

Tecnologías derivadas de la *Biología Molecular* para evaluar la calidad de las semillas

Jorge Rojas¹; Esther Rojas¹; Gabriela Bottani¹; Eric Jellen²; Jeff Maughan²

¹ Centro de Biotecnología y Nanotecnología Agropecuario y Forestal (CByNAF) de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Forestales - UMSS

² Brigham Young University (BYU), Utha - USA

E mail: rojasbeltran@hotmail.com

Resumen. La semilla es un insumo vital en la agricultura, es por eso que es crucial contar con métodos fiables que permitan evaluar su calidad. Existen numerosos métodos tradicionales para evaluar la calidad de las semillas (pureza varietal, identificación de la variedad, porcentaje de germinación, etc.), sin embargo, muchos de estos están basados en evaluaciones fenotípicas no muy precisas. La comprensión de la estructura, el funcionamiento y expresión del Ácido Desoxirribonucleico (ADN), ha permitido desarrollar numerosas tecnologías, que genéricamente se las conoce como *tecnologías derivadas de la biología molecular*, las cuales están siendo actualmente utilizadas básicamente para evaluar dos criterios de calidad de las semillas: la calidad genética y la calidad sanitaria. En este artículo se describe las diferentes tecnologías moleculares utilizadas para evaluar criterios de calidad de las semillas, sus ventajas y perspectivas con relación a los métodos tradicionales, y se presentan algunos ejemplos.

Palabras clave: ADN; Calidad Genética; Calidad Sanitaria; Análisis Molecular

Abstract. Technologies derived from molecular biology to assess the quality of seeds. The seed is a vital input in agriculture, which is why it is crucial to have reliable methods for assessing its quality. There are many traditional methods to evaluate the quality of seeds (varietal purity, identification of the variety, germination percentage, etc.). However, many of these are based on phenotypic evaluations not very accurate. The compression of the structure, the functioning, and expression of deoxyribonucleic acid (DNA) has allowed to develop many technologies that are known generically as technologies derived from molecular biology. These technologies are being currently used basically for evaluating two criteria of quality of seeds: the genetic quality and sanitary quality. This article describes the different molecular technologies used to assess quality criteria of seeds, their advantages and prospects in relation to traditional methods, and some examples.

Keywords: DNA; Genetic Quality; Sanitary Quality; Molecular Analysis

Introducción

En términos botánicos, la semilla es un óvulo fecundado y maduro. La semilla contiene un embrión del que puede desarrollarse una nueva planta bajo condiciones apropiadas, una fuente de ali-

mento almacenado y está envuelta por una cubierta protectora. En términos agrícolas, la semilla es cualquier parte de la planta que tiene la capacidad de regenerarse en una nueva planta (tubérculo, tallo, semilla botánica, etc.) Esta última definición se adoptará en el presente artículo.

Una buena cosecha comienza con una buena semilla. La semilla es un insumo vital en la agricultura, porque a través de ella, la inversión hecha en otros insumos, como pesticidas, fertilizantes, riego y el mantenimiento del cultivo, puede ser mala o exitosa. Generalmente, el costo de la semilla es menor en comparación a otros insumos, pero su impacto en la producción, y por ende en los ingresos, es mayor. Además, la semilla es un insumo que puede mejorarse permanentemente, también permite mejorar la tecnología de producción, es un medio para la rápida rehabilitación de la agricultura en los casos de desastres naturales, etc.

Criterios para evaluar la calidad de las semillas

Los criterios para evaluar la calidad de las semillas se pueden agrupar en cinco categorías:

- Calidad genética.
- Calidad fisiológica.
- Calidad física.
- Calidad sanitaria.
- Calidad de almacenaje.

El valor de cada uno de los criterios de calidad es relativo. Por ejemplo, de nada sirve tener semillas que tiene una pureza varietal del 99% pero que tengan un porcentaje de germinación del 20%.

Parámetros de calidad

En los distintos criterios de calidad antes mencionados, existen diferentes parámetros que se pueden estudiar para establecer la calidad (Pérez-García y Pita-Villamil, 2001) (Cuadro 1). Por ejemplo, la calidad genética se puede evaluar desde el punto de vista del lugar

que se cultivará la variedad. Sabemos que no todas las variedades se adaptan a todas las condiciones agroecológicas donde se cultiva una especie; entonces, para introducir una nueva variedad en una zona, es absolutamente necesario hacer pruebas de adaptación durante varios años, hasta tener la certeza que la variedad prosperará en el lugar.

También es necesario hacer estudios de la calidad respecto a su uso. Si una variedad de trigo se utilizará para hacer pan, entonces es necesario determinar la calidad panadera de la variedad. Algunas veces se olvidan estas premisas, especialmente cuando se utiliza la semilla para rehabilitar la agricultura en los casos de desastres naturales, debido a que frecuentemente se proporciona a los agricultores semillas de cualquier variedad.

Otros parámetros que permiten evaluar la calidad genética de las semillas son la identificación de la variedad y la pureza varietal. Para determinar estos parámetros, tradicionalmente se realizan estudios comparativos con descriptores específicos establecidos para la variedad.

El Cuadro 1 también muestra algunos métodos tradicionales para determinar los distintos parámetros de calidad. Así por ejemplo, se puede determinar la viabilidad de la semilla mediante pruebas de germinación, ensayo topográfico con tetrazolio (el tetrazolio tiene la capacidad de poner en evidencia daños fisiológicos y necrosis de las semillas de manera localizada) y radiografía con rayos X (los rayos X permiten distinguir, por ejemplo, las semillas con y sin embrión).

Cuadro 1. Criterios, parámetros y métodos tradicionales de evaluación de la calidad de las semillas

Criterios de calidad	Parámetros de evaluación	Métodos tradicionales de evaluación
Calidad genética	Evaluación de la variedad desde el punto de vista del lugar que se cultivará y el uso que se le dará	Ensayos de campo, pruebas de calidad de la variedad de acuerdo al destino de uso
	Identificación de la variedad	Comparación con descriptores específicos de la variedad
	Pureza varietal	Comparación con descriptores específicos de la variedad
Calidad fisiológica	Viabilidad	% de germinación, ensayo topográfico con tetrazolio, radiografía con rayos X
	Vigor	Ensayo de crecimiento y evaluación de plántulas, ensayo de conductividad eléctrica, ensayo de envejecimiento acelerado, etc.
Calidad física	Pureza física	Determinación de la proporción de semillas extrañas, de semillas de malezas u otros cultivares o especies presentes en la muestra
	Ausencia de materia inerte	Determinación de materia inerte (tierra, piedras, etc.) presentes en la muestra
	Apariencia	Comparación con descriptores específicos de la semilla de la variedad
	Uniformidad	Evaluación del tamaño, forma, color, peso de mil semillas, etc., de acuerdo a especificaciones de la variedad
	Daños mecánicos	Determinación de la proporción de semillas dañadas (rasgadas, quebradas, con cubiertas rotas, etc.)
Calidad sanitaria	Presencia de enfermedades	Diagnóstico visual, pruebas microbiológicas, ELISA
	Presencia de plagas	Identificación de plagas presentes en la muestra
Calidad de almacenaje	Contenido de humedad	Secado en estufa, método eléctrico, etc.

Nuevos métodos de evaluación de la calidad de semillas

A partir de la comprensión de la estructura, funcionamiento y expresión del ADN, se ha logrado desarrollar lo que se conoce como *Tecnologías Derivadas de la Biología Molecular*. Estas tecnologías están siendo utilizadas ámbitos de la agricultura, medicina, industria, etc.

Específicamente, en lo que respecta a la evaluación de la calidad de las semillas, estas tecnologías sirven para evaluar dos criterios de calidad: calidad genética y calidad sanitaria; para evaluar estos dos tipos de calidad de la semilla, se tiene básicamente los siguientes procesos técnicos descritos en el Cuadro 2:

- ⇒ Evaluación Molecular.
- ⇒ Marcadores Moleculares.
- ⇒ Diagnóstico Molecular.
- ⇒ Micromatrices.
- ⇒ Metagenómica.

Cuadro 2. Métodos derivados de la Biología Molecular para evaluar la calidad de las semillas

Criterios de calidad	Parámetros de evaluación	Métodos derivados de la Biología Molecular
Calidad genética	Evaluación de la variedad desde el punto de vista del lugar que se cultivará y el uso que se le dará	Evaluación molecular. Marcadores moleculares.
	Identificación de la variedad	Marcadores moleculares.
	Pureza varietal	Marcadores moleculares.
Calidad sanitaria	Presencia de enfermedades	Diagnóstico molecular.
		Micromatrices.
		Metagenómica.
	Presencia de plagas	Marcadores moleculares. Metagenómica.

Ahora bien, la pregunta lógica es:

¿qué ventajas tienen las tecnologías derivadas de la Biología Molecular con relación a los métodos tradicionales de evaluación de la calidad de las semillas?

Para empezar, las tecnologías derivadas de la Biología Molecular, permiten evaluar distintos parámetros a nivel del ADN, eliminando la influencia del medio ambiente, que es uno de los factores de mayor incertidumbre en la evaluación fenotípica.

Es por eso que las comparaciones que se hacen entre individuos para, por ejemplo, identificar la variedad o determinar la pureza genética, tienen una confiabilidad del 99.9%. La evaluación de la variedad desde el punto de vista del lugar que se cultivará y el uso que se le dará, también es mucho más fiable que las evaluaciones tradicionales, por las mismas razones antes mencionadas.

Respecto a la calidad sanitaria, las nuevas tecnologías son más sensibles, más específicas, generalmente más rápidas, permiten analizar muchos patógenos a

la vez, no requieren experiencia específica en diagnóstico y el proceso de diagnóstico puede ser automatizado.

1. Tecnología de los Marcadores Moleculares

Un marcador molecular es punto específico del cromosoma de un individuo, que es fácilmente identificable y cuya herencia genética se puede rastrear. Un marcador puede ser un par de bases (Figura 1), o un segmento de ADN formado por varios pares de bases, que pueden corresponder a un gen o a alguna sección del ADN sin función conocida. Los marcadores moleculares son un tipo de los marcadores genéticos, como son también los marcadores morfológicos (descriptores) y los marcadores bioquímicos (Coles *et al.*, 2005; Mughan *et al.*, 2012).

Los marcadores moleculares son útiles tanto en la investigación básica (análisis filogenéticos, estudios de diversidad genética, forense, búsqueda de genes útiles, etc.) como en la aplicada (selección asistida por marcadores moleculares, pruebas de paternidad, trazabilidad de los alimentos, evaluación de la cali-

dad de las semillas, etc.). Rojas-Beltrán (2007) hace una descripción detallada de la tecnología de los marcadores moleculares.

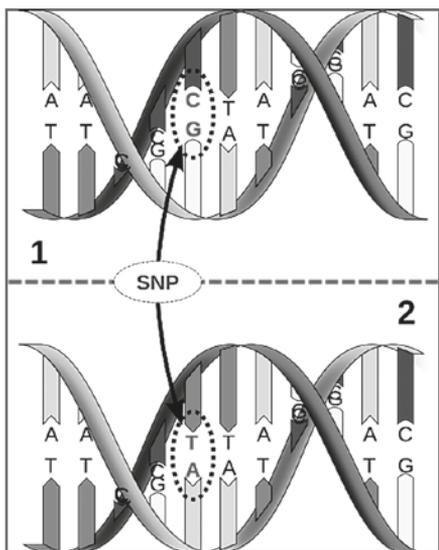


Figura 1. Diferencia en un par de bases entre dos individuos (1 y 2). Uno de los individuos tiene C-G en ese punto y el otro tiene T-A. Esta diferencia se revela por el marcador denominado SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Genetic Genealogy SIG- The Villages Genealogical Society).

Respecto a la evaluación de la calidad de la semilla, los marcadores moleculares son útiles para la evaluación de la variedad desde el punto de vista del lugar que se cultivará y el uso que se le dará, la identificación de la variedad, determinar la pureza varietal y eventualmente para evaluar la calidad sanitaria.

La Figura 2 muestra el resultado de un estudio realizado para determinar la pureza varietal de semillas de papa, a partir de variaciones fenotípicas durante la producción de semilla de una variedad de tubérculos blancos, donde aparecieron papas rosadas, atribuyendo este

hecho a un problema de mezcla varietal. Sin embargo, después de realizar la comparación de las papas blancas y rosadas a nivel del ADN, ambas resultaron genéticamente idénticas. Entonces, la causa del cambio de color no fue genético sino probablemente se trató de un fenómeno epigenético. Si no se hubiese tenido la posibilidad de realizar análisis moleculares, probablemente se hubiese concluido que se trataba de un problema de mezcla varietal (Rojas-Beltrán *et al.*, 2007).



a)



b)

Figura 2. a) Semillas de papa con diferentes colores probablemente debido a una mezcla varietal. **b)** Ejemplo de perfil genético de las semillas blancas (B1, B2 y B3) y de las semillas rojas (R1, R2 y R3) utilizando el marcador microsatélite STPoAC58. Los perfiles genéticos, utilizando 15 marcadores microsatélites, revelaron perfiles genéticos similares entre las semillas rojas y blancas.

La Figura 3 muestra los resultados de relacionamiento genético entre variedades de quinua y maní, utilizando marcadores moleculares de tipo microsatélites. Estos estudios son necesarios para establecer parámetros de comparación a

fin de determinar a qué variedad pertenece la semilla o la pureza varietal de la semilla (Rojas-Beltrán *et al.*, 2003; Rojas-Beltrán, 2005; Rojas-Beltrán *et al.*, 2007).

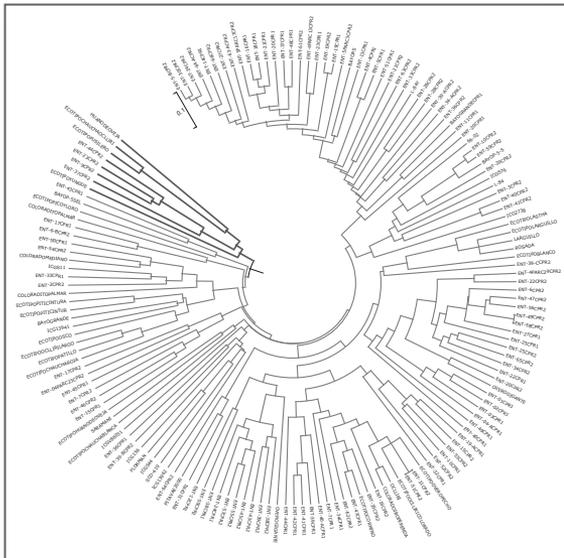
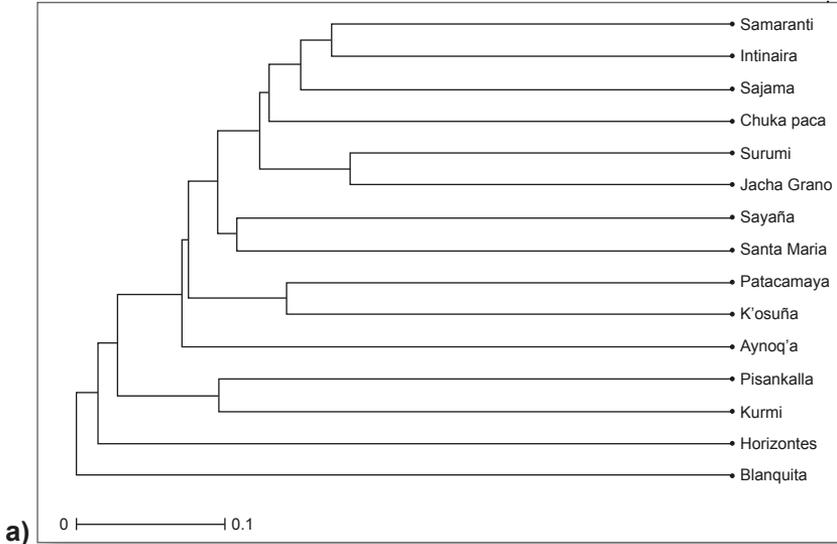


Figura 3.

a) Dendrograma generado luego de un análisis molecular con 10 marcadores moleculares de tipo microsatélites, en 15 variedades de quinua.

b) Dendrograma generado luego de hacer análisis molecular utilizando 21 marcadores moleculares de tipo microsatélites, en 156 variedades de maní. Las distancias genéticas fueron calculadas utilizando el *Coefficiente de Similitud de Jaccard* (1901).

2. Tecnología de la Evaluación Molecular

Consiste en determinar las características de interés agronómico y económico, presentes en una variedad a nivel del

ADN. Esta tecnología frecuentemente se sirve de la tecnología de los marcadores moleculares. En la evaluación de la calidad de la semilla, esta tecnología es muy útil para evaluar la variedad desde el punto de vista del lugar en que

se cultivará, el uso que se le dará, la identificación de la variedad, la determinación de la pureza varietal y la calidad sanitaria de la semilla.

Por ejemplo, en la actualidad existe un conjunto de marcadores moleculares que permiten evaluar la calidad panadera del trigo (Cakir *et al.*, 2008, Izadi-Darbandi y Yazdi-Samadi, 2012). Entre las características que permiten evaluar estos marcadores, están la dureza del grano, la elasticidad de la masa, la calidad panadera de las proteínas, el color de la harina, etc.

El número de marcadores que permite evaluar la calidad de una variedad aumenta año tras año, esto hecho permite predecir que la evaluación sea cada vez más molecular que fenotípica o bioquímica.

También existen marcadores en algunas especies que permiten evaluar si una variedad es tolerante a la sequía, al frío, a plagas y/o enfermedades.

Por ejemplo, la Figura 4 muestra el resultado de un análisis realizado en distintas variedades de papa para evaluar su resistencia a *Globodera rostochiensis*.

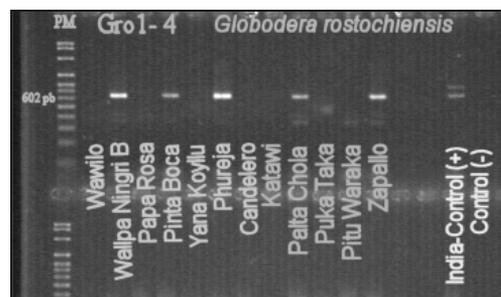


Figura 4. Identificación del marcador Gro1-4, localizado en el cromosoma VII, que confiere resistencia a *Globodera rostochiensis* (PM: peso molecular).

Asimismo, los marcadores moleculares permiten determinar, con mucha precisión, la presencia de semillas transgénicas.

La Figura 5 muestra el resultado de una evaluación que se hizo de semillas de maíz, probablemente transgénicas, que ingresaron a Bolivia. El resultado obtenido muestra sin ambigüedad que las semillas son transgénicas.

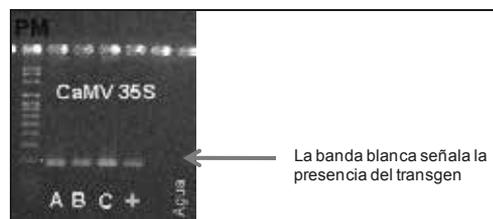


Figura 5. Detección del promotor CaMV 35S en semillas de maíz. PM: peso molecular, A: Repetición 1, B: Repetición 2, C: Repetición 3, +: Control positivo -maíz bt-, -: Control negativo (maíz no transgénico) y control negativo de reacción (agua).

3. Tecnología de las Micromatrices

Una micromatriz de ADN (del inglés DNA *microarray*) es una superficie sólida a la cual se fija una colección de fragmentos de ADN.

Las superficies empleadas para fijar el ADN pueden ser de vidrio, silicio, etc. Los chips de ADN se usan para analizar la expresión diferencial de genes y la presencia de algún genoma particular en la muestra. La cantidad de fragmentos de ADN que se pueden fijar sobre una micromatriz (un centímetro cuadrado o un poco más) puede ser hasta 250.000 (Miller y Tang, 2009 y referencias citadas).

De acuerdo a las posibilidades tecnológicas antes mencionadas, fácilmente se podría fijar en una micromatriz una representación del genoma de todos los virus y sus variantes que atacan a una especie, incluso bacterias y hongos. Entonces, el gran aporte de esta tecno-

logía, es que permite realizar muchos análisis de una sola vez.

De manera general, la Figura 6 describe esta tecnología.

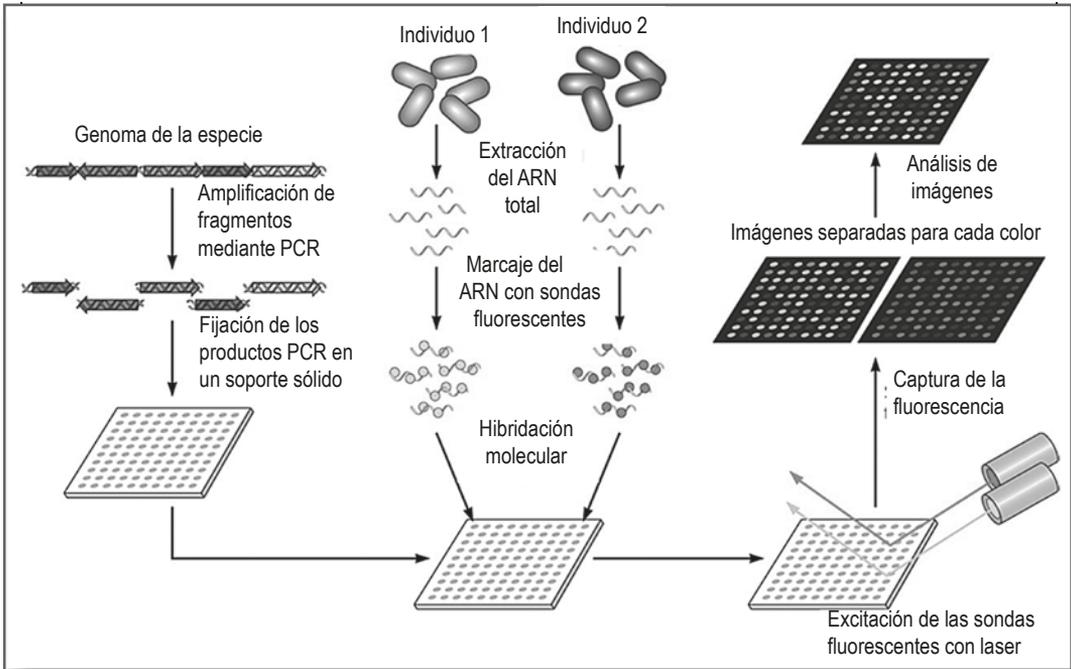


Figura 6. Pasos para realizar un análisis utilizando la tecnología de las micromatrices (adaptado de Ehrenreich, 2006).

4. Tecnología de la Metagenómica

La Metagenómica es el estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno (metagenoma), directamente a partir de muestras de ese ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar las especies presentes.

Se extrae el ADN de forma global, luego éste es fragmentado y clonado en vectores. Posteriormente, se secuencian todos los fragmentos clonados, utilizando secuenciadores de nueva generación (Illumina, Ion torrent semiconductor,

etc.) Los fragmentos secuencias son comparados con fragmentos existentes en bases de datos, a fin de identificar a que especie o cepa pertenecen (Figura 7).

Esta tecnología es revolucionaria porque tiene un alto rendimiento y bajo costo, y permite identificar microorganismos con mucha precisión sin verlos ni cultivarlos.

Esta tecnología es muy útil para evaluar la calidad sanitaria de las semillas en un solo análisis.



Figura 7. Proceso para estudiar genomas de forma global mediante la tecnología de la Metagenómica (adaptado de Handelsman, 2004).

5. Tecnología del Diagnóstico Molecular

La tecnología del diagnóstico molecular permite detectar enfermedades y plagas analizando el genoma de los individuos.

Esta tecnología utiliza otras tecnologías para este fin, como la tecnología de los marcadores moleculares, la tecnología de la metagenómica, las micromatrices y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta tecnología tiene muchas ventajas con relación a las técnicas tradicionales de diagnóstico. Por ejemplo, tienen una mayor sensibilidad, mayor especificidad, mayor rapidez, posibilidad de ana-

lizar muchos patógenos a la vez, posibilidades de automatización, etc.

Perspectivas actuales

- En la actualidad ya se utilizan varias tecnologías derivadas de la Biología Molecular para evaluar la calidad de las semillas, debido a las numerosas ventajas que ofrecen con relación a los métodos tradicionales de evaluación. Si bien estos métodos actuales se utilizan básicamente para evaluar la calidad genética y sanitaria, es predecible que en el futuro también permitan evaluar otras categorías, como la calidad fisiológica y la calidad de almacenaje.

- En vista de que los análisis se realizan utilizando básicamente el ADN o el ARN, también es predecible que en el futuro, se evalúen una gran cantidad de parámetros genéticos, fisiológicos, sanitarios y de almacenamiento, en un solo análisis.
- El *Centro de Biotecnología y Nanotecnología Agropecuario y Forestal* de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Forestales de la UMSS, está implementado las diferentes tecnologías derivadas de la Biología Molecular, para evaluar la calidad de las semillas. En un futuro próximo, este Centro de investigación ofrecerá servicios de evaluación de la calidad de las semillas a nivel molecular.

Referencias citadas

- Cakir, M., Drake-Brockman, F., Ma, J., Jose, K., Connor, M., Naughton, J., Busanich, J., Naisbitt, M., Shankar, M., McLean, R., Barclay, I., Wilson, R., Moore, C., Loughman. 2008. Applications and challenges of marker-assisted selection in the Western Australian Wheat Breeding Program. The 11th International Wheat Genetics Symposium proceedings, Appels R, Eastwood R, Lagudah E, Langridge P, Mackay Lynne M. Sydney University. Press.
- Coles, N., Coleman, C., Christensen, S., Jellen, E., Stevens, M., Bonifacio, A., Rojas-Beltrán, J., Fairbanks, D., Maughan, P. 2005. Development and use of an expressed sequenced tag library in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) for the discovery of single nucleotide polymorphisms. *Plant Science* 168:439–447.
- Ehrenreich, A. 2006. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73(2):255-273.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(4):669-685.
- Izadi-Darbandi, A., Yazdi-Samadi, B. 2012. Marker-assisted selection of high molecular weight glutenin alleles related to bread-making quality in Iranian common wheat (*Triticum aestivum* L.) *J. Genet.* 91(2):193-198.
- Jaccard P, (1901) Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. Numero 37, Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles, 547–579.
- Maughan, P., Smith, S., Rojas-Beltrán, J., Elzinga, D., Raney, J., Jellen, E., Bonifacio, A., Udall, J., Fairbanks, D. 2012. Single nucleotide polymorphisms identification, characterization and linkage mapping in *Chenopodium quinoa*. *The Plant Genome.* 5(3):1-7.
- Miller, M., Tang, Y. 2009. Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(4) 611-633.
- Pérez-García, F., Pita-Villamil, J. 2001. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (eds). Hojas divulgativas. La Paz, Bolivia.
- Rojas-Beltrán, J. 2007. Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de las plantas (2007). Daniel Dania Ed. Instituto Autónomo de Investigaciones Agrarias (INIAP-Ecuador) y Universidad de Wageningen (Holanda). 203 p.
- Rojas-Beltrán, J., Bonifacio, A., Maughan, J., Jellen, E., Stevens, M., Coleman, C., Fairbanks, D. 2003. Avances en el estudio de la diversidad genética de la colección boliviana de quinua utilizando marcadores de tipo microsatélites. Informe Compendio (2002-2003) Fundación PROINPA. pp. 84-89.
- Rojas-Beltrán, J. 2005. Mejoramiento genético asistido por técnicas modernas para el desarrollo competitivo de la

cadena de la quinua: Técnicas derivadas de la Biología Molecular I. Ministerio de Desarrollo Rural, Agropecuario y Medio Ambiente. 8 p.

Rojas-Beltrán, J., Bonifacio, A., Maugham, J. 2007. Mejoramiento genético asistido por técnicas modernas para el desarrollo competitivo de la cadena de la quinua: técnicas derivadas de la Biología Molecular II. Ministerio de Desa-

rollo Rural, Agropecuario y Medio Ambiente. 16 p.

Rojas, J., Sánchez, Y., Alba, E., Cadima, X., Franco, J., Gandarillas, A. 2007. Utilización de la tecnología de los marcadores moleculares en la conservación del germoplasma y mejoramiento genético de la papa: Experiencias en Bolivia. Revista de Agricultura 40(59):29-36.

Trabajo recibido el 26 de julio de 2015 - Trabajo aceptado el 3 de agosto de 2015

Libros destacados de reciente publicación:



Autores:

Carola Antezana;
Magaly Mercado;
Susana Arrázola;
Miltón Fernández;
Bertha Soto y
Olga Ruiz

Fecha de publicación: Diciembre de 2014

Mayores referencias: Centro de Biodiversidad y Genética FCyT-UMSS
susana_arrazola@yahoo.com

Descripción general: Documento con información descriptiva y gráfica, de más de 140 especies de 47 familias botánicas, presentes y predominantes en bosques de kewiña en el departamento de Cochabamba. Además contiene un glosario de términos técnicos en áreas de botánica y un capítulo descriptivo de las áreas donde predomina la kewiña.