2005b). Además, algunos de los cambios metabólicos observados parecen expresarse diferencialmente en los genotipos más tolerantes, por lo que podrían ser indicadores genéticos de tolerancia y utilizarse en los procesos de selección (Jiménez, 2006).

Como resultado de los ensayos establecidos en condiciones reales de campo (plantaciones y viveros experimentales), y en condiciones controladas de cultivo hidropónico y/o en maceta, puede concluirse que, en general, los híbridos almendro x melocotonero (*P. dulcis* x *P. persica*), algunas selecciones clonales de las especies *P. insititia*, *P. cerasifera* y *P. mahaleb*, así como de las especies *P. domestica* y *P. cerasus*, son mucho más tolerantes a clorosis que los patrones francos de melocotonero (*P. persica*) e híbridos de melocotonero x *P. davidiana*.

#### 19.2.4. Análisis genético de la tolerancia a la clorosis férrica

En los programas de selección de frutales se comenzó a realizar la selección asistida por marcadores moleculares (MAS) para caracteres de herencia simple, como la resistencia a nematodos (Lecoals et al., 2004), compatibilidad polen-pistilo, almendra amarga (Martínez-Gómez et al., 2007), etc. En la actualidad, en distintas especies de la familia Rosaceae están disponibles marcadores para realizar MAS para varios caracteres (Arús y Gardiner, 2007). Por otro lado, en varias especies de esta familia se han establecido mapas de ligamiento saturados en los que se han localizado caracteres cuantitativos (QTLs). Toda la información se encuentra disponible en <http://www.bioinfo.wsu.edu/gdr/> (Jung et al., 2008). Dentro del género *Prunus* hay varios mapas construidos con distintos tipos de marcadores y en algunos casos muy saturados (para una revisión ver: Martínez-Gómez et al., 2003; Vilanova et al., 2003; Burgos et al., 2007; Arús y Gardiner, 2007; Dirlewanger y Arús, 2008). En *Prunus* se han localizado algunos QTLs implicados en la tolerancia a estreses bióticos (Foulongne et al., 2003), caracteres de fruto en melocotonero (Etienne et al., 2002; Quilot et al., 2004; Boudehri et al., 2007; Cantín et al., 2008; Ogundiwin et al., 2008), arquitectura del árbol y otros caracteres agronómicos (Wang et al., 2000; Lambert et al., 2007; Sánchez-Pérez et al., 2007).

En cuanto a la tolerancia a la clorosis férrica, existen evidencias de que podría ser de tipo cuantitativo, como se ha observado en soja y tomate (Diers et al., 1992; Dasgan et al., 2004), habiéndose identificado varios QTLs relacionados (Diers et al., 1992; Lin et al., 2000). En especies leñosas, en una población de vid segregante para vigor y tolerancia a clorosis, se han identificado algunos QTLs que controlan el contenido en clorofila en las hojas y se han localizado genes candidatos como *FRO2* e *IRT1* (Decroocq et al., 2004). Estos marcadores (*FROc* y *IRT1c*) se han posicionado en el mapa consenso de *Vitis* junto con QTLs de tolerancia a clorosis (Decroocq et al., 2007). Sin embargo, no existen trabajos ni en *Prunus* ni en otras especies leñosas sobre QTLs asociados a clorosis férrica o contenido mineral en hojas o fruto.

El control genético de los caracteres de tolerancia a clorosis férrica en *Prunus* no se conoce todavía, aunque es previsible que se trate de una herencia de tipo complejo. En este sentido, se dispone de una descendencia F1 de cruzamientos inter-específicos de tres vías entre un ciruelo mirobolán (*P. cerasifera*, P 2175) y un híbrido almendro x melocotonero (*P. dulcis* x *P. persica*, Garfi x Nemared = GxN 22, Felinem): P 2175 x Felinem (Dirlewanger et al., 2004b), que segrega para tolerancia a clorosis férrica. La progenie creada en el INRA de Burdeos (Francia) ha sido ya genotipada con 277 SSR y se dispone de los mapas de ligamiento de los parentales (Dirlewanger et al., 2004a). Esta descendencia está siendo evaluada en la Estación Experimental de Aula Dei en condiciones clorosantes de campo (Gonzalo et al., 2007). Resultados preliminares apuntan a que en los cromosomas 2 y 6 se encuentran marcadores moleculares significativos, posiciones en las que ya se han incluido QTLs controlando la morfología de la hoja o la resistencia a nematodos. La misma población se evalúa frente a otros estreses abióticos (tolerancia a asfixia y sequía) y bióticos (resistencia a nematodos) en distintos centros de investigación europeos (Dichio et al., 2004; Dirlewanger et al., 2004a; 2004b).

Igualmente, se lleva a cabo otra aproximación de genes candidatos, relacionados con el metabolismo del hierro (*FRO2* e *IRT1* que codifican la reductasa y un transportador de hierro de raíz, respectivamente) en los genotipos parentales (Gonzalo et al., 2008). Para ello, se hace una búsqueda *in silico* de genes, ya secuenciados en *Arabidopsis* y otras especies conocidas, implicados en la homeostasis del hierro, y se busca la homología con EST en *Prunus* en la base de datos disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Se pretende conocer la expresión diferencial de estos genes en los genotipos con distinta base genética.

Por otra parte, se han aislado y secuenciado 100 fragmentos de *vid* obtenidos con la técnica de cDNA-AFLP, que ha permitido identificar 35 genes expresados diferencialmente en condiciones clorosantes y relacionados con el metabolismo del hierro (Gogorcena et al., 2006). La validación de la expresión diferencial por RT-PCR mostró que más del 50% de los genes se expresaba diferencialmente en dos genotipos de *vid*. Estas secuencias podrían utilizarse como genes candidatos en varios genotipos de *Prunus*, en distintas condiciones de clorosis.

### 19.3. TOLERANCIA A LA ASFIXIA DE RAICES EN SUELOS PESADOS

El encharcamiento del suelo debido a largos periodos de inundación, por riegos o lluvias abundantes y dificultades de drenaje, provoca una alteración de su estructura, una disminución del oxígeno disponible, acumulación de CO<sub>2</sub>, y descomposición anaeróbica de la materia orgánica. Además se forman compuestos tóxicos producidos por las raíces de las plantas (etanol, etileno, acetaldéhid, compuestos cianogénicos, etc.) y por el metabolismo microbiano en condiciones de anaerobiosis (Rowe y Catlin, 1971; Kozłowski, 1984). En estas condiciones, se produce la denominada asfixia de raíces, que afecta a gran número de especies leñosas y sobre todo a frutales de hueso y de pepita (Kozłowski, 1997). Además, este problema se acentúa en los suelos pesados y compactos, con texturas arcillosas y mal drenaje (Moreno et al., 2001), y cuando las condiciones de encharcamiento van acompañadas de fuertes vientos, que mueven el tronco del árbol y dejan un espacio abierto a su alrededor (Reighard et al., 2001). Este es un problema frecuente en el Valle del Ebro, debido a la incidencia de los fuertes vientos del Noroeste y al cultivo de frutales en suelos con texturas arcillosas o franco arcillosas.

#### 19.3.1. Respuestas fisiológicas y metabólicas

En los árboles frutales, los problemas de encharcamiento y asfixia de raíces provocan la alteración del metabolismo de la variedad injertada y del patrón. En la variedad, se produce una reducción del crecimiento vegetativo y reproductivo, que puede ir acompañada de una senescencia y defoliación prematura, marchitez de brotes y muerte del árbol en los casos más severos (Moreno et al., 1996). La productividad y calidad de los frutos también disminuye, afectando al tamaño, características organolépticas y aspecto externo del fruto (Saunier, 1966; Moreno et al., 2001). Entre las reacciones más inmediatas, se observa el cierre estomático y disminución de la transpiración de la planta (Kozłowski, 1984). La fotosíntesis y el transporte de carbohidratos también se ven inhibidos (Dichio et al., 2004), posiblemente debido al cierre estomático y productos tóxicos de la respiración anaeróbica (Kozłowski, 1984). En el caso del patrón, se reduce el crecimiento y la formación de nuevas raíces, con pérdida de funcionalidad y muerte de las ya existentes (Kozłowski, 1984). Como consecuencia, disminuye la absorción de agua y de nutrientes (Moreno et al., 2001; Jiménez et al., 2004), hay una pérdida considerable de micorrizas (Rutto et al., 2002) y una supresión del metabolismo de las raíces, unido a una alteración de los balances hormonales (ácido abscísico, auxinas, giberelinas, etc.), que, en general, provoca un incremento de la proporción de etileno (Mizutani et al., 1982; Kozłowski, 1997).

El estrés hídrico ocasiona una mayor reducción del crecimiento de raíces que de la parte aérea (Kozlowski, 1984). Este desequilibrio puede implicar una mayor sensibilidad de la planta a periodos de sequía posteriores, donde una mayor masa de raíces sería necesaria para explorar una mayor superficie del suelo y absorber el agua disponible. Este problema es frecuente en el área mediterránea, donde las lluvias se concentran en invierno y, por el contrario, disminuye la disponibilidad de agua en el verano, cuando las necesidades son más acentuadas. Igualmente, se ha observado una mayor incidencia del estrés en árboles jóvenes, con mayor proporción relativa de la parte aérea respecto a las raíces, comparado a plantaciones ya en plena producción (Reighard et al., 2001).

Entre los mecanismos de adaptación a las condiciones de privación parcial (hipoxia) o total (anoxia) de oxígeno, las plantas han desarrollado distintas estrategias, con adaptaciones morfológicas y fisiológicas diversas (Kozlowski, 1984). Entre las adaptaciones morfológicas, se incluyen la formación de tejido aerenquimático (tejido blando con grandes espacios intercelulares), hipertrofia de lenticelas (aperturas en raíces y tallos sumergidos para aumentar el intercambio gaseoso entre los tejidos internos de la planta y el medio externo) y regeneración de nuevas raíces y/o formación de raíces adventicias. Entre las adaptaciones fisiológicas observadas en periodos cortos de asfixia, se ha propuesto que una glicólisis acelerada podría aportar cantidades adecuadas de ATP para mantener el nivel de energía requerido frente al estrés. También la regulación del aporte de glucosa y un ajuste en el metabolismo del carbono podrían evitar la acumulación de productos tóxicos. En situaciones de estrés más prolongado, el ajuste metabólico debería mantener una baja carga de energía y de metabolismo (Kozlowski, 1984).

La supervivencia de los árboles frutales en suelos pesados y compactos, con problemas de encharcamiento y mal drenaje, se debe principalmente a la tolerancia de las raíces a bajos contenidos de oxígeno, así como a la menor concentración de glucósidos cianogénicos en sus raíces o a una menor sensibilidad frente a dichos compuestos (Rowe y Catlin, 1971; Tamura et al., 2004). Las diferencias en la tolerancia a la asfixia en los *Prunus* se ha relacionado con el metabolismo de la prunasina, un glucósido cianogénico (Salesses y Juste, 1970). En condiciones anaeróbicas, la prunasina es hidrolizada liberando el ácido cianhídrico, que es tóxico para las raíces. Las diferencias en sensibilidad del melocotonero y del ciruelo podrían estar relacionadas con su capacidad para hidrolizar la prunasina (Salesses y Juste, 1971). Rowe y Catlin (1971) atribuyeron la mayor tolerancia de las raíces de ciruelo frente al melocotonero a que las de este último eran dañadas por la disociación hidrolítica del ácido cianhídrico, realizada por sus propios tejidos en condiciones de bajo oxígeno.

En algunos patrones ciruelo también se ha relacionado su gran tolerancia con la distribución de sus raíces en los horizontes más superficiales del suelo, y con la mayor facilidad de emisión de raíces adventicias, que restablecerían las dañadas por el encharcamiento del terreno (Massai et al., 1986). También la simbiosis con micorrizas parece conferir una mayor tolerancia, posiblemente debido a una mayor absorción de nutrientes, aumento de la viabilidad de las raíces sometidas a estrés y disminución de la concentración de etanol y de otros productos tóxicos (Rutto et al., 2002).



### 19.3.2. Variabilidad genética y material vegetal

La importancia que supone el problema de la asfixia de raíces en amplias zonas productoras de melocotonero y de otros frutales de hueso, ha motivado los trabajos de selección y mejora genética basados fundamentalmente en el uso como patrones de clones de ciruelo (Saunier, 1970). Estos patrones toleran mejor la humedad y los suelos con problemas de encharcamiento que otras especies del género *Prunus*, razón fundamental por la que han sido utilizados en distintos países europeos (Bernhard y Grasselly, 1959; Rowe y Catlin, 1971; Salesses y Juste, 1970; Bernhard et al., 1979). Su buen comportamiento en suelos calizos y polivalencia, en términos de compatibilidad, con distintas especies también ha potenciado el uso de estos patrones (Moreno et al., 1995a; 1995b).

En este grupo de patrones, se encuentran preferentemente los ciruelos de crecimiento rápido, entre los que se incluyen los Mirobolanes (*P. cerasifera*) y Marianas (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*). También se incluyen los ciruelos denominados de crecimiento lento (Bernhard y Grasselly, 1959), como los 'Pollizos de Murcia' (*P. insititia*) y otros ciruelos comunes utilizados como patrones (*P. domestica*). Además, existen numerosos híbridos interespecíficos, tanto entre los ciruelos diploides (*P. cerasifera*, *P. salicina*) como hexaploides (*P. domestica*, *P. insititia*) y otras combinaciones, con niveles variables de tolerancia y adaptación al estrés. La tolerancia a la asfixia radicular de los ciruelos triploides del grupo Mariana (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*) y los diploides del grupo Mirobolán (*P. cerasifera*) es, en general, superior a la de los ciruelos de las especies *P. insititia* o *P. domestica*. Sin embargo, generalmente son incompatibles con melocotonero y con variedades exigentes, en términos de compatibilidad, de albaricoquero y ciruelo (Bernhard y Grasselly, 1959; Crossa-Raynaud y Audergon, 1987, Moreno et al., 1993; 1995b; 1995c).

Los patrones ciruelo de crecimiento lento, entre los que se incluyen los derivados de *P. insititia* (Pollizo de Murcia, San Julián A, San Julián de Orleans, San Julián Híbrido Nº 1, San Julián Híbrido Nº 2, San Julián GF 655-2), *P. domestica* (Brompton, GF 43), y *P. domestica* x *P. spinosa* (Damas GF 1869), en general, exhiben un vigor moderado y una buena compatibilidad con melocotonero, ciruelo y otras especies del género *Prunus*. Por otra parte, a algunos de ellos se les atribuye una entrada en producción más temprana y una mejor coloración del fruto (Bernhard y Grasselly, 1959; Loreti y Massai, 1990; Moreno et al., 1995a).

### 19.3.3. Métodos de selección de patrones tolerantes a la asfixia de raíces

Para determinar el grado de tolerancia ante la asfixia radicular, se han utilizado una serie de técnicas basadas en la inundación temporal del suelo donde se colocan los patrones a evaluar (Figura 19.2), tanto durante el período de reposo vegetativo de la planta (Saunier, 1966; 1970; Salesses et al., 1970; Salesses y Juste, 1971) como durante la estación de crecimiento (Dichio et al., 2004; Dirlwanger et al., 2004b). La rapidez en la aparición de los síntomas de amarillez y marchitez en hojas y brotes, así como la muerte de la planta, determina la sensibilidad frente a la asfixia. Otras respuestas fisiológicas, utilizadas como criterios de selección, incluyen funcionalidad de la hoja (regulación estomática y transpiración, concentración de clorofila, fotosíntesis) y formación de raíces adventicias (Domingo et al., 2002; Dichio et al., 2004; Robbani et al., 2006).



**Figura 19.2.** Evaluación de patrones *Prunus* frente a asfixia de raíces en semilleros inundados temporalmente.

En ensayos recientes, con encharcamiento controlado durante el período de crecimiento vegetativo, se han evaluado patrones clonales de distintas especies *Prunus*: ciruelo, cerezo, híbridos almendro x melocotonero y francos de melocotonero, ya seleccionados y/o en fases avanzadas de selección (Pinochet et al., 2008). Así, por ejemplo, los genotipos: PM 105 AD y PADAC 150 (*P. insititia*), Evrica (*P. besseyi* x *P. salicina*) y Mariana 2624 (*P. cerasifera* x *P. munsoniana*) mostraron una mayor tolerancia al estrés, con plantas supervivientes hasta los 30-45 días en condiciones de encharcamiento. Por el contrario, en dichas condiciones, los patrones GF 677 y Garnem mostraron el 100% de mortalidad a los 6 días del encharcamiento del terreno, y entre los 10-14 días murieron todas las plantas de los patrones Gisela 6, VSV-1 y Kuban-86 (datos no publicados).

En general, los patrones ciruelo (*P. insititia*, *P. cerasifera*, *P. salicina*, *P. cerasifera* x *P. munsoniana*) respondieron mejor que los patrones francos de melocotonero e híbridos de almendro x melocotonero (*P. dulcis* x *P. persica*) y de melocotonero x *P. davidiana*. Se ha observado una gran sensibilidad para los patrones que incluyen en su genotipo una mayor proporción de las especies almendro y melocotonero.

#### 19.3.4. Análisis genético de la tolerancia a la asfixia de raíces en patrones *Prunus*

Los procesos fisiológicos y bioquímicos involucrados en la tolerancia al encharcamiento del suelo y anoxia de raíces son muy poco conocidos en el caso de las especies leñosas (Kozłowski y Pallardy, 2002). Además no existe información disponible sobre el grado del determinismo genético ni un modelo consistente para la tolerancia a dicho estrés, dada la variabilidad en los mecanismos de tolerancia según especies. La identificación de algunos mecanismos regulados genéticamente sería relevante para comprender las bases fisiológicas de la tolerancia e identificar las regiones genómicas implicadas (Parelle et al., 2007).

En estudios recientes iniciados con *Prunus*, se ha tratado de relacionar el efecto de la falta de oxígeno en las raíces con la evolución de algunas proteínas, que podrían estar implicadas con los cambios metabólicos observados en un genotipo tolerante (Mirobolán P 2175), cuando es sometido a condiciones de asfixia en cultivo hidropónico (Amador et al., 2007). La expresión diferencial de dichas proteínas y la búsqueda de genes candidatos podría ayudar a comprender mejor las bases fisiológicas y bioquímicas de la tolerancia a la asfixia de raíces.

Al igual que ocurre en la herencia de la tolerancia a la clorosis férrica, existen evidencias de que el carácter de la tolerancia a asfixia podría ser de tipo cuantitativo (Parelle et al., 2007). En *Prunus*, al analizar las descendencias de un cruzamiento interespecífico de tres vías, entre un genotipo tolerante (Mirobolán P 2175; *P. cerasifera*) y un híbrido interespecífico de melocotonero x almendro sensible (GxN 15, Garnem) se ha observado que dichas descendencias muestran, en general, un comportamiento intermedio (Dirlewanger et al., 2004b). No obstante, la mayor proximidad del comportamiento de algunos de los híbridos a los parentales sensible y/o tolerante (Xiloyannis et al., 2007) podría indicar una distribución normal para la tolerancia frente a dicho estrés. De forma paralela a los estudios genéticos sobre clorosis férrica, se está llevando a cabo el análisis genético para tolerancia a la asfixia en las poblaciones segregantes antes mencionadas [mirobolán x (híbridos almendro x melocotonero)] en colaboración con distintos grupos europeos de España, Francia e Italia (Dirlewanger et al., 2004a; 2004b).

### 19.4. TOLERANCIA A LA SALINIDAD

La salinidad es un problema creciente en algunas zonas de cultivo del área mediterránea, debido a la excesiva concentración de sales en el agua de riego y a la existencia de capas freáticas altas en suelos con problemas de drenaje. En estas condiciones es frecuente la combinación de asfixia de raíces y salinidad, que resulta mucho más perjudicial en especies leñosas que los dos estreses actuando separadamente (Boland et al., 1996; Kozłowski, 1997). Los suelos con características naturales de salinidad y/o sodicidad no son tan importantes como las zonas de salinidad secundaria, situadas en las áreas de cultivo de frutales en regadío.

#### 19.4.1. Respuestas fisiológicas y metabólicas

En frutales, los síntomas visuales más característicos de los daños por salinidad comienzan con la necrosis marginal e internervial de las hojas, seguida por una defoliación prematura y muerte de brotes (Bernstein et al., 1956; Karakas et al., 2000). La salinidad provoca una reducción del crecimiento vegetativo y reproductivo del árbol, limitando tanto el número y tamaño de los frutos como la producción total (Hoffman et al., 1989). No obstante, la disminución del crecimiento vegetativo parece ser un indicador más sensible y temprano que el efecto sobre la producción, este último muy relacionado con la toxicidad a nivel de las flores (Catlin et al., 1993).



La inhibición del crecimiento de la planta va acompañado por disfunciones metabólicas, incluyendo disminución del índice de fotosíntesis, alteraciones en la actividad enzimática y en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, así como anomalías en la absorción de elementos minerales y respiración de la planta (Abou El-Khashab et al., 1997; García-Sánchez et al., 2002; Massai et al., 2004; Sotiropoulos et al., 2006). Como respuesta al estrés oxidativo inducido por la salinidad, se han visto incrementados el contenido de malondialdehído y de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, catalasa, glutatión reductasa, etc.) (Ertuk et al., 2007) además de algunos azúcares específicos como sorbitol (Massai et al., 2004).

Como ocurre en otras especies hortícolas, la respuesta frente a la salinidad en leñosas no solo depende del efecto osmótico de las sales sino también del efecto tóxico de los iones específicos y su acumulación en los órganos vegetativos y reproductivos de la planta. En *Prunus*, los daños característicos de necrosis foliar se han atribuido a la concentración de cloruro (Bernstein et al., 1956; Hoffman et al., 1989; Boland et al., 1996) y/o de sodio en hojas (Zisca et al., 1991; Abou El-Khashab et al., 1997; Karakas et al., 2000; Ertuk et al., 2007). La controversia entre algunos trabajos podría atribuirse a las diferencias entre especies, concentraciones salinas evaluadas y/o a los diversos mecanismos de almacenamiento, transporte y exclusión de estos iones (Catlin et al., 1993; García-Sánchez et al., 2002). También el almacenamiento de los iones tóxicos en la madera o estructura permanente del árbol y su posterior removilización, incluso en periodos vegetativos de distintos años, pondría en evidencia su efecto diferencial en frutales (Hoffman et al., 1989; Catlin et al., 1993).

Los patrones frutales difieren en su tolerancia a la salinidad debido a su capacidad para inhibir la absorción y/o el transporte de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  entre sus raíces y los órganos de la variedad injertada (Walker y Douglas, 1983; García-Sánchez et al., 2002; Massai et al., 2004). También la variedad podría influir en los mecanismos de tolerancia y acumulación de los iones tóxicos en hojas y frutos, como se ha observado en vid (Downton, 1977). No obstante, las diferencias en tolerancia de patrones de cítricos y vid se han asociado preferentemente con la exclusión de las sales por las raíces de la planta (Sykes, 1992; Walker y Douglas, 1983; García-Sánchez et al., 2002). Por ello, la selección de patrones con un mayor poder de exclusión de dichos iones, ha sido el criterio de selección propuesto en dichas especies (Sykes, 1992).

#### 19.4.2. Variabilidad genética y métodos de selección

La mayoría de los árboles frutales son sensibles a la salinidad, sobre todo las especies de hueso (*P. armeniaca*, *P. domestica* y *P. persica*), pero también las especies de pepita (*Malus domestica*, *Pyrus spp.*), vid y cítricos, en general. No obstante, existe variabilidad en la tolerancia para estos cultivos, la cual se ha puesto en evidencia al estudiar el comportamiento frente a salinidad de distintas especies y patrones de *Prunus*, cítricos y vid (Sykes, 1992; García-Sánchez et al., 2002; Rieger, 2001; Massai et al., 2004).

En *Prunus* son muy escasos los trabajos de selección y mejora genética para tolerancia a salinidad de los patrones disponibles para las distintas especies. En general, los estudios realizados han ido dirigidos a evaluar la influencia de distintas concentraciones salinas (generalmente a partir de  $\text{NaCl}$ ) sobre un número muy limitado de cultivares. En algunos casos, se ha estudiado la interacción entre la salinidad y el exceso de Boro por su manifestación simultánea en determinadas áreas de cultivo (El Motaïum et al., 1994; Sotiropoulos et al., 2006). Para estudiar el efecto de las distintas concentraciones salinas aplicadas, se ha utilizado especialmente el cultivo de las

plantas en maceta (Figura 19.3) (El Motaium et al., 1994; Sotiropoulos et al., 2006) y la salinización de algunas plantaciones comerciales (Hoffman et al., 1989; Catlin et al., 1993). También se ha inducido el estrés en condiciones de cultivo hidropónico (Zisca et al., 1991; Karakas et al., 2000; Rieger, 2001; Massai et al., 2004) e *in vitro* (Erturk et al., 2007) para tratar de determinar las respuestas fisiológicas y bioquímicas en condiciones más controladas.



**Figura 19.3.** Evaluación de patrones *Prunus* frente a salinidad en macetas con riego salino.

En cultivo hidropónico, Rieger (2001) evaluó cuatro especies de *Prunus* de Norteamérica (*P. andersonii* Gray, *P. havardii* (Wight) Mason, *P. maritima* Marsh., y *P. mexicana* Wats.) y el patrón de melocotonero Nemaguard. Aunque no encontró diferencias en la capacidad de exclusión de los iones de Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> por las raíces de las distintas especies, observó que las hojas de las plantas de *P. maritima* soportaban una mayor concentración de dichos iones, antes de manifestar los daños por salinidad y apuntó el interés de esta especie como posible fuente de tolerancia en el desarrollo de nuevos patrones de *Prunus*. También en cultivo hidropónico, Massai et al. (2004) estudiaron el comportamiento de dos patrones clonales de melocotonero con distinto origen genético: el híbrido almendro x melocotonero GF 677 y el híbrido de ciruelo MrS 2/5. Aunque el estrés salino redujo en mayor medida los índices de crecimiento y asimilación neta de la variedad injertada sobre el patrón GF 677, este patrón tuvo una mayor capacidad para controlar la acumulación de iones tóxicos en la variedad y posiblemente por ello de recuperar la actividad fotosintética al cesar dicho estrés.

En otro ensayo de patrones *Prunus*, establecidos en maceta y en condiciones de invernadero, se evaluaron patrones clonales de distintas especies e híbridos interespecíficos de *Prunus* (Pinochet et al., datos no publicados). Utilizando un agua salina (CE=2,8-3,1 dS/m; 12,6 mM Na<sup>+</sup> y 9,7 mM Cl<sup>-</sup>), durante un periodo de 70 días, se determinaron los daños foliares y la influencia sobre el desarrollo de raíces y parte aérea de las plantas sometidas al estrés. Entre los genotipos que se vieron menos afectados por el tratamiento salino, destacaron los híbridos interespecíficos PAC-941 (*P. cerasifera* x *P. dulcis*) y Garnem (*P. dulcis* x *P. persica*). Por el contrario, los patrones Gisela 5 (*P. canescens* x *P. cerasus*), Mayor (*P. dulcis* x *P. persica*) y especialmente VSL-2 (*P. fruticosa* x *P. lannesiana*), sufrieron tanto el mayor daño en hojas como una mayor reducción del crecimiento vegetativo. El híbrido GF 677, utilizado como testigo, mostró un comportamiento intermedio. Sotiropoulos et al. (2006) también refieren al patrón Gisela 5 como un patrón más sensible comparado con la selección CAB 6P (*P. cerasus*).

### 19.4.3. Análisis genético de la tolerancia a la salinidad en frutales

Los intentos de mejorar la tolerancia a la salinidad en frutales han tenido unos resultados muy limitados, debido a la complejidad del carácter, tanto genética como fisiológicamente, y a la dificultad añadida de trabajar con leñosas. En cítricos y vid, donde se dispone de una mayor información sobre la heredabilidad de la tolerancia a la salinidad, se ha visto que la tolerancia relacionada con la exclusión de los iones Cl<sup>-</sup> y/o Na<sup>+</sup> es un carácter multigénico, con mecanismos independientes para ambos iones (Sykes, 1992). No obstante, en vid también se refiere la existencia de un gen mayor dominante procedente de la especie *V. berlandieri* (Sykes, 1992).

Por otra parte, se han identificado QTLs relacionados con dicha tolerancia en cítricos (Tozlu et al., 1999a, 1999b), aunque su dependencia de las condiciones de cultivo y su especificidad con los parentales y cruzamientos particulares en los que se han determinado, ha limitado una aplicación más generalizada en los programas de mejora (Flowers y Flowers, 2005). Es de esperar que en el futuro se desarrollen nuevas aproximaciones, por ejemplo mediante el análisis de RNA o proteínas (con expresión diferencial), que ayuden a identificar genes específicos y que se puedan introducir de una forma más efectiva y generalizada en los materiales avanzados de mejora.

En resumen, la selección de patrones *Prunus* tolerantes a estreses abióticos ha sido siempre uno de los objetivos prioritarios en la mejora de patrones para especies frutales de hueso. En general, los criterios de selección han incluido la buena adaptación a las condiciones de cultivo más limitantes del área mediterránea: suelos calizos y pesados, que ocasionan problemas de clorosis y asfixia de raíces. Además, se han tenido en cuenta las buenas características agronómicas inducidas a las variedades injertadas (vigor, productividad, calidad del fruto), lo cual ha implicado largos procesos de selección. En España y otros países de la cuenca mediterránea, la recogida y aprovechamiento de la variabilidad genética existente para las especies *Prunus* cultivadas, ha dado lugar a la selección de una serie de patrones clonales, algunos de los cuales están siendo ampliamente comercializados. Actualmente, los programas de mejora en curso se dirigen a la obtención de nuevos patrones, con multi-tolerancia y/o resistencia frente a los factores abióticos (clorosis, asfixia, sequía, salinidad) y/o bióticos (nematodos, bacterias, hongos de suelo) más limitantes en nuestras condiciones. Para ello, se aprovecha la variabilidad genética existente en especies próximas del género *Prunus*, mediante la realización de cruzamientos interespecíficos. En las poblaciones segregantes así obtenidas, se buscan QTLs y otros marcadores asociados a la tolerancia a clorosis férrica y asfixia de raíces. En este sentido, se dispone de varias descendencias F1 de cruzamientos inter-específicos de tres vías entre ciruelo mirabolán y distintos híbridos

almendro x melocotonero (*P. dulcis* x *P. persica*, Garfi x Nemared), que podrían segregarse para tolerancia a los estreses abióticos antes mencionados. Estas descendencias creadas en colaboración entre distintos centros europeos, también están siendo evaluadas en diversos centros de investigación (Dichio et al., 2004; Dirlwanger et al., 2004a, 2004b; Gonzalo et al., 2008) y se dispone de los mapas de ligamiento de los parentales. A pesar de las dificultades del trabajo con especies leñosas, es de esperar que esta cooperación internacional, junto a los altos niveles de similitud observados entre genomas de distintas especies (Dirlwanger et al., 2003) puedan contribuir a acelerar el progreso genético en la obtención de nuevos patrones *Prunus*, tolerantes a los estreses abióticos más limitantes en las condiciones de cultivo mediterráneas.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación de los proyectos AGL2005-0533, PETRI 95.1000.OP y A-44, así como del programa de movilidad del MEC concedida a M. A. Moreno (ref. PR2007-0496) en la Universidad de California, Davis.

## REFERENCIAS

- Abadía, J., Tagliavini, M., Grasa, R., Belkhdja, R., Abadía, A., Sanz, M., Araujo, E., Tsiouridis, C., and Marangoni, B. (2000). Using the flower Fe concentration for estimating chlorosis status in fruit tree orchards: a summary report. *J. Plant Nutr.* 23: 2023-2033.
- Abadía, J., López-Millán, A.F., Rombolà, A.D. and Abadía, A. (2002). Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant Soil* 241: 75-86.
- Abadía, J., Álvarez-Fernández, A., Rombolà, A.D., Sanz, M., Tagliavini, M. and Abadía A. (2004). Technologies for the diagnosis and remediation of Fe deficiency. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50(7): 965-971.
- Abou El-Khashab, A.M., El-Sammak, A.F., Elaidy, A.A. and Salama, M.I. (1997) Paclobutrazol reduces some negative effects of salt stress in peach. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 43-46.
- Almaliotis, D.D., Manganaris, A.G., Simonis, A.D., and Bladenopoulou, S.B. (1995). Rootstock effect on yield and mineral nutrition of "Maycrest" peach trees under conditions of lime-induced chlorosis, pp. 301-306, in J. Abadía (ed.). *Iron Nutrition in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Álvarez-Fernández, A., Paniagua, P., Abadía, J. and Abadía, A. (2003). Effects of Fe deficiency chlorosis on yield and fruit quality in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *J. Agric. Food Chem.* 51: 5738-5744.
- Álvarez-Fernández, A., Abadía, J. and Abadía, A. (2006). Iron deficiency, fruit yield and fruit quality. pp. 85-101, in L.L. Barton and J. Abadía (eds.). *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Amador, M.L., Sancho, S. and Rubio-Cabetas, M.J. (2007). Genetic and biochemical aspects involved in waterlogging tolerance in *Prunus* rootstocks. *Twelfth Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*. Zaragoza, septiembre. Abstracts, pp. 44.

- Arús, P. and Gardiner, S. (2007). Genomics for improvement of Rosaceae temperate tree fruit. pp. 357-395, in R.K. Varshney and R.Tuberosa (eds.). *Genomics Assisted Crop Improvement*. Vol 2 *Genomics applications in crops*. Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Bernhard, R. and Grasselly, C. (1959). Les pruniers porte-greffes du pêcher. *Jour. Fruit et Maraich. d'Avignon*, pp. 75-100.
- Bernhard, R., Grasselly, C. and Salesses, G. (1979). Orientations des travaux de sélection des porte-greffes du pêcher à la Station d'Arboriculture I.N.R.A. de Bordeaux. *Eucarpia fruit section*, pp. 277-286.
- Bernstein, L., Brown, J.W. and Hayward, H.E. (1956). The influence of rootstock on growth and salt accumulation in stone fruit trees and almonds. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 68: 86-95.
- Boland, A.M., Jerie, P.H., Mitchell, P.D., Irvine, J.L. and Nardella, N. (1996). The effect of a saline and non-saline water table on peach tree water use, growth, productivity and ion uptake. *Aust. J. Agric. Res.* 47: 121-139.
- Boudehri, K. Belka, M.A., Cardinet, G., Capdeville, G., Renaud, C., Tausin, Y., Dirlwanger, E., Troadec, C., Jublot, D., Caboche, M. Bendahmane, A. and Moing, A. (2007). Toward the isolation of the D gene controlling the acidity of peach fruit by positional cloning. *Twelfth Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*. Zaragoza, septiembre. Acta Hortic. (in press).
- Breton, S., Jeandet, C., Mesnil, G., Trillot, M., Vidaud, J., Viard, M.P. and Fourel, M.A. (1972). *Le Cerisier, Monographies de l'Invuflec*. Institut National de Vulgarisation pour les fruits, légumes et champignons. Paris, France, p. 235.
- Burgos, L., Petri, C. and Badenes, M. (2007). *Prunus* spp. pp. 283-307. In. E.C. Pua and M.R. Davey (eds.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 60 *Transgenic Crops V*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Byrne, D.H., Bacon, T.A. y Egilla, J.N.A. (1990). Patrones de frutales de hueso tolerantes a suelos calizos. *ITEA Vol. Extra 9*: 117-133.
- Calvet, C., Estaún, V., Camprubí, A. y Pinochet, J. (2000). Enfermedades de replantación en los frutales. pp 107-109, en E. Montesinos, P. Melgarejo, M.A. Cambra y J. Pinochet (eds.). *Enfermedades de los frutales de pepita y hueso. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología Nº 3*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Barcelona, México.
- Cambra, R. (1990). 'Adafuel', an almond x peach hybrid rootstock. *HortScience* 25: 584.
- Cantín, C.M., Crisosto, C.H., Ogundiwin, E., Torrents, J., Moreno, M.A. y Gogorcena, Y. (2008) Susceptibilidad a los daños por frío en una población de melocotonero. *IV Congreso de Mejora Genética de Plantas*. Córdoba, octubre de 2008.
- Catlin, P.B., Hoffman, G.J., Mead, R.M. and Johnson, R.S. (1993). Long-term response of mature plum trees to salinity. *Irrig. Sci.* 13: 171-176.
- Cinelli, F. and Loreti, F. (2004). Evaluation of some plum rootstocks in relation to lime-induced chlorosis by hydroponic culture. *Acta Hort.* 658: 421-427.



- Cinelli, F., Tamantini, I., and Iacona, C. (2004). Nutritional (Fe-Mn) interactions in 'Big Top' peach plants as influenced by the rootstock and by the soil CaCO<sub>3</sub> concentration. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 1097-1102.
- Cinelli, F., Viti, R., Byrne, D.H. and Reed, D.W. (1995). Physiological characterization of two peach seedling rootstocks in bicarbonate nutrient solution. I. Root iron reduction and iron uptake, pp. 323-328, in J. Abadía (ed.). *Iron Nutrition in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Crossa-Raynaud, P. and Audergon, J.M. (1987). Apricot rootstocks. pp. 295-320, in R.C. Rom and R.F. Carlson (ed.). *Rootstocks for Fruit Crops*. John Wiley & Sons, New York, U.S.A.
- Dasgan, H.Y., Abak, K., Cakmak, I., Römheld, V. and Sensoy, S. (2004). Inheritance of tolerance to leaf iron deficiency chlorosis in tomato. *Euphytica* 139: 51-57.
- Decroocq, S., Manicki, A., Boury, C., Donnart, M., Bordenave, L., Merdinoglu, D. and Ollat, N., (2004). QTL analysis of a grape full sib descent for lime induced iron chlorosis tolerance. *XIth Int. Symp. on iron nutrition and interactions in plants*. Japan, April.
- Decroocq, S., Manicki, A., Boury, C., Nemorin, A., Donnart, M. and Ollat, N. (2007). Genetic mapping of some homologous keys genes for iron homeostasis in Vitis. *Cost Action 858: Understanding the genetic and molecular basis of quality and production traits in grapevine: from traits to genes and backwards*. Logroño (Spain), p. 19.
- De Salvador, F.R., Di Tommaso, G. and Piccioni, C. (2005). Performance of new and standard cherry rootstocks in different soils and climatic conditions. *Acta Hort.* 667: 191-199.
- Dichio, B., Xiloyannis, C., Celano, G., Vicinanza, L., Gómez-Aparisi, J., Esmenjaud, D. and Salesses, G. (2004). Performance of new selections of *Prunus* rootstocks, resistant to root knot nematodes, in waterlogging conditions. *Acta Hort.* 658: 403-405.
- Diers, R.W., Cianzio, S.R. and Shoemaker, R.C. (1992). Possible identification of quantitative trait loci affecting iron efficiency in soybean. *J. Plant Nutr.* 15: 2127-2136.
- Dirlwanger, E. and Arús, P. (2008). Markers in fruit tree breeding: Improvement of peach. pp. 279-304, in H. Lörz and G. Wenzel (eds.). *Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.
- Dirlwanger, E., Cosson, P., C. Pozat, R., Laigret, F., Aranzana, M.J., Arús, P. Dettori, M.T., Verde, I. and Quarta, R. (2003). Synteny within the *Prunus* genomes detected by molecular Markers. *Acta Hort.* 622: 177-187.
- Dirlwanger, E., Cosson, P., Howad, W., Capdeville, G., Bosselut, N., Claverie, M., Voisin, C. Pozat, R., Lafargue, B., Baron, O., Laigret, F., Kleinhentz, M., Arús, P. and Esmenjaud, D. (2004a). Microsatellite genetic linkage maps of myrobalan plum and an almond-peach hybrid-location of root-knot nematode resistance genes. *Theor. Appl. Genet.* 109: 827-838.
- Dirlwanger, E., Kleinhentz, M., Voisin, R., Claverie, M., Lecouls, A.C., Poëssel, J.L., Faurobert, M., Arús, P., Gómez-Aparisi, J., Di Vito, M., Xiloyannis, C. and Esmenjaud, D. (2004b). Breeding for a new generation of *Prunus* rootstocks: an example of MAS. *Acta Hort.* 658: 581-590.

Domingo, R., Pérez-Pastor, A. and Ruiz-Sánchez, M.C. (2002). Physiological responses of apricot plants grafted on two different rootstocks to flooding conditions. *J. Plant Physiol.* 159: 725-732.

Dondini, S., Vigani, G.P. and Zocchi, G. (2006). Biochemical and molecular analysis of Fe deficiency responses in *Vitis* spp. In: *13th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants*, Montpellier, France, p. 123.

Downton, W.J.S. (1977). Influence of rootstocks on the accumulation of chloride, sodium and potassium in Grapevines. *Aust. J. Agric. Res.* 28: 879-89.

EL-Motaium, R., and Hu H. Brown, P.H. (1994). The relative tolerance of six *Prunus* rootstocks to boron and salinity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119 (6): 1169-1175.

Erturk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2007). Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*. *Biol. Plant.* 51 (3): 597-600.

Etienne, C., Rothlan, C., Moing, A., Plomion, C., Bodénès, C., Svanella-Dumas, L., Cosson, P., Pronier, V., Monet, R. and Dirlwanger, E. (2002). Candidate genes and QTLs for sugar and organic acid content in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor. Appl. Genet.* 105: 145-159.

FAOSTAT (2008) <http://faostat.fao.org>.

Felipe, A.J. y Pascual, M.T. (1990). Propagación de los nuevos clones de ciruelo 'Pollizo', 'Monpol' y 'Montizo'. *ITEA Vol. Extra 9*: 215-220.

Felipe, A.J., Gómez Aparisi, J., Socias i Company, R. and Carrera, M. (1997). The almond x peach hybrid rootstocks breeding program at Zaragoza (Spain). *Acta Hort.* 451 (1): 259-262.

Flowers, T.J. and Flowers, S.A. (2005). Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders?. *Agric. Water Manage.* 78: 15-24.

Foulongne, M., Pascal, T., Pfeiffer, F., Kervella J. (2003) QTLs for powdery mildew resistance in peach x *Prunus davidiana* crosses: consistency across generations and environments. *Mol. Breed.* 12: 33-50.

García-Sánchez, F., Jifon, J.L., Carvajal, M., and Syvertsen, J.P. (2002). Gas exchange, chlorophyll and nutrient contents in relation to Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> accumulation in 'Sunburst' mandarin grafted on different rootstocks. *Plant Sci.* 162: 705-712.

Giorgi, M., Capocasa, F., Scalzo, J., Murri, G., Battino, M. and Mezzetti, B. (2005). The rootstock effects on plant adaptability, production, fruit quality, and nutrition in peach (cv. 'Suncrest'). *Sci. Hortic.* 107: 36-42.

Gogorcena, Y., Abadía, J. and Abadía, A. (2000). Induction of *in vivo* root ferric chelate reductase activity in fruit tree rootstock. *J. Plant Nutr.* 23: 9-21.

Gogorcena, Y., Abadía, A. and Abadía, J. (2004). New technique for screening iron-efficient genotypes in peach rootstocks: Elicitation of root ferric chelate reductase by manipulation of external iron concentrations. *J. Plant Nutr.* 27: 1701-1715.

Gogorcena, Y., Decroocq, S., Palomo, D., Cantin, O., Donnart, M., Decroocq, V. and Ollat, N. (2006). Differential gene expression in *Vitis* under iron deficiency: cDNA-AFLP. *XIIIth Int. Symp. Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Montpellier (France) July (S5-póster-12).

- Gonzalo, M.J., Dirlwanger, E., Legrait, F., Moreno, M.A. and Gogorcena, Y. (2007). Genetic analysis of iron chlorosis tolerance in a Myrobalan plum x almond peach hybrids. *Twelfth Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*. Zaragoza, septiembre. Acta Hort. (in press).
- Gonzalo, M.J., Jiménez, S., Rubio-Cabetas, M.J., Moreno, M.A. and Gogorcena, Y. (2008). Search of candidate genes expressed in response to iron deficiency in *Prunus* rootstocks. *6<sup>o</sup> International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops*. Faro (Portugal), May. Abstract book p. 61.
- Gradziel, T.M. (2003). Interspecific hybridizations and subsequent gene introgression within *Prunus* subgenus *Amygdalus*. Acta Hort. 622: 249-255.
- Hoffman, G.J., Catlin, P.B., Mead, R.M., Johnson, R.S., Francois, L.E. and Goldhamer, D. (1989) Yield and foliar injury responses of mature plum trees to salinity. Irrig. Sci. 10: 215-229.
- Jiménez, S., Garín, A., Gogorcena, Y., Betrán, J.A. and Moreno M.A. (2004). Flower and foliar analysis for prognosis of sweet cherry nutrition. Influence of different rootstocks. J. Plant Nutr. 27: 701-712.
- Jiménez, S., Moreno, M.A. y Gogorcena, Y. (2005a). Cambios metabólicos en la raíz del patrón GF 677 en condiciones de deficiencia de hierro. Geórgica 11: 43- 49.
- Jiménez, S., Ollat, N., Moreno, M.A. y Gogorcena, Y. (2005b). Estudio de la respuesta metabólica de patrones *Prunus* frente a clorosis por medio de <sup>1</sup>H-Resonancia Magnética Nuclear Monodimensional. *Actas Portuguesas de Horticultura 2*: 162-167.
- Jiménez, S. (2006). Selección de patrones frutales de hueso tolerantes a la clorosis férrica. Aspectos nutricionales y metabólicos. Tesis Doctoral. Univ. de Zaragoza (Facultad de Ciencias), p. 227.
- Jiménez, S., Pinochet, J., Gogorcena, Y., Betrán, J.A. and Moreno, M.A. (2007). Influence of different vigour cherry rootstocks on leaves and shoots mineral composition. Sci. Hortic.112: 73-79.
- Jiménez, S., Pinochet, J., Abadía, A., Moreno, M.A. and Gogorcena Y. (2008). Response of *Prunus* selections for tolerance to iron chlorosis in the Mediterranean area. HortScience 43(2): 304-309.
- Jung, S., Staton, M., Lee, T., Blenda, A., Svancara, R., Abbott, A. and Main, D. (2008) GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. Nucleic Acids Res. 36: 1034-1040.
- Karakas, B., Lo Bianco, R. and Rieger, M. (2000). Association of marginal leaf scorch with sodium accumulation in salt-stressed peach. HortScience 35(1): 83-84.
- Kester, D.E. and Assay, R.N. (1986). Hansen 2168 and Hansen 536: two *Prunus* rootstock clones. HortScience 21: 331-332.
- Kozłowski, T.T. (1984). Responses of woody plants to flooding. pp. 123-164, in T.T. Kozłowski (ed.). *Flooding and Plant Growth*. Academic Press, New York, U.S.A.
- Kozłowski, T.T. (1997). Responses of woody plants to flooding and salinity. Tree Physiol. 1: 1-22.
- Kozłowski, T.T. and Pallardy, S.G. (2002). Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. Bot. Rev. 68: 270-334.



- Lambert, P., Dicenta, F., Rubio, M. and Audergon, J.M. (2007). QTL analysis of resistance to sharka disease in the apricot (*Prunus armeniaca* L.) 'Polonais' x 'Stark Early Orange' F1 progeny. *Tree Genetics & Genomes*. 3: 299-309.
- Lecoals, A.C., Bergougnoux, V, Rubio-Cabetas, MJ, Bosselut, N., Voisin, R. Poessel, JL, Faurobert, M., Bonnet, A., Salesses, G., Dirlwanger, E. and Esmenjaud, D. (2004) Marker-assisted selection for the wide-spectrum resistance to root-knot nematodes conferred by the *Ma* genes from Myrobalan plum (*Prunus cerasifera*) in interspecific *Prunus* material. *Mol. Breed.* 13: 113-124.
- Leece, D.R. (1975). Diagnostic leaf analysis for stone fruit. Sweet cherry. *Austr. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 15: 118-122.
- Lin, S.F., Baumer, J.S., Ivers, D., Cianzo, S.R. and Shoemaker, R.C. (2000). Nutrient solution screening of Fe chlorosis resistance in soybean evaluated by molecular characterization. *J. Plant Nutr.* 23: 1915-1928.
- Loreti, F. y Massai, R. (1990). Los patrones del melocotonero y del almendro: situación actual, problemas y perspectivas. *ITEA Vol. Extra* 9: 73-116.
- Martínez-Gómez, P., Sozzi, G.O., Sánchez-Pérez, R., Rubio, M. and Gradziel, T.M. (2003). New approaches to *Prunus* tree crop breeding. *Food, Agric. Env.* 1(1): 52-63.
- Martínez-Gómez, P., Majourhat, K., Zeinalabedini, M., Erogul, D., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Hafidi, A., Piqueras, A., and Gradziel, T.M. (2007). Use of biotechnology for preserving rare fruit germplasm. *Bioremediation, Biodiver. Bioavailab.* 1(1): 31-40.
- Massai, R. and Loreti, F. (2004) Preliminary observations on nine peach rootstocks grown in a replant soil. *Acta Hort.* 658: 185-192.
- Massai, R., Remorini, D. and Tattini, M. (2004). Gas exchange, water relations and osmotic adjustment in two scion/rootstock combinations of *Prunus* under various salinity concentrations. *Plant Soil* 259: 153-162.
- Massai, R., Xiloyannis, C. and Cerqua, A. (1986). Comportamento di alcuni portinnesti del Pesco sottoposti a stress da eccessi idrici. *Atti del "XVIII Convegno Peschicolo"*, Cesena, may 3: 195-207.
- Mircetich, S.M. and Matheron, M.E. (1976). Phytophthora root and collar rot of cherry trees. *Phytopathology* 66: 549-558.
- Mizutani, F., Yamaha, M. and Tomana, T. (1982). Differential water tolerance and ethanol accumulation in *Prunus* species under flooded conditions. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 51(1): 29-34.
- Moreno, M.A. (2004). Breeding and selection of *Prunus* rootstocks at the Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza, Spain. *Acta Hort.* 658: 519-528.
- Moreno, M.A. and Cambra, R. (1994). 'Adarcias', an almond x peach hybrid rootstock. *HortScience* 29: 925.
- Moreno, M.A., Tabuenca, M.C. and Cambra, R. (1994). Performance of 'Adafuel' and 'Adarcias' as peach rootstocks. *HortScience* 29: 1271-1273.

- Moreno, M.A., Tabuenca, M.C. and Cambra, R. (1995a). 'Adesoto 101', a plum rootstock for peaches and other stone fruits. *HortScience* 30: 1314-1315.
- Moreno, M.A., Tabuenca, M.C. and Cambra, R. (1995b). 'Adara', a plum rootstock for cherries and other stone fruit species. *HortScience* 30: 1316-1317.
- Moreno, M.A., Tabuenca, M.C. and Cambra, R. (1995c). 'Ademir', a myrobalan rootstock for plums. *HortScience* 30: 1475-1476.
- Moreno, M.A., Montañés, L., Tabuenca, M.C. and Cambra, R. (1996). The performance of 'Adara' as a cherry rootstock. *Sci. Hortic.* 65: 85-91.
- Moreno, M.A., Adrada, R., Aparicio, J. and Betrán, J.A. (2001). Performance of 'Sunburst' sweet cherry grafted on different rootstocks. *J. Hort. Sci. and Biotech.* 76 (2): 167-173.
- Moreno, M.A., Moing, A., Lansac, M., Gaudillère, J.P. and Salesses, G. (1993). Peach/myrobalan plum graft incompatibility in the nursery. *J. Hort. Sci.* 68: 705-714.
- Nicotra, A. and Moser, L. (1997). Two new plum rootstocks for peach and nectarines: Tetra and Penta. *Acta Hort.* 451: 269-271.
- Ogundiwin, E.A., Peace, C.P., Nicolet, C.M., Rashbrook, V.K., Gradziel, T.M., Bliss, F.A., Parfitt D. and Crisosto, C.H. (2008) Leucoanthocyanidin dioxygenase gene (PpLDOX): a potential functional marker for cold storage browning in peach. *Tree Gen. Genom.* 4 (3): 543-554.
- Ollat, N., Laborde, B., Neveux, M., Diakou-Verdin, P., Renaud, C. and Moing, A. (2003). Organic acid metabolism in roots of various grapevine (*Vitis*) rootstocks submitted to iron deficiency and bicarbonate nutrition. *J. Plant Nutr.* 26: 2165-2176.
- Parelle, J., Zapater, M., Scotti-Saintagne, C., Kremer, A., Jolivet, Y., Dreyer, E. and Brendel, O. (2007). Quantitative trait loci of tolerance to waterlogging in a European oak (*Quercus robur* L.): physiological relevance and temporal effect patterns. *Plant Cell Environ.* 30: 422-434.
- Perry, R.L. (1987). Cherry rootstocks. pp. 217-264, in R.C. Rom and R.F. Carlson (eds) *Rootstocks for Fruit Crops*. John Wiley & Sons, New York, U.S.A.
- Pinochet, J., Calvet, C., Hernández-Dorrego, A., Bonet, A., Felipe, A. and Moreno, M.A. (1999). Resistance of peach and plum rootstocks from Spain, France, and Italy to rootknot nematode *Meloidogyne javanica*. *HortScience* 34: 1259-1262.
- Pinochet, J., Cunill, M., Torrents, J., Moreno, M.A., Gogorcena, Y., Jiménez, S., Eremin, V., and Eremin, G. (2008). Performance of new low and medium vigour rootstocks for peach to biotic and abiotic stresses. *18th Eucarpia General Congress (Modern Variety Breeding for Present and Future Needs)*, Valencia, 9-12 de septiembre de 2008.
- Quilot, B., Wu B.H., Kervella J., Genard M., Foulongne M. and Moreau K. (2004). QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between *Prunus persica* cultivars and the wild relative species *P. davidiana*. *Theor. Appl. Genet.* 109 (4): 884-897.
- Rabotti, G., De Nisi, P., and Zocchi, G. (1995). Metabolic implications in the biochemical responses to iron deficient in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots. *Plant Physiol.* 107: 1195-1199.

- Rehder, A. (1940). *Manual of Cultivated Trees and Shrubs: Hardy in North America*. Mac Millan, New York, USA (2<sup>nd</sup>), p. 996.
- Reighard, G.L. (2002). Current directions of peach rootstock programs worldwide. *Acta Hort.* 592: 421-428.
- Reighard, G.L., Parker, M.L., Krewer, G.W., Beckman, T.G., Wood, B.W, Smith, J.E. and Whiddon, J. (2001). Impact of hurricanes on peach and pecan orchards in the Southeastern United States. *HortScience* 36: 250-252.
- Renaud, R., Bernhard, R., Grasselly, C. and Dosba, F. (1988). Diploid plum x peach hybrid rootstocks for stone fruit trees. *HortScience* 23: 115-117.
- Rieger, M. (2001). Salt stress resistance of peach and four North American *Prunus* species. *Acta Hort.* 557: 181-187.
- Robbani, M., Banno, K. and Kakegawa, M. (2006). Differential flooding tolerance of some dwarfing pear rootstock clones selected from the progenies of *Pyrus betulaefolia* and *P. calleryana*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75(4): 297-305.
- Rombolà, A.D., Gogorcena, Y., Larbi, A., Morales, F., Baldi E., Marangoni, B., Tagliavini, M. and Abadía, J. (2005). Iron deficiency-induced changes in carbon fixation and leaf elemental composition of sugar beet (*Beta vulgaris*) plants. *Plant Soil* 271: 39-45.
- Rombolà, A.D., and Tagliavini, M. (2006). Iron nutrition of fruit tree crops. pp. 61-84, in L.L. Barton and J. Abadía (eds.). *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Micoorganisms*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Romera, F.J., Alcántara, E. and De La Guardia, M.D. (1991a). Characterization of the tolerance to iron chlorosis in different peach rootstocks grown in nutrient solution. I. Effect of bicarbonate and phosphate. *Plant Soil* 130: 115-119.
- Romera, F.J., Alcántara, E. and De La Guardia, M.D. (1991b). Characterization of the tolerance to iron chlorosis in different peach rootstocks grown in nutrient solution. II. Iron-stress response mechanism. *Plant Soil* 130: 121-125.
- Rowe, R.N. and Catlin, P.B. (1971). Differential sensitivity to waterlogging and cyanogenesis by peach, apricot, and plum roots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96: 305-308.
- Rutto, K.L., Mizutani, F. and Kadoya, K. (2002). Effect of root-zone flooding on mycorrhizal and non-mycorrhizal peach (*Prunus persica* Batsch) seedlings. *Sci. Hortic.* 94: 285-295.
- Salesses, G., Dirlwanger, E., Bonnet, A., Lecouls, A.C. and Esmenjaud, D. (1998). Interspecific hybridization and rootstock breeding for peach. *Acta Hort.* 465: 209-217.
- Salesses, G. and Juste, C. (1970). Recherches sur l'asphyxie radriculaire des arbres fruitières à noyau. I- Rôle éventuel de certaines substances présentes dans les racines du pêcher *Prunus persica*. *Ann. Amélior. Plantes* 20: 87-103.
- Salesses, G. and Juste, C. (1971). Recherches sur l'asphyxie radriculaire des arbres fruitiers à noyau. II- Comportement des porte-greffes de types pêcher et prunier: Etude de leur teneur en amygdaline et des facteurs intervenant dans l'hydrolise de celle-ci. *Ann. Amélior. Plantes* 1: 265-280.

- Salesses, G., Saunier, R., and Bonnet, A. (1970). L'asphyxie racinaire chez les arbres fruitiers. Bull. Tech. Infor. 251: 403-415.
- Sánchez-Pérez, R., Howad, W., Dicenta, F., Arús, P. and Martínez-Gómez, P. (2007). Mapping major genes and quantitative trait loci controlling agronomic traits in almond. Plant Breed. 126: 310-318.
- Sanz, M., Pascual, J., and Machín, J. (1997). Prognosis and correction of iron chlorosis in peach trees: influence on fruit quality. J. Plant Nutr. 20(11): 1567-1572.
- Saunier, R. (1966). Methode de détermination de la résistance a l'asphyxie racinaire de certains porte-greffes d'arbres fruitiers. Ann. Amélior. Plantes 16: 367-384.
- Saunier, R. (1970). Résistance à l'asphyxie racinaire de quelques porte-greffes d'arbres fruitiers. CTIFL-Documents 26: 11 p.
- Shi, Y. and Byrne D.H. (1995). Tolerance of *Prunus* rootstocks to potassium carbonate-induced chlorosis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 283-285.
- Socias i Company, R., Gómez-Aparisi J. and Felipe A.J. (1995). A genetical approach to iron chlorosis in deciduous fruit trees, pp. 167-174, in J. Abadía (ed.). *Iron Nutrition in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sotiropoulos, T.E., Terrizo, I.N., Almaliotis, D., Papadakis, I., and Dimassi, K.N. (2006). Response of cherry rootstocks to boron and salinity. J. Plant Nutr. 29: 1691-1698.
- Sykes, S.R. (1992). The inheritance of salt exclusion in woody perennial fruit species. Plant Soil 146: 123-129.
- Tagliavini, M., Abadía, J., Rombolà, A.D., Abadía, A., Tsipouridis, C. and Marangoni, B. (2000). Agronomic means for the control of iron deficiency chlorosis in deciduous fruit trees. J. Plant Nutr. 23(11&12): 2007-2022.
- Tagliavini, M. and Rombolà A.D. (2001). Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. Eur. J. Agron. 15: 71-92.
- Tamura, F., Tanabe, K. and Itai, A. (2004). Characteristics of the respiration chain in relation to flooding tolerance in pear rootstocks. Acta Hort. 636: 191-198.
- Thimm, O., Essigmann, B., Kloska, S., Altmann, T. and Buckhout, T.J. (2001). Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. Plant Physiol. 127: 1030-1043.
- Tozlu, I., Guy, C.L. and Moore, G.A. (1999a). QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC1 progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and non-saline environments. Genome 42: 1020-1029.
- Tozlu, I., Guy, C.L. and Moore, G.A. (1999b). QTL analysis of Na and Cl accumulation related traits in an intergeneric BC1 progeny of *citrus* and *Poncirus* under saline and non saline environments. Genome 42: 692-705.
- Vilanova, S., Romero, C., Abbott, A.G., Llácer, G. and Badenes, M.L. (2003). An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. Theor. Appl. Genet. 107: 239-247.

Walker, R.R. and Douglas, T.J. (1983). Effect of salinity level on uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in citrus plants. *Aust. J. Agric. Res.* 34: 145-53.

Wang, D., Karle, R. and Iezzoni, A.F. (2000). QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry. *Theor. Appl. Genet.* 100: 535-544.

Wertheim, S.J. and Webster, A.D. (2005). Rootstocks and interstems. pp. 156-175, in J. Tromp, A.D. Webster and S.J. Wertheim (eds). *Fundamentals of Temperate Zone Tree Fruit Production*. Blackhuys Publisher. Leiden, The Netherlands.

Xiloyannis, C., Dichio, B., Tuzio, A.C., Kleinhentz, M., Salesses, G., Gomez-Aparisi, J., Rubio-Cabetas, M.J. and Esmenjaud, D. (2007). Characterization and selection of *Prunus* rootstocks resistant to abiotic stresses: waterlogging, drought and iron chlorosis. *Acta Hort.* 732: 247-251.

Yi, Y. and Guerinot, M.L. (1996). Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J.* 10: 835-844.

Zarrouk, O., Gogorcena Y., Gómez-Aparisi J., Betrán J.A. and Moreno M.A. (2005). Influence of peach x almond hybrids rootstocks on flower and leaf mineral concentration, yield and vigour of two peach cultivars. *Sci. Hortic.* 106: 502-514.

Ziska, L.H., Seemann, J.R. and DeJong, T.M. (1990). Salinity induced limitations on photosynthesis in *Prunus salicina*, a deciduous tree species. *Plant Physiol.* 93: 864-870.

Zocchi, G (2006). Metabolic changes in iron-stressed dicotyledonous plants. pp. 359-370, in L.L. Barton and J. Abadía (eds.). *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.



## CAPÍTULO 20

---

# MEJORA DE LA ADAPTACIÓN EN SISTEMAS DE CULTIVO ASOCIADO

*Ana Paula Rodiño  
Marta Santalla  
Antonio M. de Ron*





## MEJORA DE LA ADAPTACIÓN EN SISTEMAS DE CULTIVO ASOCIADO

---

Ana Paula Rodiño, Marta Santalla y Antonio M. De Ron

**Misión Biológica de Galicia, CSIC**  
**Apartado 28, 36080 Pontevedra**  
**Correo-e: [aprodino@mbg.cesga.es](mailto:aprodino@mbg.cesga.es)**

---

### 20.1. CULTIVO ASOCIADO O MÚLTIPLE

Se denominan cultivos asociados o múltiples los que se desarrollan simultáneamente en el mismo lugar y tiempo, coincidiendo, durante la mayor parte de su ciclo, dos especies vegetales distintas. Según el Instituto Nacional de Estadística (1997) no se consideran cultivos asociados, sino cultivo único, las mezclas de cultivos o cultivos mixtos cuyos productos no se recogen por separado, como los cereales mezclados. Pueden asociarse cultivos herbáceos, cultivos leñosos o herbáceos con leñosos. De hecho, las principales asociaciones inventariadas por el INE son:

cítricos-cítricos, viñedo-herbáceo, viñedo-olivar, viñedo-frutales, olivar-herbáceos, olivar-frutales, frutales-herbáceos, frutales-frutales, maíz-judías, otros herbáceos con herbáceos y cultivos agrícolas-especies forestales.

Entre las ventajas del cultivo asociado puede citarse un aprovechamiento mejor de los recursos, los beneficios mutuos y la barrera a la diseminación de plagas y enfermedades (Mateeva et al., 2002; Okigbo y Greenland, 1975). Adicionalmente, Flores (1993), cita diferentes aspectos positivos del cultivo asociado para unas prácticas orgánicas dentro de la agricultura y la horticultura, referidos a la protección frente a plagas.

### 20.2. EL CULTIVO ASOCIADO EN ESPAÑA Y EN EL MUNDO

El Anuario de Estadística Agroalimentaria (2006) cita, en España, únicamente, como cultivo asociado, el caso de judía y maíz, ya que otras mezclas, que se cultivan juntas, pero se cosechan también juntas, entrarían dentro de la categoría de cultivos mixtos, como el *tranquillón* (trigo+cen-teno) y las praderas polifitas. En el referido caso de la judía y el maíz, la mayor parte del cultivo asociado se realiza en Galicia, y en general en el Norte de España.

La Tabla 20.1 muestra los datos relativos a los años 2004 y 2005. La marcada reducción en la superficie cultivada de judía en España se acentúa aún más en el caso del cultivo asociado, que ha pasado a ser una práctica en desuso (Figura 20.1.)

La práctica de los cultivos asociados está especialmente extendida en las zonas en las cuales se practica “agricultura de subsistencia o autoconsumo”, en algunas zonas de Europa, África, Asia y América (Centro y Sur) (Aponte y Quiroz, 1999; Dixon et al., 2001; Ghosh et al., 2007; Okigbo y Greenland, 1975; Santalla et al., 1994; Yildirim y Guvenc, 2005). El cultivo asociado, en estas zonas, es una opción que puede asegurar estabilidad en la producción y más diversidad para la alimentación animal y humana (Federer, 1993; Federer y Scully, 1993). Algunas asociaciones típicas de dichas zonas son:

- nuez de macadamia y café, en Venezuela
- caña de azúcar y “frijol” (judía), en Colombia
- vid y chopo, en Portugal
- árboles diseminados: cítricos, frutales, olivo, algarrobo, alcaparra, en España, al igual que mezclas forestales de frondosas y Coníferas
- en Ecuador, el sistema agrícola reconoce la existencia oficial de 25 combinaciones de cultivos asociados, del cual la más común es judía-maíz, como en España y Portugal, pero también se incluyen otros cultivos relevantes como cacao, café y platanera
- en Asia son frecuentes mezclas de diversos cultivos, agrícolas y forestales, como: arroz, maíz, leguminosas de grano, caña de azúcar, cultivos oleaginosos, hortalizas, y también caucho, palma aceitera, coco, café, té, cacao, especias, arroz.

**Tabla 20.1.** Superficie y producción de judía en cultivo asociado con maíz.

Sistema		2004		2005	
España	Monocultivo	8315 ha	13928 t	7487 ha	12704 t
	Asociado	3483 ha	1960 t	3127 ha	2111 t
Galicia	Monocultivo	2075 ha	1889 t	1521 ha	2086 t
	Asociado	2236 ha	1304 t	1969 ha	1546 t

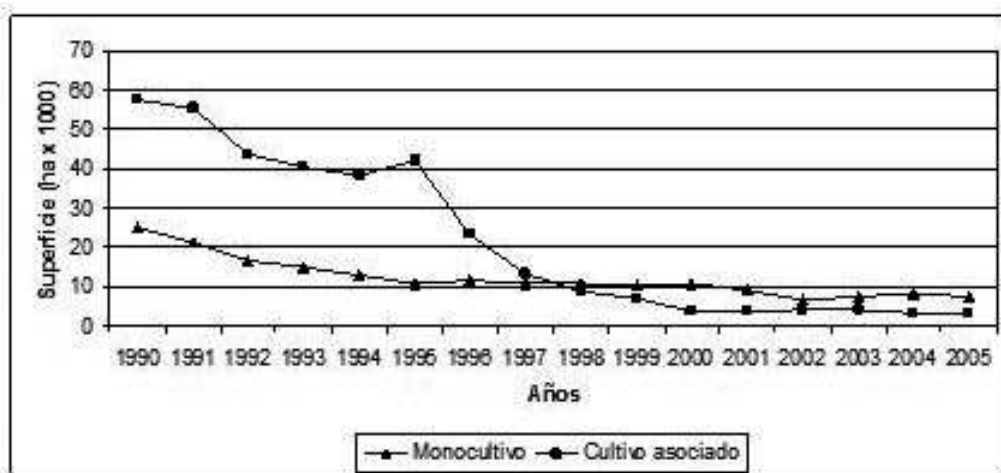


Figura 20.1. Serie histórica de las superficies cultivadas en monocultivo y en cultivo asociado de judía con maíz

### 20.3. EL SISTEMA MODELO JUDÍA – MAÍZ

La judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una especie de difusión global y se cultiva en diferentes sistemas en todo el mundo, los cuales se agrupan en las siguientes categorías (Woolley y Davis, 1991), aunque pueden existir diferentes variantes:

- Cultivo puro o monocultivo de judía arbustiva o judía de enrame.
- Cultivo asociado retardado de judía arbustiva o judía de semi-enrame con maíz. En este tipo las judías son sembradas cuando el maíz alcanza su madurez fisiológica.
- Cultivo asociado en filas alternas de judía arbustiva o judía de semi-enrame con maíz. La siembra es frecuentemente simultánea, aunque en algunas zonas se han encontrado diferencias de 20 a 30 días entre cultivos.
- Cultivo asociado en la misma fila de maíz y judía de semi-enrame o enrame. En estos sistemas, el maíz y la judía son sembrados en el mismo golpe, pudiendo existir además otros cultivos.
- Cultivo asociado de judía con otros cultivos tales como plátanos, patatas y café entre otros.

En los países en vías de desarrollo, el cultivo asociado de judía con maíz es más frecuente que el monocultivo, debido a la preferencia de los agricultores por este sistema de cultivo en estas zonas. Existen diferentes causas que pueden explicar las ventajas en la producción cuando los dos cultivos crecen juntos (Willey, 1979a; Van Rheenen et al., 1981; Trenbath, 1993; Midmore, 1993):

- mayor diversidad en la dieta y ventajas en el rendimiento comparado con el monocultivo (Crookston, 1976; Gebeyehu et al., 2006)
- estabilidad del rendimiento sobre diferentes estaciones (Federer y Scully 1993), ya que si un cultivo falla o crece pobremente, el otro cultivo puede compensarlo; tal compensación no sería posible si los cultivos creciesen separadamente

- utilización más eficiente de los recursos ambientales en cultivo asociado. Esto sucede cuando los cultivos difieren en sus usos de los recursos, de tal manera que pueden complementarse uno a otro para hacer una mejor utilización de ellos que cuando crecen separadamente. Esta complementariedad puede ser temporal, cuando los modelos de crecimiento de los cultivos ocurren en tiempos diferentes, de tal manera que cada cultivo hace su mayor demanda de recursos en tiempos diferentes. Puede existir además una complementariedad espacial, cuando se combinan cultivos con distinta canopia de hoja o distinto sistema radicular, existiendo así un mejor aprovechamiento de nutrientes, agua o luz. Sería el caso de un cereal alto, de una canopia más esparcida, con una leguminosa de canopia más densa; además en este caso la leguminosa al fijar Nitrógeno durante el crecimiento puede beneficiar al cereal.
- control más eficiente de las malas hierbas, plagas y enfermedades. La combinación de cultivos genéticamente diferentes creciendo juntos en la misma área, no provee del substrato uniforme necesario para que las plagas se multipliquen rápidamente y adquieran proporciones epidémicas, lo que da lugar a un aumento del rendimiento. Finalmente, otra de estas ventajas es que el cultivo asociado puede además mejorar la conservación del suelo y la retención de agua, por el mantenimiento de una cubierta de follaje durante más tiempo que el cultivo puro.

Hay que considerar, sin embargo, que pueden existir desventajas al cultivar juntas dos especies, como es la disminución del rendimiento que se produce debido a efectos de competencia o también a la existencia de dificultades debidas al manejo de este sistema de cultivo, especialmente en donde hay un alto grado de mecanización o donde cada cultivo tiene necesidades diferentes de fertilizantes, herbicidas, pesticidas, etc, aunque estas dificultades están asociadas con agroculturas desarrolladas.

#### 20.4. ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA JUDÍA COMÚN Y DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO

Las características morfológicas, fisiológicas y genéticas de las variedades de judía común cultivadas y de los sistemas de cultivo utilizados son el resultado de muchos años de evolución y selección. Un mejor conocimiento del origen de las especies cultivadas y de los sistemas de cultivo, así como de su evolución, constituye una información muy valiosa para el mejorador, ya que le permite un manejo más adecuado de los recursos genéticos y de los programas de mejora.

Basándose en observaciones arqueológicas, botánicas, históricas y lingüísticas, Gepts y Debouck (1991) concluyen que la judía común se ha originado en América, en el área comprendida entre el Norte de Méjico y el Norte de Argentina. Existe una variación geográfica entre las formas silvestres y cultivadas de judía común, según el tipo de faseolina (proteína de reserva de la semilla) y el tamaño de semilla presentes (Gepts, 1988; Gepts et al., 1986; Gepts y Bliss, 1986). En Centroamérica, se encuentra el tipo de faseolina "S" con semillas pequeñas, sin embargo, en los Andes predomina el tipo "T" de faseolina con semillas grandes. Esta distribución paralela de la variabilidad genética puede ser atribuida principalmente a una domesticación múltiple, y a cruces ocasionales entre las formas silvestres y las cultivadas (Gepts, 1988). El centro de origen de la judía común y el maíz se localiza en las mismas áreas Centroamericana y Andina (Vavilov, 1951), de ahí que los sistemas de cultivo asociados con las dos especies hayan evolucionado conjuntamente, en esas zonas, utilizándose el maíz, frecuentemente, como un soporte efectivo de la judía

(Gentry, 1969; Smartt, 1988). Los sistemas de cultivo utilizados en estas situaciones tienden a imitar la vegetación natural, incluyendo una mezcla compleja de un cultivo alto y otro bajo tales como el maíz y la judía. Durante la domesticación han tenido lugar varios cambios en la arquitectura de la planta de judía, entre los cuales se encuentra el surgimiento de formas de crecimiento determinado (Smartt, 1978; Smartt, 1985), probablemente debido a la necesidad de producir combinaciones compatibles de cultivos incluyendo la judía, con la consiguiente reducción en su hábito de crecimiento. De tal manera que este tipo sería adaptable tanto para el crecimiento en cultivos puros como en cultivos asociados con otros cultivos de baja altura (Smartt, 1988).

Por otro lado, con el desarrollo de un mercado para los productos de los agricultores, estos tienden a especializarse y el cultivo mixto puede ser reemplazado por el monocultivo. Además, las variedades cultivadas llegan a ser más uniformes, debido a que el agricultor o mejorador seleccionan para aquellos caracteres requeridos por la sociedad. Se incrementa así drásticamente la vulnerabilidad genética, debido al efecto doble de una reducción de la variabilidad genética en las variedades cultivadas y al abandono de los sistemas de cultivo. En algunos ambientes, como en los países en vías de desarrollo, esta situación puede llegar a ser insostenible, debido al aumento de la erosión del suelo y a una mayor presión de plagas y enfermedades.

Después de la domesticación, las variedades de judía común se introdujeron en otras regiones del mundo. En general, ambos tipos de variedades centroamericanas y andinas, se diseminaron por las tierras bajas de Sudamérica y África. Las variedades centroamericanas predominaron en las tierras bajas de Sudamérica (Brasil) y en el suroeste de los Estados Unidos, y las variedades andinas en África, Europa y el Noroeste de los Estados Unidos (Gepts y Debouck, 1991). Respecto a los sistemas de cultivo, son los primeros exploradores del continente americano los que introdujeron estos sistemas asociados en Europa, todavía en uso en diferentes zonas del sur del continente.

## **20.5. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO ASOCIADO**

Existen diferentes índices para evaluar la productividad y eficiencia por unidad de área de tierra, en sistemas de cultivo asociado cereal-leguminosa (Davis y Smithson, 1986; Mead y Riley, 1981; Ofori y Stern, 1987; Willey, 1979a). Estos incluyen rendimientos absolutos, rendimientos proteícos o bien términos económicos, de cultivos asociados y cultivos puros. La evaluación en términos económicos no se considera apropiada debido a las fluctuaciones estacionales de los precios y a la ausencia de una economía de mercado, propiamente dicha, en la mayoría de las áreas donde se utilizan estos sistemas.

La mayoría de los estudios sobre competencia examinan dos especies creciendo en series de reemplazamiento, esto es una serie de tratamientos de cultivos puros de cada especie y otros tratamientos mixtos formados por el reemplazamiento de una especie por otra en una proporción equivalente. Existen diferentes situaciones de competencia, la primera ocurre cuando el rendimiento de cada especie es menor que el esperado y tratándose de inhibición mutua, si los rendimientos de cada especie son mayores que los esperados es el caso de una cooperación mutua, y por último, la situación más frecuente, cuando una especie rinde menos que lo esperado y la otra más será, en este caso, una compensación. En estas situaciones de compensación la capacidad competitiva de las dos especies es diferente (Willey, 1979a; Mead y Riley, 1981). Existen muchos términos para describir a las especies que son más o menos competitivas, Huxley y Maingu (1978) utilizan dominante y dominado respectivamente.

Es evidente que la situación de mutua inhibición no puede dar una ventaja de rendimiento por mezclar las dos especies, aunque la de cooperación mutua si lo hace, sin embargo, cuando ocurre compensación, esta ventaja no está clara. En esta situación, si la especie dominante es la de mayor rendimiento (frecuentemente aunque no necesariamente), la comparación entre el rendimiento combinado de cultivos puros y asociados es sesgada en favor de estos últimos, pero si la especie dominante es la de menor rendimiento, la comparación es sesgada en favor del cultivo puro (Willey, 1979a).

Willey y Osiru (1972) evitan este sesgo definiendo una medida de la eficiencia de un sistema mixto en términos de las áreas de tierra requeridas en cultivo puro para dar los mismos rendimientos que los obtenidos por los cultivos que componen el sistema asociado. Los rendimientos combinados de los cultivos puros serán igualados a los rendimientos combinados en el cultivo asociado, y de este modo la eficiencia del sistema mixto vendrá determinada si el total de las dos áreas requeridas para los cultivos puros es mayor o menor que el área para el cultivo asociado. Definen así, como un índice de rendimiento combinado, la Proporción Parcial de Tierra (LER, Land Equivalent Ratio). Donde  $Y_i$  es el rendimiento por unidad de área del cultivo  $i$  en el cultivo asociado,  $S_i$  es el rendimiento por unidad de área del cultivo  $i$  en monocultivo, y  $L_i$  es el componente separado de LER para cada cultivo. En el caso de dos cultivos "1" y "2", el LER se establece como sigue:

$$LER = L_1 + L_2 = \frac{Y_1}{S_1} + \frac{Y_2}{S_2}$$

Otro índice para evaluar la productividad en sistemas mixtos, aunque menos frecuente, es la Proporción Parcial de Tiempo X Area (ATER, Area x Time Equivalency Ratio) propuesto por Hiebsch y McCollum (1987), el cual tiene en cuenta la duración del cultivo.

$$ATER = (L_1 t_1 + L_2 t_2) / T$$

donde  $L_i$  es el LER parcial de cada cultivo,  $t_i$  es la duración (días) de cada cultivo en monocultivo, y  $T$  es la duración (días) del sistema de cultivo asociado.

En aquellas situaciones donde el objetivo principal es producir un rendimiento fijo de un componente, generalmente el cereal, y algún rendimiento de la leguminosa, Reddy y Chetty (1984) proponen el concepto de Proporción Parcial de Tierra Estable (SLER, Stable Land Equivalent Ratio) como una extensión del LER (Ofori y Stern, 1987).

$$SLER = (R_1/S_1) + P_{12} (Y_2/S_2)$$



El rendimiento deseado del cultivo  $i$ , generalmente el cereal, es  $R_i$ ,  $S_i$  es el rendimiento del cultivo  $i$  en monocultivo,  $P_{ij}$  es la proporción de tierra desarrollada para el sistema asociado, e  $Y_i$  es el rendimiento del cultivo  $i$  en cultivo asociado.

El índice ATER es sólo apropiado en aquellos sistemas que presentan cultivos con maduraciones diferentes, ya que cuando los componentes presentan un ciclo de crecimiento similar, los valores de ATER son casi iguales a los de LER. Por otro lado, el índice SER se aplica solamente cuando se necesita alcanzar un rendimiento específico del cultivo de cereal y algún rendimiento en el componente de la leguminosa. De esta manera, este índice no puede ser utilizado en aquellas situaciones en las que se desea producir un rendimiento igual en los dos cultivos, que es la meta más frecuente en los sistemas asociados cereal-leguminosa (Willey, 1979a).

En general, se considera el LER la función más adecuada para determinar la eficiencia de sistemas asociados cereal-leguminosa y puede ser aplicado a muchos tipos de sistemas mixtos. Por otro lado, este índice está determinado por factores como la densidad y las capacidades competitivas de cada cultivo. Así, los rendimientos de cada componente en monocultivo, utilizados como factores de estandarización para estimar el LER (Mead y Willey, 1980), deberían estar calculados en las densidades óptimas de cada cultivo, para evitar confundir así los beneficios obtenidos de interacciones entre componentes con una respuesta a un cambio de densidad. Además, las diferencias en las capacidades competitivas afectan al desarrollo de cada cultivo y de este modo a los valores de LER. De ahí que los valores parciales de LER den una indicación de las habilidades competitivas de cada cultivo en el sistema mixto, siendo el cultivo con el valor de LER parcial más alto el más competitivo para factores limitantes del crecimiento que el cultivo con el LER parcial más bajo (Willey, 1979a).

## 20.6. EVALUACIÓN DE LAS VARIEDADES DE JUDÍA COMÚN EN DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO

La evaluación de material genético avanzado en sistemas de cultivo asociado, sin especial mejora previa para este propósito o seleccionado en cultivos puros, necesitaría ser llevada a cabo en ensayos de campo bajo unas condiciones tan similares como sea posible a los ambientes en los que se utilizan estos sistemas, pudiendo realizarse una selección inicial para aquellos caracteres requeridos en estos sistemas mixtos. Hay que tener especial cuidado en asegurar que las condiciones ambientales sean representativas, los diseños experimentales óptimos, y los criterios de selección claros. Por otro lado, estas evaluaciones en cultivo asociado deben realizarse durante varios años para asegurar que los rendimientos de los cultivos junto con otros caracteres sean estables para los agricultores (Fukai y Midmore, 1993). En los ensayos de campo, se utilizan parcelas más grandes en cultivo asociado que en monocultivo, esto es debido a que la penetración de la luz de los bordes puede afectar a las relaciones de competencia entre los cultivos que forman parte del sistema mixto, aumentando así el rendimiento del cultivo más bajo (Davis et al., 1981; Davis y Woolley, 1993).

La mayoría de la investigación sobre cultivo asociado se ha centrado en aspectos agronómicos, rendimiento de los cultivos, densidades, control de plagas, fechas de siembra, etc, aunque el aspecto al que se le ha dado mayor importancia es el aumento del rendimiento. Esto es debido a que, en general, las variedades de judía común cuando crecen en asociación con maíz rinden menos que cuando lo hacen en cultivos puros; siendo este aspecto importante en los países en vías de desarrollo donde la condición primordial es el incremento de la producción. Por otro lado, hay que considerar que la judía común es una importante fuente alimenticia de

proteínas y calorías en estas zonas, y que existe además un aumento de demanda de algunas cualidades, especialmente en los países desarrollados, más que de cantidad por parte del consumidor; de ahí también la importancia de una caracterización nutritiva y física de estas variedades.

En general, el cultivo asociado es uno de los principales factores causantes de los rendimientos bajos en judía, siendo éstos afectados fuertemente por la competencia del maíz. Debido a la diversidad morfológica que existe en las variedades de judía común, es de esperar que exista una interacción entre el tipo de planta con el sistema de cultivo, reaccionando cada tipo de forma diferente a la competencia del maíz. Los rendimientos de los tipos arbustivos y de enrame se ven afectados negativamente por una siembra simultánea o retardada con maíz (Francis, 1978), aunque la interacción de la variedad por el sistema de cultivo es más pronunciada en los tipos de enrame que en los arbustivos (Davis y Smithson, 1986; Francis et al., 1978b). Hay que considerar también, que las plantas derivadas de semillas grandes tienen más reservas y son más competitivas que las procedentes de semillas pequeñas (Hamblin, 1975).

Respecto al maíz, generalmente, se ve mucho menos afectado por la asociación que la judía, aunque los distintos tipos de judía afectan de diferente manera a los rendimientos de maíz. Así, las judías de enrame causan una reducción mayor en el rendimiento de maíz que las arbustivas, encontrándose en algunos casos reducciones en el rendimiento de maíz (Davis y García, 1983; Fisher, 1977) y en otros incrementos (Willey y Osiru, 1972). También influye el tipo de maíz, siendo los tipos altos los que, en general, presentan una menor reducción en el rendimiento, al contrario que los tipos más bajos, aunque existen controversias acerca de este particular (Hamblin y Zimmerman, 1986).

Por otro lado, el rendimiento de judía no sólo depende del tipo de planta y de semilla, sino que influyen también otros componentes, cuya importancia varía con el sistema de cultivo. Así, los rendimientos en cultivos puros están correlacionados positivamente con el número de vainas por planta (Duarte y Adams, 1972), pero en cultivos asociados la masa de 100 semillas es el componente más importante (Hamblin y Zimmerman, 1986). Esto sugiere que la selección para rendimiento en un sistema de cultivo no ayudará a avances rápidos en otro sistema de cultivo alterno.

Teniendo en cuenta que el aumento del rendimiento debería ser frecuentemente la primera consideración en un programa de mejora, igual importancia se debería dar a aquellas características que influyen en la adaptación a los factores ambientales del agrosistema, limitantes de la productividad de los cultivos. Entre dichos factores pueden destacarse las bajas temperaturas, especialmente en las fases iniciales del cultivo, la disponibilidad de agua y la fertilidad del suelo. En el caso del sistema modelo judía-maíz, la presencia de una leguminosa facilita el enriquecimiento en nitrógeno, a través de la simbiosis con rhizobios (Ghosh et al., 2007; Santalla et al., 2001b).

## 20.7. ESTUDIO DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS EN DIFERENTES AMBIENTES Y SISTEMAS DE CULTIVO

El estudio sobre cultivo asociado se ha centrado principalmente en la selección de variedades adaptadas para este sistema, ya que no hay una razón clara por la que genotipos adaptados para sistemas puros lo sean también para sistemas asociados. Esto indica la importancia de conocer la estabilidad y variabilidad de los caracteres cuantitativos (agronómicos e indicadores de cualidades físicas y nutritivas) en diversos ambientes (años y localidades distintos), así como las interacciones con sistema de cultivo, ya que permite elegir aquellos caracteres que sean más estables de un ambiente a otro. Existen diversos estudios sobre interacciones de variedad por sistema de cultivo (Gebeyehu et al., 2006), de los cuales se puede sugerir o no la selección en un sistema de cultivo específico, según que la magnitud de la interacción sea o no significativa. Davis et al., (1984) entre otros, describieron interacciones significativas para variedades de judía común asociadas con maíz, aunque otros autores no encuentran este tipo de interacciones (Francis et al., 1978a; Wortmann y Sengooba, 1993). De estos trabajos se concluye que la interacción de variedad por sistema de cultivo es una realidad constatada en algunos cultivos y debe ser considerada por el mejorador.

Se han usado dos tipos de diseños, bloques completos al azar y en parcelas divididas, ambos ampliamente utilizados en todos los estudios sobre cultivo asociado (Mead y Riley, 1981; Mead y Stern, 1980). Los diseños en parcelas divididas presentan varias ventajas, como son que la medida de los efectos del factor adjudicado a la subparcela (en este caso sistema de cultivo) y su interacción con el factor de la parcela principal (variedad) es más precisa que la obtenida con un diseño de bloques al azar. Sin embargo, la medida de los efectos de los tratamientos de la parcela principal es menos precisa que la conseguida con un diseño de bloques completos al azar (Gómez y Gómez, 1984). Por otro lado, si lo que interesa es conocer si existe alguna ventaja de combinar los dos cultivos, se necesitará un diseño de bloques aleatorizados en el que pueden incluirse tratamientos de cultivos puros de ambas especies, para así poder estandarizar las medidas.

Los diseños en parcelas divididas repetidos en varios ambientes también permiten obtener una estimación de los componentes de la varianza y calcular, por tanto, la heredabilidad en sentido amplio o grado de determinación génica (Falconer, 1981) y la constancia. La primera se define como el cociente entre la varianza genotípica y la fenotípica, y expresa el grado en el cual el fenotipo del individuo es determinado por su genotipo en caracteres variables, mientras que la constancia es el cociente entre la varianza genética y la no genética (De Ron y Ordás, 1987). Valores bajos de estos parámetros indican que las diferencias entre variedades son debidas más a los efectos de los ambientes y a la interacción entre genotipos y ambientes que a las diferencias entre las variedades.

La heredabilidad en sentido amplio, considerada como un índice que describe a la población y a la acción del medio (Hanson, 1963), resulta adecuada para poder determinar que caracteres son los más apropiados para diferenciar las variedades, así como cuales de ellos serán válidos para caracterizar el germoplasma. Además, estos parámetros genéticos se han estimado en ambos sistemas de cultivo (monocultivo y cultivo asociado con maíz), ya que la determinación de los mismos en un sólo sistema de cultivo es una pobre guía para el otro (Hamblin y Zimmerman, 1986).

Por otro lado, estos diseños también permiten estimar las correlaciones parciales entre sistemas de cultivo, lo cual da una idea de la interacción de variedad por sistema de cultivo. En algunos casos, se ha encontrado que las correlaciones cambian de signo y valor entre sistemas, así el índice de cosecha se relaciona positivamente con el rendimiento en monocultivo pero negativamente en asociación con maíz (Zimmermann et al., 1984).

## 20.8. SELECCIÓN DE VARIEDADES PARA SISTEMAS DE CULTIVO ASOCIADO

El objetivo de la mejora de plantas es la obtención de variedades que posean una producción idónea, cualidades particulares, resistencia a plagas y enfermedades y a condiciones abióticas adversas, así como una adaptación adecuada a ambientes diferentes. Sin embargo, la mayoría de la investigación realizada se ha centrado en cultivos puros, asumiéndose que las variedades mejores para estos sistemas lo son también para sistemas de cultivo asociado. Es posible, por otro lado, que las variedades que son destinadas para sistemas de cultivo asociado deban ser mejoradas específicamente para este propósito, aunque hasta ahora son muy pocos los mejoradores que han seleccionado sus variedades para estos sistemas de cultivo. En general, las variedades empleadas para evaluar los sistemas de cultivo son de dos tipos: variedades tradicionales utilizadas habitualmente por los agricultores, a menudo con un limitado potencial de rendimiento, y variedades mejoradas desarrolladas para sistemas de monocultivo. En este caso, y sin un programa específico para seleccionar variedades que sean óptimas para los sistemas de cultivo asociado, los rendimientos obtenidos pueden no ser los esperados.

El primer paso en el desarrollo de variedades para sistemas de cultivo asociado es la determinación de si son necesarios programas de mejora específicos (Davis y Woolley, 1993; Francis, 1981). Un factor que influye en la decisión del mejorador, es la magnitud de la interacción del genotipo por el sistema de cultivo, la cual es un tipo de interacción genotipo x ambiente, y puede variar con los años y localidades. Esta interacción tiene lugar y es importante, en aquellos casos en los que existe competencia entre los cultivos o bien en que hay diferencias en la capacidad competitiva entre las variedades. Así, las variedades de judía común de enrame varían considerablemente en su habilidad competitiva, y se han encontrado interacciones genotipo x sistema de cultivo cuando se asocian con maíz (Davis y García, 1983), sin embargo, las variedades arbustivas muestran pocas diferencias en su habilidad para competir con maíz u otro cultivo dominante, y en consecuencia se encuentran menos interacciones genotipo x sistema de cultivo (Francis et al., 1978a; Santalla et al., 1994). Aunque estas interacciones no existen normalmente en cultivos dominantes, tales como maíz, algunas variedades de estos cultivos pueden presentar diferencias en su adaptabilidad para cultivo asociado.

Existen diferentes factores que afectan a las relaciones de competencia entre los cultivos que forman parte del sistema de cultivo asociado (Davis y Woolley, 1993). Así es el caso de la fecha de siembra, siendo la competencia mayor en la plantación simultánea que cuando un cultivo se siembra en la madurez fisiológica del otro. También la densidad, la disposición espacial, las enfermedades, la fertilidad y la disponibilidad de agua son factores importantes. Hay que considerar además que la competencia provee una cierta estabilidad al sistema, ya que si un cultivo falla el otro puede compensarlo.

En general, el beneficio obtenido de un programa de mejora para sistemas asociados será mayor, cuando se mejore la complementariedad entre los cultivos y se reduzca la competencia entre ellos. Debido al elevado costo y complejidad de seleccionar en estos sistemas de cultivo, es necesario identificar aquellos caracteres adecuados para sistemas de cultivo asociado, los cuales favorezcan la complementariedad entre los cultivos, y que puedan ser seleccionados en cultivos puros. Existen así una serie de caracteres deseables para sistemas de cultivo asociado que pueden ser seleccionados en una primera etapa del programa de mejora y que, en general, muestran poca interacción con el sistema de cultivo, como son: floración, madurez, diferencias en el uso de los recursos naturales y arquitectura de planta. Sin embargo, la adaptación a las condiciones del agrosistema, en el sentido de la tolerancia a condiciones adversas (como bajas temperaturas o déficit hídrico) probablemente se manifieste en modo muy diferente en monocultivo y cultivo asociado.

La mayoría del trabajo de mejora para estos sistemas se ha centrado en el cultivo dominado, en este caso la judía, con el objetivo de seleccionar variedades más tolerantes al *stress* producido por este sistema. Se ha prestado menor atención a los cultivos dominantes, aunque existe un potencial importante en seleccionar tipos de planta que se complementen con el otro cultivo. Además, los resultados obtenidos de estos programas no serían exclusivos para sistemas de cultivo asociado, ya que los tipos menos competitivos tienden a desarrollarse bien cuando se siembran en cultivos puros (Donald y Hamblin, 1976). La mejora para estos sistemas de cultivo asociado ofrece una alternativa importante, especialmente en aquellas condiciones en las que los cultivos puros tienen dificultades para adaptarse debido a la degradación del suelo así como a la presión producida por determinadas plagas y enfermedades. Utilizando variedades seleccionadas para este propósito en combinación con técnicas adecuadas, los sistemas de cultivo asociado tienen el potencial de utilizar la humedad y los nutrientes del suelo más eficientemente (Willey, 1979b). Además, al proveer de una cubierta al suelo durante un gran período de tiempo, y reducir el uso de pesticidas, estos sistemas tienen un bajo impacto sobre el ambiente.

De acuerdo con lo tratado en apartados anteriores, puede concluirse que, tanto en el sistema modelo judía-maíz, como en otros sistemas de cultivo asociado, no se han desarrollado programas específicos de selección y mejora en caracteres relacionados con la adaptación y con la tolerancia a estreses abióticos, ni por vía convencional, ni facilitado mediante herramientas moleculares (Capel et al., 2000). En realidad, la selección realizada en estos sistemas se ha orientado directamente hacia la productividad del sistema (Federer y Scully, 1993; Gebeyehu et al., 2006; Santalla et al., 1999) o hacia la calidad de los productos cosechados (Santalla et al., 1995; Santalla et al., 2001b). Adicionalmente, se ha investigado el sistema simbiótico judía-rhizobio como un medio de mejorar la disponibilidad de nitrógeno en el sistema de cultivo asociado (Ghosh et al., 2007; Santalla et al., 2001a). La selección y mejora se ha basado en las previas evaluaciones agronómicas o de otro tipo sobre el material cultivado en monocultivo y cultivo asociado, pero, por la complejidad de estos sistemas no existe información disponible acerca del comportamiento del material genético según sistema de cultivo y las condiciones ambientales susceptibles de producir estrés en las plantas.

## REFERENCIAS

- Anuario de Estadística Agroalimentaria. (2006). Secretaría General Técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Aponte, A. y Quiroz, A. (1999). *Cultivos asociados al café*. FONAIAP Divulga No. 64 Octubre – Diciembre. Venezuela.
- Capel, J., Santalla, M., Ferreira, J.J., De Ron, A.M. y Lozano, R. (2000). Selección asistida por marcadores moleculares. Pp 357-381, en F. Nuez y J. M. Carrillo (eds.). *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Crookston, R. (1976). Intercropping, a new version of an old idea. *Crops Soils Magazine*: 7-9.
- Davis, J.H.C., Amézquita, M.C. and Muñoz, J.E. (1981). Border effects and optimum plot sizes for climbing beans (*Phaseolus vulgaris*) and maize in association and monoculture. *Expt. Agr.* 17: 127-135.
- Davis, J.H.C. and García, S. (1983). Competitive ability and growth habit of indeterminate beans and maize for intercropping. *Field Crops Res.* 6: 59-75.
- Davis, J.H.C., van Beuningen, L., Ortiz, M.V. and Pino, C. (1984). Effect of growth habit of beans on tolerance to competition from maize when intercropped. *Crop Sci.* 24: 751-755.
- Davis, J.H.C. and Smithson, J.B. (1986). *Principles of intercropping with beans. Guía de estudio*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. Pp. 37.
- Davis, J.H.C. and Woolley, J.N. (1993). Genotypic requirement for intercropping. *Field Crops Res.* 34: 407-430.
- Dixon, J., Gulliver, A. and Gibbon, D. (2001). *Compendio. Sistemas de producción agropecuaria y pobreza. Cómo mejorar los medios de subsistencia de los pequeños agricultores en un mundo cambiante*. Hall, M. (Ed.). FAO y Banco Mundial. Roma, Italia y Washington DC, USA.
- De Ron, A.M. and Ordás, A. (1989). Estimation of variances at different significance levels. *Biom. J.* 31: 957-966.
- Donald, C.M. and Hamblin, J. (1976). The biological yield and harvest index as agronomic and plant breeding criteria. *Adv. Agron.* 28: 361-405.
- Duarte, R.A. and Adams, M.W. (1972). A path coefficient analysis of some yield component interrelations in field beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Sci.* 12: 579-582.
- Falconer, D.S. (1981). *Introduction to quantitative genetics*. 2ª ed. Longman Inc. New York, USA.
- Federer, W.T. (1993). *Statistical design and analysis for intercropping experiments: two crops*. Springer. Berlin, Heidelberg, Germany and New York, USA.
- Federer, W.T. and Scully, B.T. (1993). A parsimonious statistical design and breeding procedure for evaluating and selecting desirable characteristics over environments. *Theor. Appl. Genet.* 86: 612-620

- Fisher, N.M. (1977). Studies in mixed cropping. I. Seasonal differences in relative productivity of crop mixtures and pure stands in the Kenya highlands. *Expt Agr.* 13: 177-184.
- Flores, E. (1993). *El cuidado orgánico de las plantas*. Planeta Tierra. Madrid, España.
- Francis, C.A. (1978). Multiple cropping potentials of beans and maize. *HortSci.* 13: 12-17.
- Francis, C.A, Prager, M., Laing, D.R. and Flor, C.S. (1978a). Genotype x environment interactions in bush bean cultivars in monocultivo and associated with maize. *Crop Sci.* 18: 237-242.
- Francis, C.A., Laing, D.R. and Prager, M. (1978b). Genotype x environment interaction in climbing bean cultivars in monoculture and associated with maize. *Crop Sci.* 18: 242-246.
- Francis, C.A. (1981). Development of plant genotypes for multiple cropping systems. pp 179-229. In K.J. Frey (Ed.) *Plant Breeding II* (1ª edition). The Iowa State, University Press. Ames, USA.
- Fukai, S. and Midmore, D.J. (1993). Adaptive research for intercropping: steps towards the transfer of intercrop research findings to farmers' fields. *Field Crops Res.* 34:459-271.
- Gebeyehu, S., Simane, B, and Kirkby, R. (2006). Genotype x cropping system interaction in climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown as sole crop and in association with maize (*Zea mays* L.). *Eur. J. Agron.* 24: 396-403
- Gentry, H. (1969). Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Econ. Bot.* 23: 55-69.
- Gepts, P. and Bliss, F.A. (1986). Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Econ. Bot.* 40: 469-478.
- Gepts, P., Osborn, T.C., Rashka, K and Bliss, F.A. (1986). Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40: 451-468.
- Gepts, P. (1988). Phaseolin as an evolutionary marker. pp 215-241, in P. Gepts (ed.). *Genetic resources of Phaseolus beans: their maintenance, domestication, evolution and utilization*. Kluwer. Dordrecht, The Netherlands
- Gepts, P. and Debouck, D.G. (1991). Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). pp 7-53, in A. van Schoonhoven y O. Voysest (eds.). *Common bean: Research for Crop Improvement*. C. A. B. Int., Wallingford, Reino Unido y CIAT, Cali, Colombia.
- Ghosh, P.K., Bandyopadhyay, K.K., Wanjari, R.H., Manna, M.C., Misra, A.K. Mohanty, M. and Rao, A.S. (2007). Legume effect for enhancing productivity and nutrient use-efficiency in major cropping systems - An Indian perspective: A review. *J. Sustainable Agr.* 1: 59-86
- Gómez, K.A. and Gómez, A.A. (1984). *Statistical procedures for agricultural research*. John Willey & Sons (2nd ed.). New York, USA. Pp. 680.
- Hamblin, J. (1975). Effect of environment, seed size and competitive ability on yield and survival of *Phaseolus vulgaris* (L.) genotypes in mixtures. *Euphytica* 24: 435-445.
- Hamblin, J. and Zimmermann, MJO. (1986). Breeding common bean for yield in mixtures. *Plant Breed. Rev.* 4: 240-270.



- Hanson, W.D. (1963). Heritability. pp 125-139, in W.D. Hanson and H.F. Robinson (eds.). *Statistical genetics and plant breeding*. NAS-NRC 982. Washington DC, USA
- Hiebsch, C.K. and McCollum, M.C. (1987). Area x time equivalency ratio: A method for evaluating the productivity of intercrops. *Agron. J.* 79: 15-22.
- Huxley, P.A. and Maingu, Z. (1978). Use of a systematic spacing design as an aid to the study of inter-cropping: some general considerations. *Expt. Agr.* 14: 49-56.
- Instituto Nacional de Estadística. (1997). Encuesta sobre la Estructura de las Explotaciones Agrícolas 1997. Madrid.
- Mateeva, A., Ivanova, M. and Vassileva, M. (2002). Effect of intercropping on the population density of pests in some vegetables. *Acta Hort.* (ISHS) 579: 507-511
- Mead, R. and Stern, R.D. (1980). Designing experiments for intercropping research. *Expt. Agr.* 16: 329-342.
- Mead, R. and Riley, J. (1981). A review of statistical ideas relevant to intercropping research. *J. Royal Stat. Soc. A* 144: 462-509.
- Midmore, D.J. (1993). Agronomic modification of resource use and intercrop productivity. *Field Crops Res.* 34: 357-380.
- Ofori, F. and Stern W.R. (1987). Cereal-legume intercropping systems. *Adv. Agron.* 41: 41-90.
- Okigbo, B.N. and Greenland, D.J. (1975). Intercropping systems in tropical Africa. In Stelly, M, Kral, DM, Eisele, LC and Nauseef, JH (eds.) *Symposium on Multiple Cropping*. Knoxville, Tennessee, USA. American Society of Agronomy. Special Publication 27: 63-101.
- Reddy, M.N. and Chetty, C.K.J.R. (1984). Staple land equivalent ratio for assessing yield advantage from intercropping. *Expt. Agr.* 20: 171-177.
- Santalla, M., De Ron, A.M. and Escribano, M.R. (1994). Effect of intercropping bush bean populations with maize on agronomic traits and their implications for selection. *Field Crops Res.* 36: 185-189.
- Santalla, M., De Ron, A.M. and Casquero, P.A. (1995). Nutritional and culinary quality of bush bean populations intercropped with maize. *Euphytica* 84: 57-65
- Santalla, M, Casquero, P.A. and De Ron, A.M. (1999). Yield and yield components from intercropping improved bush bean cultivars with maize. *J. Agron. Crop Sci.* 183: 263-269.
- Santalla, M., Amurrio, J.M., Rodiño, A.P. and De Ron, A.M. (2001a). Variation in traits affecting nodulation of common bean under intercropping with maize and sole cropping. *Euphytica* 122: 243-255.
- Santalla, M., Rodiño, A.P., Casquero, P.A. and De Ron, A.M. (2001b). Interactions of bush bean intercropped with field and sweet maize. *Eur. J. Agron.* 15: 185-196
- Smartt, J. (1978). The evolution of pulse crops. *Econ. Bot.* 32: 185-198.
- Smartt, J. (1985). Evolution of grain legumes. IV. Pulses in the genus *Phaseolus*. *Expt. Agr.* 21: 193-207.



Smartt, J. (1988). Morphological, physiological, and biochemical changes in *Phaseolus* beans under domestication. pp 543-560, in P. Gepts (ed.). *Genetic Resources of Phaseolus beans: their maintenance, domestication, evolution, and utilization*. Kluwer. Dordrecht, The Netherlands.

Trenbath, B.R. (1993). Intercropping for the management of pests and diseases. *Field Crops Res.* 34: 381-405.

Van Rheenen, H.A., Hasselbach, O.E. and, Muigai, S.G.S. (1981). The effect of growing beans together with maize on the incidence of bean diseases and pests. *Neth. J. Plant Pathol.* 87: 193-199.

Vavilov, N.I. (1951). *The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants*. Ronald Press. New York, USA.

Willey, R.W. and Osiru, D.S.O. (1972). Studies on mixtures of maize and beans (*Phaseolus vulgaris*) with particular reference to plant population. *J. Agr. Sci., Cambridge* 79: 517-529.

Willey, R.W. (1979a). Intercropping-Its importance and research needs. Part 1. Competition and yield advantages. *Field Crop Abstr.* 32: 1-10.

Willey, R.W. (1979b). Intercropping-Its importance and research needs. Part 2. Agronomy and research approaches. *Field Crop Abstr.* 32: 73-83.

Woolley, J. and Davis, J.H.C. (1991). The agronomy of intercropping with beans. In A. Schoonhoven and M. Ouyet (eds.) *Common Beans: Research for Crop Improvement*. CAB International. Cali, Colombia, 980 p.

Wortmann, C. S. and Sengooba, T. (1993). The banana-bean intercropping system – bean genotype x cropping system interactions. *Field Crops Res.* pp 31:19-25.

Yildirim, E. and Guvenc, I. (2005). Intercropping based on cauliflower: more productive, profitable and highly sustainable. *Eur. J. Agron.* 22: 11-18

Zimmermann, M.J.O., Rosielle, A.A., Waines, J.G. and Foster, K.W. (1984). A heritability and correlation study of grain yield, yield components and harvest index of common bean in sole crop and intercrop. *Field Crops Res.* 9: 109-118.



JUNTA DE ANDALUCÍA

*Consejería de Agricultura y Pesca*